



Institut des Sciences  
Vétérinaires- Blida

Université Saad  
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du  
**Diplôme de Docteur Vétérinaire**

**L'effet antibactérien des huiles essentielles du *citrus limon* et  
*lavandula strikas* sur des bactéries d'origine animale**

Présenté par  
**MERIEM DJEGHBOUB**

Soutenu le 24 Juin 2019

Devant le jury :

<b>Président(e) :</b>	ADEL D.	MCB	(I.S.V.B)
<b>Examineur :</b>	HADJ OMAR K.	MCB	(I.S.V.B)
<b>Promoteur :</b>	SAHRAOUI N.	Professeur	(I.S.V.B)
<b>Co-promoteur :</b>	DJEGHBOUB S.	Ingénieur	(I.S.V.B)

**Année :** 2018-2019

# Résumé

Abritant une grande diversité bactérienne, entre bactéries commensales, opportunistes et pathogènes, l'animal fait face à une multitude forme d'agression et leur fréquence augmente considérablement en raison de l'usage extensif des agents antimicrobiens dans la médication humaine et dans les élevages animaux ce qui conduit à la sélection des souches résistantes. En revanche, les huiles essentielles et leurs constituants se sont révélés comme des agents antimicrobiens très efficaces.

Les huiles essentielles suscitent de plus en plus l'intérêt de la médecine que se soit humaine ou vétérinaire en raison de leur utilisation dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour laquelle les antibiotiques deviennent de moins en moins actifs.

Notre étude a été réalisée sur 30 souches bactériennes d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* fournis par le laboratoire de biotechnologie et de la reproduction animale (LBRA) de l'institut des sciences vétérinaire de Blida, et des souches de référence.

La sensibilité de ces souches a été testée in vitro vis-à-vis de deux huiles essentielles ( citron et lavande ) ainsi que leurs association par la technique d'aromatogramme qu'on a réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'institut, les souches de référence ont été aussi testées par la même technique .

Nos résultats montrent que 40% des souches d'*Escherichia coli* étaient sensibles à l'huile essentielle du citron,80% étaient extrêmement sensible vis-à-vis de celle de lavande et 53,33% étaient extrêmement sensibles pour le mélange et tout ces résultats étaient obtenus en utilisant 100µl .

Quand à *Staphylococcus aureus*, 100% de souches testéesétaient extrêmement sensibles à ces deux huiles essentielles ainsi qu'à leur mélange.

Les huiles essentielles ainsi que leur association avaient un effet bactéricide sur les souches de *Staphylococcus aureus* testées. En revanche, l'huile essentielle de la lavande et le mélange avaient un effet bactéricide et le citron avait un effet bactériostatique sur les souches d'*Escherichia coli* .

**Mot clés :** Huiles essentielles, Aromatogramme, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

# Abstract

Sheltering a great bacterial diversity, between bacteria commensales, opportunist and pathogenic, the animal faces a multitude forms aggression and their frequency increases considerably because of the extensive use of the antimicrobial agents in human medication and the animal breedings what leads to the selection of the resistant stocks. On the other hand, essential oils and their components appeared like very effective antimicrobial agents.

Essential oils arouse the interest of medicine more and more that is human or veterinary surgeon because of their use in the treatment of certain infectious illness for which the antibiotics become less and less active.

Our study was carried out on 30 bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* provided by the laboratory of biotechnology and the animal reproduction (LBRA) of the veterinary institute of sciences of Blida, and the stocks of reference.

The sensitivity of these stocks was tested in vitro with respect to two essential oils (lemon-yellow and lavender) as their association by the technique of aromagramme which one carried out on the level of the teaching laboratory of microbiology of the institute, the stocks of reference were also tested consequently technical.

Our results show that 40% of the stocks of *Escherichia coli* were sensitive to the essential oil of lemon, 80% were extremely sensitive with respect to that of lavender and 53,33% were extremely sensitive for the mixture and all these results were obtained by using 100µl.

When in *Staphylococcus aureus*, 100% of stocks testéesétaient extremely sensitive to these two oils essential like with their mixture.

Essential oils as their association had a bactericidal effect on the aureustestées stocks of *Staphylococcus*. On the other hand, the essential oil of the lavender and the mixture had a bactericidal effect and the lemon had an effect bacteriostatic on the stocks of *Escherichia coli*.

Key word: Essential oils, LBRA, Aromagramme, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

# ملخص

مع تنوع البكتيريا العالية، و البكتيريا التناسلية و الانتهازية المسببة للأمراض؛ يواجه الحيوان العديد من أشكال العدوان ويزداد تواترها بشكل كبير بسبب الاستخدام المكثف للعوامل المضادة للميكروبات في الأدوية البشرية و تربية الحيوانات. مما يؤدي إلى اختيار سلالات مقاومة من ناحية أخرى، أثبتت الزيوت الأساسية ومكوناتها أنها عوامل فعالة للغاية لمضادات الميكروبات.

جذب الزيوت العطرية اهتمام الدواء بشكل متزايد سواء كان إنسانياً أو بيطرياً نظراً لاستخدامها في علاج بعضاً لأمراض المعدة التي تصبح المضادات الحيوية أقل نشاطاً فيها.

أجريت دراستنا على 30 سلالة بكتيرية من الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية التي يوفرها مختبر التكنولوجيا الحيوية و استنساخ الحيوانات (LBRA) من معهد العلوم البيطرية في البلدة، والسلالات المرجعية. تم اختبار حساسية هذه السلالات في المختبر فيما يتعلق بزيتين أساسيتين (الليمون والخزامى) وارتباطهما بتقنية العلاج العطري التي أجريت في مختبر علم الأحياء الدقيقة بالمعهد. كم اتتم اختبار السلالات المرجعية بنفس الطريقة. أظهرت نتائجنا أن 40٪ من سلالات الإشريكية القولونية كانت حساسة للزيت أساسياً للليمون، 80٪ كانت حساسة للغاية للخزامى و 53.33٪ كانت حساسة للغاية للخليط وجميعها تم الحصول على النتائج باستخدام 100µl عند استخدام المكورات العنقودية الذهبية، كانت 100٪ من السلالات التي تم اختبارها حساسة للغاية لهاتين الزيوت الأساسية وكذا لك لخليطهما.

كان للزيوت الأساسية ومزيجها تأثير مبيد للجراثيم على سلالات المكورات العنقودية الذهبية التي تم اختبارها. في المقابل، كان لزيوت اللافندر والخلطة تأثير مبيد للجراثيم وكان للليمون تأثير مضاد للجراثيم على سلالات الإشريكية القولونية.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية ، Aromatogram ، الإشريكية القولونية ، المكورات العنقودية الذهبية.

## Sommaire

	<b>Page</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Les huiles essentielles</b>	
<b>I-1-Définition .....</b>	<b>2</b>
<b>I-2-Répartition et localisation des huiles essentielles.....</b>	<b>2</b>
<b>I-3- Caractéristique physique.....</b>	<b>2</b>
<b>I-4-Composition chimique.....</b>	<b>2</b>
<b>I-5-Méthodes d'extraction.....</b>	<b>3</b>
<b>I-5-1- Distillation et entrainement à la vapeur.....</b>	<b>3</b>
<b>I-5-2- Hydrodistillation.....</b>	<b>4</b>
<b>I-5-3- Extraction par solvants volatils.....</b>	<b>4</b>
<b>I-5-4- Extraction par enfleurage.....</b>	<b>5</b>
<b>I-6-Méthodes d'analyse.....</b>	<b>5</b>
<b>I-6-1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....</b>	<b>5</b>
<b>I-6-2- Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) .....</b>	<b>6</b>
<b>I-6-3- Acquisition et traitement des données .....</b>	<b>7</b>
<b>I-7-Domains d'utilisation des huiles essentielles.....</b>	<b>7</b>
<b>I-7-1- En pharmacie.....</b>	<b>7</b>
<b>I-7-2- En cosmétologie.....</b>	<b>8</b>
<b>I-7-3- En industries agroalimentaires.....</b>	<b>8</b>
<b>I-7-4- En agriculture.....</b>	<b>8</b>
<b>I-8-Conservation des huiles essentielles.....</b>	<b>8</b>
<b>I-9-Toxicité et précautions d'emploi des huiles essentielles.....</b>	<b>9</b>
<b>I-10-L'huile de citron et de lavande .....</b>	<b>10</b>
<b>I-10-1-Citronnier.....</b>	<b>10</b>

<b>I-10-2-Lavandula.....</b>	<b>11</b>
<b>Chapitre II : Escherichia coli et Staphylococcus aureus</b>	
<b>II-1-Escherichia .coli .....</b>	<b>13</b>
<b>II-1-1-Historique.....</b>	<b>13</b>
<b>II- 1-2-Présentation d'<i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>II-1-3- Taxonomie.....</b>	<b>13</b>
<b>II-1-4-Caractéristiques .....</b>	<b>14</b>
<b>II-1-4-1-Caractéristiques morphologiques et culturaux .....</b>	<b>14</b>
<b>II-1-4-2-Caractéristiques biochimiques.....</b>	<b>14</b>
<b>II-1-4-3-Caractéristiques antigéniques.....</b>	<b>14</b>
<b>II-1-5-Génome.....</b>	<b>15</b>
<b>II-1-6-Habitat et stratégies de l'infectieux .....</b>	<b>15</b>
<b>II-1-7-Mode de transmission.....</b>	<b>16</b>
<b>II-1-7-1-Transmission alimentaire.....</b>	<b>16</b>
<b>II-1-7-2- Transmission par le contact direct avec les animaux de ferme et leur environnement .....</b>	<b>16</b>
<b>II-1-8-Pouvoirs pathogène .....</b>	<b>17</b>
<b>II-1-8-1-Les facteurs de virulence .....</b>	<b>17</b>
<b>II-2-Staphylococcus aureus .....</b>	<b>19</b>
<b>II-2-1-Historique .....</b>	<b>19</b>
<b>II-2-2-Position taxonomique.....</b>	<b>19</b>
<b>II-2-3-Caractères généraux .....</b>	<b>21</b>
<b>II-2-3-1-Caractères morphologique .....</b>	<b>21</b>
<b>II-2-3-2- Caractères biochimiques et physiologiques .....</b>	<b>22</b>
<b>II-2-3-3- Caractères culturaux.....</b>	<b>23</b>
<b>II-2-4- Habitat et mode de transmission.....</b>	<b>23</b>
<b>II-2-5-Classification physiologique .....</b>	<b>24</b>

<b>II-2-6-Espèce touchée .....</b>	<b>24</b>
<b>II-2-6-1- Agent infectieux .....</b>	<b>24</b>
<b>II-2-7-Clinique/pathologie.....</b>	<b>25</b>
<b>II-2-8-Epidémiologie.....</b>	<b>25</b>
<b>Partie pratique</b>	
<b>I-Matériel et méthodes .....</b>	<b>26</b>
<b>I-1- Matériel .....</b>	<b>26</b>
<b>I-1-1-Matériel biologique .....</b>	<b>26</b>
<b>I-2- Matériel non biologique .....</b>	<b>29</b>
<b>II-Méthodes .....</b>	<b>29</b>
<b>II-Résultats et discussion .....</b>	<b>36</b>
<b>II-1-Résultats de l'aromatogramme.....</b>	<b>36</b>
<b>II-1-1 Diamètres des zones d'inhibition .....</b>	<b>36</b>
<b>II-1-2- Etudes de l'efficacité des HE sur les 30 souches étudiées .....</b>	<b>39</b>
<b>II-1-3-Etude de la sensibilité des souches de prélèvement .....</b>	<b>46</b>
<b>II-1-4-Comparaison entre les moyennes des différents tests et les diamètres de la souche de référence .....</b>	<b>50</b>
<b>II-2-Effet antibactérien .....</b>	<b>51</b>
<b>II-3-Résultat de test de contrôle.....</b>	<b>52</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>53</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>55</b>



## Liste des tableaux

	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b> : Caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i> .....	14
<b>Tableau II</b> : Caractères différentiels des principales espèces de Staphylocoques .....	20
<b>Tableau III</b> : Principaux caractères des staphylocoques .....	21
<b>Tableau IV</b> : . Equipement de base d'un laboratoire de microbiologique.....	29
<b>Tableau V</b> : tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition des souches de <i>E. coli</i> .....	37
<b>Tableau VI</b> : tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition des souches de <i>S. aureus</i> .....	38
<b>Tableau VII</b> : distribution des souches de prélèvement d' <i>E. coli</i> étudiées selon le type d'effet exercé par les HE.....	40
<b>Tableau VIII</b> : distribution des souches de prélèvement de <i>S. aureus</i> étudiées selon le type d'effet exercé par l'HE .....	43
<b>Tableau IX</b> : Fréquences des souches de prélèvement d' <i>Escherichia coli</i> selon leur sensibilité aux HE.....	46
<b>Tableau X</b> : Fréquences des souches de prélèvement de <i>S. aureus</i> selon leur sensibilité aux HE.....	48
<b>Tableau XI</b> : Comparaison entre les 15 souches de prélèvement d' <i>E.coli</i> et la souche de référence.....	50
<b>Tableau XII</b> : Comparaison entre les 15 souches de prélèvement de <i>S.aureus</i> et la souche de référence.....	50

## Liste des figures

	Page
<b>Figure 1:</b> Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile .....	4
<b>Figure 2 :</b> morphologie de citrus.....	11
<b>Figure 3 :</b> Morphologie de <i>Lavandula</i> .....	12
<b>Figure 4:</b> Couques de <i>Staphylococcus aureus</i> disposée en grappes de raisins .....	19
<b>Figure 5:</b> HE utilisées.....	26
<b>Figure 6 :</b> photos originales des souches d' <i>E.coli</i> utilisées .....	27
<b>Figure 7:</b> photos originales des souches de <i>S.aureus</i> utilisées .....	28
<b>Figure 8:</b> Préparation du milieu de culture .....	30
<b>Figure 9 :</b> Repiquage des souches .....	31
<b>Figure 10 :</b> préparation de la suspension bactérienne .....	31
<b>Figure 11 :</b> Ensemencement dans la gélose MH .....	32
<b>Figure 12:</b> Application des disques .....	33
<b>Figure 13 :</b> incubation .....	33
<b>Figure 14 :</b> Illustration de la technique d'aromatogramme utilisée .....	34
<b>Figure 15 :</b> la lecture après incubation .....	34
<b>Figure 16 :</b> photos originales des diamètres d'inhibition des souches de <i>E. coli</i> traitées par les HE .....	36
<b>Figure 17:</b> Effet de l'HE du citron sur les souches d' <i>E.coli</i> testées .....	40
<b>Figure 18 :</b> Effet de l'HE de lavande sur les souches d' <i>E.coli</i> testées .....	41
<b>Figure 19</b> Effet de l'association des deux HE sur les souches d' <i>E.coli</i> testées:.....	42
<b>Figure 20 :</b> Effet de l'HE du citron sur les souches de <i>S.aureus</i> testées .....	44

<b>Figure 21</b> : Effet de l'HE de lavande sur les souches de <i>S.aureus</i> testées.....	45
<b>Figure 22</b> : Effet de l'association des deux HE sur les souches de <i>S.aureus</i> testées.....	45
<b>Figure 23</b> : Répartition des souches d' <i>E.coli</i> selon leur sensibilité aux HE .....	47
<b>Figure 24</b> : Répartition des souches de <i>S .aureus</i> selon leur sensibilité aux HE .....	49
<b>Figure 25</b> : .. photos originales d'un résultat de l'effet antibactérien des deux HE et le mélange sur les <i>E.coli</i> .....	51
<b>Figure 26</b> : résultat de l'effet antibactérien des deux HE et le mélange sur les <i>S.aureus</i> .....	52

## Liste des abréviations

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**Cit-lavan** : Citron-lavande

**Gélose MH**: Gélose Muller-Hinton

**HE** : Huile Essentielle

**LBRA** : laboratoire de biotechnologie et de la reproduction animale

**CLHP** : chromatographie en phase liquide à haute performance

**Ir** : indice de rétention

**SM** : spectrométrie de masse

**CPG** : chromatographie en phase gaz

**RMN** : résonance magnétique nucléaire

## Glossaire

**Antibiogramme** : C'est une méthode de travail microbiologique, utilisant un milieu gélosé spécifique en boîte de Pétri et des disques imprégnés d'antibiotiques à des concentrations déterminées. Cette méthode permet d'évaluer la sensibilité d'une bactérie pathogène vis-à-vis d'antibiotiques choisis en fonction des indications fournies et de la prévalence de la résistance acquise (**Delarras, 2007**)

**Aromathérapie** : Le mot « aromathérapie » est un néologisme créé dans les années 1930 par le chimiste René Maurice Gattefossé qui vient du latin *aroma*, aromate et du grec *therapeia*, traitement. Thérapeutique par les HE végétales, utilisées par voie interne ou externe, sous forme de teinture, d'extrait aromatique, d'infusion etc... (**Garnier, et al., 2009**).

**Infection** : Ensemble de perturbation au sein d'un organisme postérieures au franchissement des moyens mécaniques (peau, muqueuse) et physiologiques de défense par une population de microorganismes, la porte d'entrée est variable (piqueure, blessure, opération, lésion.etc) (**Bugnicourt, 1995**).

**Inoculum** : Terme utilisé en microbiologie pour désigner la quantité de germes introduite dans un milieu de culture ou inoculée à un animal de laboratoire (**Kernbaum , 2008**).

## Introduction

A la fin du XIX<sup>e</sup> et au début du XX<sup>e</sup> siècle, plusieurs travaux scientifiques relataient de l'action antiseptique de plusieurs alternatives aux antibiotiques (**Chamberland M et al., 1887**). Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles (HE) s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses (**De Billerbeck et al., 2002**).

En effet, de nombreuses bactéries sont devenues résistantes aux antibiotiques à large spectre de l'arsenal pharmaceutique (**OMS 2005**). Parmi ces bactéries, nous pouvons citer les *Escherichia coli* et les *Staphylococcus aureus* qui peuvent causer des différentes maladies infectieuses.

Il s'avère donc nécessaire de chercher une autre opportunité qui prendra la relève dans les traitements anti-infectieux.

Parmi les alternatives, les HE sont de plus en plus utilisées comme antibiotiques naturels. En réalité il s'agit plus d'antiseptiques car, contrairement aux antibiotiques, elles ne détruisent pas la flore bénéfique. N'ayant pas non plus les effets indésirables causés par les antibiotiques, évidemment elles tuent effectivement des bactéries sans favoriser l'acquisition de la résistance (**Ali et al., 2005**).

L'étude des HE est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Depuis des millénaires, l'homme se parfume et parfume son environnement en ayant recours à des HE et apprécie leurs vertus apaisantes et analgésiques. Les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des HE. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées et plus efficaces. L'usage des HE en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables.

Les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. En effet, avec les progrès de la science d'analyse, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des HE d'authentiques médicaments. De nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques (**Chikhi Ilyas 2013**).

### **I-1-Définition**

Une huile essentielle appelée aussi essence est un mélange de substances aromatiques volatiles peu complexe issue et produit par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytopathogènes (**Lahlou, 2004**).

L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. La matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contusée ou pulvérisée, à l'exception des fruits du genre citrus qui sont toujours traités à l'état frais (**Ollier, 2011**).

### **I-2-Répartition et localisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles peuvent être présentes dans différents organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines des rhizomes, fruits et graines (**Bruneton, 1999**).

### **I-3-Caractéristiques physiques des huiles essentielles**

Les HE possèdent en commun un certains nombres de propriétés physiques (**Bardeau, 1976 ; Legrand, 1978 ; Lemberg, 1982 ; Bruneton, 1999**) :

- Elles sont solubles dans : l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la pluparts des solvants organiques.
- La densité est généralement inférieure à celle de l'eau.
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation.
- Elles sont liquides à température ambiante.
- Elles sont incolores ou de couleur jaune pale.
- Elles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes (**Roux et Catier, 2007**).

### **I-4-Composition chimique**

La composition des huiles essentielles est très complexe, ce sont des mélanges fortement variables et analysables, ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par les origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés

aromatiques dérivés du phenylpropane, elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (**Benayad, 2008 ; Guinoisseau, 2010**).

D'après la littérature plus de 30 000 terpènes sont connus jusqu'à présent. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (2-méthyl-1,3-butadiène : C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>), ou par couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>), soit deux unités pour les monoterpènes (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) et trois unités concernant les sesquiterpènes (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>). Exceptionnellement, quelques diterpènes (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (**Vila et Coll., 2002 ; Newman, 1972 ; Pridham, 1967**).

En général, une huile essentielle est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures (**Rhayour, 2002**). La structure varie en fonction du (**Pibiri, 2006**) :

- nombre d'atomes de carbone qui la constitue,
- caractère saturé ou insaturé des liaisons, et leur agencement : linéaire ou cyclique,
- la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...),
- la nature des groupes fonctionnels : terpènes, alcools terpéniques, cétones, phénols.

### **I-5-Méthodes d'extraction**

Il existe plusieurs méthodes :

#### **I-5-1- Distillation et entrainement à la vapeur**

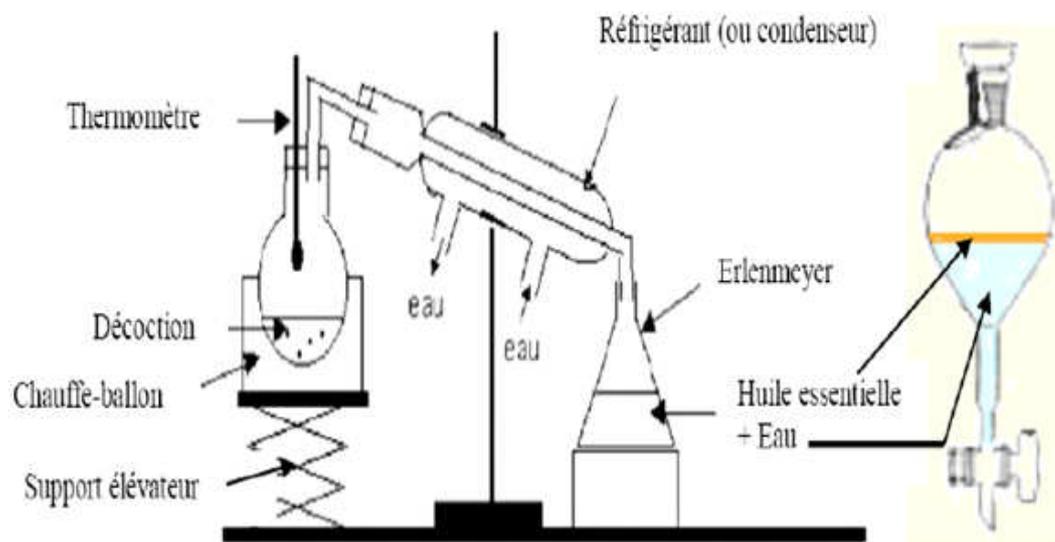
C'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des essences (**Bego, 2001**). Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, son principe réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « Vapeur d'eau- huile essentielle » dispersé dans la matière végétale (**Lucchesi, 2005**). Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation, le produit de la distillation

se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (**Belaiche, 1979 ; Benjilali, 2004**).

### I-5-2- Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode qui se définit pour l'extraction des huiles essentielles

(**Lucchesi, 2005**). Selon **Bruneton (1999)**, l'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à l'ébullition, les vapeurs hétérogènes condensées sur une surface froide se transforment à l'état liquide, le mélange l'huile- eau se sépare par différence de densité. Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants (**Haekel et Omar, 1993**). (**Figure1**)



**Figure1 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Lagunez, 2006).**

### I-5-3- Extraction par solvants volatils

C'est une méthode qui est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Dans ce procédé un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé « concrète ». Le

traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à « l'absolu » (**Belaiche, 1979 ; Duraffourd et al., 1990**). Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité, inertie chimique, température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale et pas trop faible pour éviter les pertes, sécurité de manipulation c'est-à-dire non toxique ou inflammable (**Bruneton, 1999**).

#### **I-5-4- Extraction par enfleurage**

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras, elle consiste à déposer des plantes en particulier les organes fragiles (pétale des roses) sur une couche mince de graisse. Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures à 72 heures. Les pétales sont éliminés et remplacés par des pétales frais jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (**Belaiche, 1979 ; France-Ida, 1996**).

#### **I-6-Méthodes d'analyse**

A cause de l'importance des huiles essentielles dans le marché des cosmétiques et des parfums, les besoins de l'industrie de luxe ont conduit les chimistes à analyser les composants de diverses huiles essentielles qui sont des produits de base pour la fabrication de matières premières odorantes. Le développement de la technique dans le monde industriel, ainsi que les exigences d'une législation de plus en plus complexe et sévère quant à la qualité et à la limitation des nuisances des produits industriels, confrontent le chimiste au double problème toujours croissant de la demande d'analyse et de leur complexité (**Laverdière et al., 1999**).

##### **I-6-1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées. La diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces. Comme toutes les méthodes chromatographiques, la CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**).

Dans une CPG, la séparation des composés est réalisée de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. La CPG permet l'individualisation et quantification des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Barboni, 2006**).

#### **I-6-2- Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) :**

L'identification des composés volatils caractéristiques des plantes aromatique nécessite l'utilisation de méthodes dites couplées. Les extraits à étudier sont généralement tellement complexes que la simple utilisation des temps ou indices de rétention chromatographiques ne permet pas d'identifier certains des composés détectés.

Les méthodes couplées permettent d'associer la capacité séparative des méthodes chromatographiques (CPG, CLHP) au pouvoir de caractérisation des méthodes spectroscopique et spectrométrique (IR, RMN, SM). Ainsi, le couplage CPG/SM est devenu incontournable pour les laboratoires de recherche et contrôle qui étudient les huiles essentielles (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**). Le couplage CPG/SM impose peu de contraintes techniques. Seul l'hélium peut être utilisé comme gaz vecteur car les ions He<sup>+</sup> formés lors de l'ionisation électronique n'interfèrent pas avec ceux de l'analyse en raison de leur faible rapport m/z. Tous les types d'injecteurs sont utilisables et les appareils actuels utilisent exclusivement des colonnes capillaires.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CPG/SM) est la première association réussie d'une méthode chromatographique à la spectrométrie de masse. Mis au point dès la fin des années 1950, il est régulièrement commercialisé depuis 1966. Ce couplage est totalement maîtrisé depuis 1980, le couplage CPG/SM est simple à mettre en oeuvre, et plusieurs appareils peuvent fonctionner simultanément sous la surveillance d'un seul responsable. Le domaine d'application des CPG/SM se confond avec celui de la CPG et tous les progrès récents de la CPG ont été transposés à la CPG/SM, notamment en termes de rapidité d'analyse.

En analyse qualitative, la CPG/SM produit en routine des spectres reproductibles, identifiables à ceux d'une bibliothèque, pour des quantités injectées de l'ordre de 10<sup>10</sup>g. En analyse quantitative, des dosages exacts et précis sont obtenus avec une très

grande dynamique de réponse, et des limites inférieures de détection parmi les plus basses de toutes les techniques d'analyse chimique, à condition de connaître et de disposer au préalable des molécules à quantifier, afin d'établir un étalonnage (Arpino, 2008).

### **I-6-3- Acquisition et traitement des données**

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatisants. La CPG sur colonne capillaire constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation en impact électronique. Un grand nombre de méthodes d'ionisation et d'analyseurs de masse sont utilisables.

La méthodologie d'analyse est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG/Ir et de la CPG/SM-IE. L'analyse s'organise en deux étapes, d'une part le calcul des Ir, polaires et apolaires, et la quantification des composés par CPG/Ir et, d'autre par l'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants correspondants (Paolini, 2005) (Figure 30).

Les fragmentations du chromatogramme sont minutieusement analysées, il faut avoir une meilleure concordance entre le spectre de masses (composé recherché et composé proposé) pour valider le choix d'une telle proposition. Quel que soit l'analyseur, le spectre final est comparé à ceux d'une bibliothèque, puis le résultat est donné sous forme de tableau où sont classées en ordre décroissant, les molécules dont les spectres ressemblent le plus à celui soumis à la recherche. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles.

## **I-7-Domains d'utilisation des huiles essentielles**

### **I-7-1- En pharmacie**

Le contenu des plantes en essence et la nature chimique des constituants leurs confèrent de grandes perspectives d'application, ces substances sont d'un grand intérêt pour le domaine médicale et pharmaceutique. En effet, les huiles essentielles ont un champ d'activité très large, elles inhibent la croissance des bactéries, et des

levures (**Duarte et al., 2005**) et également des moisissures (**Koba et al., 2004**), de plus elles sont très efficaces sur les microorganismes résistants aux antibiotiques.

- **Activité antibactérienne :**

les plantes n'ont pas un système immunitaire proprement dit qui peut identifier une infection spécifique, leurs propriétés antimicrobiennes sont généralement efficaces contre une large gamme de microorganisme, ces propriétés sont utiles pour les infections chez les humains (**Remmal, 1993 ; Chami, 2005 ; Caillet et al., 2009**).

- **Activité antifongique :**

le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes médicinales a été mis en évidence par de nombreux chercheurs contre les champignons pathogènes et opportunistes (**De Bellerbeck, 2002**).

### **I-7-2- En cosmétologie**

Le secteur d'hygiène et l'industrie des cosmétiques sont également des consommateurs, la majorité des produits cosmétiques contiennent une quantité de l'huile essentielle comme élément parfumant et aussi élément assurant une odeur agréable (**Bruneton, 1999**).

### **I-7-3- En industries agroalimentaires**

Les huiles essentielles sont de plus en plus utilisées dans la conservation des denrées alimentaires et cela grâce à leur activité antimicrobienne à large spectre sans pour autant en dénaturer le goût car ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires (**Kurita et Koike, 1982**).

### **I-7-4- En agriculture**

Les pesticides naturels basés, notamment, sur les huiles essentielles représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les adventices et les champignons (**Isman, 2000 ; Dayan et al., 2009**). Les huiles essentielles sont utilisées comme agent de lutte biologique dans plusieurs cas y compris le cas de niébé infectée par *Callosobruchus maculatus* (**Ilboudo, 2009**).

### **I-8-Conservation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des substances sensibles et très délicates, ce qui rend leur

conservation difficile et obligatoire dans le but de limiter les risques de dégradation, ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons opaques à l'abri de la chaleur et de la lumière (Valnet, 2000).

### **I-9-Toxicité et précaution d'emploi des huiles essentielles**

- **Toxicité :**

Ils procèdent de leur activité thérapeutique élevée à l'origine d'une toxicologie spécifique qui impose des règles d'utilisation précises des huiles essentielles. (Ollier, 2011). La toxicité des HE ne doit pas être sous-estimée en cas de mauvaise utilisation. Elle est directement liée à leur composition chimique : les risques dépendent des familles biochimiques auxquelles ces composés appartiennent et de leur concentration dans l'HE (Ollier, 2011).

- **Précaution d'emploi :**

L'aromathérapie n'est pas une thérapeutique anodine. Pour une utilisation sans risque des HE, des précautions d'emploi s'imposent :

-Utiliser des HE 100 % pures et naturelles, identifiées et conservées dans de bonnes conditions

-En cas d'allergie ou d'antécédent d'épilepsie, un avis médical est conseillé avant d'employer des HE

-Ne pas avaler les HE pures : elles peuvent brûler les muqueuses oropharyngées

-Ne pas appliquer d'HE pures dans le nez, le conduit auditif et sur les zones anogénitales mais toujours diluées à une concentration maximale de 10 %

-Ne jamais injecter d'HE par voie IV ou IM et ne jamais en mettre même diluées dans les yeux

-Bien se laver les mains après avoir touché une HE ou une préparation en contenant pour éviter un contact accidentel avec l'oeil.

En cas de contact avec l'oeil, rincer sous l'eau courante pendant 5 minutes puis appliquer un coton imprégné d'HV (huile d'amande douce)

-Ne jamais appliquer chez les enfants de moins de 6 ans d'HE de Menthe poivrée sur la peau (risque de spasme laryngé) ni chez l'adulte sur une grande surface car elle provoque une sensation glacée avec vasoconstriction

-Ne pas laisser les flacons d'HE à portée des enfants

-Respecter strictement les voies d'administration, les doses prescrites et les contre-indications propres à certaines HE.

**I-10- l'huile de citron et de lavande :**

**I-10-1- Citronnier**

Citronnier, arbre poussant sous les climats chauds, pouvant atteindre 7 mètres de haut, et de 3 jusqu'à 5 mètres de largeur, caractérisé par la persistance de son feuillage (Elsevier, 2016). ( **Figure 2**)

Noms communs : Citronnier, Limonier, Citron.

Nom scientifique : *Citrus limon*.

Parties utilisées : Feuilles, fruits, écorce et pépins.

Climat : Méditerranéen, semi-tropical, tempéré, supporte très bien la canicule mais craint la sécheresse

Sol : Léger, sableux, humus ou terreau

Description botanique :

Taxonomie :

- Domaine : Biota
- Règne : Plantae
- Sous règne : Viridaeplantae
- Classe : Equisetopsida
- Ordre : Sapindales
- Famille : Rutaceae
- Genre : Citrus
- Espèce : *Citrus limon*



**Figure2 : Morphologie de citrus (Nedjai Ibtissem et Salma , 2017)**

Propriétés médicinales :

Le citronnier est connu pour son utilisation contre plusieurs infections ou maladies infectieuses tels que la tuberculose pulmonaire et osseuse, les états fébriles, les ulcères d'estomac, l'insuffisance hépatique, les vomissements ainsi que le paludisme et il sert aussi à prévenir les épidémies. Pour cela, diverses formes d'applications sont possibles, on peut utiliser le jus de citron en cure, comme il est possible d'utiliser ses huiles essentielles (**Morigane**).

Parmi toutes les huiles essentielles, c'est celles du citron qui font l'objet de la plus grande production au niveau mondiale, en aromathérapie elle fait partie des huiles essentielles incontournables dans le conseil pharmaceutique (**Iserin, 2001**).

### **I-10-2-Lavandula**

Description botanique :

La lavande est un sous-arbrisseau vivace, caractérisé par ses feuilles linéaires et persistantes portant des épis au bout de ses tiges, sa hauteur peut atteindre 1 mètre, ses fleurs sont bilabiées bleues pourpre à violettes, elles représentent les parties les plus aromatiques de la plante (**Morigane**). (**Figure 3**)

Nom commun : Lavande, Lavande officinale, aspic, Lavandin.

Nom scientifique : *Lavandula angustifolia*.

Parties utilisées : Sommités fleuries.

Habitat et origine : Plante originaire des montagnes du bassin méditerranéen, aujourd'hui elle est cultivée à travers le monde, partout où elle peut trouver du soleil à profusion.

Taxonomie :

- Règne : Plantae
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Lavandula*
- Espèce : *Lavandula strikas*



**Figure 3 : Morphologie de *Lavandula* (Nedjai Ibtissem et Salma , 2017)**

Propriétés médicinales :

La lavande est utilisée contre plusieurs maladies, y compris, les spasmes, les insomnies, les maladies infectieuses, les affections des voies respiratoires (asthme, bronchite, tuberculose...). Pour cela, il est possible de l'utiliser sous forme d'infusion, ou d'utiliser ses huiles essentielles qui sont riches en Linalol et l'acétate de linalyl. Sa toxicité est quasiment nulle, d'où l'usage sécuritaire de cette huile essentielle devenue incontournable (Iserin, 2001).



## II-1-Escherichia .coli

### II-1-1-Historique

En 1885, Theodor Echerich (1857-1911) découvrit un bacille qu'il dénomma bactérium coli commun dans des selles de nourrissons (**Leminor et al., 1954**).

Médecin allemand, il fit une partie de ses études de médecine à Strasbourg « A propos des bactéries intestinales des nourrissons et de leurs rapport avec la physiologie de la digestion ». En 1904, cette même bactérie a été isolée dans un cas d'infection urinaire et en 1919, Castellani et Challmers donnent le nom d'*Escherichia* à cette bactérie (**Buttiaux R et al., 1956**).

### II-1-2-Présentation

*Escherichia coli* (*E .coli*) est un type de coliforme fécal faisant partie des bactéries trouvées dans les intestins d'humains et d'animaux à sang chaud. La plupart des *Escherichia coli* sont inoffensifs et ont une fonction utile dans le corps en arrêtant la croissance des espèces bactériennes nuisibles et en synthétisant des vitamines nécessaires (vitamines K), qui aide à la coagulation sanguine (**Aril et al.,1988**). Cependant, elles peuvent être des pathogènes opportunistes, tandis que d'autres peuvent causer la maladie gastro-intestinale chez des individus sains quand elles sont ingérées. *Escherichia coli* est présent dans le gros intestin, donc elle est aussi présente dans la matière fécale des humains et des animaux.

Si la contamination récente de sources d'eau avec des vidanges ou des déchets animaux a lieu, *Escherichia coli* sera présente (**Chalmers, 2000**).

### II-1-3- Taxonomie

L'espèce *Escherichia coli* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle a été caractérisée sur les plans phénotypique, biochimique et physiologique. Aujourd'hui, ce sont des techniques basées sur l'utilisation de l'ADN qui permettent une étude génétique des populations et la caractérisation des différentes souches d'*Escherichia coli* (**Stewart et al., 2015**).

- Domaine : *Bacteria*
- Embranchement : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : Entérobactérie
- Famille ; *Enterobactériaceae*

- Genre : *Escherichia*
- Espèce : *Escherichia coli*

**II-1-4-Caractéristiques**

**II-1-4-1-Caractères morphologiques et cultureux**

*Escherichia coli* ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 µ de long sur 0,4 à 0,6 µ de large. C’est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe non exigeant, sur gélose ordinaire donne des colonies lisses, brillantes et homogènes (Lobril, 1998).

**II-1-4-2-Caractères biochimiques**

*Escherichia coli* possède une catalase mais est dépourvue d’oxydase. L’étude d’activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l’aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces dernières permettent l’identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille (Fludrois J, 2004).(tableau1)

**Tableau1: Caractères biochimiques d’*Escherichia coli* (Fludrois , 2004).**

TEST	GLU	LAC	H2S	GAZ	CS	GEL	MAL	LDC	NIT	ODC	ADH	URE	TDA	VP	ESC
RESULTAT	+	+	+	+	-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-
+ : Caractère positif			- : Caractère négatif						+/- : Caractère inconstant						

**II-1-4-3-Caractères antigéniques**

✓ **Antigènes somatique O**

Les antigènes somatiques sont composés plus de 150 de lipopolysaccharides complexes. Actuellement certains laboratoires d’analyses médicales utilisent l’agglutination avec des sérums pour déterminer le sérotype, mais cette technique est limitée par le nombre de plus en plus élevé de sérums à fabriquer, par la présence d’agglutination croisée entre les antigènes O de *Escherichia coli*, *Shigella* et ceux de *Salmonella*, et par le passage de la consistance crémeuse de la colonie à une consistance rugueuse ayant pour conséquence l’absence de synthèse de l’antigène O sont regroupés dans le groupe de gènes rfb peut être amplifié spécifiquement grâce a un système d’amorces puis, après restriction par l’endonucléase MbII,

un profil noté « R » peut être obtenu par électrophorèse, correspondant à un séro groupe de *Escherichia coli* (Sureillane E, 1997).

#### ✓ Antigènes de surface ou d'enveloppe K

Il existe 3 types d'antigène K désignés par les lettres L, A ou B.

- **L'antigène L** : est le plus fréquent mais est thermolabile (il est détruit en une demi heure à 100°C), donc le chauffage provoque une perte du pouvoir antigénique, du pouvoir de fixer les anticorps et du pouvoir de masquer l'antigène O (Posl et al., 1998).

- **L'antigène A** : est rare, c'est un antigène capsulaire (les *Escherichia coli* encapsulés sont relativement fréquents dans les infections urinaires). L'Ag A est très thermostable (il faut un autoclavage pour le détruire) (Posl et al., 1998).

- **L'antigène B** : est toujours présent chez les *Escherichia coli* entéro pathogènes de gastro-entérite infantile. Il a une thermolabilité intermédiaire : après une demi-heure à 100°C il reste toujours de l'antigène O peut entrer en contact avec le sérum par « trouage » de l'enveloppe, la fixation de l'anticorps est toujours positive mais le pouvoir antigénique se perd progressivement (en fonction de la durée de chauffage) (Posl P et al., 1998).

#### II-1-5-Génome

Le patrimoine génétique de la souche *Escherichia coli* de laboratoire non pathogène a été entièrement séquencé en 1997. Leur génome comprend 4,6 millions de paires de bases codant environ 4 200 protéines. En 2001, le génome d'une souche d'*Escherichia coli* entérohéorragique a été séquencé. Il comprend 5,5 millions de paires de bases codant 5 400 protéines. L'année suivante, le génome d'une souche d'*Escherichia coli* provoquant des infections urinaires et des méningites néonatales, a été séquencé. Il comprend 5,2 millions de paires de bases codant 5 300 protéines. En effet, les souches d'*Escherichia coli* pathogènes ont acquis au cours de l'évolution un répertoire de gènes de virulence, qui leur permettent de coloniser de nouvelles niches écologiques en contournant les mécanismes de défense de l'hôte. L'expression d'un répertoire spécifique de facteurs de virulence est corrélée à une pathologie particulière et permet de définir différents phatovar (Dobrint, 2005).

#### II-1-6- Habitat et Stratégie de l'infection

Les entérobactéries sont présentes dans de nombreux écosystèmes, elles peuvent être saprophytes, commensales pathogènes. Le cas d'*Escherichia coli* est typique. Cette bactérie est retrouvée dans les eaux souvent en provenance d'une contamination fécale, dans l'intestin.

(Greatorex et al., 2000). Cependant, bien que la majorité des souches d'*Escherichia coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales (Montet, 2009) ou extra-intestinales très diverses chez l'homme. Comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches d'*Escherichia coli* pathogènes utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont la colonisation de muqueuses, éventuellement l'invasion des cellules, la multiplication, l'évasion des défenses de l'hôte et les dommages à l'hôte. (Bergey's M, 2001). La détermination des combinaisons de propriétés particulières associées à la virulence d'une souche, les modes d'infection et les signes cliniques de l'infection, constituent un moyen de typage d'*Escherichia coli* que l'on désigne sous le néologisme de pathotype ou pathovar (Levine, 1998).

## II-1-7-Mode de transmission

### II-1-7-1- Transmission alimentaire

- Les produits carnés sont à l'origine d'un grand nombre d'infection à *Escherichia coli* (Vernozy-Rozand et al., 2005). La viande de boeuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante (Baranyi ,Roberts,1995). La viande d'autres animaux de boucherie, ou de volailles a également été mise en cause (Paton, 2001).

-Le lait et les produits laitiers non pasteurisés ont également été à l'origine d'épidémie.

La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. En effet, les conditions de traite et l'environnement dans lequel elle se réalise jouent un rôle prépondérant dans la contamination du lait (Allerberger , 2001).

- Les fruits et légumes crus (salade, radis, épinards, oignons...) peuvent être directement contaminés par l'eau d'irrigation, à partir du sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages ou via l'activité de la faune du sol (Baranyi , Roberts , 1995).

### II-1-7-2-Transmission par le contact direct avec les animaux de ferme et leur environnement

La transmission d'*Escherichia coli* se fait par un contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors de cas sporadiques (O'brien A et al., 1982). Par ailleurs, le taux de porteurs sains en *Escherichia coli* est plus élevé dans la population vivant en contact permanent avec les animaux (Evans J et al., 2002). Par exemple, chez les

éleveurs anglais, la séroprévalence à *Escherichia coli* varie de 1,6% à 5%. Le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a également été à l'origine d'épidémies à *Escherichia coli*, notamment durant des événements en plein air, tels que des festivals ou des campements touristiques sur des sols préalablement pâturés par des ruminants (**Ogden et al., 2002**). En Ecosse, du sol souillé a été impliqué dans 11% des infections environnementales à *Escherichia coli* (**Strachan N et al., 2006**).

## **II-1-8- Pouvoir pathogène**

### **II-1-8-1- Les facteurs de virulence :**

La définition des facteurs de virulence et la compréhension des mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène des souches d'*Escherichia coli* sont des préalables indispensables à l'évaluation du risque pour la santé publique lié à l'existence de ces pathogènes.

Ainsi, la combinaison des facteurs de virulence impliqués dans le pouvoir pathogène des souches restent encore à déterminer (**Escobar P et al., 2006**). L'étude des facteurs de pathogénicité d'*Escherichia coli* a montré que dans l'espèce, il existe de nombreuses variantes des facteurs (**Escobar et al., 2006**).

#### ➤ **Les facteurs de virulence potentiels**

*Escherichia coli* possède plusieurs facteurs de virulence :

- ✓ **Une capsule** qui s'oppose à la phagocytose.
- ✓ **Des protéines** de la membrane externe et le LPS donnant aux bactéries la capacité

d'échapper à l'activité bactéricide du sérum de l'hôte en s'opposant à la fixation du complément.

- ✓ **Des systèmes de captation du fer :**

**Les sidérophores** : notamment codé par l'îlot de pathogénicité fournissant aux bactéries le fer indispensable à leur multiplication, au détriment de la transferrine.

- ✓ **Des toxines**

- **L'endotoxine** commune aux entérobactéries
- Les **entérotoxines** ST (thermostables) et LT (thermolabiles). Ce sont des toxines cytotoxiques qui agissent sur le contrôle entérocytaire de la sécrétion hydro-électrolytique la toxine LT est proche de la toxine cholérique.

□ Les **cytotoxines** SLT1 et SLT2 (Shiga-like toxine). Ce sont des toxines qui altèrent l'intégrité des entérocytes. On les appelle encore des vero-toxine (VT) à cause de leur effet toxique sur les cellules vero en culture. (Vervet origine - vervet, un singe africain) (**Levine M, 1988**).

- **Sat et Vat** : Sat (secreted autotransporter toxin) et Vat (vacuolating autotransporter toxin) sont des toxines de type V, de la famille des auto-transporteurs. Elles vont produire une vacuolisation et un engorgement cellulaire.

**Vat** toxine entré dans la pathogénèse d'une infection extra-intestinale d'*Escherichia coli* n'a pas encore été bien identifié.

**Sat** toxine provoque un dommage sévère dans les reins, perte de la membrane glomérulaire, perte de l'épithélium des tubules, et une vacuolisation du tissu, mais sans avoir un rôle déterminé dans la colonisation de la bactérie

- Des protéases, telles que la sérine protéase, la catalase peroxydase, la métallo-protéase.
- Des systèmes de résistance à l'acidité gastrique et des uréases (**Guyer D et al., 2002**).

La liste de ces facteurs de virulence potentiels ne cesse de s'allonger mais, à ce jour, leur rôle respectif dans la pathogénie d'*Escherichia coli* n'est pas démontré.

- Les facteurs de virulence peuvent être codés par des gènes trouvés dans des transposons (Tn), des îlots de pathogénicité (PAI), des bactériophages (Phage) et/ou dans des plasmides. Selon les pathovars, on trouvera les différents éléments acquis par le transfert horizontal d'information génétique. De cette façon, les souches provoquent plusieurs maladies et symptômes comme une dysenterie, une méningite chez les nouveau-nés, une diarrhée, une infection urinaire (UTI), ou (SHU), portent des éléments génétiques différents, qui leur confèrent des facteurs de virulence spécifiques et donc des avantages de colonisation et survie dans un environnement spécifique (**Kaper et al., 2004**).

## II-2-Staphylococcus aureus

### II-2-1-Historique

Les Staphylocoques ont été découverts par PASTEUR en 1880. En 1983 OGSTAN a créé le mot "Staphylocoque" pour décrire ces grains (KOKKOS) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (Staphylos) (**figure4**)

En 1884 ROSBACH a obtenu des cultures pures de ces bactéries.

Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (**Fransoss et al., 1992 in Ouissate et Bakini, 2009**).



**Figure 4 : Coques de *Staphylococcus aureus* disposée en grappes de raisins ; micrographie électronique à balayage (Gx100) (Willey et al., 2010).**

### II-2-2-Position taxonomique

La famille des micrococcaceae, est composée de trois genres de cocci à gram positif en amas, qui diffèrent par leur pourcentage (G+C) : *Staphylococcus* (30-39%), *Micrococcus* (65-75%) et *Planococcus* (45-52%).

Les espèces appartenant à ces trois genres possèdent une catalase et se développent en aérobiose. Quant au genre *Staphylococcus*, il occupe une place privilégiée en pathologie humaine et animale (**Avril et al., et Slammat, 2005**).

Parmi les espèces les plus isolées : *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, leur principaux caractères sont portés sur le (**tableauII**)

#### • *Staphylococcus aureus* :

L'espèce *S. aureus*, qui produit une coagulase (enzyme capable de coaguler, le plasma de lapin oxalate) est très souvent responsable d'infections pyogènes graves. Isolée des

prélèvements où sa présence est physiologique, c'est aussi une espèce saprophyte ou commensale (Fauchere et Avril, 2002 in Hinana et Slammat, 2005).

• *Staphylococcus epidermidis* :

Cette espèce ne produit pas de Staphylocoagulase ni la plupart des enzymes produites par *S. aureus*, en revanche elle est dotée d'une forte capacité d'adhésion aux biomatériaux, et constamment présente sur la peau et les muqueuses (Fauchere et Avril, 2002 in Hinana et Slammat, 2005).

*S. epidermidis*, peut être responsable d'infection de prothèse vasculaire ou articulaire, de valves de dérivations du LCR et d'infections diverses particulièrement chez les immunodéprimés.

• *Staphylococcus saprophyticus* :

Cette espèce a un nom particulièrement mal choisi puisqu'elle peut être responsable d'infection urinaire qui s'observe particulièrement chez les jeunes femmes, habituellement non hospitalisées. Cette espèce adhère à l'épithélium urinaire (AVRIL et al., 1992 in hinana et Slammat, 2005).

**Tableau II : Caractères différentiels des principales espèces de Staphylocoques (El kouri et al., 1998 in Hinana et Slammat,2005).**

Caractère	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
Pigment	+	-	-
Coagulase	+	-	-
ADNase	+	-	-
Re.novobiocine	-	-	+
Nitrate réductase	+	+	-
Phosphatase	+	+	-
D.mannitol	+	-	- ou +
Clumping factor	+	-	-
Hémolysine	+	-	-
Protéine A	+	-	-

Re : Résistance, (+) : positif, (-) : négatif

### II-2-3- Caractères généraux

#### II-2-3-1- Caractères morphologiques

Les Staphylocoques sont des analogues de Micrococcus, il s'agit de cocci de 0,5 à 1 µm de diamètre en très courtes chaînes, disposées en paire, plus souvent il en fait des grappes de raisin immobiles (**Buttiaux et al., 1966**).

Ce sont des bactéries à Gram positif, non sporulées, ils se divisent en plusieurs plans en formant des amas irréguliers. Leur paroi est principalement constituée de peptidoglycane, et renferme des acides teichoïques responsables de la fixation de bactériophages spécifiques (**tableau III**).

*Staphylococcus aureus* élabore un pigment caroténoïde qui donne aux colonies une coloration jaune ou orange d'intensité très variable selon les souches (**Bourgeois et al., 1988**).

**Tableau III: Principaux caractères des staphylocoques (Camille, 2007).**

Morphologie	Cocci sphérique de 0,5 à 1µm de diamètre : -en amas (grappes de raisin) : <i>S.aureus</i> - en paires, amas irréguliers : autre espèces
Coloration de gram	Gram+
Mobilité	Immobilisés (mouvements browniens)
Type respiratoire	Anaérobies facultatifs en général
Oxydase	+
Catalase	+
Conditions de culture	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Température optimale à 37 °C ; croissance à 10 °C et à 45 °C selon les espèces</li> <li>• PH optimal de 7,2 à 7,4</li> </ul>
Caractères spécifiques	Halotolérants : 6,5 % de NaCl
Milieux de culture d'usage courante	Gélose nutritive, gélose trypticase soja ...
Milieux d'isolement sélectifs	Gélose de Baird-Parker Gélose Baird-Parker RPF Milieu de Chapman ...
Milieu d'enrichissements sélectifs	Bouillon de Giolitti-Cantoni
Identification biochimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• API Staph bioMérieux SA</li> <li>• ID 32 Staph bioMérieux SA</li> </ul>

### **II-2-3-2-Caractères biochimiques et physiologiques**

Les Staphylocoques produisent une catalase, le critère de base de leur classification est la production de coagulase. Il ya trois espèces productrices de coagulase : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Staphylococcus hyicus*.

L'espèce *S.aureus* peut produire de nombreuses enzymes : protéases, lipases, coagulases liées au "Clumping-facteurs" , coagulases libres et nucléases thermostables ou thermonucléases (**Bourgeois et al., 1988**). Elle est aéro-anaérobie facultatif et se multiplie plus facilement en aérobiose qu'en anaérobiose.

Elle exige des acides aminés et des vitamines, cette espèce est mésophile et généralement inhibée, en présence d'une flore compétitive importante (**Bourgeois et al., 1988**).

*S.aureus* est sensible à l'acidité du milieu, et tolère des concentrations élevées du NaCl et (AW) réduites. Elle survit longtemps dans des aliments déshydratés ou congelés car, c'est un germe thermosensible (**Bourgeois et al., 1988**).

Comme les bactéries lactiques les membres du genre *Staphylococcus* croissent de la façon anaérobie et produisent de l'acide lactique par fermentation des sucres (**Jerome et al., 2004**).

Les bactéries appartenant à ce genre possèdent un métabolisme respiratoire normal. Les genres *Micrococcus* et *Staphylococcus* sont facilement différenciables grâce à leur type respiratoire.

Ce genre de bactérie fermente sans produire de gaz, de nombreux hydrates de carbone dont le glucose, saccharose, glycérol (**Michael et al., 2007**).

#### **Enzymes et toxines de Staphylococcus**

Comme les *Staphylococcaceae*, *S.aureus* est caractérisée par son pouvoir de sécréter quelques types d'enzymes et de toxines :

- Les enzymes : parmi les enzymes de *Staphylococci* pathogène, on distingue

(**Buttiaux et al., 1966**)

1. Coagulase
2. Phosphatase
3. ADN ase
4. Fibrinolysine
5. Hyaluronidase
6. La désoxyribonucléase

7. La pénicillinase

- Les toxines :

1. Hémolysine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ )

2. Les leucocidines

3. Les enterotoxines (**Pilet et al., 1983**).

**II-2-3-3- Caractères culturels**

Les staphylocoques se multiplient 24 heures sur la plupart des milieux usuels :

La température optimale de croissance est 37°C (culture entre 12 et 46°C), le pH optimal est 7,2-7,4 .

- Sur gélose nutritives : on obtient des colonies arrondies, bombées, luisantes, opaques, à contours nets, pigmentés après 24 à 36 heures, pouvant alors présenter :

-Une coloration ocre-jaune ; c'est le cas de la majorité des souches de *S.aureus*

-Une teinte blanche, porcelainée : il peut s'agir alors de *S.aureus*, *S.epidermidis*

ou de *S.saprophyticus*.

- En bouillon nutritif : on observe en 24 heures un trouble uniforme abondant, puis un dépôt et un voile pelliculaire en surface.
- En gélose profonde : on remarque des colonies rondes ou lenticulaire dans toute la hauteur de milieu : les staphylocoques sont aérobies facultatifs (**Pilet et al., 1983**).

**II-2-4- Habitat et mode de transmission**

L'espèce *Staphylococcus aureus* est un germe ubiquitaire (**Jean-Louis et Jean Loup, 2002**). Elle est très répandue dans la nature, on la trouve fréquemment dans l'eau, l'air, les poussières (saprophyte), au niveau de la peau de l'homme et des animaux (**Jean-Claude, 1973**).

C'est une commensale des muqueuses de l'homme, on la trouve à l'état normale dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles, au niveau du périnée, ou des aisselles, un tiers des individus sains est porteur de *S.aureus* au niveau des fosses nasales

(**Jean-Louis et Jean Loup, 2002**).

En milieu hospitalier, un malade peut développer une infection à partir des bactéries de sa propre flore ou être contaminé par transmission manu portée à l'occasion des soins.

*S. aureus* est un agent majeur d'infection nosocomiale (**Jean-Louis et Jean-Loup, 2002**). Un aliment faiblement contaminé lors de sa préparation peut s'il a été conservé à température ambiante, permettre la multiplication d'une souche produisant de l'enterotoxine et être responsable d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) (**Jean-Louis et Jean-Loup, 2002**).

*S. aureus* représente l'une des espèces staphylocoque pathogène (**Michael et al., 2007**).

### **II-2-5- Classification phylogénique**

Il existe plusieurs types de classification de *S. aureus* dont la plus utilisée est la classification de **Bergey** :

- Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.
- Phylum XIII : Firmicutes.
- Classe : Bacilli.
- Ordre : Bacillales.
- Familles : Staphylococcaceae.
- Genre : Staphylococcus.
  
- Espèces : *Staphylococcus aureus* (**Camille, 2007**).

### **II-2-6- Espèces touchées**

Être humain. On ne connaît pas de toxi-infections spontanées chez les animaux domestiques, mais des mammites chez la vache, des infections cutanées chez les chiens, des pyodermites et des septicémies chez la volaille.

#### **II-2-6-1- Agent infectieux**

*Staphylococcus aureus* réagit positivement à la coagulase. C'est une bactérie Gram-positif, immobile, aérobie ou facultativement anaérobie qui produit des entérotoxines. La toxine est produite dans des denrées alimentaires contaminées. Il existe 7 types d'entérotoxines: A – E (TS ST-1 = Toxic shock syndrome Toxin 1, anciennement F). Le type A est le type le plus répandu dans les régions d'épidémie. Les biotypes E sont regroupés dans une nouvelle espèce: *S. intermedius* que l'on rencontre souvent en pathologie animale. Certaines souches peuvent produire deux ou trois entérotoxines différentes, résistantes à une température de 100° C pendant 30 minutes. La

pasteurisation ne permet pas d'obtenir une inactivation totale. Les staphylocoques survivent longtemps dans les aliments déshydratés ou congelés.

**II-2-7- Clinique/Pathologie :**

✓ **Animal:**

elle est responsable de :

mammite bovine qui peut aller de la forme subclinique à la forme gangreneuse; infections cutanées chez le chien: pyodermite, impétigo, folliculite et furonculose; pyodermite et septicémie chez la volaille. Les animaux sont moins sensibles aux entérotoxines.

**II-2-8- Epidémiologie :**

✓ **Animaux:**

dans les conditions naturelles, l'infection n'est pas diagnostiquée comme étant une toxi-infection de l'appareil digestif. Expérimentalement, on peut provoquer une diarrhée chez les singes, les chiens et les chats. En cas d'infection par des staphylocoques, le germe peut se transmettre à partir de plaies purulentes ou à partir d'une mammite par contact direct, par des objets contaminés, des aérosols ou le lait. La transmission d'une espèce à l'autre est rare.

## **I-Matériel et méthodes**

Il existe plusieurs méthodes employées pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des HE classées selon la nature du contact de l'HE avec le germe (Aromatogramme, Micro-atmosphère, méthode de dilution à partir des disques, méthode des puits ainsi que les méthodes sur milieu liquide ...etc.), mais dans notre étude nous avons choisi la méthode des disques baptisé aromatogramme par ce qu'elle est la plus utilisée et la plus accessible par rapport aux moyen qu'on a.

### **I-1- Matériel**

#### **I-1-1-Matériel biologique**

##### **a)- Les huiles essentielles :**

Les deux huiles essentielles testés dans notre travail sont extraites de deux plantes faisant partie de la famille des Rutaceae et des *Lamiaceae* HE de la lavande sauvage (*Lavandula strikas*), de citron(*Citrus limon*). Elles sont obtenues par distillation en utilisant l'entraînement à la vapeur d'eau .

Les huiles essentielles ont été conservées dans des flacons stériles et stockées a 4°C et a l'abri de l'air et de la lumière pendant toute la durée de notre travail , pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.(figure5)



**Figure 5 : Les deux HE utilisées ( à gauche : lavande , à droite : citron)**

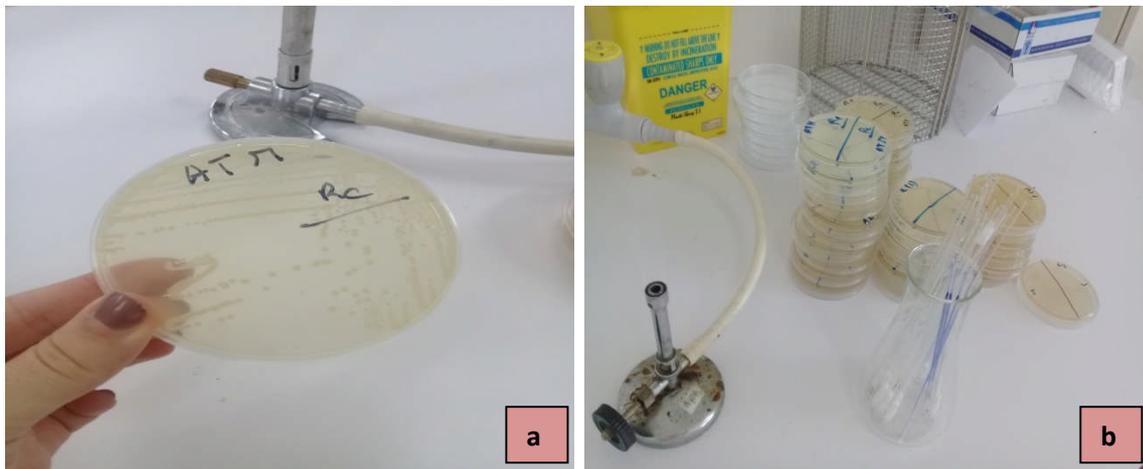
**b)- Souches bactériennes :**

Dans cette étude, nous avons utilisé plusieurs souches bactériennes provenant des différents prélèvements d'origine animale des différents élevages de la willaya de Tizi ousou , Bouira et d'autre à partir des animaux destinées à l'abattage .

Nous avons pu récolter 15 souches de *Escherichia coli* et 15 souches de *Stphylococcus aureus* plus les souches de référence ATCC 25922 de *Escherichia coli* et ATCC 25923 de *Stphylococcus aureus*. Ces souches bactériennes testées ont été fournis par le laboratoire de biotechnologie et de la reproduction animal (LBRA).

✓ Les souches d'*Escherichia coli* :

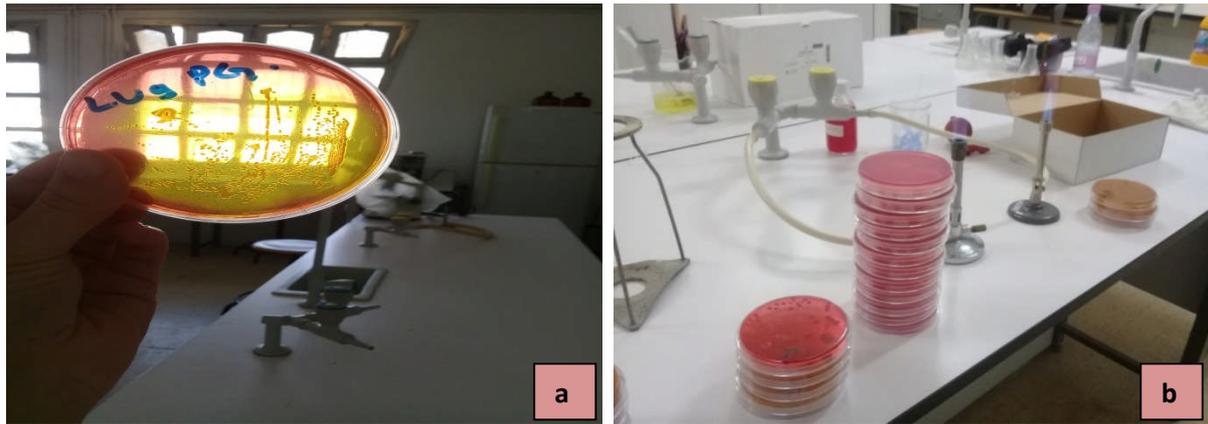
Toutes les souches ont été isolées de prélèvements obtenu d'un seul élevage. (figure6)



**Figure 6: photos originales des souches d'*E.coli* utilisées (a,b)**

✓ Les souches de *Stphylococcus aureus* :

13 souches ont été obtenus par un écouvillonnage nasal des bovins et ovins destinés à l'abattage et deux autres souches par un prélèvement du lait des vaches atteintes d'une mammites clinique.(figure 7)



**Figure 7 : photos originales des souches de *S.aureus* utilisées (a,b)**

Choix des souches :

Choix de ces souches a été porté sur la base de leur importance dans le domaine clinique.

*Escherichia coli* : Infections des tissus profonds, diarrhée. **Baliere, 2016.**

*Stphylococcus aureus* : mammite bovine. **Michel et Vattiaux, 2006.**

## I-2- Matériel non biologique

Le matériel non biologique se résume dans le tableau suivant.

**Tableau IV : Equipement de base d'un laboratoire de microbiologique**

Appareillage, verrerie et solutions	Milieux de culture et disques imprégnés
Etuve à 37°C Réfrigérateur à 4°C Bec bunsen Pipettes Pasteur stériles Pinces métalliques Ecouillons stériles Boîte de Pétri Tubes à essai stériles Portoir Poire La gaze, Ciseaux Blouse de laboratoire Liquide désinfectant Conteneur pour élimination des déchets Etiquettes, Marqueurs, Registres Règles graduée ou pied à coulisse Eau physiologique stérile à 0.9% Eau de javel et Alcool Micropipette	Gélose nutritive (GN) Gélose hektoen Gélose Muller-Hinton (MH) Shapman Milieu de conservation Disques vierges

## II-Méthodes

La méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne utilisée dans cette étude est la méthode de l'aromatogramme :

Elle est appelée aussi méthode de diffusion sur gélose appelée, c'est l'équivalent de l'antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dépose une quantité donnée de l'huile essentielle.

Cette méthode a été utilisée par beaucoup d'auteurs (**Deans et Ritchie, 1987; Zaika, 1988; Carson et Riley, 1995; Pattnaik, Subramanyam *et al.*, 1996; Sivropoulou, Papanikolaou**

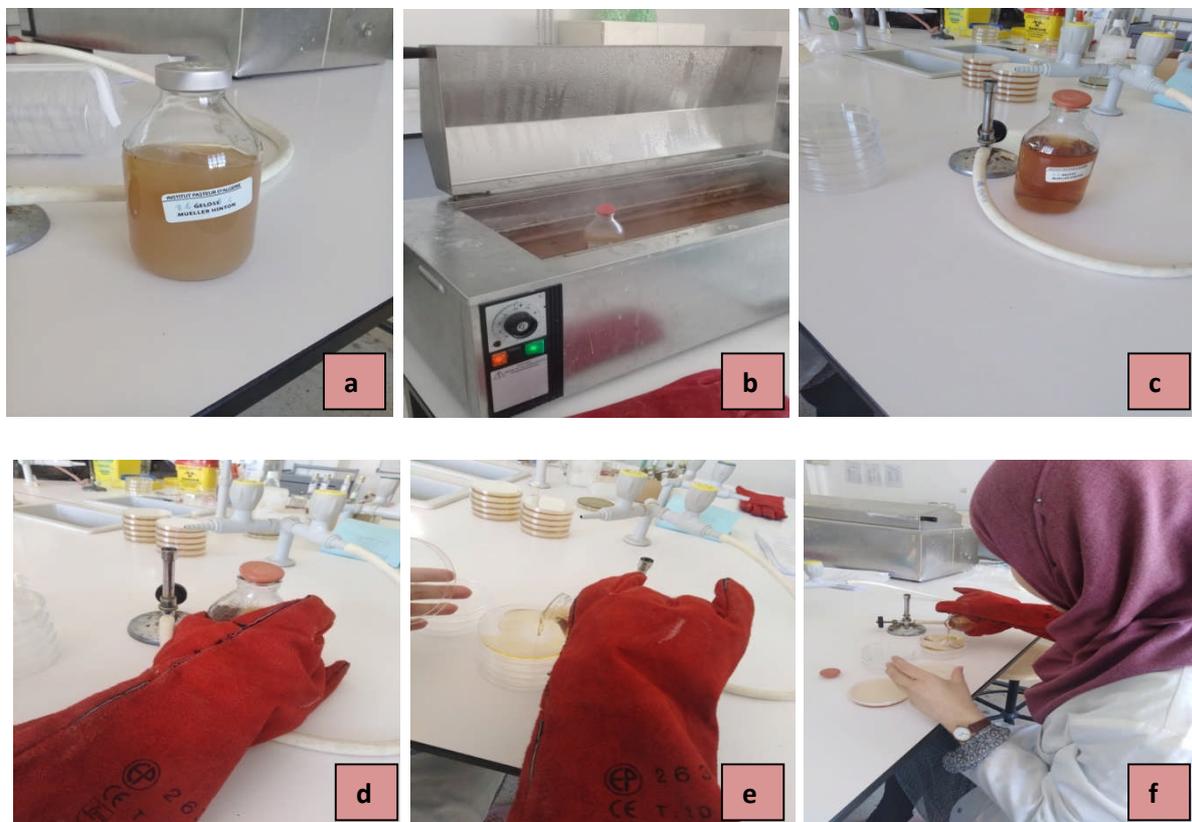
*et al.*, 1996; Smith-Palmer, Stewart *et al.*, 1998; Lis-Balchin, Hart *et al.*, 2000; Burt et Reinders, 2003; Faleiro, Miguel *et al.*, 2003; Kunle, Okogun *et al.*, 2003).

La technique d'aromatogramme s'effectue selon les étapes suivantes :

#### a)-Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est gélose Muller-Hinton, qui doit être fondue et coulée en boîte de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et puis laissée se solidifier.

Les géloses doivent être séchées avant l'emploi pour éliminer toute trace d'humidité qui favorise l'envahissement (figure 8).



**Figure 8: Préparation du milieu de culture ( photos originales ) (a,b,c,d,e,f)**

#### b)-Préparation de l'inoculum

- Dans le premier jour, nous avons effectué un repiquage des souches conservées afin d'obtenir des culture jeunes .

Le repiquage est réalisé pour toutes les souches sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive qui sont incubés à 37°C pendant 24h.(figure 9)



**Figure 9 : Repiquage des souches (photos originales ) (a,b)**

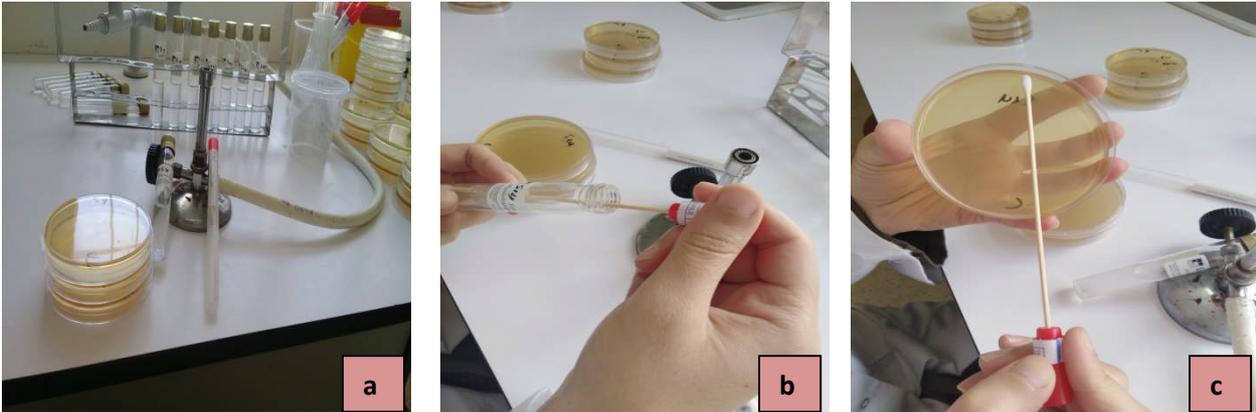
- A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement et à l'aide d'une Pipettes Pasteur, racler quelques colonies identiques de chaque souche
- Préparer une suspension bactérienne en déchargeant la Pipettes Pasteur dans l'eau physiologique stérile 0.9% et homogénéiser(figure 10)



**Figure 10 : préparation de la suspension bactérienne (photo originale)**

**c)- Ensemencement**

- Tremper un écouvillon propre et stérile dans la suspension et l'essorer sur les bords.
- Frotter délicatement l'écouvillon sur la gélose MH et tourner la boîte de 60° de façon à croiser les stries.(figure 11).



**Figure 11: Ensemencement dans la gélose MH(photos originales) (a,b,c)**

**d)- Application des disques**

Des disques de papier Wattman n°3 de 6 mm et de 9mm de diamètre, stérilisés précédemment à la chaleur humide sont imprégnés par 50 ou 100 µl par disque (Figure12 ), ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action "dose-dépendante" de l'HE sur la croissance bactérienne. Donc on distingue deux cas à savoir le disque est imprégné par une :

❖ **Huile essentielle pure**

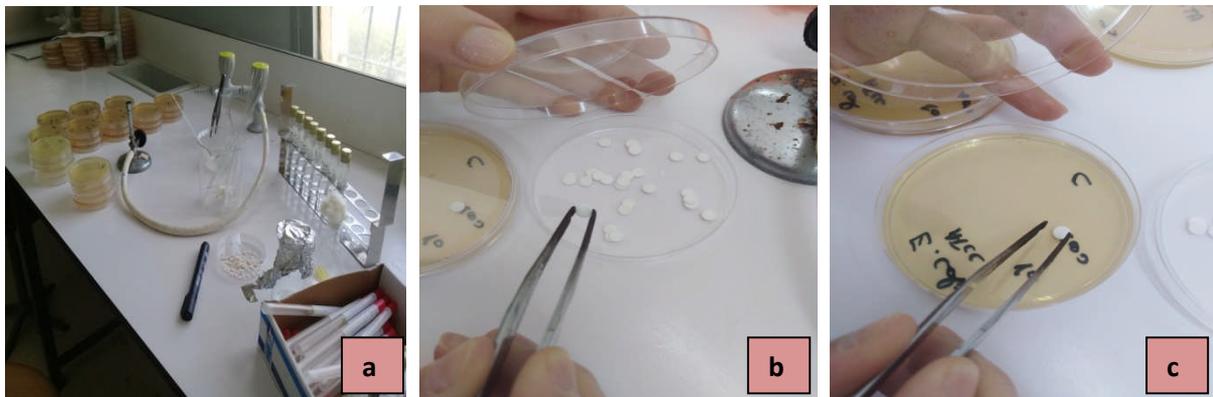
Dans ce cas le disque est imprégné par 50 ou 100 µl de l'huile essentielle pure que ce soit l'huile de lavande, ou de citron

❖ **Association des huiles essentielles**

Dans ce cas le disque est imprégné par 50 ou 100 µl de l'association des deux huiles essentielles et chacune des deux HE représente 50% de l'association.

Après avoir imprégné les disques, déposer ces derniers sur la gélose déjà ensemencés par l'inoculum avec une répétition, c.à.d. que chaque boîte doit contenir quatre disques : deux disques

imprégnés chacun par 50  $\mu$ l et deux autres imprégnés chacun par 100  $\mu$ l du même produit antibactérien testé.



**Figure 12 : Application des disques ( photos originales ) (a,b,c)**

**e)- Incubation :**

Incuber les boîtes à 35-37°C pendant 18-24 heures. (figure 13)

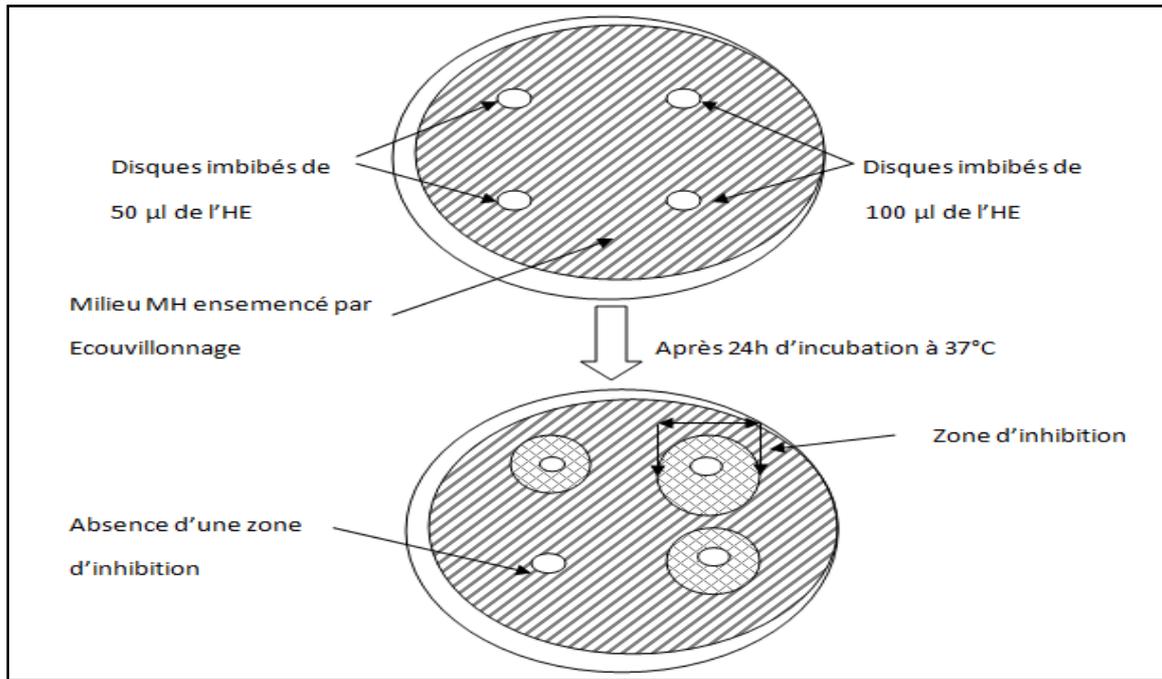


**Figure 13: incubation (photo originale )**

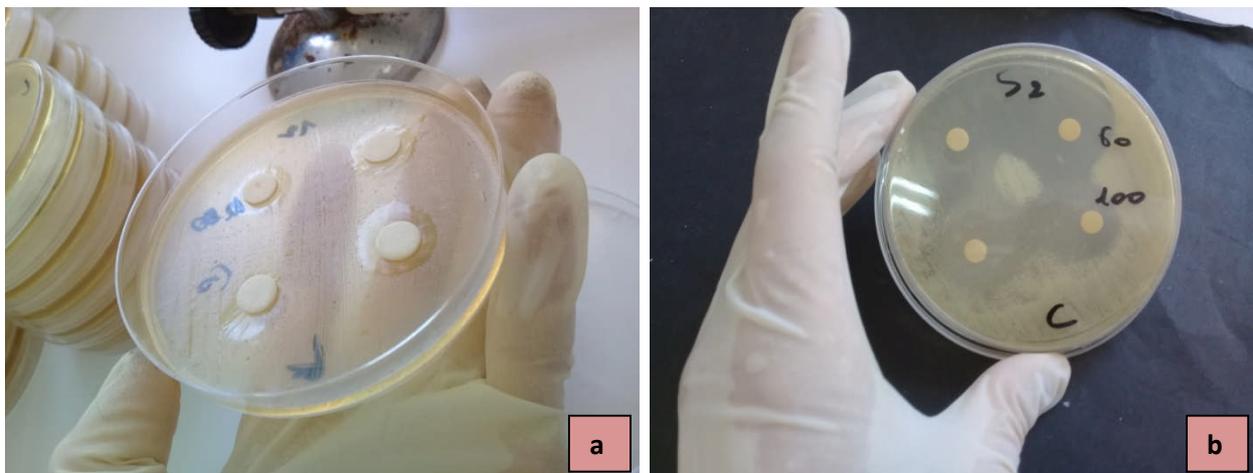
**f)-Lecture**

À l'aide d'un pied à coulisse métallique (ou d'une règle) on mesure les diamètres des zones d'inhibition (zone circulaire stérile autour du disque), et puis on calcule la moyenne des diamètres d'inhibition de chaque deux disques identique (répétition), c.à.d. pour une boîte x contenant quatre

disques on calcule la moyenne des deux diamètres d'inhibition correspondant aux deux premiers disques imprégnés par 50 µl ainsi que celle des deux diamètres d'inhibition correspondant aux deux autres disques imprégnés par 100 µl et en se basant sur ces deux valeurs, les souche étudiées sont alors classées.(figure 14,15).



**Figure 14: Illustration de la technique d'aromatogramme utilisée (photo Originale)**



**Figure15 : la lecture après incubation ( photos originales) (a,b)**

❖ **Effet antibactérien**

Pour savoir si l'EH ou l'association des HE a un effet bactériostatique ou bactéricide, on racle avec une pipette pasteur la zone d'inhibition et on ensemence sur une nouvelle gélose puis on incube à 37°C pendant 24h :

- Une culture positive indique qu'il s'agit d'un effet bactériostatique.
- Une culture négative indique qu'il s'agit d'un effet bactéricide.

❖ **L'efficacité des HE**

Pour classer les HE utilisées selon leur activité nous avons utilisé l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne élaborée par **Mutai et al., (2009)** qui ont scindé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes :

- Très fortement inhibitrice :  **$D \geq 30$  mm**
- Fortement inhibitrice :  **$21 \text{ mm} \leq D \leq 29$  mm**
- Modérément inhibitrice :  **$16 \text{ mm} \leq D \leq 20$  mm**
- Légèrement inhibitrice :  **$11 \text{ mm} \leq D \leq 16$  mm**
- Non inhibitrice :  **$\square 10$ mm**

❖ **Sensibilité des souches de prélèvements**

La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition comme suit (**Mutai et al., 2009**) :

- Extrêmement sensible :  **$D \geq 20$  mm**
- Sensible :  **$15 \text{ mm} \leq D \leq 19$  mm**
- Intermédiaire sensible :  **$9 \text{ mm} \leq D \leq 14$  mm**
- Non sensible (résistante) :  **$D \square 8$  mm**

❖ **Test de contrôle**

On a testé un disque vierge sur une boîte ensemencée.



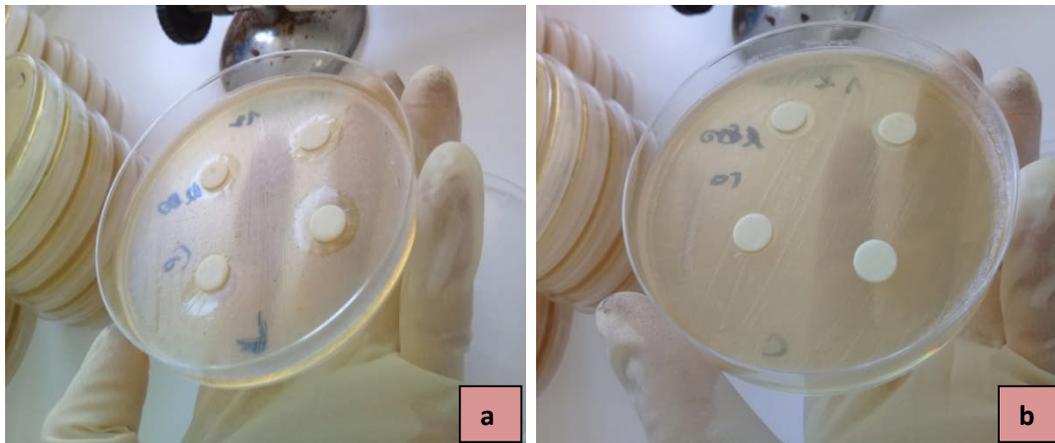
## II-Résultats et discussion

Dans ce chapitre sont présentés les résultats de notre étude de l'effet antibactérien des HE réalisée sur 30 souches de prélèvement *d'Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* ainsi que les souches de référence.

### II-1-Résultats de l'aromatogramme

#### II-1-1 Diamètres des zones d'inhibition

Après 24 heures d'incubation à 37°C, on observe les diamètres d'inhibition autour des disques imprégnés des HE (Figure16).



Lavande

Citron



Mélange

**Figure 16: photos originales des diamètres d'inhibition des souches de *E. coli* traitées par les HE (a,b,c)**

Les deux tableaux ci-dessous représentent tous les résultats obtenus lors de notre étude de l'effet antibactérien *in vitro* des huiles essentielles sur les 15 souches d'*Escherichia coli*, les 15 souches de *Staphylococcus aureus* et les souches de référence.

**Tableau V : tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition des souches de *E. coli***

Souches	Citron D (mm)		Lavande D (mm)		Mélange (cit-lavan) D (mm)	
	50µl	100 µl	50µl	100 µl	50µl	100 µl
<b>E1</b>	17,5	22,5	22	30	14	17,5
<b>E2</b>	15	21,5	40	27,5	15	22,5
<b>E3</b>	16	18	17,5	23	21	22,5
<b>E4</b>	15	20	13,5	21,5	16	21
<b>E5</b>	21	18,5	16	23,5	13,5	16,5
<b>E6</b>	21	18	20	20	20	22,5
<b>E7</b>	21	18,5	23	29	21	25,5
<b>E8</b>	12,5	22	19	25	11,5	20
<b>E9</b>	13,5	20	19	25,5	16	23,5
<b>E10</b>	16	18	32,5	30	15,5	18,5
<b>E11</b>	0	12,5	15	21,5	11,5	15,5
<b>E12</b>	0	12	14	16	12,5	16,5
<b>E13</b>	0	11,5	15,5	16,5	14	17
<b>E14</b>	0	13	15	20	15	20
<b>E15</b>	6	15	13	19	12	15
ATCC 25922	25	36	19	35	20	39

D : diamètre de la zone d'inhibition. E:*E.coli*

D'après le tableau V, les diamètres d'inhibition des souches d'*E. coli* varient entre 6 mm et 40mm, sachant qu'il y'a des résultats négatifs qui s'explique par des résistances.

les résultats d'inhibition des souches de *S.aureus* sont représentés dans le tableau ci-dessous

**Tableau VI: tableau récapitulatif des diamètres d'inhibition des souches de *S. aureus***

Souches	Citron D (mm)		Lavande D (mm)		Mélange (cit-lavan) D (mm)	
	50µl	100 µl	50µl	100 µl	50µl	100 µl
<b>S1</b>	30	40	30	40	25	30
<b>S2</b>	25	28	32	42	30	40
<b>S3</b>	30	40	40	50	35	45
<b>S4</b>	31	37	40	50	30	42
<b>S5</b>	29	22	39	40	32	40
<b>S6</b>	30	40	33	45	32	42
<b>S7</b>	40	45	45	50	29	38
<b>S8</b>	35,5	48,5	31	47	27	39
<b>S9</b>	30	42	40	50	38	40
<b>S10</b>	29	40	42	50	40	48
<b>S11</b>	33,5	39	41	49	30	40
<b>S12</b>	30	34	47	46	32	42
<b>S13</b>	35	40	40	50	39	44
<b>S14</b>	42,5	48	44	47	39	45
<b>S15</b>	40	44	42	47	41	47
ATCC 25923	30	41	39	46	24	31

D : diamètres de la zone d'inhibition. S : *S. aureus*

D'après le tableau VI, les diamètres d'inhibition des souches de *S. aureus* varient entre

25 mm et 50mm.

Les deux derniers tableaux représentent les diamètres des zones d'inhibition (D) observés autour des disques imprégnés des HE pures ou du mélange des deux HE, selon les doses dont le disque est imbibé (50 $\mu$  ou 100 $\mu$ ), après 24 heures d'incubation à 37°C.

Le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne des HE est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HE. Ainsi *in vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison avec des terpènes hydrocarbures a été observée. La caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminantes vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des terpénoïdes **(Dorman et Deans, 2000)**

Sur cette base, l'ordre d'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant :

**1)Phénols**

**2) Alcools**

**3) Aldéhydes**

**4)Cétones**

**5)Oxydes**

**6)Hydrocarbures**

**7)Esters**

**( Bekhechi *et al.*, 2008; Ouraini *et al.*, 2007)**

## **II-1-2- Etudes de l'efficacité des HE sur les 30 souches étudiées**

Les résultats de notre étude, suivent l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne élaborée par **Mutai *et al.*, (2009)**.

Dans les deux tableaux ci-dessous (tableau VII et VIII) sont présentés le nombre et le pourcentage des souches correspondant à chacune des 5 classes en fonction de la dose utilisée, sachant que le nombre total des souches utilisées est 15 par espèce. Ce qui correspond à 100%.

a) Efficacité des trois HE sur *E. coli*

L'efficacité des HE sur *E. coli* sont présentés dans le tableau suivant et les figures 17,18,19

**Tableau VII: distribution des souches de prélèvement d'*E. coli* étudiées selon le type d'effet exercé par les HE**

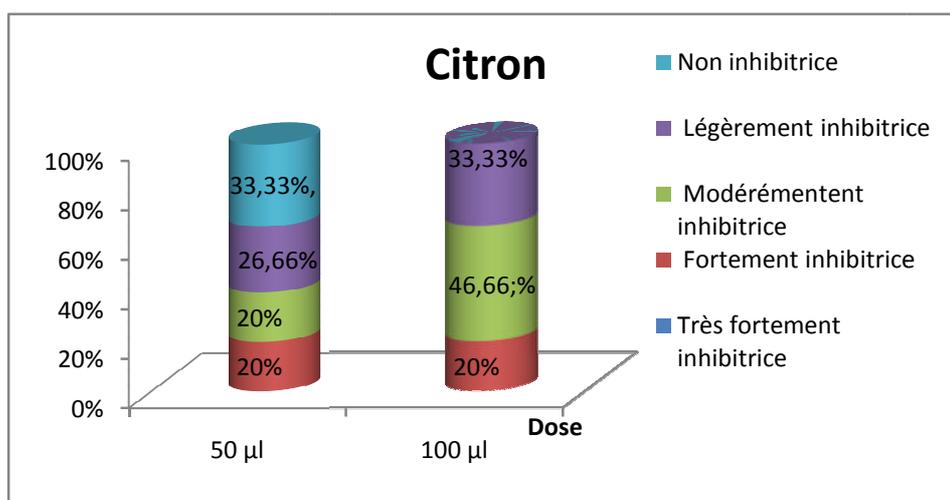
Classe	Association	Très fortement inhibitrice		Fortement inhibitrice		Modérément inhibitrice		Légèrement inhibitrice		Non inhibitrice		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
citron	50µl	0	0	3	20	3	20	4	26,66	5	33,33	15	100
	100µl	0	0	3	20	7	46,66	5	33,33	0	0	15	100
lavande	50µl	2	13,33	2	13,33	5	33,33	6	40	0	0	15	100
	100µl	2	13,33	8	53,33	5	33,33	0	0	0	0	15	100
Mélange	50µl	0	0	2	13,33	3	20	10	66,66	0	0	15	100
	100µl	0	0	6	40	7	46,66	2	13,33	0	0	15	100

N : Nombre de souches. % : pourcentages des souches dans la classe correspondante

Sur les souches d'*E. coli*, les HE utilisées montrent une activité :

- ✓ Modérément inhibitrice sur 46,66% des souche avec une dose de 100 µl pour le citron
- ✓ fortement inhibitrice sur 53,33%des souches avec une dose de 100 µl pour la lavande
- ✓ Légèrement inhibitrice sur 66,66% des souches avec une dose de 50µ pour le mélange

Dans la figure suivante, nous présentons l'activité du citron sur les souches d'*E. coli*



**Figure 17 : Effet de l'HE du citron sur les souches d'*E. coli* testées**

Selon l'échelle citée par **Mutai et al., (2009)**, l'HE de citron est modérément inhibitrice sur 20% des souches avec 50  $\mu$ l et sur 46,66% des souches avec 100  $\mu$ l, ce qui indique que l'effet inhibiteur augmente avec l'augmentation de la dose de l'HE (Fig17) (activité dose-dépendante)

A la dose de 50  $\mu$ l, l'HE de Citron est légèrement inhibitrice sur 26,66% des souches, non inhibitrice sur 33,33% des souches et elle est fortement inhibitrice sur 20% des souches pour les deux doses.

On note que la concentration des huiles essentielles influence l'activité inhibitrice, plus la concentration de l'extrait augmente plus les diamètres d'inhibition sont importants. le même constat a été fait par **Karagoz et al., (2010)**.

Selon **Cosentino et al. (1999)** et **Gulfraz et al. (2008)**, l'activité antimicrobienne de toutes les huiles essentielles est assignée aux terpénoïdes et aux composés phénoliques.

Dans la figure suivante , nous présentons l'activité de l'HE de lavande sur les souches d'*E.coli*.

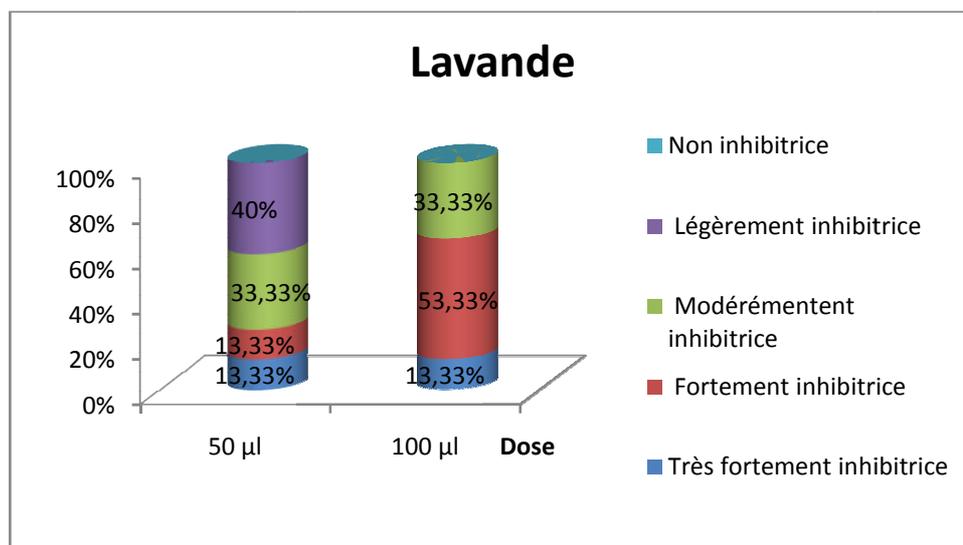


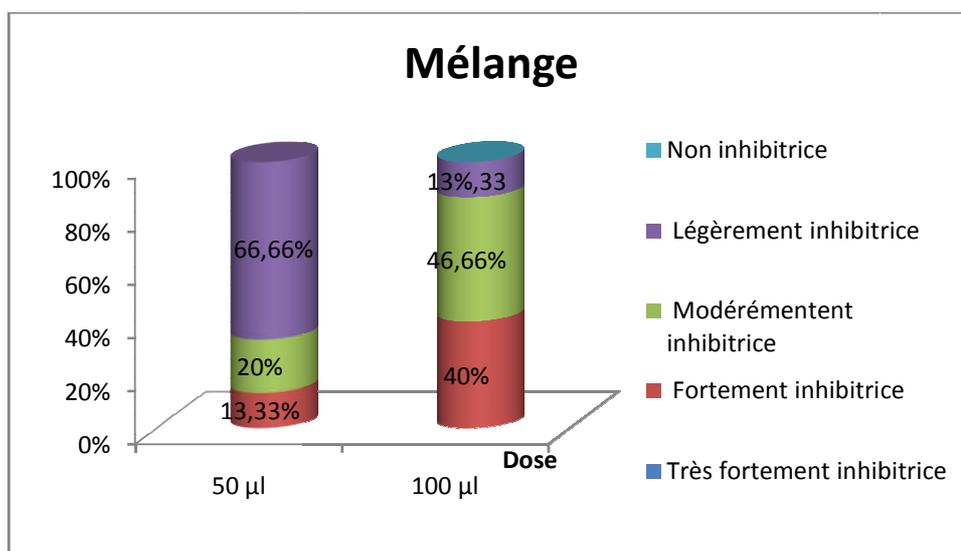
Figure 18: Effet de l'HE de lavande sur les souches d'*E.coli* testées

La figure 18 montre que l'HE, à la dose de 50  $\mu$ l, est légèrement inhibitrice sur 40% des souches, modérément inhibitrice sur 33,33% des souches et très fortement inhibitrice sur 13,33 % des souches et on trouve la même activité pour ces deux dernières classes à 100  $\mu$ l. Elle est fortement inhibitrice sur 13,33% des souches avec 50  $\mu$ l et elle augmente pour atteindre son activité sur 53,33 % des souches testées avec 100  $\mu$ l.

Ces résultats obtenus indiquent que l'HE de lavande a une forte activité sur *E.coli* par rapport à l'HE de citron.

Les trepénoides et leurs dérivés oxygénés sont les composants principaux des HE. Ces composés ont un potentiel inhibiteur fort sur les souches bactériennes pathogènes. (Gudzić et al., 2002)

Dans la figure suivante, nous présentons l'activité de l'association des deux HE sur les souches d'*E.coli*



**Figure19 : Effet de l'association des deux HE sur les souches d'*E.coli* testées**

En utilisant des disques imbibés de 50  $\mu$ l, l'association des deux HE (citron et lavande) est fortement inhibitrice sur 13,33% des souches, modérément inhibitrice sur 20% des souches et légèrement inhibitrice sur 66,66% % des souches (Fig19). A 100  $\mu$ l, elle est fortement inhibitrice sur 40% des souches, modérément inhibitrice sur 46,66% des souches et légèrement inhibitrice sur 13,33% des souches.

On observe une augmentation de l'activité de ce mélange avec l'augmentation de la dose dans la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> classe par contre, nous constatons une diminution de l'activité malgré l'augmentation de la dose dans la 4<sup>ème</sup> classe, elle pourrait avoir une activité dose-indépendante.

Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne.

Cela peut induire un changement de conformation de la membrane. (Cox *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2002).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a été aussi rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995).

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

#### a) Efficacité des trois HE sur *S. aureus*

Les résultats mentionnés dans le tableau VIII, illustrés par les figures 20, 21, 22 montrent l'efficacité des HE sur des souches de *S. aureus*.

**Tableau VIII : distribution des souches de prélèvement de *S. aureus* étudiées selon le type d'effet exercé par l'HE**

Classe	Association	Très fortement inhibitrice		Fortement inhibitrice		Modérément inhibitrice		Légèrement inhibitrice		Non inhibitrice		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
citron	50µl	12	80	3	20	0	0	0	0	0	0	15	100
	100µl	13	86,66	2	13,33	0	0	0	0	0	0	15	100
lavande	50µl	15	100	0	0	0	0	0	0	0	0	15	100
	100µl	15	100	0	0	0	0	0	0	0	0	15	100
Mélange	50µl	12	80	3	20	0	0	0	0	0	0	15	100
	100µl	15	100	0	0	0	0	0	0	0	0	15	100

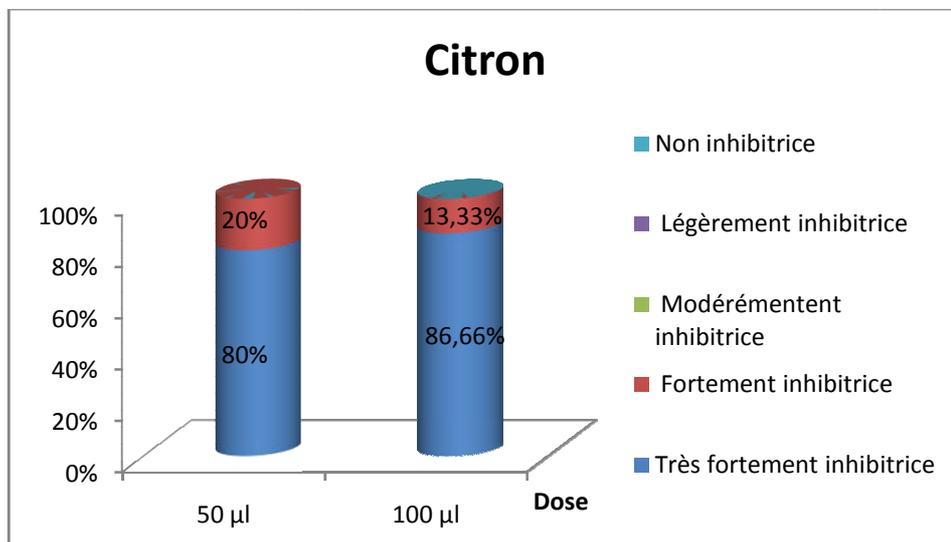
N : Nombre de souches. % : pourcentages des souches dans la classe correspondante

Sur les souches de *S. aureus* les HE utilisées dans notre travail montrent une activité :

- ✓ Très fortement inhibitrice sur 86,66 % des souches avec une dose de 100 µl pour le citron
- ✓ Très fortement inhibitrice sur 100% des souches avec les deux doses pour la lavande

- ✓ Très fortement inhibitrice sur 100% des souches avec une dose de 100 $\mu$ l pour le mélange.

Dans la figure suivante, nous présentons l'activité du citron sur les souches de *S. aureus*



**Figure 20: Effet de l'HE du citron sur les souches de *S.aureus* testées**

La figure 20 montre que l'HE est très fortement inhibitrice sur 80% des souches avec 50 $\mu$ l et sur 86,66% avec 100  $\mu$ l. En revanche, elle est fortement inhibitrice sur 20% des souche à 50  $\mu$ l et sur 13,33% des souches à 100  $\mu$ l

**Winward *et al.* (2002)** ont montré que la nature antimicrobienne des HE est apparemment en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et carvacrol. Ces résultats sont en accord avec ceux donnés par (**Sokmen *et al.*, 2004 ; Fella *et al.*, 2006**). Ils ont prouvé que, plus les teneurs phénols sont élevées, plus les HE sont efficaces.

Par ailleurs, **Kaloustian *et al.* (2008)** confirment que ce sont les phénols (thymol, carvacrol) qui donnent à l'HE le caractère antibactérien, comme cela a également été souligné dans d'autres études (**Valero, 2006; Horvath, 2002**)

**Hilan et Sfeir (1998)** ont prouvé que le thymol est 20 fois plus antiseptique que le phénol.

Dans la figure suivante , nous présentons l'activité de l'HE de lavande sur les souches de *S.aureus*

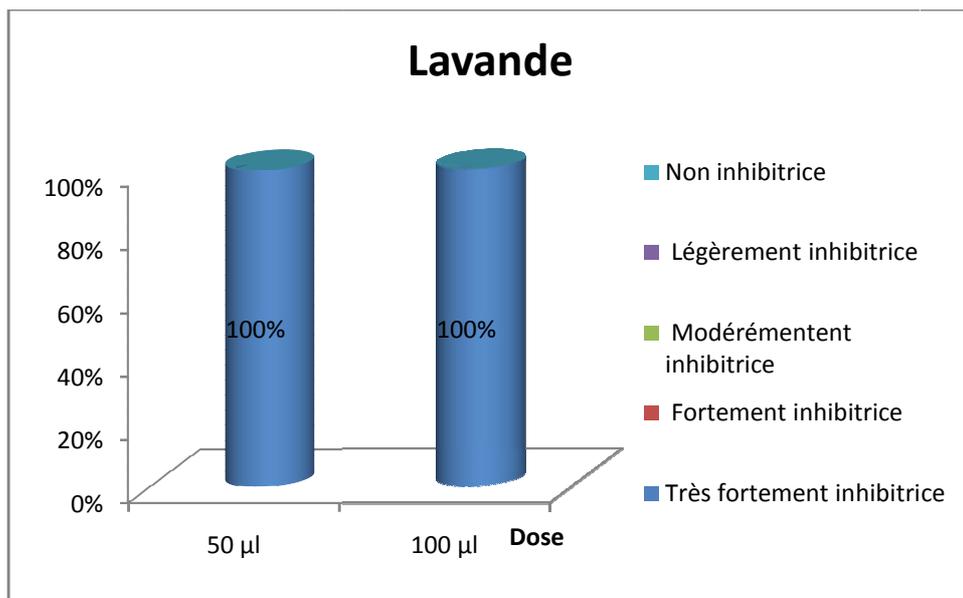


Figure 21: Effet de l'HE de lavande sur les souches de *S.aureus* testées

L'HE de lavande est très fortement inhibitrice sur 100% des souches quelque soit la dose.

Les propriétés antibactériennes de composants actifs des HE sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cytoplasmiques, et l'épuisement de la force motrice des protons. (Helander et al., 1998).

Dans la figure suivante, nous présentons l'activité de l'association des deux HE sur les souches de *S.aureus*.

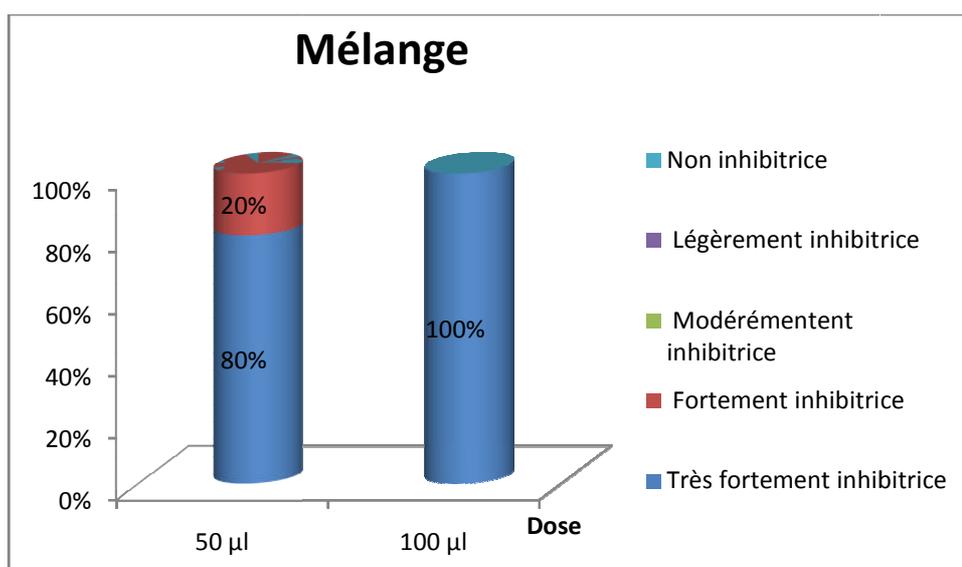


Figure 22 : Effet de l'association des deux HE sur les souches de *S.aureus* testées

L'association des deux HE est très fortement inhibitrice sur 80% des souches et fortement inhibitrice sur le reste des souches, avec des disques imbibés de 50µl. En revanche à 100 µl, l'association est très fortement inhibitrice aussi mais sur 100% des souches.

### II-1-3-Etude de la sensibilité des souches de prélèvement

selon l'échelle de (Mutai *et al.*, 2009), Le comportement des souches et leur sensibilité vis-à-vis des deux HE et leur association sont présentés dans les tableaux (IX ,X) et illustrés par les figures (23,24)

#### a) Sensibilité de *E. coli*

Les fréquences des souches de prélèvement d'*E. coli* selon leur sensibilité aux HE sont présentées dans le tableau ci-dessous

**Tableau IX : Fréquences des souches de prélèvement d'*Escherichia coli* selon leur sensibilité aux HE**

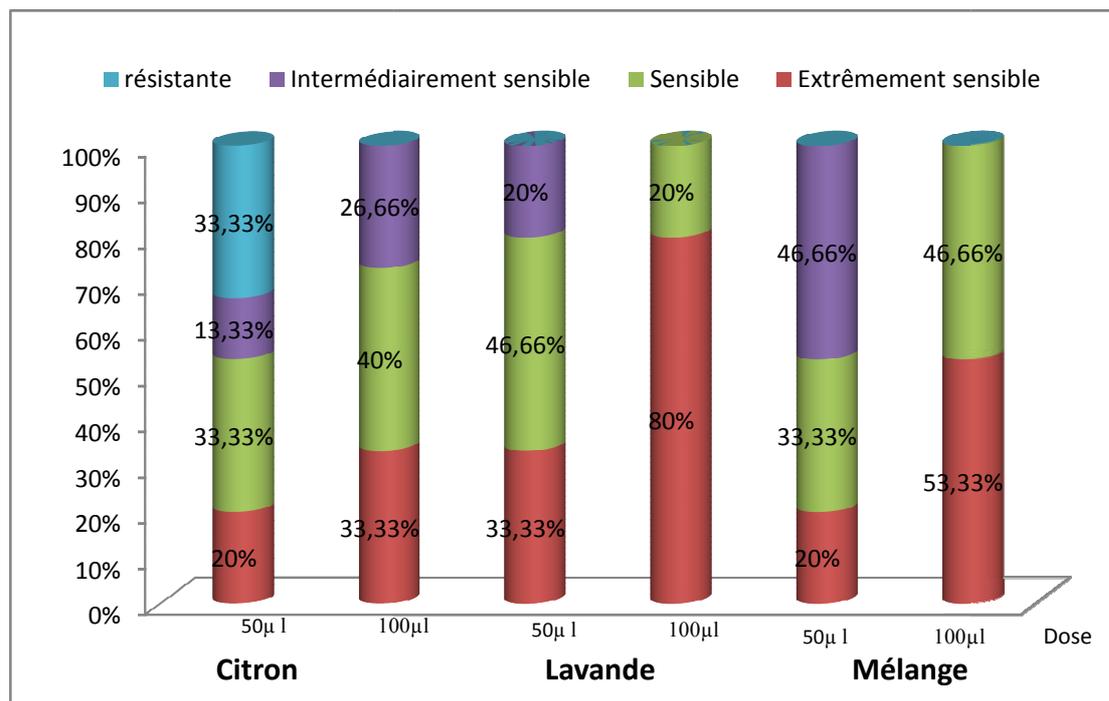
		Extrêmement sensible		Sensible		Intermédiairement sensible		résistante		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
citron	50µl	3	20	5	33,33	2	13,33	5	33,33	15	100
	100µl	5	33,33	6	40	4	26,66	0	0	15	100
lavande	50µl	5	33,33	7	46,66	3	20	0	0	15	100
	100µl	12	80	3	20	0	0	0	0	15	100
mélange	50µl	3	20	5	33,33	7	46,66	0	0	15	100
	100µl	8	53,33	7	46,66	0	0	0	0	15	100

N : Nombre de souches. % : pourcentages des souches dans la classe correspondante

D'après notre étude, nous avons obtenu les résultats suivants :

- ✓ 40% des souches testées sont sensibles à 100µl pour le citron
- ✓ 80% des souches testées sont extrêmement sensibles à 100µl pour la lavande
- ✓ 53,33% des souches testées sont extrêmement sensibles à 100µl pour le mélange

Dans la figure suivante, nous présentons la sensibilité de *E.coli* vis-à-vis les HE



**Figure 23: Répartition des souches d' *E.coli* selon leur sensibilité aux HE**

20% des souches sont extrêmement sensibles à l'HE de citron dans le cas de disques imbibés de 50 µl alors qu'à 100 µl, 33,33% sont extrêmement sensibles et 40% sont sensibles par contre à 50 µl, 33,33% sont sensibles et 13,33% sont intermédiairement sensibles. On constate aussi qu'à 100 µl, 26,66% des souches sont intermédiairement sensibles.

On remarque qu'il y a un faible pourcentage correspondant à des souches résistantes au HE de citron de 33,33% à 50 µl.

La grande résistance des bactéries à Gram(-) est liée en partie à la complexité de la paroi cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram(+) (Poole et al., 2001).

*E. coli* s'est avérée sensible, malgré qu'elle est Gram négatif.

Il est postulé que les différents composants des HE de différents degrés d'activité contre des bactéries Gram(-) et Gram(+) (Dorman et Deans, 2000) et que la composition chimique des HE peut varier selon plusieurs facteurs intrinsèque et extrinsèque (Lahlou, 2004).

Il est connu aussi que les espèces bactériennes n'ont pas également la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et

après une diminution du nombre de bactéries, il y'a une reprise de la croissance bactérienne.(Dorman et Deans, 2000).

A 50µl 33,33% des souches sont extrêmement sensibles à l'HE de lavande et 80% sont extrêmement sensible à 100µl .

46,66% des souches sensibles à 50µl et 20% sont intermédiairement sensibles en utilisant la même dose. par contre, avec des disques de 100 µl d'HE, 20%des souches sont sensibles.

Dans le cas de l'association, à 50 µl, 20% des souches d'*E.coli* sont extrêmement sensibles, 33,33% sensibles et 46,66% sont intermédiairement sensibles.

Par contre, en utilisant 100 µl par disque, 53,33% des souches sont extrêmement sensibles et 46,66% sont sensibles.

### b) la sensibilité de *S. aureus*

Les fréquences des souches de prélèvement de *S.aureus* selon leur sensibilité aux HE sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau X: Fréquences des souches de prélèvement de *S. aureus* selon leur sensibilité aux HE**

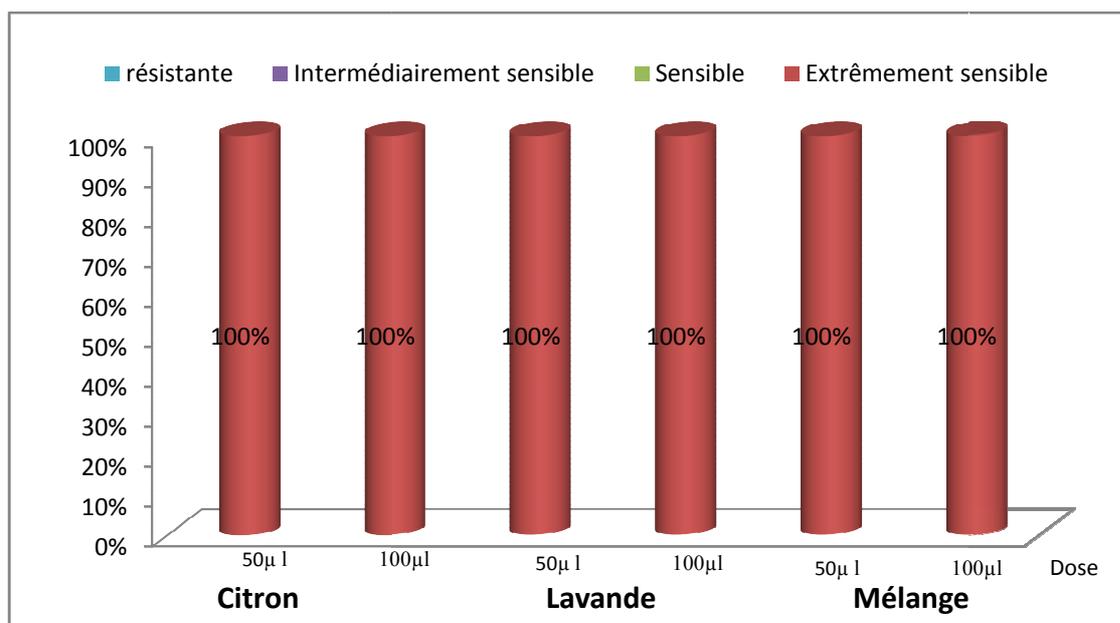
		Extrêmement sensible		Sensible		Intermédiairement sensible		résistante		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
citron	50µl	15	100	0	0	0	0	0	0	15	100
	100µl	15	100	0	0	0	0	0	0	15	100
lavande	50µl	15	100	0	0	0	0	0	0	15	100
	100µl	15	100	0	0	0	0	0	0	15	100
mélange	50µl	15	100	0	0	0	0	0	0	15	100
	100µl	15	100	0	0	0	0	0	0	15	100

N : Nombre de souches. % : pourcentages des souches dans la classe correspondante

La sensibilité des souches de *S.aureus* testées vis-à-vis des trois HE montrent les résultats suivants :

On observe les même résultats pour chaque huile, c'est à dire que 100% de nos souches sont extrêmement sensibles quelque soit la dose utilisée.

Dans la figure 24, nous présentons la sensibilité des *S. aureus* vis-à-vis les HE .



**Figure 24: Répartition des souches de *S. aureus* selon leur sensibilité aux HE**

Toutes les souches sont extrêmement sensibles vis-à-vis les deux HE ainsi que le mélange en utilisant les deux doses (50µl et 100µl). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'efficacité des deux HE et du mélange, ainsi par la perméabilité de la paroi bactérienne vis-à-vis de leurs composants, tels que les phénols qui sont responsables des dégâts irréversibles au niveau de la membrane et des parois cellulaires (**Winward et al., 2002**).

En général, le premier site d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique. Ceci est directement lié à l'hydrophobicité des molécules qui entrent dans la composition des huiles essentielles. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Il s'ensuit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires (**Sikkema et al., 1994; Cox et al., 2000 ; Ultee et al., 2002 ; Carson et al., 2006**). En plus des altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (**Cristani et al., 2007**). Compte tenu de la diversité moléculaire des huiles essentielles, il semble plus probable que leur activité antibactérienne résulte de l'association de plusieurs mécanismes, qui s'exercent sur différentes cibles cellulaires (**Burt, 2004**). Les huiles essentielles d'*I. graveolens* et de *S. corsica* semblent agir simultanément sur la paroi cellulaire et la membrane plasmique. L'identification de nouveaux antibactériens se base sur la recherche de molécules capables

d'induire la mort cellulaire, en agissant simultanément sur plusieurs cibles bactériennes ou en développant de nouveaux mécanismes d'action. La complexité et la diversité moléculaire des huiles essentielles font de ces dernières des candidates privilégiées pour entreprendre de telles Recherches (Lawrence, 1999).

#### II-1-4-comparaison entre les moyennes des différents tests et les diamètres de la souche de référence

Le tableau XI présente les moyennes des diamètres d'inhibition des 15 souches de prélèvement d'*E.coli* ainsi que les diamètres d'inhibition de la souche de référence ATCC 25922

**TableauXI : Comparaison entre les 15 souches de prélèvement d'*E.coli* et la souche de référence.**

HE	Citron D (mm)		Lavande D (mm)		Mélange D (mm)	
	50µl	100 µl	50µl	100 µl	50µl	100 µl
Moyenne	11,63	17,4	19,66	23,2	15,23	19,6
ATCC 25922	25	36	19	35	20	39

Selon le tableau XI, on remarque que les diamètres d'inhibition de croissance de la souche de référence correspondant aux deux HE et leur association sont légèrement supérieur à la moyenne des 15 souches de prélèvement d'*E. coli*, ce qui prouve que ces HE sont efficace sur la souche de référence.

Le tableau XII présente les moyennes des diamètres d'inhibition des 15 souches de prélèvement de *S. aureus* ainsi que les diamètres d'inhibition de la souche de référence ATCC 25923

**TableauXII : Comparaison entre les 15 souches de prélèvement de *S.aureus* et la souche de référence.**

HE	Citron D (mm)		Lavande D (mm)		Mélange D (mm)	
	50µl	100 µl	50µl	100 µl	50µl	100 µl
Moyenne	32,7	39,16	39	46,86	33,26	41,46
ATCC 25923	30	41	39	46	24	31

Selon le tableau XII, on remarque qu'il n'y a pas une grande différence entre le diamètre d'inhibition de la souche de référence et les 15 souches de prélèvement dans le cas de l'HE de citron et la lavande, en revanche, on observe que le diamètre d'inhibition de croissance de la souche de référence correspondant au mélange est légèrement inférieure à la moyenne des 15 souches de prélèvement de *S. aureus*.

A partir de ces résultats, il semblerait que le comportement des souches vis-à-vis des HE utilisées est plus ou moins compatible avec celui des souches de références.

## II-2-Effet antibactérien

Pour les *Escherichia coli* :

HE de citron a donné un effet bactériostatique.

HE de la lavande et l'association d'HE ont donné un effet bactéricide (figure25)

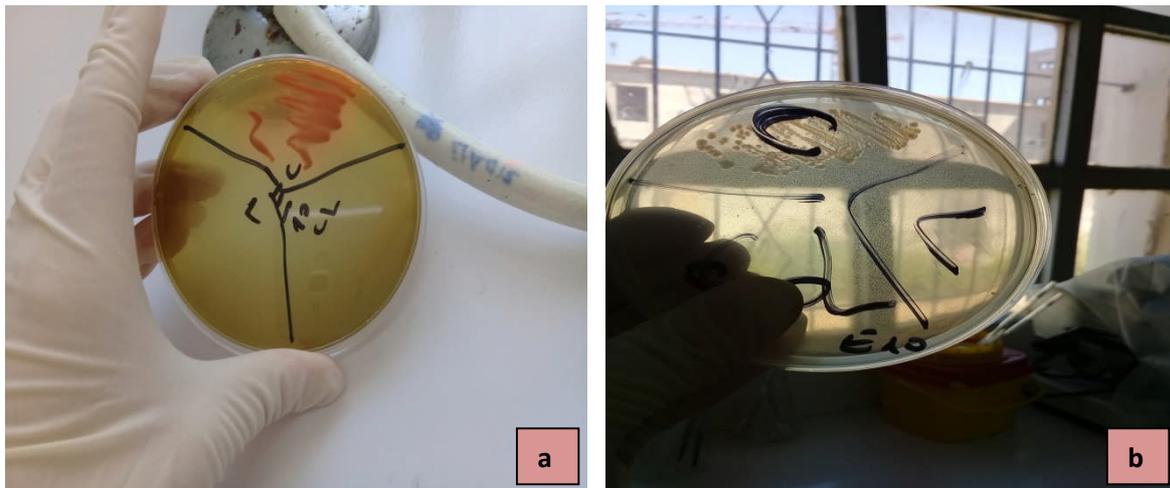


Figure25 :photos originales d'un résultat de l'effet antibactérien des deux HE et le mélange sur les *E.coli* (a,b)

Pour les *Staphylococcus aureus* :

Toutes les HE ainsi que l'associations d'HE ont donné un effet bactéricide.(figure26)



**Figure 26: résultat de l'effet antibactérien des deux HE et le mélange sur les *S.aureus* (photos originales)**

### **II-3-résultat de test de contrôle**

On a obtenu un résultat négatif pour le disque vierge testé, c'est à dire qu'il n'a aucune activité sur les bactéries

## Conclusion

Les micro-organismes existent sur la terre depuis des milliards d'années avant même l'apparition des plantes et des animaux (MICHEAL *et al.*, 2007).

Les premiers êtres vivants étaient les bactéries, le monde bactérienne a été le seul monde vivant pendant près de deux milliards d'années (BACH, 2009). L'évolution de la diversité de microorganisme largement dépassé celle des autres organismes, cette diversité fait partie de leur nombreuses propriétés.

Parmi les espèces pathogènes les plus connus dans le monde Bacteria on distingue *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui on une grande importance sur le plan clinique dans la médecine vétérinaire.

En outre, les huiles essentielles sont actuellement candidates à de multiples applications de traitement ou de conservation.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne de *Citrus limon* et *Lavandula strikas*, vis-à-vis des souches bactériennes Gram positives et Gram négatives (*S. aureus* et *E. coli*).

Dans notre étude, l'activité antibactérienne des HE a été évaluée par la méthode d'aromatogramme.

Les huiles essentielles ainsi que leurs associations ont donné des résultats différents : les deux HE testées ainsi que leur association ont montré une efficacité remarquable sur les souches d'*E. coli* testées malgré leur résistance connu aux antibactériens, par contre on a obtenu des résultats très importants pour les *S. aureus* et ce qui montre l'intérêt de ces HE dans la thérapeutique et motive son exploitation afin de mettre au point son utilisation comme traitement alternatif.

Toutefois, ces résultats restent préliminaires et afin de les approfondir, d'autres approches et études sont souhaitables a réaliser, il serait intéressant de :

- Comparer les diamètres d'inhibitions des huiles essentielles à ceux des antibiotiques,
- Déterminer les concentrations minimales inhibitrices,
- Etablir des synergies de différents composés de diverses HE en plus d'étudier d'autres propriétés biologiques de ces HE, à savoir les propriétés anti-inflammatoires, antivirales, antiparasitaires et insecticides.

D'étudier le mode d'action des huiles essentielles au niveau cellulaire sur les souches bactériennes. De même que la cinétique d'inhibition au cours de la croissance bactérienne.

-D'effectuer des études sur l'association d'antibiotiques avec des HE connues par leur pouvoir antibactérien afin d'aller plus loin dans la recherche concernant ce domaine prometteur

-D'utiliser la biologie moléculaire dans une recherche pareille afin d'expliquer, à l'échelle moléculaire et génétique, le comportement des *E.coli* et *S.aureus* vis-à-vis des huiles essentielles.

-De passer aux études *in vivo* et cliniques et de tester les composés majoritaires des huiles isolement ou en synergie, ainsi qu'effectuer des tests toxicologiques surtout quand il s'agit d'une huile essentielle à usage interne car il faut faire la différence entre plante à HE et HE : si l'innocuité de la première est établie cela ne signifie pas que son HE est sans danger.

## Références bibliographiques

- Arpino P.**, Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. II, Techniques-Ingénieur, **2008**, pp.1491–2,4.
- ARIL JL, DABERNAT H, DENIS F, MONTEIL H.** La Bactériologie clinique 2<sup>ème</sup> édition section IV 1988 ; P : 149.
- .-**ALLERBERGER F, WAGNER M., SCHWEIGER P, RAMMER HP, RESCH A, -DIERICH MP, ET AL.** *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk.*Euro Surveill* 2001 ; 6 :147-151.
- BUTTIAUX R, LE MINOR L, GAUDIER B, LE MINOR S, ET NICOLLE P.** « Epidemiologie research on gastroenteritis due to *Escherichia coli* in a Hospital in Northern France ». Dans *Arch Mal Appar Dig Mal Nutr* 1956 ; 45 : 225-247.
- Bergey's Manual of systematic Bacteriology .2001.** 2<sup>ème</sup> Edition .vol 1.
- BARANYI J, ROBERTS TA.** Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* 1995 ; 26 :199-218.
- Burt, S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223-253.
- Burt, S. A. et Reinders, R. D., 2003.** "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7" *Letters in Applied Microbiology* 36- 3: (162-167).
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales, *Tec et Doc*, Paris, 1119.
- Bardeau F. (1976).** La médecine par les fleurs. Ed. Robert Laffont.
- Benayad N. (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Université Mohammed V-Agdal, Maroc, 61.
- Bego Ph. (2001).** Connaitre l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, p.2-3.
- Belaiche P. (1979).** Aromatogramme. In *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Edition Maloine-S-S, tome I. p. 9-20.

- Benjlali B.** (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement a la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante a la commercialisation. P 17-59.
- Bisignano G, Saija A, Trombetta D., 2007.** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 6300-6308
- BUTTIAX R. et BEERENS H. et TACQUET A. (1966).** Manuel de techniques bactériologiques. 2 éme Ed. médicales Flammarion. Paris. P 371-376.
- BOURGEOIS C. M. et MESCLE J. F. et ZUCCA J. (1988).** Microbiologie alimentaire. Ed. Technique et documentation-Lavoisier. Paris, p 65-74.
- Barboni T.,** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie, Thèse de doctorat, Université de Corse, **2006**, pp.21.
- CAMILLE D. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire. Ed. Tec et doc. Paris. P 357-361.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV, 2006.** *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 50-62
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E and Palmas F., 1999.** *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils- Letters in Applied Microbiology; Vol. 29; pp 130-135.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG., 2000.**The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 170-175
- Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V,**
- Caillet, Lacroix. (2009).** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en science appliquées a l'alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand-Frappier.
- Chami. (2005).** Oregano and clove essential oil induce surface.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.F., Warmington J.R. et**

- Wyllie S.G., 2000**, The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tee tree oil), *Journal of Applied Microbiology*, p:170-175.
- CHALMERS RM, AIRD HOLTON, ET BOLTON FJ.** Waterborne *Escherichia coli* O157. *Journal of applied Microbiology* 2000; 88(supplement):124S-132S.
- Dobrint U. (Path-) genomics of *Escherichia coli* .Int J .Med Microbiol** 2005; 295:357-378
- De Billerbeck K.V.G., Roques C., Vanière P., et Marquier P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits a base d'huiles essentielles. *Hygiène*, 10(3), 248-251.
- Dayan F., Cantrell C.L., et Duke S.O. (2009).** Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- Duraffound C., Hervicourt L.et Lapraz J.C. (1990).** Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.
- Duarte M.C.T., Fingueira G.M., Sartoratto., Rehder V.L.G and Delarmelina C.(2005).** Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305-311.
- Département fédéral de l'intérieur DFI **Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires OSAV** Santé animale 412/2014/
- Dorman, H. J. D. et Deans, S. G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88- 2: (308-316).  
-Elsevier, 2016)
- EVANS J, CHALMERS R.,CHART H, SALMON R.L,KENCH SM,COLEMAN TJ,ET AL.** Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England.*Eur J Epidemiol* 2002 ;16 :885-889.
- Escobar □Paramo, P. et al..** Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* **8**, 19 :75-84 (2006).

- Fellah S., Romadhane M., Abderrab M., 2006.** Extraction et étude des huiles essentielles de *la Salva officinalis*. L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie- Journal de la Société Algérienne de Chimie J. Soc. Alger. Chi. ; Vol. 16 ; N° 2 ; pp 193-202.
- France-Ida J. (1996).** Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essence, 3 :5-6.
- FLAUDROIS JP.** Bactério Géné /croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médicale DCEM1UFR Médecine Lyon Sud-Laboratoire de biométrie 2004.P :1-3-10.
- Fernandez X., Cabrol-bass D., Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. Sept. 2007,** pp. 3233-5, 10
- Guinoiseau E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action, Thèse de Doctorat, Université de Corse, 114.
- Greatorex J .S.,Thorene G .M.,1994 .**Hurmonal immune responses to shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects .J clin microbial 2000; P 32:1172-1178.
- Guyer, D.M., Radulovic, S., Jones, F.E. & Mobley, H.L.** Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells.*Infect Immun* **70**, 45 : 39-46 (2002).
- Gulfraz M., Mehmood S., Minhas N., Jabeen N., Kausar R., Jabeen K. and Arshad G., 2008,**Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*, AfricanJournal of Biotechnology Vol. 7 (24), p.4364-4368.
- Gudzic ;B, djokovic.D;Vajs, V; Palic,R; Stojanovic,G; Flavour Frag J.2002 17(5)392-394**
- Helander , IM;** Alkone, HL journal of agriculture and food chemistry 1998: 3590-3595
- HINANA S. et SLAMAT K. (2005).** Isolement et identification du *S.aureus* des prélèvements génitaux chez la femme. Mémoire de fin d'études supérieures de microbiologie. Université Kasdi Merbah Ouargla. P 12-13.
- Hilan C., et Sfeir R., 1998.** Antimicrobial effect of essential oil of *Salvia libanotica* (sauge)- The British Journal of Phytotherapy ; Vol. 4; pp 155-162.
- Isman M.B. (2000).** Plant essential oils for pest ans dieseae management. *Crop protection*,

19(8), 603-608.

**-Iserin P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales. Ed : Larousse Bourdasse. Paris.

P335.

**-JEROME J. P. et JAMES T. S. et STEPHEN L. (2004).** Microbiologie. Ed. Dunod. Paris. P 479.

**-JEAN-LOUIS F. et JEAN-LOUP A. (2002).** Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses Edition Marketing. Paris. P 214-216-217

**-Kurita, Koike. (1982).** Systematic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. Agric. Biol. Chem., p 46-159-165.

**-Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2:123-140.

**-Levine M, .1987.** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enter hemorrhagic, and enter adherent. J. infect. is. p 155:377-389.

**-LOBRIL JR.** Réévaluation du modèle de croissance de Monod : effets des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de l'université de Lyon I France 1998 : 42-77.

**-LE MINOR L, NICOLLE P, BUTTIAUX R, GAUDIER B, CHABBERT Y, ET LE MINOR S** « Studies on *Escherichia coli* isolated in infantile gastroenteritis ». Ann Inst Pasteur 1954; 86: 204-187.

**-Legrand. (1978).** Manuel préparatoire en pharmacie. 8ème éd. Masson.

**-Lemberg. (1982).** « Armoise » *Artémisia herba alba*. Perfumer flavorist, 7, p58-63.

**-Lahlou M. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *phytotherapy research*, 18(6), 435-448.

**-Lucchesi, 2005 Ilboudo, 2009).**

**-Lagunez –Rivera L. (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; Thèse

**-Laverdière F., Holstein A., Thiebaut L., Mallee R., Gravejat G., Dossier *Couplage*, 1999,** pp.21.

**-Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D., Roussis V., 2009.** Antimicrobial activity of *acacia mellifera* extracts and *lupane triterpenes*. Journal of Ethnopharmacology: doi: (10.1016/j.jep.02.007).V :123 : 143-148

**-Montet M., 2009.** Contamination des aliments par *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines

(stec) en France, et importance de l'acide-résistance de la souche. *This école pratique des hautes études*. p72.

**-MICHAEL M. et JOHN M. et THOMAS B. (2007).** Biologie des microorganismes. 11<sup>ème</sup> Ed. Pearson éducation France. Paris. P 379.

**-Marriotta P-J., Shelliea R., Cornwellb C.** Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, Vol. 936, Issues: 1–2, **2001**, pp. 1–22.

**-Nedjai Ibtissem et Salma , 2017**

**-NICOLET, C.** Comment réussir en aromathérapie *Le Quotidien du pharmacien*, n°2719, janvier 2010.

**-Newman A.A.,** Chemistry of Terpenes and Terpenoids, Academic Press, London, New York, **1972**

**-OLLIER, C.** Aromathérapie - Le bon usage *Le Moniteur des pharmacies*, cahier II du n°2767, février 2009.

- **OLLIER, C.** L'aromathérapie *Le Moniteur des pharmacies*, cahier II du n°2576, avril 2005.

**-OLLIER, C.** L'essentiel de l'aromathérapie *Le Moniteur des pharmacies*, cahier II du n°2341, février 2000.

**-Ollier, C. 2011.** Le conseil en phytothérapie. 2<sup>ème</sup> édition. PRO-OFFICINA. 178p

**-O'BRIEN AD, LAVECK GD, THOMPSON MR., FORMAL S.B.** production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1982 ;146 :763-769.

**-OGDEN ID, HEPBURN NF ,MACRAE M,STRACHAN NJ,FENLON DR**

**Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M.I., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M.A., Belabbas M.A., 2007.** Antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L. , comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques-Phytothérapie ; Vol. 1 ; pp 6-14

**-Pibiri Cécille M.,** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de doctorat, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, **2006.**

**-Paolini J.,** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE ET IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux astéracées endémiques de Corse : *Eupatorium*

*cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*, Thèse de doctorat, Université de Corse 2005, p.26, 38.

**-PATON AW,SRIMANOTE P,WOODROW MC, PATON JC** .Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxinogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans.*infect Immun* 2001 ;69 :6999-7009

**-Pool,K;** << current opinion in microbiology>>, 2001: 500-508

**-PILET C. et BOURDON J. L. et TOMA B. et MARCHAL N. et BALBASTRE C.** (1983). Bactériologie médicale et vétérinaire. 2<sup>ème</sup> Ed. France. P 40-46

**-Roux D.et Catier O. (2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie : Wolters Kluwer France, 146.

**-Rhayour K.,** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia*

*coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de Doctorat, 2002, pp.9,10,17.

**-ROUX, D.** *Conseil en aromathérapie*, 2<sup>ème</sup> édition Pro-officina, mars 2008.

de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE ; p. 31-42.

**-Remmal et al., 1993).**

**,-RUSBRIDGE SM,PENNINGTON TH.** Long-tem survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp.Lett Appl Microbiol 2002 ; 34 :100-104.

**-Stewart et al.** Plos Biology February 2015.

**.-SURVEILLANE E.** Surveillance des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et du

syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Europe. DGV de la commission des communautés européennes 1997 ; p : 12.

**-STRACHAN NJ, DUNN GM, LOCKING ME, REID TM, OGDEN ID.** *Escherichia coli* O 157 : burger bug or environmental pathogen ?Int J Food Mmicrobiol 2006 ; 112 :129-137.

**-Lawrence, B-M., 1999.** Progress in Essentials Oils. *Perfumer & Flavorist*. **24**: 41-50

**.-Sokmen A. Gulluce M. Akpulat H.A. Daferera D., Tepe B., Polission M., Sokmen M., Sahin F., 2004.** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and menthol extracts of endemic *Thymus Spathulifolius* ; Food Control, Vol. 15; pp 627- 634

- Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022-8028
- Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R., 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1561-1568
- Valero M., Francés E., 2006.** Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth- *Food Microbiology*; Vol. 23; pp 68-73
- Vila R., Mundina M., Tomi F., Fursan R., Zacchino S., Casanova J., Canigreal S.,** Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*, Vol. 68, **2002**, pp. 164-167.
- Valnet J. (2000).** Aromathérapie. Ed. Maloine S. A.alteration of *saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res.* 19(5), 405-8.
- Vila et Coll., 2002**
- VERNOZY-ROZAND C, MONTET MP,BERARDIN M.,** Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France.*Lett Appl Microbiol* 2005 ;41 : 235-241.
- WILLEY J. M. et SHERWOOD L. M. et WOOLVERTON C. J. (2010).** Microbiologie. 3éme de Boeck université. Bruxelles. P 582.
- Winward G.P., Avery L.M., Stephenson T., Jefferson B., 2002-** Essential oils for the disinfection of grey water-*Tech Rep Ser*; Vol. 905; pp 1-109.
- Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L. Vergnes M. F., 2008.** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne- *Phytothérapie* ; Vol. 6 ; pp 160-164.
- Wendakoon C. N. et Sakaguchi M., 1995,** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices, *Journal of Food Protection* 58, p. 280-283.

<http://www.francoistournay.fr/2.html> Page consultée le 15 juin 2010