

## **Résumé : Lutte biologique par l'huile essentielle de *Zingiber officinale***

Les huiles essentielles possèdent des activités antibactériennes importantes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants .Ce qui nous a conduits à effectuer l'étude de l'activité antibactériennes d'huile essentielle de la plante *Zingiber officinale* sous ses deux formes fraîche et séchée et d'évaluer leurs propriétés physicochimiques, afin d'avoir une idée sur la pureté des huiles essentielles obtenues et donc l'efficacité de la technique d'extraction choisie.

D'après les résultats obtenus on remarque que le rendement en huile essentielle est de l'ordre de 0.91% pour la plante fraîche et de 0.76% pour la plante séchée est conforme aux standards international.

Les résultats des analysés physicochimiques de l'huile essentielle sont conformés aux normes (AFNOR) l'activité antimicrobienne a donné des résultats intéressantes inhibition de la croissance de la souche *E.carotovora* avec des taux qui dépassent 96.15 % pour l'huile essentielle issus des rhizomes fraîches et de 65.38 % pour l'HE issus des rhizomes séchées pour une dose de 0.5% (V/V).

**Mots clés** : huile essentielle, *Zingiber officinale*, activité antibactérienne, paramètres physicochimiques, taux d'inhibition.

## *Remerciement*

*Comme nous le faisons, et nous le ferons toujours, nous remercions, incessamment, le bon Dieu qui nous a accordé courage, patience et volonté pour pouvoir verser cette goutte dans l'océan de la science.*

*Je tiens particulièrement à remercier Madame BENOURAD Fouzia, de dirigé ce travail, tout au long de sa réalisation, pour ses précieux conseils et qu'elle puisse voir en ce travail l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mme. SAIH Farida, de m'avoir fait honneur de présider ce jury.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Mlle BOUALEM Malika l'Université de Mostaganem, Département d'Agronomie Biologie, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je ne saurai oublier de remercier les techniciennes du laboratoire de protection des cultures a leurs gentilleses et leurs aides dans la réalisation de ce modeste travail.*

# **DEDICACE**

*je dédie ce modeste travail :*

*Aux deux être le plus chers au monde, qui ont souffert nuit et jour pour nous couvrir de leur amour, mes parents.*

*A mon père pour sa patience avec moi et son encouragement.*

*A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère*

*Que le bon ALLAH vous garde en bonne santé ;*

*Je dédie aussi ce modeste travail :*

*A mon très cher frère et mes sœurs ;NAJET ,KHALIDA et ma jolie nièce DJOURI*

*Ainsi que pour toutes mes amies.*

**KHELLAF NOUR EL HOUDA**

## SOMMAIRE

**Résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des photos**

**Introduction générale**

### CHAPITRE I: GENERALITE SUR Le GINGEMBRE

I.Zingiber officinale .....	1
I.1. Définition du Gingembre .....	1
I.2.Description botanique du gingembre .....	2
I.3.Usages traditionnels et vertus alléguées.....	2
I.4.Principaux constituants du gingembre .....	3
I.6.Le Principe actif majeur.....	3
I.7.Toxicité .....	4
I.8.récole du gingembre.....	5
I.8.1. Etape de la maturité du gingembre .....	5
I.8.2. Le cultivar sélectionné .....	5
I.8.3. Processus de production du gingembre sec.....	5
I.8.4. Production d'huile essentielle de gingembre.....	6
I.9.Activités biologique de l'huile essentielle de gingembre .....	7

### CHAPITRE II : Généralité sur les huiles essentielles II

II.1.Définition.....	9
II.2.Classification .....	9

II.3.Répartition et localisation .....	9
II.3.1.Répartition .....	10
II.3.2.Localisation.....	10
II.4.Méthodes d'extraction .....	10
II.4.1.Hydro distillation .....	11
II.5.Caractéristiques des huiles essentielles.....	12
II -8- Mode d'action des huiles essentielles.....	14

### **CHAPITRE III : *Erwinia carotovora***

III.1. Introduction .....	15
III-2-Généralité sur le monde microbien.....	15
III.3.Morphologie et structure des bactéries.....	15
III.4.Bactéries Gram négatif .....	16
III.5.Genre <i>Erwinia carotovora</i> .....	16
III.5.1.Généralité .....	16
III.5.2.Classification .....	16
III.5.3. Dégâts occasionnés par <i>Erwinia carotovora</i> .....	16
III.6. Résistance des bactéries Gram négatif à certaines huiles essentielles.....	18
III.7. Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries .....	18
III.8.Principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des H.E. ....	19

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE I: Matériels et methodes :**

I.1.Objectifs .....	21
I.2.Structure du stage.....	21
I.3.Matériel biologique .....	21
3.1. Matériel végétale .....	21
I-2-Matériel microbiologique .....	21
I.3. Procédé d'extraction .....	22
I.4.Plan d'extraction .....	24
I.5.Plan d'expérimentation .....	25

I.6. Détermination du rendement d'extraction .....	26
I.7. Analyses physico-chimiques de l'huile essentielle .....	26
I.8. Activité antimicrobienne .....	28
I.8.1. Préparation du milieu de culture .....	28

## **CHAPITRE II**

I.1. Ecoulement.....	29
I.2. Préparation de l'inoculum .....	29
I.3. L'ensemencement .....	30
I.4. Préparation des disques d'aromatogramme .....	30
I.5. Préparation des dilutions d'huile essentielle .....	30

## **CHAPITRE III Résultats et discussions**

II-Résultats et discussion.....	33
II-1- Caractéristiques organoleptiques .....	33
II-2- Les analyses physico-chimiques de l'huile essentielle du Gingembre .....	33
II-3- Activité antimicrobienne .....	34
II-4- La concentration minimale inhibitrice d'huile de <i>Zingiber officinale</i> .....	37

## **CONCLUSION GENERALE**

### **Référence bibliographique**

### **ANNEXE**

## LISTE DES TABLEAUX

N	TITRE	PAGE
1	Rendements d'extraction selon l'état des rhizomes de Zingiber officinale	8
2	Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Zingiber officinale	8
3	Classification d' <i>Erwinia carotovora</i>	17
4	Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Zingiber officinale.	33
5	rendement et caractéristiques physicochimique de l'huile essentielle du Gingembre	34
6	Illustre les variations des taux d'inhibition des souches bactériennes apparues en présence de l'extrait de Zingiber officinale.	35
7	Diamètres (mm) des zones d'inhibition d'huile essentielle de Zingiber officinale (plante séchée) sur <i>Erwinia carotovora</i> .refractomètre	36

## LISTE DES PHOTOS

N	TITRE	PAGE
1	Matériel végétale utilisé (A)fraiche, (B) sèche	21
2	la pesé des échantillons	22
3	début d'extraction	23
4	distillat obtenu	23
5	pH mètre	27
6	densimètre	27
7	refractomètre	27
8	dispositif de titrage	28
9	préparation des dilutions et des boîtes dans les zones stériles	29
10	Réactivation de la souche (inoculum).	29
11	développement de la souche bactérienne sur la gélose nutritive additionnée de l'acétone (témoin).	37
12	effet d'une dose de 0.5% de l'huile essentielle (plante fraîche) sur la croissance bactérie <i>E.carotovora</i> .	37
13	effet d'une dose de 0.25% de l'huile essentielle (plante fraîche) sur la croissance de la bactérie <i>E.carotovora</i> .	38
14	effet des doses de 0.12% de l'huile essentielle (plante fraîche) sur la bactérie <i>E.carotovora</i> .	38
15	effet d'une dose de 0.5% de l'huile essentielle (plante séchée) sur la croissance de la bactérie <i>E.carotovora</i>	39
16	effet des doses de 0.25% de l'huile essentielle(plante séchée) sur la bactérie <i>E.carotovora</i>	39
17	effet d'une dose de 0.12% de l'huile essentielle (Plante séchée) sur la croissance de la bactérie <i>E.carotovora</i>	39



## LISTE DES FIGURES

N	TITRE	PAGE
1	Aspects morphologiques du <i>Zingiber officinale</i>	3
2	Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle	11
3	Illustration de la méthode d'aromatogramme	16
4	Représentation schématique de différentes étapes d'extraction	24
5	Représentation schématique du protocole expérimental	25
6	Représentation schématique des tests aromatoigramme réalisés	31
7	Histogramme présentant le taux d'inhibition de la croissance <i>E.carotovora</i> sous l'effet de différentes concentrations en huile essentielle issues de gingembre frais.	35
8	Histogramme présentant le taux d'inhibition de la croissance de la souche <i>E.carotovora</i> sous l'effet de l'huile essentielle issues de gingembre séché.	36



# *Introduction*

# Introduction

---

Depuis longtemps l'homme reconnaît et utilise les plantes pour se nourrir et pour traiter diverses maladies. Selon **HOSTETTMANN(1997)**, connaître une plante ayant des vertus médicinales suppose pouvoir décrire sa morphologie et son anatomie, connaître son origine et son mode d'action, apprécier l'incidence de ceux-ci sur sa qualité, analyser sa composition chimique et les facteurs qui peuvent la faire varier, connaître la structure et les propriétés des principes actifs aussi bien que leur activité pharmacologique, savoir apprécier la qualité par des éléments objectifs et mettre en œuvre des méthodes pour la contrôler et enfin d'appréhender tous les problèmes liés à l'utilisation des plantes et des produits qui sont issus: indication, contre -indication, effets secondaires, interactions médicamenteuses.

*Zingiber officinale* est l'une des plantes médicinales et aromatiques les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des huiles essentielles de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre une multitude de maux, de problèmes de sante humaine et des végétaux. Aujourd'hui, le gingembre est entré dans la médecine moderne (**HOSTETTMANN ,1997**)

L'objectif de notre travail est de déterminer les propriétés Physico-chimiques et d'étudier in vitro l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de gingembre obtenue par hydrodistillation du rhizome de *zingiber officinale* pour d'éventuelles utilisations en lutte biologique comme un biopesticide d'origine végétale.

Le plan de rédaction de ce mémoire est présenté comme suite :

- ✚ Une introduction générale.
- ✚ Présentation de l'espèce étudiée(*Gingembre*).
- ✚ Généralités sur les huiles essentielles.
- ✚ Présentation du germe test: *Erwinia carotovora. Spp.*
- ✚ Matériels et méthodes.
- ✚ Résultats et discussions.
- ✚ Conclusion.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

## *Zingiber officinale*

### I.1. Définition du Gingembre

C'est une plante condimentaire et médicinale, cette épice orientale a probablement traversé la première fois la mer Méditerranée grâce aux Phéniciens. Elle entraine aussi dans la composition des produits de momification dans l'Égypte antique. Sa diffusion dans toute l'Europe à partir de l'Empire romain s'est produite dès le premier siècle.

C'est une plante tropicale herbacée vivace poussant dans les régions ensoleillées et humides, se dressant sur une tige de 1,50 mètre environ, ornée de longues feuilles persistantes et lancéolées avec des inflorescences blanches à jaunâtres et des bractées pourpres. Les parties souterraines utilisées, racines et rhizomes, sont des tubercules globuleux ramifiés au goût piquant et aromatique( **Ivan, 2005**).



**Figure .1** : Aspects morphologiques du *Zingiber officinale* (**ROSCOE, 1807**)

Sa répartition géographique concerne toute l'Asie, les Caraïbes, l'Afrique et le Brésil mais plus de 50 % de sa production mondiale est localisée en Inde et en Chine.

Le gingembre est connu dans de nombreux pays du monde pour sa valeur culinaire, mais aussi pour ses vertus thérapeutiques, depuis plus de 5 000 ans. Il peut être utilisé pour combattre les infections, la fatigue, les douleurs musculaires et, surtout, les problèmes digestifs (vomissements, diarrhées...). Le gingembre a également des propriétés aphrodisiaques, anti-oxydantes et antibactériennes (Ivan, 2005).

## I.2. Description botanique du gingembre

Le gingembre est constitué de deux parties : la partie souterraine, appelée le rhizome, est noueuse et branchue et la partie aérienne est formée de feuilles et d'une tige d'environ un mètre de hauteur. Le rhizome, dont la pulpe est jaune à l'intérieur, sert de réserve à la plante et assure sa survie. Les feuilles sont alternes, lancéolées et odorantes et les fleurs sont de couleur jaune avec une lèvre rouge. Les fruits renferment des graines noires peu nombreuses. Le gingembre se multiplie et se reproduit donc plutôt grâce à la division de son rhizome. Il lui faut un temps humide, chaud et ensoleillé pour croître, c'est pourquoi on le trouve généralement dans les pays tropicaux (Ivan, 2005).

- Classification
- Règne: Plantae
- Embranchement: Spermaphytes
- Classe: Monocotylédones
- Ordre: Scitaminées
- Famille: Zingibéracées
- Genre: *Zingiber*
- Espèce: *Zingiber officinale*

## I.3. Usages traditionnels et vertus alléguées

Le gingembre est carminatif ; il aide à expulser les gaz intestinaux et à lutter contre les spasmes douloureux et les ballonnements. Il soigne en particulier les douleurs et les symptômes de rhumatisme et d'arthrite. Il est consommé par les femmes pendant leur

grossesse pour combattre la nausée du matin. Néanmoins, sa réputation ne vient pas de ses propriétés mais de ces vertus aphrodisiaques. Le gingembre est préparé sous toutes les formes; infusion, jus, teinture, décoction et HE, ce dernier est indiquée contre les flatulences et les douleurs rhumatismales (**Guire, 2005**).

#### **I.4.Principaux constituants du gingembre**

Le gingembre est constitué principalement d'environ 60% Amidon, des Oléorésines ; contenant des composés phénoliques responsables du goût piquant : shogaol, 6-gingérol, paradol, zingérone. Son huile essentielle contenant essentiellement des sesquiterpènes (zingiberène, curcumène, phellandrène, bisabolène) et des monoterpènes (alpha-pinène, camphène, limonène, bêta-phellandrène) (**Ibrahim et al., 2010**).

Le gingembre moulu est une excellente source de manganèse pour la femme et une bonne source pour l'homme. Le manganèse agit comme cofacteur de plusieurs enzymes qui facilitent une douzaine de différents processus métaboliques. Il participe également à la prévention des dommages causés par les radicaux libres (**Ibrahim et al., 2010**).

Le gingembre cru est une source importante de cuivre, nécessaire à la formation de l'hémoglobine et du collagène (protéine servant à la structure et à la réparation des tissus) dans l'organisme. Plusieurs enzymes contenant du cuivre contribuent également à la défense du corps contre les radicaux libres (**Ibrahim et al., 2010**).

#### **I.6.Le Principe actif majeur**

Le rhizome est riche en amidon (60%). Il contient des protéines, des graisses (10%), mais aussi une huile essentielle puissamment aromatique poivrée de saveur chaude et piquante. L'impression du feu (pseudo-chaleur) lors de la consommation de gingembre est due à la présence de shogaol, de paradol et de zingérone. La concentration de gingérol, constituant majeur du gingembre frais- est plus faible dans le gingembre séché, tandis que la concentration en shogaol augmente ( **Joy et al., 1998** ) .

L'huile essentielle du gingembre est constituée de l'oléorésine (6%) et l'huile essentielle (1-3%). L'oléorésine contient des composés chimiques à l'origine de la saveur

piquante (le gingérol). L'huile essentielle renferme des composantes odorantes comme le zingiberène, le curcumène, le camphène, le bisabolène, le citral et le linalol. Ces molécules majoritaires ont des actions antioxydantes, ce qui protège les cellules du corps des dommages causés par les radicaux libres. Ces derniers sont des molécules très réactives impliquées dans le développement des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement. Une quarantaine de composés antioxydants ont été découverts dans le gingembre. Certains d'entre eux seraient résistants à la chaleur et pourraient même être libérés durant la cuisson, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'activité antioxydante du gingembre cuit. Le gingembre moulu se situe au troisième rang quant à son contenu en antioxydants parmi plus de 1 000 aliments analysés. Mentionnons toutefois que cette comparaison a été effectuée sur la base de 100 g d'aliments et non par portion usuelle (qui correspond à environ 2 g dans le cas du gingembre). ( Joy et al, 1998).

Le gingembre frais possède aussi une forte activité antioxydante comparativement à d'autres légumes et épices consommés en Asie. À la suite d'une trentaine d'analyses effectuées, le gingembre, ainsi que le curcuma, la menthe, la coriandre, le brocoli et les choux, se sont classés parmi les quatorze végétaux frais les plus fortement antioxydants.

Le principal composé actif responsable du goût piquant du gingembre frais est le gingérol. Ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes sont bien connues et son potentiel anticancer est démontré in vitro dans plusieurs recherches. ( Joy et al, 1998).

Durant la déshydratation du gingembre, les gingérols sont convertis en composés nommés shogaols. Ce groupe de composés se retrouve donc en plus grande quantité dans le gingembre séché que dans le gingembre frais.

## **I.7.Toxicité**

A haute dose, le gingembre peut irriter la peau et déclencher des allergies, en effet, il augmente la photosensibilité de la peau. La toxicité existe et elle est liée aussi à son HE: Il s'agit d'une intoxication neurologique grave par surdosage en l'HE. L'application de l'huile de gingembre est déconseillée aux femmes enceintes, car elle peut déclencher des contractions comme elle peut causer des effets tératogènes (**Mukeudi 2011**).

## **I.8.récole du gingembre**

Deux facteurs importants sont à considérer lors du choix des Rhizomes de gingembre à traiter :

### **I.8.1. Etape de la maturité du gingembre**

Les Rhizomes de gingembre peuvent être récoltés environ 5 mois après la plantation. A ce stade, les rhizomes ne sont pas encore matures.

Les racines sont tendres avec une saveur douce convenant à la consommation fraîche et pour la production de gingembres saumurés ou en sirop. C'est seulement une récolte entre le septième et le neuvième mois après plantation qui est convenable. A ce stade de maturité, ils ont un goût et une saveur suffisamment prononcé pour une qualité organoleptique acceptable du produit. Une moisson au-delà de 9 mois entrainerait une mauvaise qualité commerciale du produit dans la mesure où il y aura trop de fibres (Geiger, 2005).

### **I.8.2. Le cultivar sélectionné**

Les différents cultivars de gingembres cultivés à travers le monde diffèrent en fonction de leur saveur, leur arôme et leur couleur. Ce sont des qualités organoleptiques très importantes pour la production du gingembre sec dans la mesure où on recherche un produit ayant une saveur et un arôme prononcé et ayant une couleur attirante (Geiger, 2005).

### **I.8.3. Processus de production du gingembre sec**

Le gingembre sec est disponible sous différentes formes. Les rhizomes peuvent être laissés entiers ou découpé en tranches de plus petits morceaux pour accélérer le séchage. Parfois, les rhizomes sont épluchés et mis à ébullition pendant 10 à 15 minutes, ce qui les fait noircir. Ils doivent donc être blanchis par un traitement avec la chaux ou l'acide sulfureux. Le rhizome est moissonné frais entre 8 à 9 mois d'âge.

Les rhizomes sont séparés des racines et des feuilles puis sont lavés. D'après **(Geiger ,2005)** Les rhizomes entiers non épluchés peuvent être endommagé par l'ébullition dans l'eau pendant 10 minutes.

Après épluchage et lavage, les rhizomes sont imbibés pendant 2 ou 3 heures dans l'eau propre puis imbibés dans une solution de la chaux 1.5-2.0% (oxyde de calcium) pendant 6 heures. Après le trempage, les rhizomes sont vidangés **(Geiger ,2005)**

Les rhizomes sont ensuite séchés. La méthode traditionnelle est d'étendre les morceaux sur les nattes en bambou propres ou sur un plancher en béton jusqu'à une teneur en humidité finale de 10%. Le séchage peut prendre 7 à 14 jours en fonction des conditions atmosphériques. Pendant le séchage, les rhizomes perdent entre 60 et 70% du poids.

Dans des conditions pluvieuses, un séchoir mécanique devrait être employé pour accélérer le processus de séchage. Les morceaux découpés en tranches de gingembre prennent seulement 5-6 heures pour sécher quand un séchoir à air chaud est employé. Les rhizomes épluchés entiers de gingembre prennent environ 16-18 heures pour sécher dans un séchoir mécanique. Il est important de surveiller la circulation et la température d'air. La température ne devrait pas excéder 60 degrés Celsius afin de conserver une couleur attirante au produit final **(Geiger ,2005)**.

Après avoir séché, les rhizomes sont nettoyés en vue d'ôter les corps étrangers : morceaux de peau sèche insectes...etc. Un séparateur d'air peut être utilisé pour de grandes quantités, mais à la petite échelle il est probablement non rentable **(Geiger ,2005)**.

Les rhizomes secs devraient être conditionnés dans emballage hermétique et étanche à l'humidité en vue d'être stockés ou exportés **(Geiger, 2005)**.

#### **I.8.4. Production d'huile essentielle de gingembre**

L'essence de gingembre peut être produite à partir des rhizomes frais ou secs. L'huile des rhizomes secs contiendra moins de composés volatils ayant un bas point d'ébullition (les composés qui donnent à gingembre sa saveur et arôme) qui seront déjà évaporés pendant le

processus de séchage. La meilleure essence de gingembre est obtenue à partir des rhizomes entiers qui sont non épluchés.

L'essence de gingembre est obtenue en utilisant un processus de distillation par entraînement à la vapeur. Les rhizomes secs sont réduits en une poudre brute et chargés dans un distillateur. On peut redistiller le matériel afin d'obtenir un rendement maximum d'huile. Le rendement d'huile des rhizomes secs de gingembre est entre 1.5 à 3.0%. La poudre restante de rhizome contient l'amidon environ de 50% et peut être employée pour l'alimentation des animaux. Elle est parfois séchée et rectifiée pour faire une épice de basse qualité (Geiger, 2005).

### **I.9. Activités biologique de l'huile essentielle de gingembre**

On attribue à l'huile essentielle les propriétés suivantes : antioxydante, antimicrobienne, antifongique (contre le *Fusarium moniliforme*, l'*Aspergillus niger*, l'*Aspergillus solani*, l'*Aspergillus oryzae* et l'*Aspergillus flavus*, l'*Aspergillus fumigatus*), antibactérienne (contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*), tonique digestive, stomachique, carminative, tonique sexuelle, aphrodisiaque, antalgique, anticatarrhale, expectorante, épilatoire et préventive contre les nausées et vomissements postopératoires. On attribue aussi à l'huile essentielle de gingembre (*Zingiber officinale*) une Activité insecticide (Andria tsihorana, 2010).

(Andria tsihoarana, 2010) a effectué une petite expérience pour savoir sous quelle forme a-t-on le meilleur rendement pour l'extraction de l'huile essentielle de rhizome de *Zingiber officinale*. Pour cela, il a distillé les rhizomes de gingembre sous trois (3) états :

Entiers, tranchés en lamelles et râpés à l'aide d'une râpe de cuisine. Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau N°1 : Rendements d'extraction selon l'état des rhizomes de *Zingiber officinale* Roscoe (Andria tsihoarana, 2010)**

Etat des rhizomes	Masse des rhizomes [g]	Durée de distillation [h]	Quantité d'HE recueillie [g]	Rendement [hl]
Entiers	1000	2	1	0.100
En lamelles	700	2	1	0.143
Râpés	642	2	3	0.467

Il a prouvé que les rhizomes râpés permettent à l'huile essentielle de sortir plus facilement ; ou il pourrait aboutir au même rendement avec les rhizomes entiers ou en lamelles mais il faudrait une durée de distillation plus longue.

Donc, pour obtenir le meilleur rendement en un temps minimum, il faut réduire la taille des fragments de l'échantillon.

### **I.10. Caractéristiques organoleptiques**

Les propriétés visuelle, olfactive et gustative sur l'huile essentielle obtenue sont rapportées dans le tableau suivant (Andria tsihoarana, 2010).

**Tableau N°2 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Zingiber officinale* (Andria tsihoarana 2010)**

Aspect	Liquide mobile, limpide
Couleur	Jaune très claire
Odeur	Caractéristique, rappelant celle du rhizome de gingembre
Saveur	Amer et très légèrement piquant

## II. Généralité sur les huiles essentielles

### II.1. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverse partie des végétaux. Elles sont concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur.

Actuellement, leurs utilisations en parfumerie et en alimentation est considérables c'est pour cette raison que l'organisme de normalisation AFNOR NF et ISO ont donné une définition plus précise des huiles essentielles ; ces dernières sont des produits obtenus à partir d'une hydro distillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (BELHADI, 2010).

### II.2. Classification

D'après CHAKOU et BASSOU (2007), selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens et grâce à l'indice aromatique

Obtenu par des aromatogramme, les huiles essentielles sont classées en groupes.

- Les huiles majeures
- Les huiles médiums
- Les huiles terrains

### II.3. Répartition et localisation

On rencontre les huiles essentielles dans divers familles botaniques elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et forment dans le cytoplasme de cellules spécialisées (DEGRYSE et al., 2008).

### II.3.1.Répartition

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y a 17500 espèces aromatiques. Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité des familles, *Zingiberaceae*(*Gingembre*).....etc.(**BELLAKHDAR, 1997**).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemples : dans les sommités fleuries (*Menthe, Lavande*) les feuilles (*Eucalyptus, Laurier*) les rhizomes (*Gingembre*) les fruits (*agrumes, badiane, anis*), les racines (*Vétiver*), les graines (*Muscades*), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (*Cannelier*) (**BELLAKHDAR, J1997**).

### II.3.2.Localisation

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules ou se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (**GONZALEZ-TRUJANO et al ., 2007**).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologique spécialisés, souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont : cellules à huiles essentielles de Lauraceae, les poils sécréteurs des laminaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae, des Rutaceae, et les canaux sécréteurs qui existent dans des nombreuses familles. Il est intéressant de remarquer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante (**DEGRYSE et al ., 2008**).

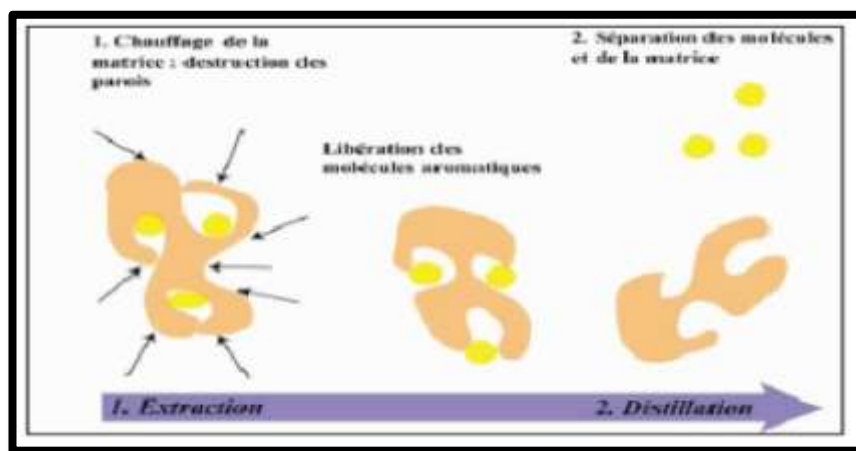
### II.4.Méthodes d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ...), de la nature des composés (par exemple, les l'huile essentielles, huiles lourdes...). Parmi les problèmes rencontré le rendement réduit en huile dans le cas des huiles essentielles et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (**DEGRYSE et al ., 2008**).

Les principales méthodes d'extraction sont:

1. Distillation à vapeur saturée
2. Entraînement à la vapeur d'eau
3. Hydro diffusion
4. Expression à froid
5. Extraction par solvants
6. Hydro distillation
7. Extraction par les corps gras
8. Extraction par micro- ondes

Sur le plan cellulaire, les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques quelque soit la technique utilisée. Il est nécessaire dans un premier temps, d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est explicité dans la figure 2 (MARIE ELISABETH et LUCCHESI, 2005).



**Figure N°2** : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle (MARIE ELISABETH et LUCCHESI, 2005).

#### II.4.1. Hydro distillation

L'hydrodistillation proprement dite est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle (LUCCHESI, 2005).

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique (MEYER-WARNOD, 1984).

La température d'ébullition du mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation. Elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange (eau + huile essentielle) distille à une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique (Normes AFNOR, 1992). Par contre, les températures d'ébullition des composés aromatiques sont la plupart très élevés (LUCCHESI ,2005) et (LAGUMEZ RIVERA,2006).

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures (OCHOA, 2005). Selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait (LAGUMEZ RIVER, 2006).

Les principales raisons de cette préférence sont liées à la facilité de mise en oeuvre du procédé, son sélectivité et donc la qualité des produits obtenus.

Cependant l'hydrodistillation possède des limites, principalement la température élevée, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques thermolabiles.

C'est ainsi que pour certains organes fragiles, comme par exemple les pétales de fleurs, une technique d'extraction plus appropriée est utilisée. Il s'agit d'une distillation dite sèche. Cette technique ancestrale, utilisée autrefois par les alchimistes arabes (LUCCHESI, 2006 ; CHEMAT et al., 2004).

## II.5.Caractéristiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles aident à traiter les petites indispositions de la vie de tous les jours. Outre leur action curative, elles opèrent de manière préventive en stimulant le système immunitaire afin que l'organisme lutte plus efficacement contre les infections bactériennes et virales.

Parmi les propriétés les plus connues, le pouvoir antiseptique. A l'heure où les germes microbiens deviennent de plus en plus résistants, ce qui implique pour l'industrie

pharmaceutique de trouver des antibiotiques de plus en plus puissants (mais aussi de plus en plus destructeurs de la flore saprophyte du système immunité), les huiles essentielles offrent une véritable alternative (**JEAN BOTTON, 1999**).

Leur efficacité se révèle en effet stable dans le temps et la preuve est faite tous les jours de leur grande efficacité, là où certains antibiotiques échouent désormais. (**ZABEIROU et HACHIMOU, 2005**).

### **II.6. Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles**

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (**BRUNETON, 1993**), Les principales caractéristiques sont :

- aspect liquides à température ambiante.
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé.
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques.
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité (**ZABEIROU et HACHIMOU, 2005**).

## II.7.La composition des huiles essentielles

### II.7.1.Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

- les terpénoïdes.
- les composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

D'après **GUENTER (1975)**. La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés.

Selon **BRUNETON (1999)**. Cette structure varie en fonction du nombre d'atomes de carbone qui les constitue.

## II .8.Mode d'action des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroulent en trois phases :

1. attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
2. acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
3. destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et raisonnables de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques.(**Caillet et Lacroix, 2007**).

### III.1. Introduction

Ces dernières décennies, la protection de l'environnement s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure. La méthode classique de lutte biologique par utilisation de micro-organisme, de prédateurs, de parasitoïdes et de substances naturelles d'origine végétale, les industries agrochimiques orientent de plus en plus leur effort vers l'étude de produits naturels pour la recherche de nouveaux insecticides (**SARNI-MANCHDO et CHEYNIER, 2006**).

### III-2-Généralité sur le monde microbien

Plusieurs chercheurs suspectaient l'existence des être vivants invisibles provoquaient les maladies, les premières observations au microscope furent sans doute réalisées entre 1625 et 1630 sur des abeilles et des charançons par l'Italien Francesco stelluti à l'aide d'un microscope probablement fabriqué par Galilée. Cependant la première personne qui réellement observa et décrivit des microorganismes est un Hollandais, amateur de microscope (**ESCOTT, HARLEIN, KLEIN ,2006**).

Ces organismes engendrent des maladies chez les êtres humains, les animaux et les végétaux en attaquant les cellules vivantes et en les divisant et en produisant des substances toxiques appelées toxines. Les organismes responsables peuvent mourir, mais la toxine peut rester et engendrer la maladie (**BERCHE et al., 2002**).

### III.3.Morphologie et structure des bactéries

On peut distinguer trois formes caractéristiques : les sphériques, les allongées et les spiralées. La position des bactéries les unes par rapport aux autres est également une caractéristique distinctive importante.

Les diplocoques sont disposés en paires. Les staphylocoques forment des groupes (du grec *staphulê* = grain de raisin), alors que les streptocoques forment des chaînes (du grec *streptos* = chaîne) (**ESCOTT, HARLEIN, KLEIN ,2006**).

Les bactéries allongées (bacilles) peuvent varier en longueur et en épaisseur. Elles forment également des chaînes. Les bactéries spiralées (spirilles) peuvent également varier en longueur et en épaisseur, et en nombre de spires (Figure .9).

La taille des coques varie entre 0,4 et 1,5  $\mu\text{m}$  (1  $\mu\text{m}$  = 0,001 mm). La longueur des bacilles peut varier entre 1 et 10  $\mu\text{m}$ , même si quelques espèces sont plus grandes ou plus petites.

La structure cellulaire des bactéries comme toutes les autres cellules, contient un semi-liquide, une substance riche en protéines appelée cytoplasme. Le cytoplasme contient les ribosomes, où a lieu la synthèse des protéines, et les enzymes qui participent au métabolisme de la cellule. La matière de réserve, telle que les graisses et le glycogène, se trouve également dans le cytoplasme.

L'ensemble sert de "squelette" à la bactérie et lui donne sa forme définitive. Cette paroi cellulaire est également entourée à l'extérieur d'une couche visqueuse plus ou moins développée. Lorsqu'elle est très épaisse, on parle alors de "capsule" (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

### III.4. Bactéries Gram négatif

Les bactéries Gram négatifs ont adopté une stratégie différente pour protéger leur membrane cytoplasmique, ils fabriquent une structure particulière, la membrane externe, située à l'extérieur de la muréine la membrane externe est chimiquement distincte des autres membranes biologique, ce qui lui confère la capacité de résister aux agent chimiques nocifs, c'est une structure à deux feuillets mais le feuillet externe contient un composant unique en plus des phospholipides; il s'agit du lipopolysaccharide bactérien ou LPS, molécule complexe rencontrée uniquement chez les bactéries Gram négative (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

### III.5. Genre *Erwinia carotovora*

#### III.5.1. Généralité

*Erwinia carotovora* est une bactérie phytopatogène de la famille des enterobactériaceae sous forme de bâtonnets de 0.5\_1  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1\_3  $\mu\text{m}$  de longueur, à gram négative ; mobiles grâce à des flagelles péritriches ; anaérobies facultatifs ayant une forte activité pectolytique ; elles sont oxydase négatives ; mais catalase positives.

Ce sont des bactéries psychotropes qui se développent à des températures comprises entre 5 et 36 °C avec un optimum entre 27 et 30 °C ; elles produisent une variété d'enzymes extracellulaires comprenant les pectinases, les cellulases et les protéases.

La paroi des bactéries *E.carotovora* est composée d'environ 95% de phosphatidyl-éthanolamine. Leur membrane externe est principalement composée d'une couche de phospholipides (34% du total) recouverte à l'extérieur d'une couche composée de lipopolysaccharides, alors que la membrane interne est constituée d'une bicouche du même phospholipide (65% du total). La bicouche externe de la paroi de ces bactéries à un ratio protéines/lipides de 1.20, donc elle est moins fluide que la bicouche interne qui a un ratio protéines/lipides de 0.89. Entre les deux membranes se trouve une mince couche de peptidoglycane.

### III.5.2.Classification

Selon Winslow *et al.* (1920) ; Hauben *et al.*,(1998) la classification de la bactérie *E.carotovora* est comme indiqué dans le tableau en dessous :

**Tableau N°3** : classification d'*Erwinia carotovora*

<b>Embranchement</b>	Bactéria
<b>Division</b>	Proteobacteria
<b>Classe</b>	gamma-proteobacteria
<b>Ordre</b>	Enterobacterisles
<b>Famille</b>	Enterobacteriaceae
<b>Genre</b>	<i>Erwinia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Carotovora</i>

### III.5.3. Dégâts occasionnés par *Erwinia carotovora*

La bactérie *E.carotovora* se conserve dans le sol et dans les débris de culture. Pour Pénétrer dans la plante, la bactérie utilise les voies naturelles, elles ne possèdent en effet aucun organe pour pénétrer mécaniquement ni les enzymes pour fragiliser l'épiderme cireux.

Elles peuvent entraîner une pourriture molle ; la jambe noire ; des flétrissements, des jaunissements. Par conséquent une énorme baisse de rendements ; les facteurs de stress pour la plante sont des facteurs favorables à la multiplication de la bactérie.

### III.6. Résistance des bactéries Gram négatif à certaines huiles essentielles

Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines ariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique.

Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) (DJENADI, 2011).

La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe.

### III.7. Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Les mécanismes d'action des H.E. et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés, cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques. Il semble que le mécanisme d'action de ces huiles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram+ et Gram- (AGNIHOTRI et al., 2003).

(BOUDJEMAA et al., 2010) a examiné le mécanisme d'action des H.E. des Clous de girofle et d'origan (*Origanum vulgare*) simultanément avec ceux de deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol, sur des bactéries: *E. coli* et *Bacillus subtilis* et qui ont été utilisées respectivement comme modèles de bactérie Gram+ et Gram-. Les deux H.E. tout comme leurs deux composants ont été capables d'induire une lyse cellulaire. Cette action a été démontrée par la libération de substances absorbantes à 260 nm. Cette libération de substances associée à la rapide mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. L'utilisation d'un microscope

électronique a permis de montrer que les H.E. attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires.

### III.8.Principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des H.E.

#### III.8.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode à l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des H.E. testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée pendant plus 50 ans d'utilisation mondiale (BOUDJEMAA *et al.*, 2010). Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar1 réalisée dans une boîte de Pétri.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d' H.E. (Figure).

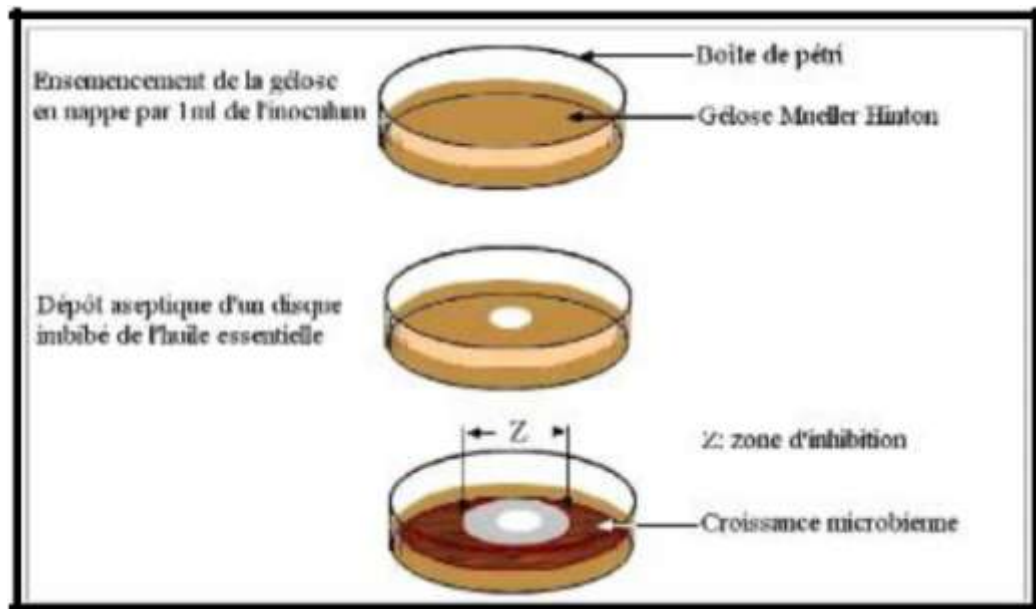


Fig.: Illustration de la méthode d'aromatogramme (ZAIKI, 1988).

### III.9.Détermination de concentration minimale CMI

L'efficacité de l'huile essentielle contre les microorganismes peut être déterminé par la concentration minimal inhibitrice CMI; c'est la concentration la plus faible de l'huile essentielle capable d'empêchée le développement d'un microorganisme. Elle consiste a préparé une série du tubes contenant l'eau physiologique plus l'extrait, chaque tube avec une concentration bien déterminée, Par exemple dans le premier tube la dilution se fait à 25 %, le deuxième tube à 50 %, le troisième tube à 75 % et un quatrième tube pour tester l'extrait brut par l'application de la méthode de disque , les disques sont imbibés avec les déférentes dilutions et placées sur la gélose après solidification de ce dernier. Et puis inoculée les boites par le germe test. La CMI est égale la concentration de dilution la plus faible qui inhibe la croissance bactérienne après 6 à 8 heure d'incubation (Caillet et Lacroix ,2007).

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

### I.1.Objectifs

La présente étude a pour but de déterminer les propriétés physicochimiques et l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Zingiber officinale* à partir de deux formes de plante (plante fraîche et Osèche) vis-à-vis la bactérie *Erwinia carotovora*.

### I.2.Structure du stage

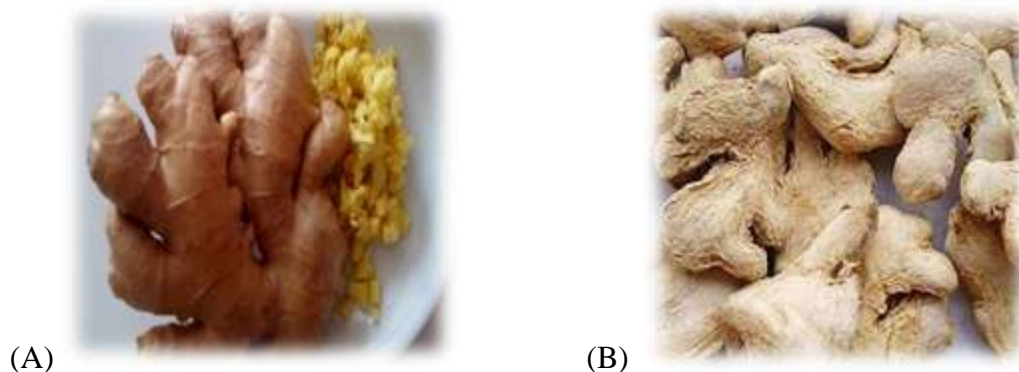
Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie N°1 et de microbiologie N°2, faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abd-El-Hamid Ibn-Badis Mostaganem.

### I.3.Matériel biologique

#### 3.1. Matériel végétale

Le Matériel végétale utilisé pour l'étude (*Zingiber officinale*) provient d'une épicerie au marché couvert à Mostaganem, il s'agit du gingembre frais et du gingembre sec d'origine indien.

La partie utilise dans cette expérimentation est le gingembre non épluché.



**Photo1:** Matériel végétale utilisé (A)fraiche, (B) sèche.

#### I-2-Matériel microbiologique

Le germe teste c'est une bactérie phytopathogène, Elle peut entrainer une pourriture molle ; la jambe noire ; des flétrissements, des jaunissements et une énorme baisse de rendements: *Erwinia carotovora*.

La souche est fournie par le laboratoire de protection des végétaux.

Une confirmation d'identification est effectuée sur :

- L'aspect morphologique des colonies sur des milieux d'isolement.
- La coloration de gram.

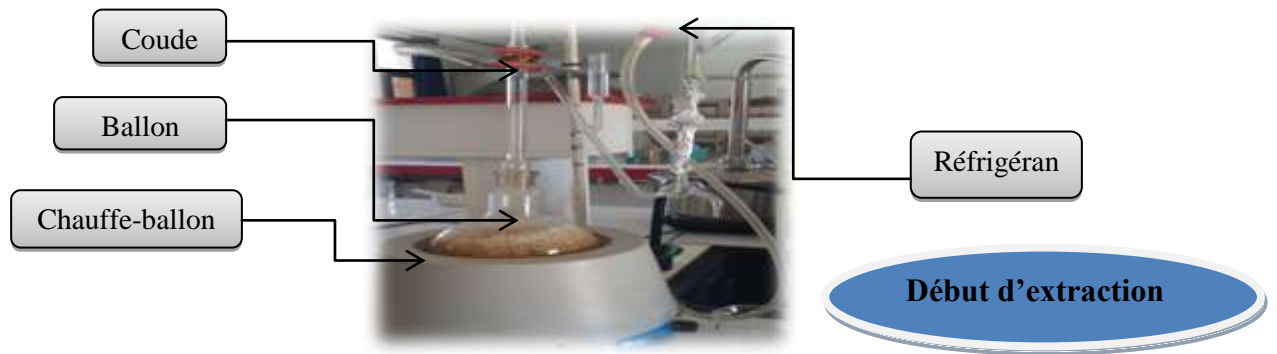
### I.3. Procédé d'extraction

Le Matériel végétal est soumis à une hydro-distillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger ; cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles.

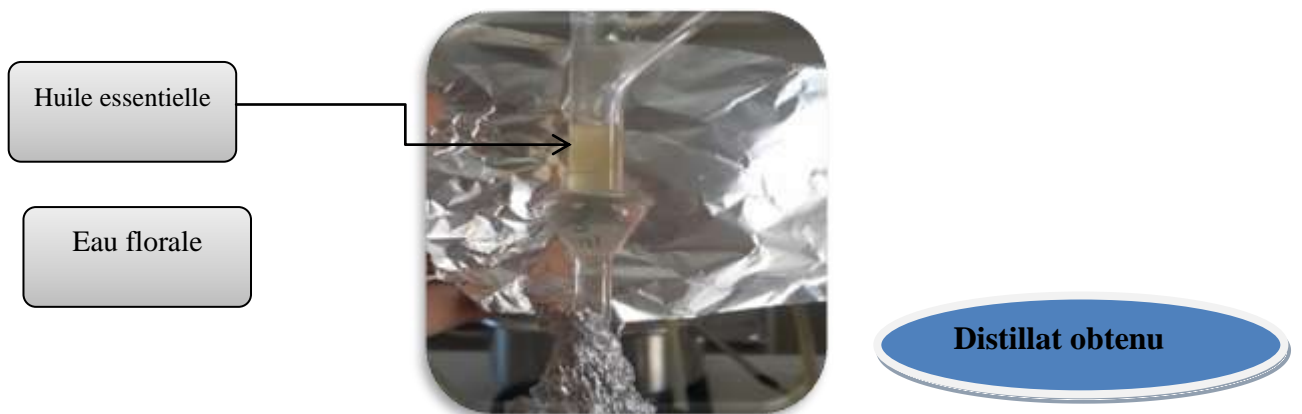
- L'opération consiste à introduire 400 g de fragments râpés de gingembre dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements lors de l'ébullition. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le condensateur. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium anhydre, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin conservée dans des tubes à essais bien scellés à température basse (4,5 C°). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition.



**Photo.2.**

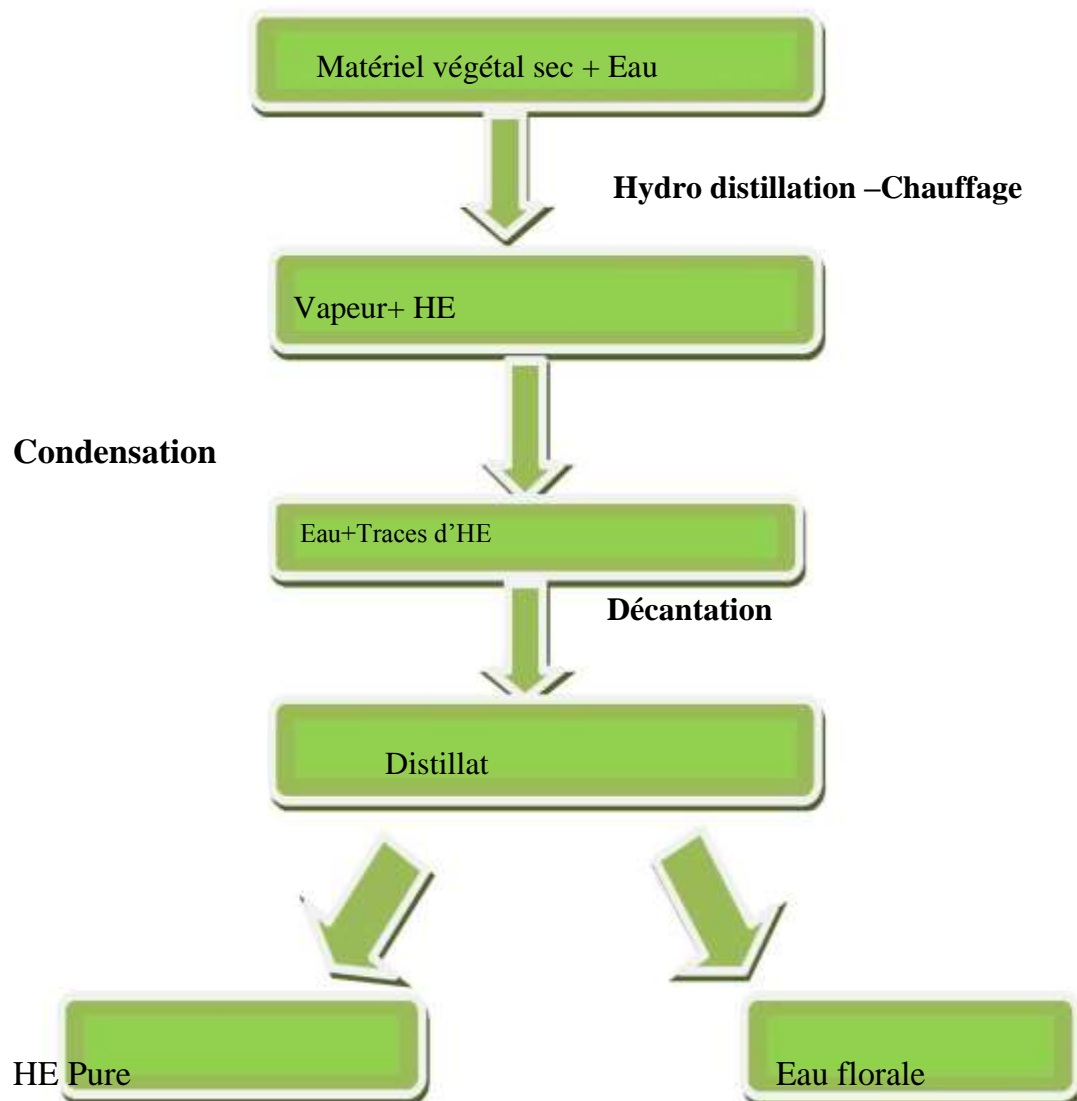


**Photo.3.**



**Photo.4.**

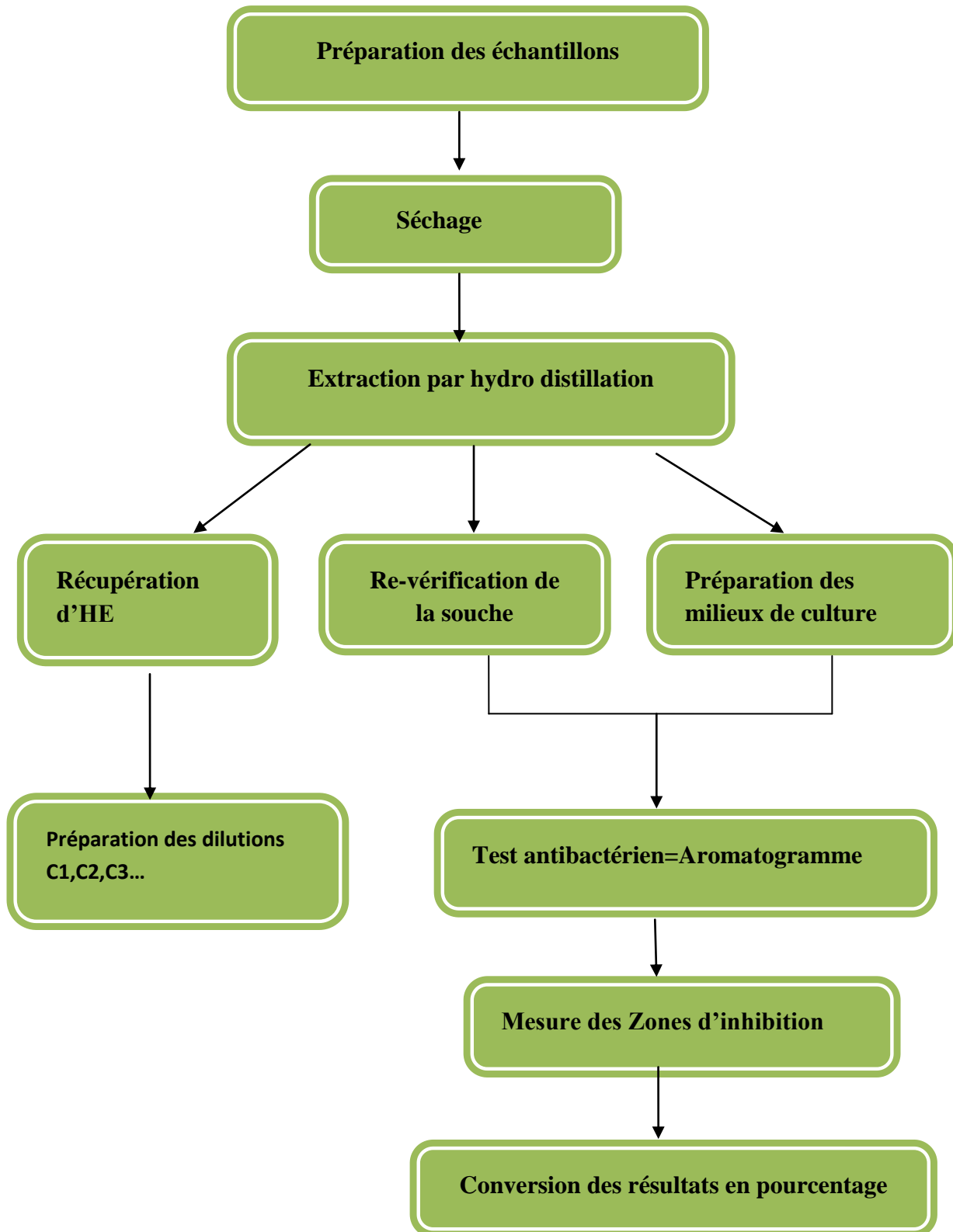
**Figure N° :** Les étapes d'extraction des huiles essentielles du gingembre dans laboratoire de biochimie n°2 de L'université de Mostaganem.

**I.4. Plan d'extraction**

**Figure.4.:** Représentation schématique de différentes étapes d'extraction.

**I.5. Plan d'expérimentation**

Le protocole général du travail est comme suite :



**Figure.5.** : Représentation schématique du protocole expérimental.

### I.6.Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle ( $R_{HE}$ ) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction ( $M'$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M$ ). Le rendement est exprimé en pourcentage, il est exprimé par la formule suivante :

$$R_{HE} (\%) = M'/M \times 100$$

- $R_{HE}$  : Rendement en huile essentielle en %.
- $M'$  : Masse d'huile essentielle en gramme.
- $M$  : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme .
- **Le résultat obtenu est:**

(EH) Gingembre frais  $R = 0.91 \%$ .

(EH) Gingembre sec  $R = 0.76\%$ .

### I.7.Analyses physico-chimiques de l'huile essentielle

Après l'extraction de l'huile essentielle de *Zingiber officinale* on a fait les analyses physico-chimiques suivantes :

- Le pH: c'est le potentiel d'hydrogène, noté pH, c'est une mesure de l'activité chimique des ions d'hydrogène.
- Indice de réfraction: est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des HE et de composés liquides, et de vérifier la qualité de l'extraction.
- Densité: rapport de la masse d'un corps à son volume , c'est-à-dire comme la masse volumique.
- Indice d'acide: exprimée en milligrammes, nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans un gramme de corps gras. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps : l'indice d'acide permet donc de juger de leur état de détérioration.

Cet indice, contrairement à l'indice de saponification, est déterminé à froid.

### I.7.1.pH

Le pH des HE se situe généralement entre 4 et 6  
C'est le gisement d'acide, pour l'HE de gingembre  
Le pH est égal à 6.00.



Photo.5: pH mètre.

### I.7.2.Densité

On a utilisé un densimètre pour mesurer la densité,  
À 20°C suivant la formule:

$$d^{20} = d^T + (T-20) \times 0.00073$$



Photo.6.: Densimètre.

### I.7.3.Indice de réfraction

Afin de mesurer l'indice de réfraction on a utilisé un réfractomètre, puis on a calculé cette valeur à 20 °C par la formule suivante:

$$n_D^{20} = n_D^T + (T-20) \times 0.0045$$



Photo.7: Réfractomètre.

### I.7.4. Indice d'acide

$$I_a = (5.61 \times V) / M$$



**Photo.8. :** Dispositif de titrage.

Les résultats des paramètres physicochimiques dans le chapitre résultats.

## I.8. Activité antimicrobienne

### I.8.1. Préparation du milieu de culture

On a choisie comme milieu Muller –Hinton.

#### I.8.1.2.Méthode

- Préparer le matériel nécessaire comme le bac benzène, les boites de pétries....etc.
- Mettre le 1<sup>er</sup> réactif l'agar dans le bain marie, cette étape est plus importants pour préparé un bon milieu.
- Ajouter les autres réactifs un par un, à la fin ajoute l'amidon et mettre le milieu dans l'autoclave pendant 15 minute et à 116 C°.

### I.1. Ecoulement



**Photo.9:** préparation des dilutions et des boîtes dans les zones stériles.

### I.2. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement (ayant au maximum 24h), raciner à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

Décharger l'anse ou la pipette pasteur dans un tube contenant l'eau physiologique stérile à 0.9 %. Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm. Cet étalon se prépare en versant 0.5ml de la suspension bactérienne dans des tubes contenant 10 ml de bouillon nutritif (annexe) ont été ensemencés avec les (03) souche de bactéries puis laisser incuber pendant 24h à 37°C, pour réactiver les souches bactériennes qui ont été conservées à 4°C.



**Photo.10 :** Réactivation de la souche (inoculum).

### I.3.L'ensemencement

- le milieu de culture utilise est Muller — Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.
- tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries Serrées.
- répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la Gélose.
- dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon chaque fois.

### I.4. Préparation des disques d'aromatogramme

- ✓ les disques sont fabriqués à partir de papier Wattman n°3 (ou autre type de papier buvard), avec un diamètre de 5.5 mm, suivant le diamètre de l'emporte-pièce.
- ✓ ensuite ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

### I.5.Préparation des dilutions d'huile essentielle

L'huile essentielle récupérée est diluée .l'acétone lui-même dilué à 70% pour obtenir les concentrations suivantes : 0.5 %(v/v), 0.25 %(v/v), 0.12%(v/v), Pour les deux huiles essentielles ; plante fraîche et plante sèche.

### I.6. Dépôt des disques

Les disques sont prélevés à l'aide d'une pince stérilisée, puis imbibés avec des différentes dilutions des huiles essentielles (plante fraîche - plante séchée) jusqu'à imprégnation totale du disque. Les

disques ainsi traités sont déposés sur la surface de la gélose inoculée auparavant pas le germe test.

Les boîtes sont incubées après 248h à 37°C.

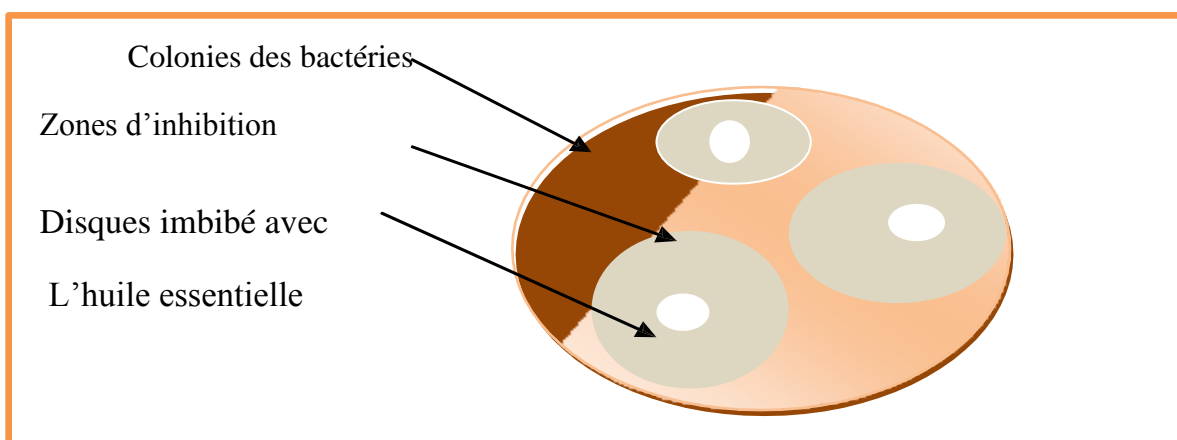
### I.8.Lecture des résultats

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibitions de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester.

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition indique comme ci-dessous et peut être symbolisés par plus(+) ou moins (-) selon (DURAFOUR, et *al.*, 1990 ; PONCE et *al.*, 2003).

- $D < 8\text{mm}$  : Souches résistante (-).
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$  : Souches sensible (+).
- $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$  : Souches très sensible (++)
- $D > 20\text{mm}$  : Souches extrêmes sensible (+++)

Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions de l'extérieur de la boîte fermée afin d'éviter les contaminations. Le Classement de la bactérie utilise dans ce test se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante selon l'efficacité des HE extraites des rhizomes frais et séchés.



**Figure.6:** Représentation schématique des tests aromatochrome réalisés.

D'après (CAILLET *et al.*, 2007). L'action antimicrobienne des H.E. se déroule en trois phases:

- ❖ Attaque de la paroi bactérienne par l'H.E., provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire.
- ❖ Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire. et la synthèse des composants de structure.
- ❖ Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

*Résultats et  
Discussions*

## II-Résultats et discussion

### II-1-Caractéristiques organoleptiques

L'huile essentielle de *Zingiber officinale* est extraite par une simple technique d'hydro-distillation, cette méthode d'extraction est normée pour l'extraction des huiles essentielles (MARIE ELISABETH L, 2005). Les paramètres organoleptiques de cette huile essentielle sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR. (AFNOR, 1999), elle est sous forme liquide, d'une coloration jaune clair et elle a l'odeur camphrée, ces résultats comparés avec la norme AFNOR sont représentés dans le tableau 01.

**Tableau N°4:** Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Zingiber officinale*.

	Aspect	Couleur	Odeur
<b>L'AFNOR</b>  (Forme fraîche)	Liquide mobile, limpide	Presque incolore à  jaune pâle	Caractéristique fraîche,  plus ou moins camphrée  selon l'origine
<b>Huile essentielle</b>	Liquide mobile	Jaune clair	Camphrée

### II-2-Les analyses physico-chimiques de l'huile essentielle du Gingembre

Le rendement obtenu lors de l'extraction est de 0.91%. Le rendement peut varier d'une récolte à l'autre cela peut être dû aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi eux on cite la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage, le mode d'extraction. Mais cette valeur reste dans les normes entre (0,5-2) selon AFNOR. Les résultats des paramètres physicochimiques étudiés sont représentés dans le tableau 02.

**Tableau N°5:** rendement et caractéristiques physicochimique de l'huile essentielle du Gingembre.

Propriétés	Valeur pratique		AFNOR Forme Fraiche
	S	F	
<b>Rendement (%)</b>	<b>0.76</b>	<b>0.91</b>	<b>0.5 – 2</b>
<b>Densité (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>0.82</b>	<b>0.9117</b>	<b>0.905-0.921</b>
<b>pH</b>	<b>6.5</b>	<b>6</b>	<b>6 – 7</b>
<b>Indice de réfraction</b>	<b>1.30</b>	<b>1.4850</b>	<b>1.3356 -1.3500</b>
<b>Indice d'acide</b>	<b>0.6</b>	<b>0,823</b>	<b>0.5 -2,0</b>

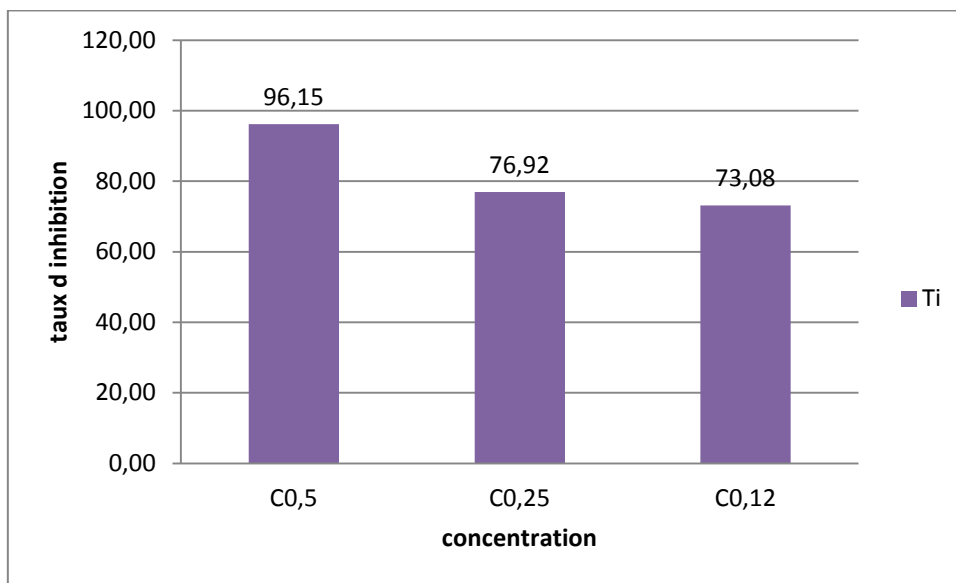
La densité est faible puisque il contient plus des mono terpènes dans sa composition (ZABEIROU et HACHIMOU ,2005), le pH est l'égerment acide a cause de la présence des acides phénoliques dans la composition (BELLKHDAR ,1997).

Par contre, l'indice de réfraction de valeur 1,48 légèrement élevé par comparaison avec la valeur d'AFNOR. Cela veut dire que l'huile essentielle est très pure car l'indice de réfraction est la vitesse avec la quelle la lumière traverse un liquide.

### II-3- Activité antimicrobienne

D'une manière générale, la souche bactérienne *Erwinia carotovora* a présenté une sensibilité remarquable vis-à-vis des huiles essentielles extraite a partir des deux échantillons frais et sec. En effet, il a été remarqué la présence de zones d'inhibition autour des disques imprègnes par l'huile essentielles, alors que sur les boites témoins aucune inhibition n'est observée. (BELLKHDAR ,1997).

D'après les résultats obtenus des témoins qui sont tous négatifs ; aucune inhibition, on peut déduire que l'acétone n'a aucun effet sur la croissance de la souche testée.



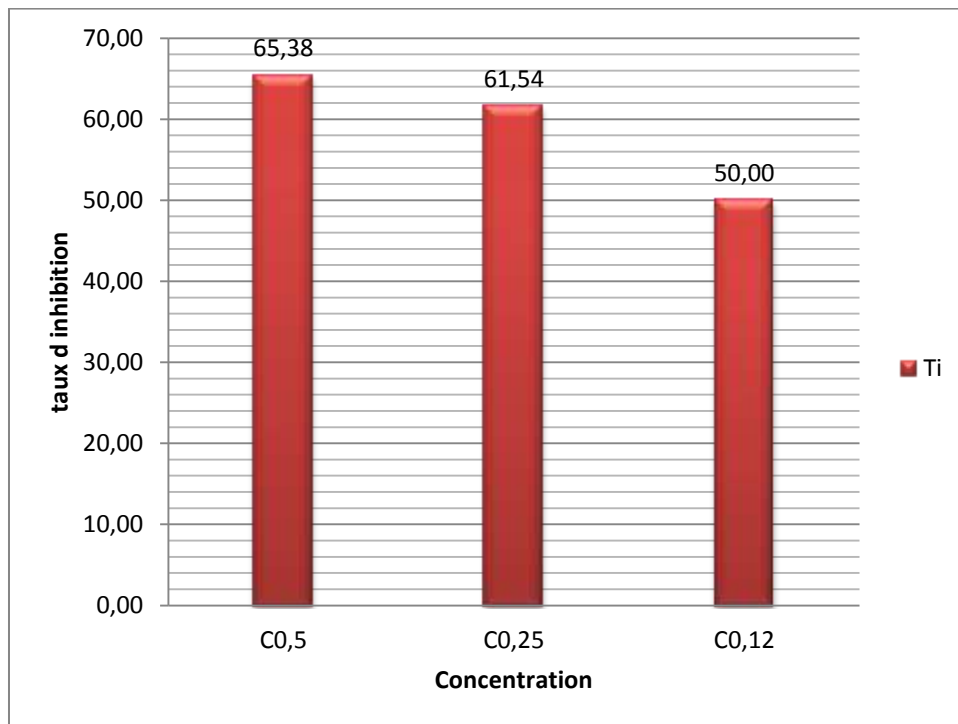
**Figure°7:** Histogramme présent le taux d’inhibition de la croissance d’ *E.carotovora* sous l’effet de différentes concentrations en huile essentielle issus de gingembre frais.

La souche *Erwinia carotovora* donnée un taux d’inhibition de 96. %avec la dilution 0.5% et une zone de 76.92% avec la dilution 0.25% et un diamètre de 1.9cm et 73.08%avec la dilution 0.12%, donc pour *Erwinia carotovora* est sensible pour toutes les dilutions de l’huile du gingembre.

**Le tableau N°6:** illustre les variations des taux d’inhibition des souches bactériennes apparues en présence de l’extrait de *Zingiber officinale*.

Dilution (HE P. fraîche)	0.5%	0.25%	0.12%	Témoin (acétone 70%)
zone d’inhibition	96.15%	76.92%	73.08%	0%

L’huile de *Zingiber officinale* présent un effet positif sur la souche bactérienne étudiée avec des zones d’inhibition de 96.15%, et 76.92% respectivement.



**Figure N°8:** Histogramme présent le taux d'inhibition de la croissance de la souche *E. carotovora* sous l'effet de l'huile essentielle issus de gingembre séché.

L'inhibition de la souche bactérienne est proportionnellement corrélé avec les différentes concentrations appliquées. La souche *Erwinia carotovora* donnée un diamètre de 1.7mm avec la dilution 0.50% et un zone de 1.6cm avec la dilution 0.25% et un diamètre de 1.3cm avec la dilution 0.12%, donc *Erwinia carotovora* est sensible pour toutes les dilutions de l'huile du gingembre sec. (BELLKHDAR, 1997).

**Tableau N°7 :** Diamètres (mm) des zones d'inhibition d'huile essentielle de *Zingiber officinale* (plante séchée) sur *Erwinia carotovora*.

Dilution (HE P. sèche)	0.5%	0.25%	0.12%	Témoin (acétone 70%)
zone d'inhibition	65.38%	61.54%	50%	0%

**II-4-La concentration minimale inhibitrice d'huile de *Zingiber officinale***

Après les résultats enregistrés sur la bactérie *Erwinia carotovora* ayant présenté une sensibilité vis-à-vis toutes les dilutions de l'huile essentielle . le diamètre d'inhibition variée de 2.5 à 1.9cm selon la dose appliquée. Et la Concentration minimale inhibitrice (CMI) dans ces conditions expérimentale est de 12% (V/V).



**photo N°11** : développement de la souche bactérienne sur la gélose nutritive additionné de l'acétone (témoin).



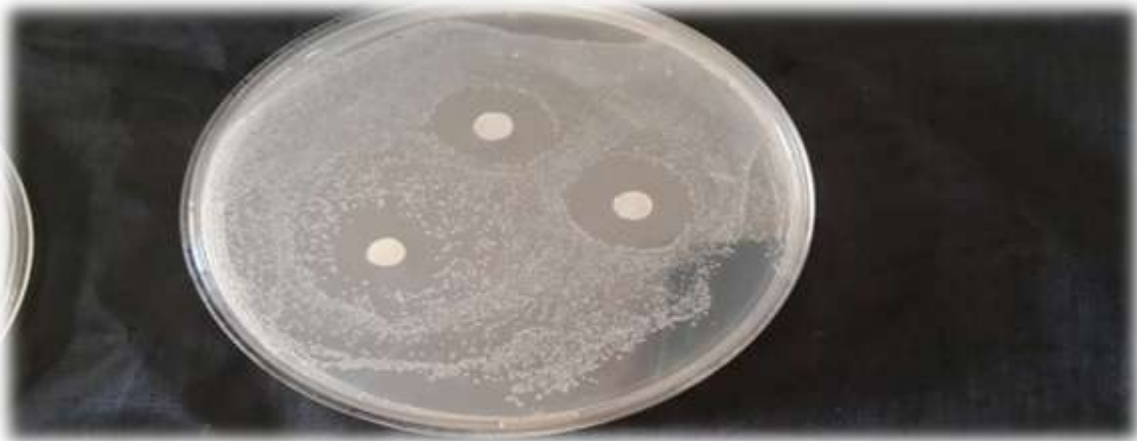
**Figure N°12** : effet d'une dose de 0.5% de l'huile essentielle (plante fraîche) sur la croissance bactérie *E.carotovora*.



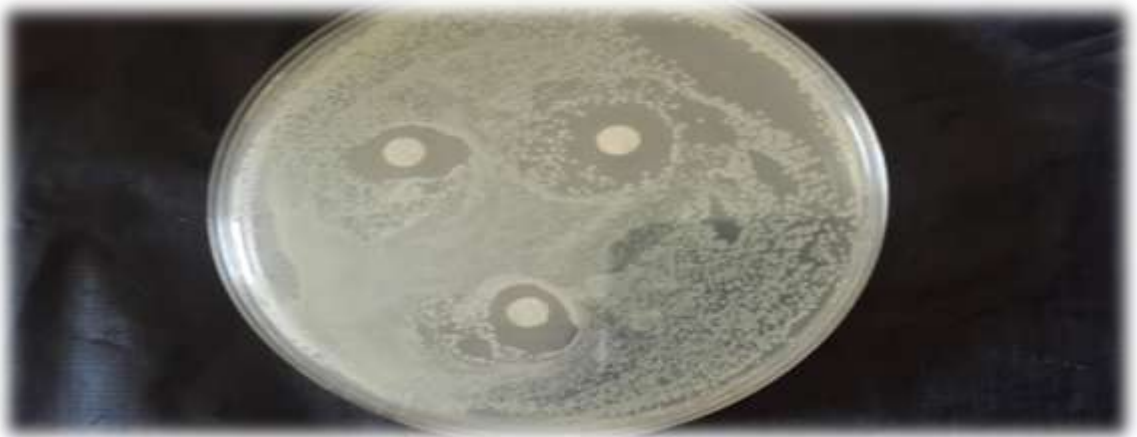
**Figure N°13 :** effet d'une dose de 0.25% de l'huile essentielle (plante fraiche) sur la croissance de la bactérie *E.carotovora*.



**Figure N°14:** effet des doses de 0.12% de l'huile essentielle (plante fraiche) sur la bactérie *E.carotovora*.



**Figure N°15 :** effet d'une dose de 0.5% de l'huile essentielle (plante séchée) sur la croissance de la bactérie *E.carotovora*.



**Figure N°16 :** effet des doses de 0.25% de l'huile essentielle(plante séchée) sur la bactérie *E.carotovora*



**Figure N°17:** effet d'une dose de 0.12% de l'huile essentielle (Plante séchée) sur la croissance de la bactérie *E.carotovora*

## II- 5-discussion

Les résultats montrent que les huiles essentielles issues de gingembre frais et gingembre séché ont un effet semblable sur la bactérie *Erwinia carotovora*.

L'efficacité des huiles essentielles étudiés vis -à- vis de cette bactérie est nettement visible pour des concentrations de 0. 5%. Ce pouvoir inhibiteur augmente au fur et à mesure que les concentrations en l'huile essentielle augmentent, pour attendre l'inhibition totale de la croissance a partir d'une concentration 0,1% en HE, ce pouvoir biocide dépend de la nature chimique des constituants des HE, qui varie selon la zone de culture, la récolte, la méthode choisi pour l'extraction et la durée de cette dernière.

La composition chimique des huiles essentielles du gingembre frais et gingembre séché est déjà authentifiée, la plupart des composés sont déjà reconnus pour leur activité antibactérienne et antifongique.

Les aryl-alcanones et les diarylheptanoïdes, sont potentiellement porteurs d'activités biologiques revendiquées traditionnellement. Les plus connus sont les curcuminoïdes et les gingérols. Ils constituent les substances colorantes des curcumas (*Curcuma spp.*) et les principes piquants du gingembre *Zingiber officinale* (CHEIKH ALI, 2012).

La différence entre les extraits des deux formes de gingembre, c'est dans la composition chimique de ces derniers, dont le constituant major est le gingérol, du gingembre frais, sa concentration est plus faible dans le gingembre séché, tandis que la concentration en shogaol augmente dans l'extrait du gingembre sec et diminue dans les extraits de gingembre frais ( Joy et al, 1998). Aussi la richesse des extraits des rhizomes frais en vitamine C totalement absente dans les extraits de la forme séchée de cette plante.

L' extrait de gingembre possède aussi des effets sur d' autres bactéries et champignons phytopathogènes, selon **LEpengue (2013)** l' extrait de gingembre inhibaient de manière significative la croissance mycélienne de *Phoma sabdariffae* et que les taux d'inhibition fongique étaient proportionnels aux concentrations.

Plusieurs paramètres influencent l'activité antibactérienne de l'huile essentielle telle que la méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne, la partie de la plante utilisée ainsi que son état physique (fraiche ou séchée), le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose testée, la sensibilité des souches microbiennes choisies pour effectuer les tests. (**CHEIKH ALI, 2012**).

# Conclusion

---

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leur potentialité bioactives.

L'objectif de notre travail consiste à faire une étude physicochimique et biologique de l'huile essentielle du Zingiber officinale frais et sec .

La valeur du rendement en huile essentielle est de 0.91% pour la forme fraîche et 0.76% pour la sèche. Cette valeur est identique avec celles obtenus chez d'autres études de la même espèce

Les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles de Zingiber extrait par hydro distillation .Ont des propriétés physicochimiques (la densité, l'indice de réfraction, indice d'acide) conformes aux normes AFNOR ce qui traduit la pureté de notre huiles essentielles

De même pour l'activité biologique de l'huile du Zingiber, donné un pouvoir antibactérien très important vis-à-vis *Erwinia carotovora* est enregistré avec un taux d'inhibition dépassent 96.15%.

En guise de conclusion et selon ces résultats, il serait intéressant de poursuivre cette étude par d'autres recherches, in vitro et in vivo sur d'autres germes phytopathogènes de l'huile essentielle ainsi que d'autres formes d'extraits comme les extraits hydro alcoolique et les extraits aqueux. Vérifier l'efficacité en plein champs, proposer et préparer des formulations afin d'augmenter l'efficacité des extraits naturels. Et le plus importants c'est de d'évaluer l'aspect toxicologique de ces extraits naturels, afin de les incorporer comme bio-pesticides d'origine végétale.

*Références*

*Bibliographiques*

## *Références Bibliographiques*

**AGNIHOTRI, S. KHATOON. M. SHANTA (2003)** .Pharmacognostic evaluation of an antioxidant plantacorus calamus linn. Nat. Prod. Sci. 9(4), 264-269.

**ATIK BEKKARA et al (2007)**. Composition chimique de L'huile essentielle de *Romarin officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. Biologie & santé .7 :6-11

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

**BELOUED, A (1998)**. Plantes médicinales d'Algérie.2<sup>ème</sup> Edition .Office des publications.

**BOULLARD (2010)**. BOUDJEMAA Nour Elyakin et BEN GUEGUA Hadjer, L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*. Université Kasdi Merbah Ouargla.

**BALENTINE et al (2006)** .The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and during storage of ground beef. *Meat Science*.73, p.413-421.

**BRUNETON, J (1999)** .Pharmacognosie ,phytochimie ,plantes médicinales.3<sup>ème</sup> Edition .Tec & Doc (Ed) .Paris,p.575

**CAILLET S, LACROIX M ,2007** .Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire.Laboratoire de recherche en Sciences appliquées à l'alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier ,université de Laval (Québec) .

**ESTEM(Ed)**. Plantes médicinales du monde réalités et croyances Paris, p.660..

**E. Vagi, B. SIMANDI, A. SUHAJDA, E (2005)**. Hethelyi. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum marjorana* L. Extracts btained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. J., 38, 51-57

**ESCOTT, HARLEIN, KIEIN (2006)**. Microbiologie 2<sup>e</sup> edition française, de boek, P : 2.  
**GUENTER E (1975)**. The essential oils Vol II, III, IV, V, VI, and D. Van No strand Ed.

New York USA.

**FOUZIA DJENADI (2011).** Memoire Online, Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du genévrier (*Juniperus phoenicea*): essai des huiles essentielles et composés phénoliques Université A Mira de Béjaia Algérie - Master en biologie option biochimie appliquée .

**FERNANDEZ-LOPEZ et al (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*.p.69:371-380.

**Gill J et al (2007).** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants

**GONZALEZ-TRUJANO et al(2007).** Evaluation of antinociceptive effect.

**GOEB Ph(1999).** Aromathérapie pratique et familiale. Ed. MDB.

**Gonzalez-Trujano, M .E. et al (2007).**evaluation of antinociceptive effect of *Romarin officinalis* L.using three different experimental models in rodents .*J Etheopharmacol*.111:476-482.

**HENRICH, et al (2006).** Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.

**HOSTETTMANN K(1997).** Tout savoir sur le pouvoir des plantes. Ed. Favre. S.A. Lausanne. Suisse.

**JEAN BOTTON A (1999).** Pharmacognosie « Photochimie plante « médicinales 3<sup>eme</sup> éd TEC.DOC Paris. P484-p540.

**JEAN-PIERRE DEDET (2006).**la microbiologie de ses origines aux maladies émergents.ISBN978-26106-B, P 213 -245.

**JUDD et al (2002).** Botanique systématique une perspective phylogénétique .pp84-87

**L.RAUL. H. OCHOA(2005).** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » D'origine végétale. Thèse De L'institut National Polytechnique De Toulouse.

**MARIE ELISABETH LUCCHESI (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23,

52, **MARIE ELISABETH LUCCHESI, FARID CHEMAT,**  
**and JACQUELINE**

**SMADJA(2004).**Flavour And Fragrance Journal Flavour Fragr. J.; 19: 134–138

**MEYER, WARNOD J (1984).** Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, *Perfumer & Flavorist*, 9, 93-103.

**M.E. LUCCHESI (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse d'Université de la Réunion

**NAUCIEL C et VILDEJ.L (2005)** .Bactériologie médicale.2<sup>ème</sup> Ed .Masson . Paris .ISBN : 2-294-018583.257p.

**NORMES AFNOR RECUEIL DES NORMES FRANCAISESE (1992).** Huiles essentielles. AFNOR, Paris,

**PRAJAPATI et al (2005)** .Insecticide, repellent.

**P.BERCHE et al (P.C.E.M.2) (2002/2003).**Bactériologie générale, faculté de médecine Necker –enfants malades. P.16.

**SACCHETTI, et ses Collaborateurs (2005).**Growing in Argentina.Bioresource Technology . (In press).

**SCHAECHTER et al(1999).** Microbiologie et pathologie infectieuse 2<sup>ème</sup> édition Decock, P ; 1, ISBN-8041-1592-5.).

**SEBROTYNEKet al (2005)** .Comparison of natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat science* .69:289-296

**SHARIFIFAR, F, Mosha, M.H., Mansouri, S. H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M.,** 2007.*Food Control*,(18),800-805.

**SKOCIBUSIC, M**Skocibusic,M., Bezic, N.,Dunkic, V., 2006. *Food Chem.*, (96), 20–28.

**SOTELO-FELIX et al ,(2002).** Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat *J Ethnopharmacology* .81:145-154.

**Tsai et al (2007).** In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of streptococcus sodrinus .*Food chem.* (in press).

**ZABEIROU ; HACHIMOU (2005).** Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicata L*) et de la Poivre (*Mentha Piperita L*) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie –Université de Kasdi Merbbah \_Ouargla .p16

**ZAMBONLLI., A.Z. D'AURELIO., A. Severi., E. BENVENUTI., L. MAGGI., A.**

**BINACHI. (2004).** Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of thymus vulgaris L J. Essent Oil Res 16(1), 69-74

**WECKESSER et al (2007).** Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. Phytomedicine. (In press).

**WANG et al (2008).**Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis L.*essential oil comared to its main components.Food Chem.108:1019-1022.



# *Annexes*

## Annexe I :

### **-Principe de méthode de préparation**

La gélose de Mueller Hinton a été formulée à l'origine comme un milieu gélose Transparent simple servant à la culture de différents types de bactéries celle-ci est aujourd'hui largement utilisé.

### **-Méthode**

- ✓ Préparer le matériel nécessaire comme le bac benzène, les boites de pétries....etc.
- ✓ Mettre le 1<sup>er</sup> réactif l'agar dans l'eau chaude, cette étape est plus importants pour préparé un bon milieu.
- ✓ Ajouter les autres réactifs un par un, à la fin ajoute l'amidon et mettre le milieu dans l'autoclave pendant 15 minute et à 116 C°.

### **• Les réactifs :**

Formule approximative pour un litre d'eau.

- Hydrolysate acide de caséine (peptone).....17.5g.
- Extrait de bœuf .....3.0g.
- Amidon.....1.5g.
- Agar.....17.0g.
- Eau distillée.....1000 ml.

### **Matériel au laboratoire**

Les matériels utilisés sont les suivants :

- ✓ bec bunsen
- ✓ les tube à essai et les boite de pétrie
- ✓ les flacons
- ✓ Papier wattman (Ø=6mm)
- ✓ Ecouvillon

### **❖ Les appareils :**

Plusieurs appareils utilisés pour étudier l'activité antibactérienne de *Zingiber officinale*. Le tableau suivant site ces appareils.

**Tableau: les appareils de laboratoire utilisés**

Matériel	Utilisation
Appareil d'hydro distillation de type Clevenger	Extraction des HEs
Agitateur plaque chauffante	Préparation du milieu de culture
Réfrigérateur	Conservation des échantillons
Autoclave	Stériliser les matériels et les m de culture
Etuve réglée à 37C	incubation les souches bactérie
Micropipette (500µl)	Préparation de micro volumes



**Photo:** Autoclave



**Photo :** Bain marie



**Photo. :** Préparation des dilutions

