

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie

Option : *Microbiologie Fondamentale et Appliquée*

*Thème*

---

# **Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Erica multiflora* d'Algérie**

---

**Présenté par :**

**Mlle. Tabti Mensouria**

**Mlle. Sali Fatima Zohra**

**Soutenu le devant le jury :**

<b>Mr Chirigen A</b>	Professeur à l'université de Mostaganem	<b>Président</b>
<b>Mr Ait chaaban O</b>	MAA à l'université de Mostaganem	<b>Examineur</b>
<b>Mr Bahri F</b>	Professeur à l'université de Mostaganem	<b>Encadreur</b>

*Année universitaire 2015-2016*

# **REMERCIEMENT**

*Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'ALLAH qui nous a donné la force afin de l'accomplir.*

*Monsieur le **Professeur Fouad BAHRI**, nous tenons à vous adresser nos profonds remerciements, pour avoir encadré ce travail. Nous tenons à manifester nos reconnaissances pour votre patience, votre gentillesse et votre écoute.*

*Monsieur le **Professeur Chirigen A**, nous sommes très sensible à l'intérêt que vous avez manifesté à l'égard de ce travail et nous avons remercié d'avoir accepté d'être président du jury.*

*Que Monsieur, le **Professeur Ait chaabane L**, trouve nos sincère considération pour l'honneur qu'il nous accorde en acceptant de juger ce travail et de faire partie du jury.*

*Nous exprimons nos remerciements sincères pour : Mademoiselle **Bouabdelli W**, pour ses conseils et surtout pour la documentation précieuse qu'elle nous a confié.*

# *Dédicace*

*Nous dédions ce travail à nos parentes, qu'ils trouvent ici toute  
notre gratitude pour leur soutien tout au long de nos études.*

*A nos sœurs et nos frères*

*A nos amies*

*A notre encadreur Mer Fouad BAHRI*

## Résumé :

Les huiles essentielles possèdent d'importantes activités antimicrobiennes 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'analyse chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Erica multiflora*

Pour cela, nous nous intéressés à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Erica multiflora*. L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode de diffusion sur disque et par contact direct. L'huile essentielle de *Erica multiflora* est active vis-à-vis des bactéries testées (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*). La souche fongique la plus sensible est : *Candida albicans* qui présente une sensibilité avec un diamètre de zone d'inhibition variant entre 14,0 et 29.5mm. L'espèce microbienne le plus résistant est : *Aspergillus brasiliensis*.

Mots clefs : *Erica multiflora*, huiles essentielles, activité antimicrobienne, Nedroma

المخلص:

الزيوت العطرية لها نشاط كبير ضد الميكروبات ويمكن أن تكون بديلا بنجاح مع المضادات الحيوية التي تظهر أوجه القصور ضد الكائنات الدقيقة المقاومة، مما دفعنا إلى إجراء التحليل الكيميائي والنشاط المضادة للميكروبات من الزيوت الأساسية من *Erica Multiflora*

لهذا، نحن مهتمون في دراسة النشاط المضادة للميكروبات من الزيوت الأساسية من *Erica multiflora*. ويتجلى نشاط مضادات الميكروبات من طريقة القرص نشر وعن طريق الاتصال المباشر. الزيت الأساسي من *Erica multiflora* نشط وجها لوجه من البكتيريا المختبرة (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*) سلالة الفطرية الأكثر حساسية هو *Candida albicans*، والتي لديها حساسية مع منطقة قطرها تثبيط بين 14.0 و 29.5mm. الأنواع الميكروبية الأكثر مقاومة: *Aspergillus brasiliensis*

الكلمات المفتاحية *Erica multiflora* : ، الزيت الأساسي، النشاطية ضد الميكروبات، ندرومة

## Sommaire

Dédicaces .....	I
Remerciements.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	III
Liste des abréviations.....	V

## Introduction

### Partie Bibliographique

#### Chapitre I

##### Valorisation des Ressources Végétales par l'Etude des Huiles Essentielles

1. Historique.....	1
2. Définition.....	1
3. Localisation et lieu de synthèse.....	2
4. Propriétés physiques.....	2
5. Rôle physiologique.....	3
6. Composition chimique.....	3
6.1. Les terpènes .....	3
6.2. Composés aromatiques.....	4
6.3. Les composés d'origine diverses.....	4
6.4. Notion de chemotype.....	6
7. Facteurs influençant la composition chimique.....	6
8. Méthodes d'extraction.....	7
8.1. Distillation.....	7
8.2. Extraction à froid.....	9
8.3. Extraction assistée par micro ondes.....	9
8.4. Extraction par les solvants et les graisses.....	10
9. Toxicité des H.Es.....	10
10. Méthodes de caractérisation chimique des H.Es.....	11
10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	12

10.2. La spectrométrie de masse (SM).....	13
10.3. Couplage CPG/SM.....	13
11. Activités biologiques.....	14
11.1. Activité antimicrobienne.....	15
11.1.1 Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	15
11.1.2 Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne.....	15
a- Aromatogramme (méthode de Vincent) .....	16
b- Méthode de micro-atmosphère (CMI Concentration minimal inhibitrice).....	16

## **Chapitre II**

### **Etude des plantes**

1. Définition.....	18
2. La famille <i>Ericaceae</i> .....	18
3. Position systématique .....	19
4. Description botanique des <i>Ericaceae</i> .....	19
5. L'espèce <i>Erica multiflora</i> .....	20
6. Classification .....	21
7. Usages traditionnels.....	21
8. Toxicité .....	22

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre III**

#### **Matériels et méthodes**

1. Objectif de travail .....	23
2. Testes microbiologiques.....	23
2.1.Souches bactériennes et fongiques étudiées .....	24
2.2.Conservation des souches microbiennes .....	24
2.3.Les milieux de culture .....	24
2.4.préparation de l'inoculum .....	24
2.5.Standardisation de la turbidité .....	25
3. L'étude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques	

et antifongiques .....	25
3.1. Préparation des disques d'antifongiques .....	26
4. Etude de l'activité antimicrobienne in vitro des huiles essentielles (technique de Vincent) .....	26
5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	27
5.1. Technique par contact direct .....	27
5.2. Méthode de dilution en milieu solide .....	27

## **Chapitre IV**

### **Résultats et Discussion**

1. Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et antifongiques vis-à-vis des souches étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles (Technique de Vincent) .....	29
2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles (méthode de contact direct) .....	31

<b>Conclusion .....</b>	<b>35</b>
-------------------------	-----------

<b>Reference bibliographique .....</b>	<b>36</b>
--	-----------

**Annexe**

## Liste des tableaux

<b>Tableau n°1</b> : Taxonomie des <i>Ericaceae</i> selon Cronquist.....	19
<b>Tableau n°2</b> : Taxonomie des <i>Erica multiflora</i> .....	21
<b>Tableau n°3</b> : Les huiles essentielles d' <i>Erica multiflora</i> .....	23
<b>Tableau n°4</b> : Liste des souches microbiennes testées.....	24
<b>Tableau n°5</b> : Liste des antibiotiques utilisés.....	25
<b>Tableau n°6</b> : Résultats de la sensibilité aux antibiotiques d' <i>Escherichia. Coli</i> et <i>Bacillus cereus</i> (zone d'inhibition en mm).....	29
<b>Tableau n°7</b> : Résultats de l'activité antimicrobienne des antifongiques exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.....	31
<b>Tableau n°8</b> : Diamètres (mm) des zones d'inhibition d'huile essentielle des feuilles fraîches et sèches et des fleurs d' <i>Erica multiflora</i> .....	32
<b>Tableau n°9</b> : Détermination de la CMI d'H.E d' <i>Erica multiflora</i> .....	34

# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure de l'unité isoprénique.....	4
<b>Figure 2 :</b> Structures chimiques des composants prépondérants des H.Es.....	5
<b>Figure 3 :</b> Montage de l'hydrodistillation.....	8
<b>Figure 4 :</b> Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur.....	9
<b>Figure 5 :</b> Schéma illustrant la méthode des aromagrammes.....	16
<b>Figure 6 :</b> Schéma illustrant la méthode de micro-atmosphère.....	17
<b>Figure 7 :</b> Répartition mondiale des Ericaceae selon Stevens.....	18
<b>Figure 8 :</b> L'espèce <i>Erica multiflora</i> .....	21
<b>Figure 9 :</b> Carte géographique montre la région de la récolte.....	23
<b>Figure 10 :</b> Effet de Gentamicine (Photo gauche) et Tobramycine (Photo droite) sur la croissance de <i>B.cereus</i> ATCC10876 .....	30
<b>Figure n°11 :</b> Effet de quelques antibiotiques sur la croissance d' <i>E.coli</i> ATCC25922.....	30
<b>Figure n°12 :</b> Effet de l'Econazol et Clotrimazol sur la croissance de <i>Candida albicans</i> ATCC16404 .....	31
<b>Figure n°13:</b> Effet des huiles essentielles des feuilles fraîches et sèches « Djebala » d' <i>Erica multiflora</i> sur la croissance de <i>B.cereus</i> ATCC10876.....	33
<b>Figure n°14 :</b> effet des huiles essentielles des fleurs et des feuilles fraîches et sèches d' <i>Erica multiflora</i> sur la Croissance de <i>C.albicans</i> ATCC16404.....	34

## Liste des abréviations :

**°C** : degré celcius

**AFNOR** : Association Francaise de Normalisation

**CG/MS**: Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse

**CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse

**CPG**: Chromatographie en Phase Gazeuse

**HE** : huile essentielle/ huiles essentielles

**IC** : ionisation chimique

**IE** : ionisation électronique

**MH** : milieu Mueller Hinton

**pH** : potentiel d'hydrogène

**SM**: Spectrométrie de masse

# **Introduction**

Pendant des siècles, l'Homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. La plupart de grands médecins du passé ont été des phytothérapeutes. Aujourd'hui encore, diverses maladies sont traitées uniquement par les seules thérapies naturelles qui font appel non seulement aux plantes aromatiques, mais aussi à leurs huiles essentielles obtenues généralement par hydrodistillation.

Il existe un grand nombre d'huiles essentielles connues dans le monde et plusieurs milliers d'entre elles ont été caractérisées. Cependant, de ce nombre, une faible proportion seulement présente un intérêt commercial. Cela s'explique par la composition chimique des huiles, les différentes utilisations possibles et leur coût de production.

Les plantes aromatiques sources de ces substances sont largement répandues dans la nature. L'Algérie abrite un ensemble d'espèces importantes et variées et témoigne de ce fait d'une richesse floristique incontestable. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier certaines plantes, poussant à l'état spontané dans la région de Nedroma. Ce travail a pour objet d'analyser l'activité biologique des huiles essentielles de l'espèce appartenant de la famille botaniques différentes; la famille des Ericaceae représentée par l'espèce *Erica multiflora*.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de trois parties, La première partie comporte une investigation bibliographique dans laquelle les connaissances liées aux huiles essentielles d'une manière générale seront étalées. Dans un second temps, nous exposerons les divers modes d'extractions, tout en se focalisant sur l'hydrodistillation et les facteurs liés à ce procédé classique d'extraction. Avant de finir par une présentation des espèces étudiées. Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel biologique, puis l'étude de son activité et enfin, l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles par la méthode de diffusion sur disque et par la méthode de contact direct. Dans la troisième partie, nous discuterons les résultats obtenus lors de cette étude. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, les annexes et la liste des références bibliographiques.

# **Revue bibliographique**

# **CHAPITRE I**

## **Généralités sur les huiles essentielles**

## 1. Historique :

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles à son alimentation, à son hygiène et à sa santé.

Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques.

Déjà, En Chine, l'Empereur Chen Nong (2800 av. J.-C.), médecin érudit, consigne son savoir relatif aux plantes médicinales dans un livre, le Pen Ts'ao, qui recense plus de 1000 plantes médicinales utiles (**Lardy et Haberkorn, 2007**).

Il semblerait que ce soit les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4000 ans qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel. L'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient déjà obtenus sous forme d'huile distillée

Hermann Boerhave (1668-1738) fut l'un des premiers à décrire les H.Es d'un point de vue chimique (**Lucchesi, 2005**). L'aromathérapie tomba ensuite dans l'oubli, toutefois il a

En 1975, Franchomme en France, aromatalogue mis en évidence l'importance du chémotype (ou race chimique de l'espèce) (**Fouche et al., 2000**).

L'ère industrielle a pris peu le pas sur un empirisme et développa ainsi de nouvelles techniques de distillation.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentiels dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums, mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. (**Zhiri, 2006**).

## 2. Définition :

Les huiles essentielles (=essences = huiles volatiles) sont : «des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation» (**Bruneton, 1993; Cavalli 2002; Chemat et al., 2007**).

Plus récemment, la norme AFNOR NF T 75-006 (**octobre 1987**) a donné la définition suivante d'une huile essentielle : «Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur (**Lucchesi et al., 2004**), soit par des procédés

mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec» (**Bruneton, 1993**).

Les huiles essentielles sont des liquides huileux aromatiques très concentrés renfermant des mélanges complexes de substances volatils constitués de plusieurs dizaines de composés. (**Bourrel,1993 ; Raul et Ochoa, 2005; Tigrine-Kordjaniet al., 2006**).Elles se retrouvent dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, fleurs et fruits) et dans toutes les régions climatiques du globe. Les facteurs environnementaux comme la température, l'irradiante et la photopériode peuvent jouer un rôle primordial sur la qualité et la quantité de l'huile essentielle (**Népomuscène, 1995**).

### **3. Localisation et lieu de synthèse :**

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal avec des familles à haute teneur en matières odorantes comme les conifères, les rutacées, les myrtacées, les ombellifères, les lamiacées, les géraniacées etc.

Les essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétrices isolées (cas des lauracées et magnoliacées), mais on les trouve le plus souvent dans des organes sécréteurs spécialement différenciés et variables suivant les familles botaniques. On peut citer, par exemple, les poils sécréteurs des lamiacées, les poches sécrétrices des rutacées et les canaux sécréteurs des conifères. L'appareil sécréteur peut être externe, comme dans bon nombre de lamiacées, ou bien interne, comme c'est le cas pour les différents eucalyptus (myrtacées) (**Agnamey P., 2002., Faye O.,1997**)

### **4. Propriétés physiques :**

Les H.Es sont en général liquides à température ambiante, volatiles, d'odeur très forte, incolores, jaunes pâles ou quelques fois bleues. Leur densité est <1 sauf pour les H.Es de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), Cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et Sassafras (*Sassafras albidum*). Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants, les huiles et la vaseline; très altérables, elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (**Charpentier et al., 2008**).

Le terme huile s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus au moins forte dégagée par la plante (**Teusher et al., 2005**).

## 5. Rôle physiologique :

Beaucoup de plantes produisent les H.Es en tant que métabolites secondaires. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Selon BAKKALI (2008), les H.Es peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines, par protection contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables.

## 6. Composition chimique :

Du point de vue chimique, les huiles essentielles représentent le groupe le plus hétérogène qui existe. On y trouve divers composés représentant un bon nombre de fonctions organiques (hydrocarbures, alcools, cétones, aldéhydes, esters et acides). Ces composés appartiennent à une classe de produits naturels nommée terpènes ou encore terpénoïdes. Les terpènes ont été nommés par Friedrich Kekulé Von Stradonitz, en référence à la térébenthine qui, en plus des acides résiniques, contient aussi des hydrocarbures. Seulement, ceux-ci ont été qualifiés à l'origine de terpène [Kekulé, 1865].

### 6.1. Les terpènes :

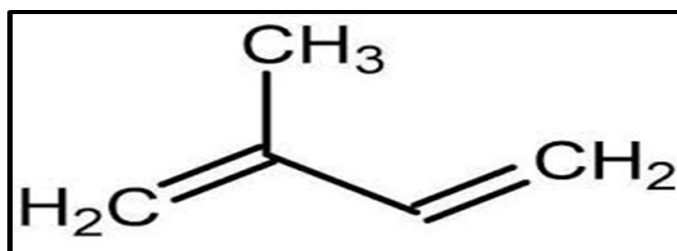
Selon le nombre des unités d'isoprène, les terpènes sont classés en monoterpènes à 10 carbones, sesquiterpènes à 15 carbones, diterpènes à 20 carbones.

Les terpènes sont des molécules très volatiles fréquentes dans la nature, surtout dans les plantes où ce sont les principaux constituants des huiles essentielles. Les terpènes sont issus du couplage d'au moins 2 sous-unités isopréniques à 5 carbones (figure 1) (Bottin, 2006).

Les substances monoterpéniques étaient parfaitement connues au début du XXe siècle. Par ailleurs, ce n'est qu'en 1910 que Semler détermine la structure correcte du premier composé sesquiterpénique; le  $\beta$ -santalène. Il faut attendre ensuite trois ans pour que Keschbaum en 1913 établisse la structure du trans-2-trans-6-farnésol. C'est la

deuxième structure sesquiterpénique décrite avec précision et depuis, le nombre des terpènes naturels connus est actuellement voisin de 5000, compte-tenu des mono, sesqui, di, tri, et polyterpéniques (**Teisseire, 1991**).

**Les terpénoïdes** sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide, etc.)



**L'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène)**

**Figure 1: Structure de l'unité isoprénique.**

**Les monoterpènes** sont volatils entrainables à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.Es, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géranial, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone,  $\beta$ -vétinone), et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate  $\alpha$ -terpinyle) (figure 2).

**Les sesquiterpènes** il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple :  $\beta$ -caryophyllène,  $\beta$ -bisabolène,  $\alpha$ -humulène,  $\alpha$ -bisabolol, farnesol (**Bruneton, 1999, Hernandez-ochoa, 2005**).

## **6.2. Les composés aromatiques :**

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les H.Es d'*Apiaceae* (anis, fenouil, cannelle, basilic)

### **6.3. Les composés d'origine diverses :**

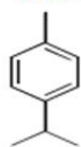
Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras, de terpènes.

D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Enfin, il n'est pas rare de trouver dans les concrètes des produits de masses moléculaires plus importantes non entraînaibles à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants : homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc... **(Bruneton, 1999)**. **Abou Zeid (1988)** signale que le composé soufré le plus rencontré est l'allyl-isothiocyanate issu de la dégradation d'un glucoside sinigroside qui se trouve dans les graines de moutarde noire. Ce composé est incolore, fluide et de saveur piquante. Certaines plantes aromatiques produisent des huiles essentielles dont les composés terpéniques renfermant l'élément nitrogène. Parmi ces composés on cite l'indole, qui se trouve dans l'huile essentielle de citron et des fleurs de jasmin.

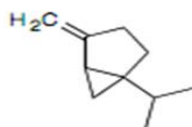
## 1. Terpenes

### -Monoterpenes

Carbure monocyclique  
Cymene ("y") or p.cymene



Sabinene



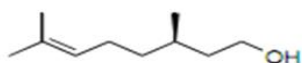
Carbure bicyclique  
Alpha-pinene



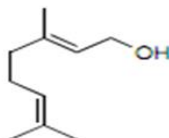
Betapinene



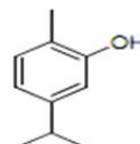
Alcool acyclique  
Citronellol



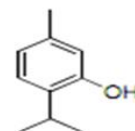
Geraniol



Phenol  
Carvacrol

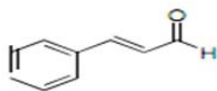


Thymol

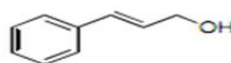


## 2. Aromatic compounds

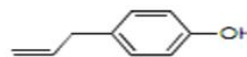
Aldehyde  
Cinnamaldehyde



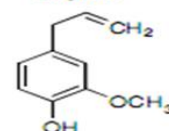
Alcool  
Cinnamyl alcohol



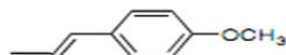
Phenol  
Chavicol



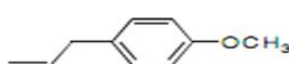
Phenol  
Eugenol



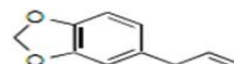
Methoxy derivative  
Anethole



Methoxy derivative  
Estragole

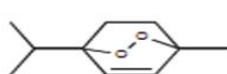


Methylene dioxy compound  
Safrole



## 3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole



Menthol

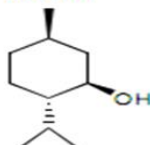


Figure 2 : Structures chimiques des composants prépondérants des H.Es (Bakkali *et al.*, 2008).

## 6.4. Notion de chemotype :

Un Chémotype, ou encore race chimique, désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Certaines espèces de plantes, de champignons ou de micro-organismes, présentent des variations chimiques de leur métabolite secondaire en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement, biotope, etc.), bien que leur morphologie ainsi que leur génétique ne soient pas substantiellement transformées. Ainsi une espèce donnée d'eucalyptus peut donner une essence à dominante, cinéol-1,8, spathuléol ou pinène « alpha » (Shama, 2011). Il est important de noter que des huiles essentielles à

chémotypes différents, présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

## 7. Facteurs influençant la composition chimique :

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'H.E : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction ; sont d'autant de facteurs susceptibles d'exercer les modifications chimiques. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en H.E, par exemple : les *citrus* ont une teneur importante en H.E lorsque la température est élevée. Les fleurs de *Chrysanthemum caronarium* sont riches en H.E sous l'effet de fertilisants (Bruneton, 1999).

### ▪ Facteurs intervenant dans la qualité des huiles essentielles:

Les facteurs prédominants dans la qualité des huiles essentielles peuvent avoir deux types, d'origines:

- Technologique ;
- Naturel.

De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle. Le mode de récolte, les conditions de transport (Yayi et al., 2004), le séchage et le stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques (Bruneton, 1993). Les changements les plus importants interviennent pendant l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (l'acidité, température) et de la durée d'extraction (Lagunez Rivera, 2006 ; Chemat et al., 2007). D'autres facteurs tels que les traitements

auxquels on peut procéder avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique ou enzymatique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (Lagunez Rivera, 2006).

## 8. Méthodes d'extraction :

Il existe différentes techniques d'exploitation des plantes aromatiques, les plus connus sont la distillation à la vapeur d'eau, l'expression à froid,

l'extraction par les solvants et par les graisses (Robert, 2000, et Proust, 2006) et l'extraction au CO<sub>2</sub> en phase supercritique (Pellerin, 1991 et Wenqtang, 2007).

Le choix du procédé d'extraction influe directement sur la qualité des produits et sur le rendement de l'extraction. Il est orienté par la localisation histologique et la composition chimique de ces essences. À l'échelle industrielle, le procédé le plus employé reste la distillation à la vapeur d'eau. Les principales raisons de cette préférence sont :

- La facilité de mise en œuvre du procédé,
- La sélectivité et donc la qualité des produits obtenus
- Le procédé ne nécessite pas de dispositifs particuliers de sécurité.
- 

### 8.1. Distillation :

Selon Piochon (2008), il existe deux différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.

#### a- Hydrodistillation :

L'hydrodistillation proprement dite est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité (AFNOR, 1992). 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 (figure 3) (Lagunez Rivera, 2006).

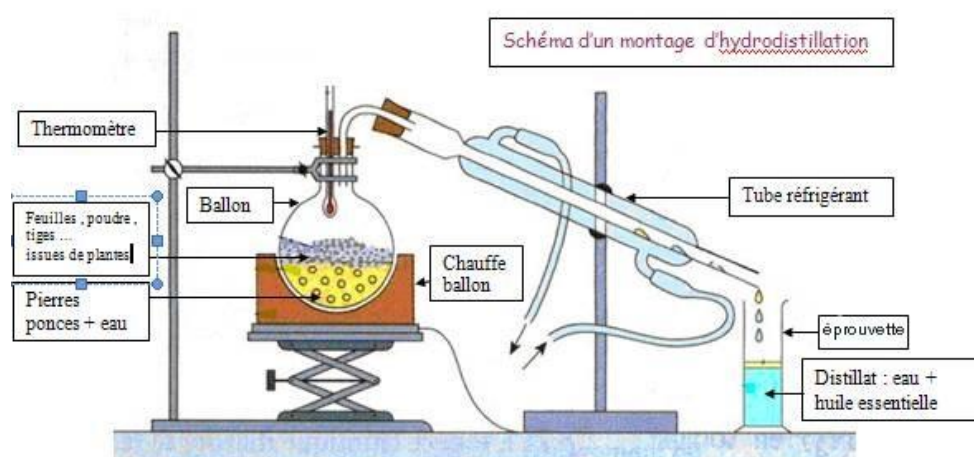


Figure 3 : Montage de l'hydrodistillation

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre

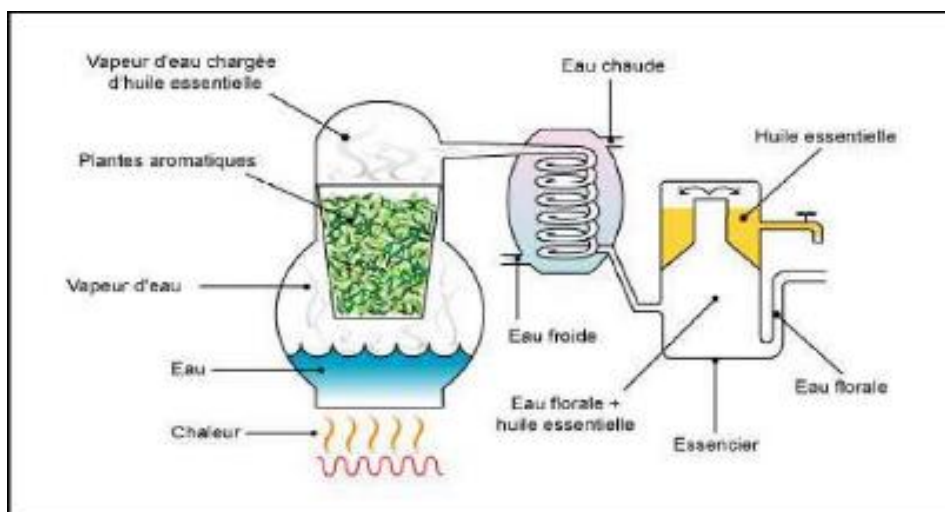
plusieurs heures (8h) ( **Lucchesi et al., 2004**),selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait (**Lucchesi, 2005**). Les principales raisons de cette préférence sont liées à la facilité de mise en oeuvre du procédé, son sélectivité et donc la qualité des produits obtenus.

Cependant l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques.C'est ainsi que pour certains végétaux fragiles, comme par exemple les pétales de fleurs, une technique d'extraction plus appropriée est utilisée. Il s'agit de la « distillation dite sèche ». Cette technique ancestrale, utilisée autrefois par les alchimistes arabes. (**French, 1651**),consiste à extraire les huiles essentielles de plantes fragiles à l'aide d'un alambic par l'effet de la chaleur du soleil. Plus récemment, en Herzégovine (**Kapetanovic et al., 1984**), une technique toute proche a permis l'extraction d'une huile essentielle de rose de très grande qualité, cependant cette technique, possède elle aussi ses limites. En effet, technique écologique par excellence, le chauffage par les rayons du soleil est très faiblement productif car plusieurs jours sont nécessaires pour extraire les précieuses gouttelettes d'essences de rose.

#### **b- Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :**

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (figure 4).  
La

vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'H.E en minimisant les altérations hydrolytiques.



**Figure 4 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (Lucchesi, 2005).**

### **c- Hydrodiffusion**

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins dommageable pour les composés volatils.

### **8.2. Extraction à froid :**

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008).

### **8.3. Extraction assistée par micro ondes :**

Le mécanisme du chauffage diélectrique repose sur le fait que les molécules polaires, telles que l'eau, ont des extrémités négatives et positives : ce sont des dipôles. En l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu diélectrique se trouvent orientés au hasard sous l'effet de l'agitation thermique du milieu. Sous l'effet d'un champ électrique

continu, les molécules tendent à s'orienter dans la direction du champ électrique. Plus le

champ électrique est intense, moins l'agitation thermique qui tend à désorganiser l'alignement a d'importance. Lorsque toutes les molécules sont orientées, il apparaît un moment dipolaire global induit. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence, les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance : c'est la rotation dipolaire. L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. L'énergie cinétique est transformée partiellement en chaleur : l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules. Ces forces peuvent être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide. Elles s'opposent ainsi à la libre rotation des molécules. De la friction produite, naît le dégagement de chaleur (Lucchesi, 2005). Cette chaleur dilate les glandes qui éclatent. Ce processus donc libère les huiles essentielles (Lucchesi et al., 2004).

#### **8.4. Extraction par les solvants et les graisses :**

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu », et sa composition se rapproche de celle d'une H.E. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose de problème de toxicité et de solvants résiduels (Hernandez-ochoa, 2005).

### **9. Toxicité des huiles essentiels :**

Les H.Es ne sont pas des produits qui peuvent être utilisées sans risque. Certaines H.Es sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol, ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de *citrus* contenant des furacoumarines), d'autres H.Es ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' $\alpha$ -thujone sont toxiques pour les tissus nerveux). La toxicité des H.Es est assez mal connue. Il manque de

données sur leurs éventuelles

propriétés mutagènes et cancérigènes. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Il existe quelques H.Es dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzène ou de propenylbenzène comme le safrole, l'estragole, la  $\beta$ -arasonne, et le méthyl-eugénol (**Guba, 2001**).

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement thérapeutique telles que l'aromathérapie (définie comme le traitement des maladies par les essences de plantes ainsi que la connotation " produit naturel" attaché à ces produits conduisent à une utilisation souvent abusive. La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue; on manque aussi des données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérogènes. (**Bruneton,1993**).

## **10. Méthodes de caractérisation chimique des H.Es :**

Les huiles essentielles sont des matières premières pour les secteurs de l'industrie pharmaceutique, de l'agroalimentaire et de la cosmétique. La connaissance parfaite de la composition chimique de ces substances permettrait aux professionnels des secteurs précités de pouvoir contrôler leur qualité et de les valorisées. L'identification des composants d'une HE reste une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques qui sont dans certains cas complémentaires (**Joulain, 1994**).

La technique incontournable pour individualiser les constituants d'un mélange reste la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Son couplage à un détecteur à ionisation de flamme (DIF) permet la quantification des constituants et le calcul de leurs indices de rétention. La CPG est souvent combinée avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) ou la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF). Une nouvelle voie d'analyse est le recours à la RMN du carbone-13 décrite par Formacek et Kubiczka et développée par Casanova et coll (**Julien, 2005**). Elle permet d'identifier les constituants d'un mélange complexe sans individualisation et sans

séparation préalable.

### **10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) :**

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour la caractérisation des H.Es.

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans le four et un détecteur. Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en "*split*" ou injection avec "division de flux", il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur (hélium, azote, argon, ou hydrogène). Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante du flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne et évitant de saturer la phase stationnaire (**Bouchonnet et Libong, 2002**).

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique la colonne analytique. Cette colonne peut être de deux types : colonne remplie ou colonne capillaire. Dans le cas des H.Es, les colonnes capillaires semblent plus adaptées ; elles sont en métal, en verre ou plus souvent en silice fondue. Les substances de l'échantillon traversent la totalité de la colonne où est placée la phase stationnaire.

Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonction du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés. La chromatographie en phase gazeuse permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par succession continue d'équilibre entre phase mobile gazeuse et phase stationnaire (**Besombes, 2008**).

Le développement des phases stationnaires et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composés dans les H.Es. Ainsi, la CPG bidimensionnelles (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation,

l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec les composés plus abondants. L'échantillon est injecté dans la première colonne, puis les composés qui coéluent sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés (Paolini, 2005).

### 10.2. La spectrométrie de masse (SM) :

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse ; tous ont en communs trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites

En couplage avec le chromatographe en phase gazeuse, où les composés sont élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à "ionisation électronique" (IE) ou à "ionisation chimique" (IC). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des substances (bouchenet et Libong, 2002). Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Dans le spectromètre de masse, les ions sont séparés selon leur ration « masse/Charge », à l'aide d'un champ magnétique ou électrique (Besombes, 2008). Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse est détecté et transformé en un signal utilisable.

### 10.3. Couplage CPG/SM :

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 aromatiques.

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 des constituants. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation chimique (IC) et l'ionisation par impact électronique (IE). Ce dernier mode est le plus répandu, le seul qui permet une étude

systématique de la structure des ions moléculaires et fragments formés.

Le principe de la CPG/SM (IE) réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). A la sortie de la colonne, les molécules arrivent au niveau de la source d'ionisation, elles entrent en collision avec

un flux d'électrons obtenus par effet thermoélectronique à partir d'un filament en rhénium. Ces électrons leur arrachent un autre électron générant des cations radicalaires, appelés aussi ions moléculaires  $M^+$ . (Cavalli, 2002)

## 11. Activités biologiques :

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques (Ziming *et al.*, 2006). En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaire (Pellecuer *et al.*, 1980), ou au niveau de la microflore vaginale (Viollon *et Chaumont*, 1994) et d'origine fongique contre les dermatophytes (Chaumont *et Leger*, 1989). Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques (Sivropoulou *et al.*, 1996), qui les rapprochent donc des antiseptiques et des désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Par exemple dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme des antiseptiques, des antibactériens et des antifongiques (Agnihotri *et al.*, 2003). Le thymol est très irritant, astringent et caustique. La dose de thymol applicable sur la peau et les muqueuses est de 0,5%. Ingré à la dose de 2 g ou à plus fortes doses, il est responsable de gastralgies avec nausées (Zambonelli *et al.*, 2004). Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des lamiacées: thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge... etc. (Agnihotri *et al.*, 2003).

L'activité des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Les travaux de Zakarya *et ses collaborateurs* (1993) ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait. En effet, l'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols,

aldéhydes et cétones).

Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des huiles essentielles et semblent agir en synergie avec les composés principaux (**Zhiri, 2006**).

Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et, à large spectre sont d'abord les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), ensuite les alcools ( $\alpha$ -terpinéol, terpinène-4-ol, linalol), les aldéhydes et dans une faible mesure les cétones (**Dorman et Deans, 2000**).

### **11.1. Activité antimicrobienne :**

De nombreuses études ont été réalisées en vue de l'estimation du pouvoir antiseptique des huiles essentielles depuis très longtemps, par exemple en **1881 Koch** testa l'action bactéricide de l'essence de térébenthine sur les spores du charbon. Ensuite, **Chamberland (1887)** étudia l'activité des essences d'origan, de cannelle et de girofle sur *Bacillus anthracis*. En **1919, Bonnaure** étudia le pouvoir antiseptique des lavandes et en 1935, Bose mit en évidence les relations entre la formule chimique et le pouvoir antiseptique (**Belaiche, 1979**).

#### **11.1.1 Activité antimicrobienne des extraits des huiles essentiels :**

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien acceptés par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) (**García-Ruiz et al., 2008 ; Kempf et Zeitouni., 2009**).

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenouil (*Foeniculum vulgare*), menthe poivrée (*Mentha piperita*),

thym (Thymus vulgaris), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (**Jürgen et al., 2009**)

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié

les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industries pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (**Huang et al., 2008**).

### **11.1.2 Méthode de détermination de l'activité antimicrobienne:**

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, *in vitro*. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

#### **a- Aromatogramme (Méthode de diffusion en milieu gélosé):**

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicinale appelé antibiogramme ou méthode de disque ou méthode par diffusion en milieu gélosé (Figure 5). La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la souche microbienne à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la souche microbienne est résistante. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (**Guerin-Faubleet Carret, 1999**).

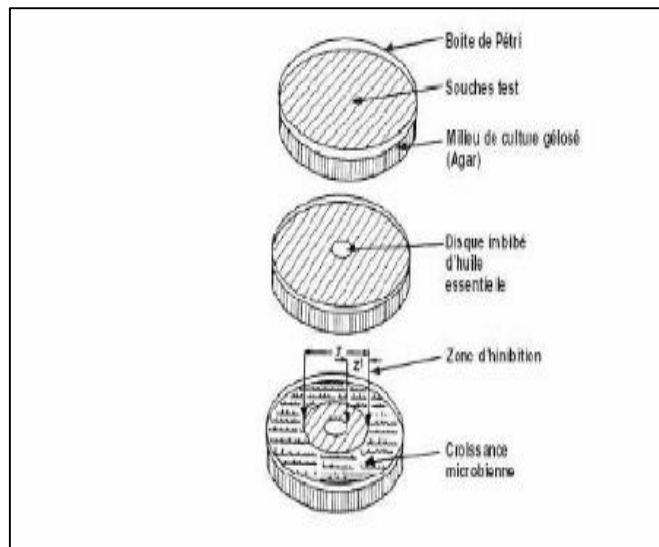


Figure 5 : Schéma illustrant la méthode des aromatochromes

( [www.memoireonline.com](http://www.memoireonline.com) )

#### b- Méthode de micro-atmosphère :

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de pétri sur milieu de culture approprié (Figure 6). La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte,

elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (Pibiri, 2005).

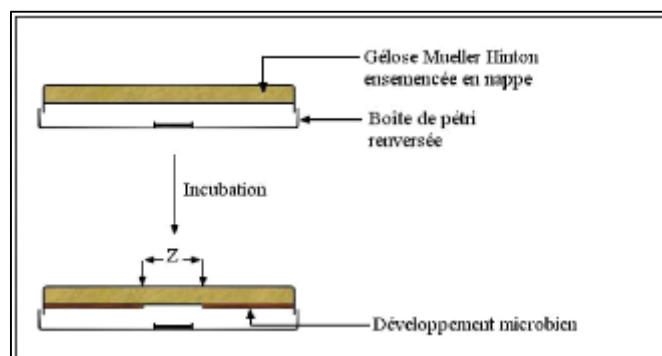


Figure 6 : Schéma illustrant la méthode de micro-atmosphère (Bousbia, 2004)

# **CHAPITRE II :**

## **Généralités sur la plante**

## 9. Définition :

Pendant des siècles, l'Homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. La plupart de grands médecins du passé ont été des phytothérapeutes (Goeb, 1999). Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles.

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications des leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux (Tchamdja, 1995).

## 10. La famille Ericaceae :

Grande famille cosmopolite représentée par 124 genres (dont *Arbutus* (arbousier), *Calluna* (calune), *Erica* (bruyère), *Rhododendron*) et environ 4 100 espèces [Maberley, 1987], les Ericaceae prédominent en Arctique, dans les régions tempérées et dans les montagnes tropicales et extratropicales du sud-est de l'Asie et d'Amérique avec une forte concentration dans l'Himalaya, en Nouvelle-Guinée et dans les Andes (figure 6). En général, la plus grande densité ainsi que la plus grande diversité des Ericaceae se retrouve sous les climats méditerranéens notamment en Australie et en Afrique du Sud (Stevens et al., 2004).

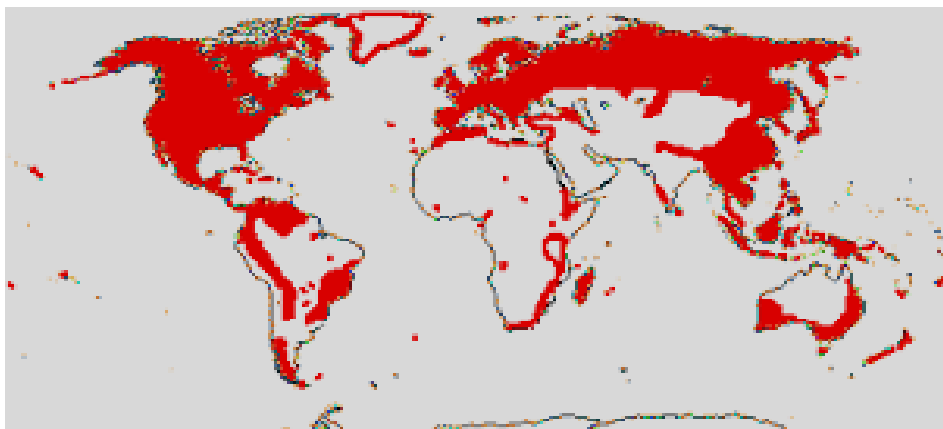


Figure 7 : Répartition mondiale des *Ericaceae* selon Stevens (Stevens, 2001).

Ce sont souvent des plantes à mycorhizes préférant les sols pauvres et acides. Leur habitat est généralement caractérisé par une faible disponibilité en nutriments, un faible taux de matières organiques et souvent une période de sécheresse (**Stevens et al., 2004**).

## 11. Position systématique

Du point de vue des classifications systématiques anciennes, la famille des *Ericaceae* fait partie des Dicotylédones et appartient à l'ordre des *Ericales* (tableau 1) (**Cronquist, 1988**).

**Tableau 1 : Taxonomie des *Ericaceae* selon Cronquist [Cronquist, 1988].**

<i>Plantae, Tracheobionta</i>
Embranchement : <i>Spermatophyta</i> Sous-Embranchement : <i>Angiospermae</i> Classe : <i>Magnolopsida</i> Sous-classe : <i>Dilleniideae</i> Ordre : <i>Ericales</i> Famille : <i>Ericaceae</i>

Bien que les limites de la famille des *Ericaceae* soient bien définies, il existe de nombreuses subdivisions en sous-familles et en tribus établies en 1971 puis révisées par les travaux de Stevens en 2004 [**Stevens, 1971 ; Stevens et al., 2004**]. Les relations phylogénétiques au sein des *Ericaceae* ont été étudiées au moyen d'analyses cladistiques basées sur la combinaison de caractères phénotypiques (morphologie, anatomie, nombre de chromosomes et métabolites secondaires) et de caractères moléculaires (séquences de nucléotides) (**Kron et al., 1997 ; Stevens et al., 2004**). Les *Ericaceae* se répartissent en 8 sous-familles, les mêmes subdivisées en tribus.

## 12. Description botanique des *Ericaceae* :

Famille de plantes sempervirentes ou caduques, les Ericaceae sont des arbustes, parfois très petits ou subherbacées, des arbres (parfois pachycaules), plus rarement des lianes ou des épiphytes. Les feuilles des Ericaceae sont alternes à subopposées ou verticillées, entières ou dentées ou souvent en aiguilles appelées éricoïdes (adaptations à des régimes hydriques défavorables). Elles sont penninervées et dépourvues de stipules. L'inflorescence, très variable, peut être terminale ou axillaire, souvent racémeuse ou paniculée, parfois réduite à une fleur solitaire. Les fleurs, petites, sont actinomorphes pentamères et hermaphrodites. Le calice possède 4-5 sépales plus ou moins soudés à la base ; il est parfois réduit à un anneau ; il peut être persistant et plus ou moins accrescent. Les pétales sont généralement soudés en tube. La corolle est campanulée, en forme d'urne ou sphérique, aux lobes généralement petits et distincts. L'androcée, à 8-10 étamines libres, est obdiplostémone par avortement, les filets sont libres et soudés sur le réceptacle, les anthères sont à déhiscence poricide, souvent avec appendices bicornes. Un disque nectarifère intrastaminal est parfois présent. L'ovaire est souvent supère. Le fruit est une petite baie charnue et indéhiscente ou une capsule sèche à déhiscence loculicide parfois enfermée dans une corolle persistante. La graine est très petite, souvent ailée à albumen charnu (Maberley, 1987 ; Spichiger et al., 2000).

### 13.L'espèce *Erica multiflora* :

**Arabe** : khlenj

**Français** : bruyère multiflore, bruyère à fleurs nombreux

**Anglais** : heather

*Erica multiflora* pousse principalement dans les pinèdes, les garrigues, sur sol calcaire, et ne pousse pas dans les montagnes.(figure 7)

*Erica multiflora* est très répandue dans les zones de maquis et garrigues et est constamment soumis à la surexploitation, soit par les populations rurales locales ou par des entreprises privées. Bois de sa souche est très recherchée, et est utilisé comme bois de chauffage. Dans les maquis du nord, *Erica multiflora* produit quelque 700 tonnes de bois de souche chaque année. La fleur-bourgeons, l'écorce et les feuilles sont également utilisées comme fourrage. Aujourd'hui, la cueillette et l'utilisation est soumise à la réglementation et la taxation. Il se propage par les bourgeons portés sur la tige souterraine. (Bellakhdhar, 1997 ; Bezanger et Pinkas, 1980)



Figure 8 : L'espèce *Erica multiflora* (Compilé par: Dr. Zeinab Gharibi)

#### 14. Classification :

Tableau 2 : Taxonomie des *Erica multiflora* ( Harnafia et al., 2007)

Règne: <b>Plantae</b>
Embranchement: <b>Tracheophyta</b>
Classe: <b>Magnoliopsida</b>
Ordre: <b>Ericales</b>
Famille: <b>Ericaceae</b>
Genre: <i>Erica multiflora</i>

#### 15. Usages traditionnels :

Elle peut être prise sous forme de décoction des sommités fleuries séchées et sous forme d'infusion. Elle est également utilisée dans de nombreuses préparations magistrales. Associant diverses autres plantes complémentaires choisies elles sont prescrites en fonction de chaque maladie par les herboristes. La bruyère appartient aux plantes intéressantes pour soigner une cystite d'où son effet diurétique pour augmenter la diurèse. Elle est aussi utilisée contre les inflammations prostatiques, le prostatisme et contre l'hypertrophie bénigne de la prostate.

## **16.Toxicité :**

La bruyère et l'arbousier, appartenant à la même famille et ont la même substance toxique; l'andromédotoxine. Les parties dangereuses: surtout les feuilles. Cette plante contient une toxine, l'andromédotoxine, responsable des vomissements et de la baisse de la tension et pouvant entraîner la mort si elle est absorbée en doses importantes. *Effets indésirables :*

C'est suite à sa teneur élevée en tanins, la tisane est amère et astringente et peut provoquer des nausées et des vomissements chez les personnes habituellement sensibles. (Maureen, 1997)

**Partie expérimentale :**  
**Matériel et méthodes**

## 1. Objectif de travail :

Notre travail a porté sur :

L'étude de l'effet de cinq antibiotiques et 6 huiles essentielles des feuilles fraîches et sèches et des fleurs d'*Erica multiflora* sur la croissance de deux bactéries *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*, et deux antifongiques sur la croissance de *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.

## 1. Testes microbiologiques :

La plante d'*Erica multiflora* ont été récolté de Nedroma et Djebala de la wilaya de Tlemcen (Tableau n°03 et figure n°09), ces échantillons nous ont été fournis par notre encadreur.

Tableau n° 3 : Les huiles essentielles d'*Erica multiflora*

Huile Essentielle	FmB	F.B	GSF	G.A	S1	E3
Origine	Feuilles sèches « Djebala »	Feuilles fraîches « Djebala »	Feuilles fraîches « Nedroma »	Feuilles sèches « Nedroma »	Fleurs « Nedroma »	Fleurs « Djebala »

La carte géographique de la région de la récolte est illustrée dans la **figure n°01**.



Figure 9 : Carte géographique montre la région de la récolte (Google Maps, 2016)

### 1.1.Souches bactériennes et fongiques étudiées :

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Erica multiflora* a été évaluée sur deux souches bactériennes et une levure et un champignon. Se sont des souches de référence proviennent de l'American Type Culture Collection ATCC (**Tableau n°4**)

**Tableau 4:** Liste des souches microbiennes testées

Souches utilisées			Référence
Bactéries	Bactéries Gram-	Escherichia coli	ATCC 25922
	Bactéries Gram+	Bacillus cereus	ATCC 10876
Champignons		Candida albicans	ATCC 10231
		Aspergillus brasiliensis	ATCC 16404

### 2.2. Conservation des souches microbiennes :

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 h à l'obscurité à 37 °C, alors que la levure et le champignon sont cultivés par repiquage sur le milieu Sabouraud pendant 7j à l'obscurité à 25 °C

### 2.3. Les milieux de culture :

Au cours de notre expérimentation la culture des souches microbiennes a nécessité l'utilisation des milieux suivants : Mueller Hinton (MH), bouillon nutritif, gélose nutritive, le milieu Sabouraud.

La composition chimique de ces différents milieux de culture se trouve en **annexe**.

### 2.4. préparation de l'inoculum :

Les souches testées ont étéensemencées dans des tubes contenant le bouillon nutritif (BN) (**Annexe 3**), pour les bactéries « Escherichia coli et Bacillus cereus » à 37°C pendant 18H, et pour Candida albicans à 30°C pendant 48H et Aspergillus brasiliensis à 25°C pendant 5 à 7jours.

## 2.5. Standardisation de la turbidité :

Une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture réactivée dans 9 ml bouillon nutritif. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à l'aide d'un spectrophotomètre de type JENWAY, 6715 UV/Vis à 625 nm est justifiée de 0.08 à 0.1 soit environ  $10^8$  UFC/ml, et pour *Aspergillus brasiliensis* soit environ  $10^6$  Spores/ml (Pessini et al., 2003)

Pour la levure un certain volume de cette culture est dilué dans le bouillon nutritif pour avoir une densité optique entre 0.08 et 0.1 à 600 nm, soit environ  $10^6$  UFC/ml (Pfaller et al., 1988).

L'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. (Annexe 4)

## 3. L'étude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques :

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classe semi-quantitatives (sensible S, intermédiaire I ou résistante R) et d'orienter l'antibiothérapie. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

Même pour l'antifongigramme, qui consiste à déterminer la sensibilité des mycètes vis-à-vis d'un ou plusieurs antifongiques. (Vedel, 2005 ; CA-SFM, 2010)

Pour notre étude nous avons recherché la sensibilité des souches étudiées vis-à-vis de cinq antibiotiques (Tableau n°02) pour les bactéries et deux antifongiques (Econazole et Clotrimazole).

**Tableau n°5 : Liste des antibiotiques utilisés**

L'antibiotique	Le sigle	Charge de disque
Gentamicine	GM	30 µg
Amoxicilline/ac.clavulanic	AUG	30 µg
Tobramycine	TOB	10 µg
Norfloxacin	NOR	10 µg
Trimethoprime-sulfamethoxazole	SXT	25 µg

### **3.1. Préparation des disques d'antifongiques :**

Les disques sont préparées à partir du papier wattman n°3 de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 15 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé)

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

Le milieu Mueller-Hinton et milieu Sabouraud sont fondu et refroidi, coulées en boîte de pétri sur une épaisseur de 4 mm (qui correspond à 20 ml pour les boîtes de 90 mm de diamètre).

Après solidification du milieu de culture, 1ml de suspension bactérienne  $10^8$  UFC/ml et 1ml de suspension fongique  $10^6$  spores/ml et  $10^6$  UFC/ml sont ensemencés, l'excédent de l'inoculum a été éliminé par aspiration

Dans des conditions aseptiques on dépose les disques d'antibiotiques et les disques imprégnés d'une solution antifongique à l'aide d'une pince stérile, il ne faut pas dépasser 6 disques sur une boîte de 90mm de diamètre.

L'incubation 24h à 37°C pour les bactéries, 48h à 30°C pour les levures et pour les champignons 5 à 7 jours à 25°C.

La lecture se fait par la mesure de diamètre de la zone inhibition qui est présentée par une aréole autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

### **4. Etude de l'activité antimicrobienne in vitro des huiles essentielles (technique de Vincent) :**

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme (Abdesselam, 2006), elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme (Jacob, 1979), méthode de VINCENT (Pibiri, 2006), méthode de diffusion dans la gélose (agar) (Razakarivony et al., 2009)

Inspiré d'une vieille méthode de Shroeder et Messing datant de 1949, l'aromatogramme consiste à déposer des disques de papiers filtres imprégnés d'huiles essentielles. Les milieux coulés en boîte de pétri sont ensemencés par 1ml de suspension bactérienne de  $10^8$  UFC/ml et fongique  $10^6$  spores/ml et  $10^6$  UFC/ml. L'excédent de l'inoculum est éliminé par aspiration.

Les disques de papier wattman de 6mm stériles sont déposés à la surface de la gélose ensemencée après avoir été chargé de 30 µl d'huile essentiels, en parallèle des témoins sont utilisés afin de vérifier la croissance des différents souches.

Pour que l'huiles puisse se diffusé, il faut mettre les boites à température ambiante pendant 1h.

L'incubation se fait à 37° C pendant 24h pour les bactéries et 30° C pendant 48h pour les levures et 25° C pour les moisissures.

La lecture se fait par la mesure les zones d'inhibitions à l'aide d'une règle en mm ou d'un pied à coulisse métallique.

## **5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :**

consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (**Oussou et al., 2008; Derwich et al., 2010**),

### **5.1. Technique par contact direct :**

La méthode de diffusion en milieu gélosé ainsi appelée permet de prévoir avec certitude l'efficacité in vitro de l'huile essentielle, il s'agit en fait d'une appréciation qualitative de l'activité. L'aspect quantitatif sera ensuite estimé par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

### **5.2. Méthode de dilution en milieu solide :**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode rapportée par **Remmal et al. (1993) et Satrani et al. (2001)**.

Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 %, pour augmenter le contacte des huiles essentielles avec les germes testées.

La CMI a été déterminée à partir d'une série de dilution suivantes : 1/10e, 1/25e, 1/50e, 1/100e, 1/300e dans une solution d'agar de 0.2%, après on prend 1.5ml de chaque dilution dans des tubes à essai contenant 13.5ml du milieu Mueller Hinton pour les bactéries et milieu sabouraud pour les moisissures pour obtenir les concentrations finales de 1 /100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/3000 (v/v) ensuite on agite les tubes avant d'être verser dans les boites de pétri où la gélose va se solidifier. Des témoins contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2% seule sont également préparés.

L'ensemencement se fait par des stries à l'aide d'une anse de platine, l'inoculum ensemencé se présente sous forme de bouillon de culture de 24h pour les bactéries et 48h pour les levures et sous forme d'une suspension dans l'eau physiologique de spores provenant d'une culture de 7 jours dans Sabouraud.

On incube les boîtes de pétri à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h à 30°C pour la levure et 25°C pour le champignon.

À cause de la quantité insuffisante on a réalisé la CMI par quatre huiles essentielles : feuilles fraîches de *Nedroma* et feuilles fraîches de Djebala et feuilles sèches de Djebala pour *B.cereus*, GSF et G.A pour *E.coli*, feuilles fraîches de Djebala et des fleurs de Djebala et feuilles fraîches de *Nedroma* pour *C.albicans*.

La CMI est représentée par la première des concentrations d'huile essentielles qui inhibe toute la culture sur la gélose, les boîtes considérées positives sont celles qui renferment des colonies visibles (**Satrani et al., 2007**)

# **Résultat et discussion**

## 1. Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et antifongiques vis-à-vis des souches testées :

La méthode utilisée pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique est la diffusion sur gélose Mueller-Hinton et sur milieu sabouraud respectivement. Grâce à sa spécificité et à sa composition, ce milieu, souvent rencontré dans la littérature, permet une bonne croissance aux bactéries-tests et aux champignons-tests tout en offrant des résultats clairs (Horikawa *et al.*, 1999 ; Woo *et al.*, 2002).

Les résultats de l'effet de cinq antibiotiques et deux antifongiques sur les souches testés sont présentées dans les **tableaux n° 6 et 7 et les figures n°10, 11, 12.**

Nous avons remarquée de larges intervalles dans les diamètres des zones d'inhibitions obtenues, allant de 9mm à 34mm pour les antibiotiques et de 11mm à 36mm pour les antifongiques.

On observe que les antibiotiques agissent de manière différente chez les souches testées, nos résultats sont semblables à ceux obtenus par nos collègues. (Mokhtari, 2016).

**Tableau n°6 :** Résultats de la sensibilité aux antibiotiques d'*Escherichia. Coli* et *Bacillus cereus* (zone d'inhibition en mm)

	Amoxicilline	Gentamicine	Norfloxacine	Tobramycine	Triméthoprim-sulfaméthoxazole
<b>Souches bactériennes</b>					
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	9mm	34mm	30mm	27mm	22mm
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	10mm	33mm	30mm	25mm	22mm

Nous avons classé la sensibilité des souches selon le diamètre de la zone d'inhibition (Moreira *et al.*, 2005) :

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm.

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm

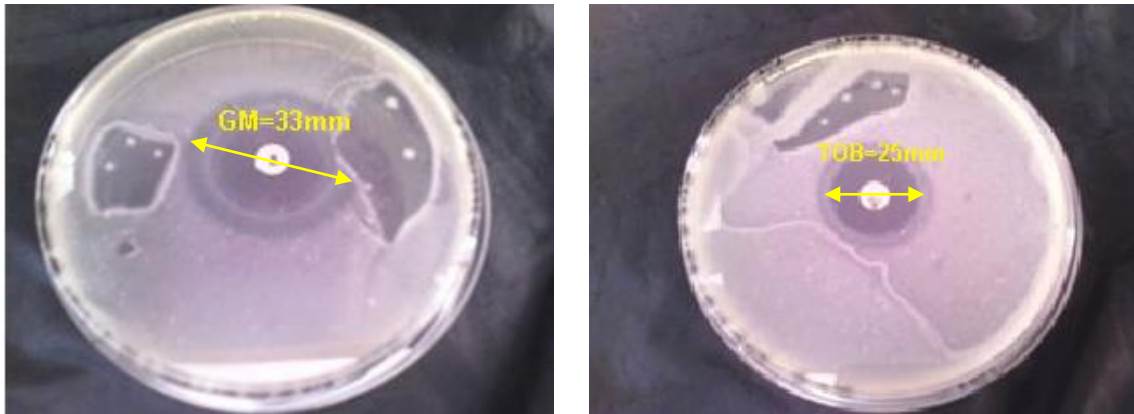
Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm

Non sensible (-) « Résistante » : diamètre < 8mm

***Bacillus cereus* ATCC10876 :**

*Bacillus cereus* ATCC10876 est sensible à tous les antibiotiques testés. La Gentamicine (GM) a provoqué une forte inhibition de cette bactérie avec une zone d'inhibition 33mm.

La Norfloxacine, Tobramycine, Triméthoprime-sulfaméthoxazole se sont également montrés efficaces contre cette souche avec des zones d'inhibition de 30mm, 25mm, et 22mm respectivement (**Figure n°10**)



**Figure 10 :** Effet de Gentamicine (**Photo gauche**) et Tobramycine (**Photo droite**) sur la croissance de *B.cereus* ATCC10876

***Escherichia coli* ATCC25922 :**

Tous les antibiotiques testés sur *Escherichia coli* ATCC25922 ont provoqué une inhibition à l'exception de l'Amoxicilline(AUG).La plus grande inhibition a été remarquée par Gentamicine (GM) « 34mm ».La Norfloxacine, la Tobramycine, la Triméthoprime-sulfaméthoxazole se sont également montrés une efficacité contre cette bactérie avec des zones d'inhibition de 30mm, 27mm, 22mm respectivement.



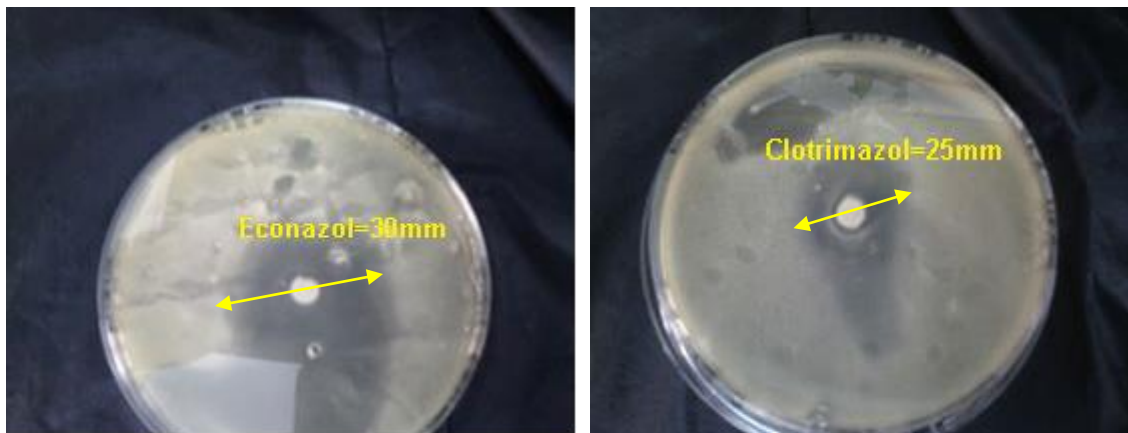
**Figure n°11 :** Effet de quelques antibiotiques sur la croissance d'*E.coli* ATCC25922

**Tableau n°7 :** Résultats de l'activité antimicrobienne des antifongiques exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

	Clotrimazol	Econazol
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC10231	<b>11cm</b>	<b>36mm</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC16404	<b>25mm</b>	<b>30mm</b>

D'après les résultats de **Tableau n°7**, les deux antifongiques Clotrimazole et Econazole ont provoqués l'inhibition des deux souches testées, Econazole est plus puissant que Clotrimazole.

Les zones d'inhibition obtenues Par l'effet d'Econazol sont 36 mm pour *Aspergillus brasiliensis* ATCC10231 et 30 mm pour *Candida albicans* ATCC16404  
Aussi Clotrimazol a montré l'efficacité contre *Aspergillus brasiliensis* avec diamètre 11mm et *Candida albicans* ATCC16404 avec diamètre 25mm



**Figure n°12 :** Effet de l'Econazol et Clotrimazol sur la croissance de *Candida albicans* ATCC16404

## **2. Résultat de l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles (technique de Vincent)**

La technique de l'aromatogramme est la technique la plus répandue de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos huiles essentielles utilisées.

Les résultats de la détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentiels des feuilles fraîches et sèches et des fleurs d'Erica multiflora sur les quatre souches testées sont représentés dans **Tableau n°8 et figure n°13, 14.**

Seules les zones d'inhibition supérieures à 10 mm sont considérées comme positives (**Hassan et al., 2006**)

**Tableau n°8** : Diamètres (mm) des zones d'inhibition d'huile essentielle des feuilles fraîches et sèches et des fleurs d'Erica multiflora

Huiles	feuilles sèches de Nedroma	feuilles Fraiches de Nedroma	Fleurs Djebala	feuilles fraîches de Djebala	feuilles sèches Djebala	fleurs d'Erica multiflora de Nedroma
B.cereus ATCC10876	<b>10mm</b>	-	-	<b>13mm</b>	<b>10mm</b>	-
E.coli ATCC25922	-	-	-	<b>15mm</b>	<b>8mm</b>	-
C.albicans ATCC16404	<b>30mm</b>	<b>6mm</b>	<b>26mm</b>	<b>8mm</b>	<b>9mm</b>	-
A.brasiliensis ATCC10231	-	-	-	-	-	--

- : Pas d'inhibition

**FSN**: huiles essentielles des feuilles sèches de Nedroma

**F.B**: huiles essentielles des feuilles fraîches de Nedroma

**GSF**: huiles essentielles des feuilles fraîches de Djebala

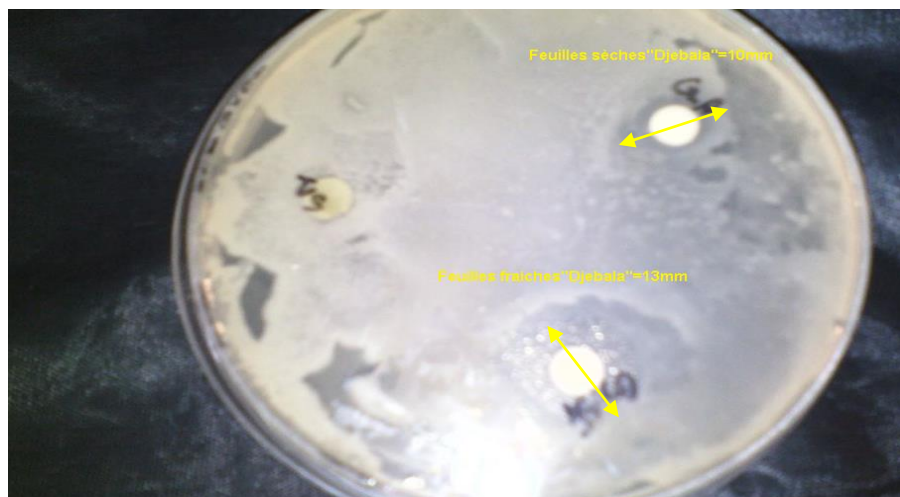
**G.A**: huiles essentielles des feuilles sèches de Djebala

**S1**: huiles essentielles des fleurs de Nedroma

**E3**: huiles essentielles des fleurs de Djebala

D'après les résultats représentés dans le **Tableau n°8** nous avons remarqués que pas toutes les huiles essentielles d'Erica multiflora ont un effet inhibiteur sur *B.cereus* ATCC10876 et *E.coli* ATCC 25922 et *Candida albicans* ATCC16404, alors que *Aspergillus brasiliensis* ATCC10231 a été résistante à toutes les huiles essentielles.

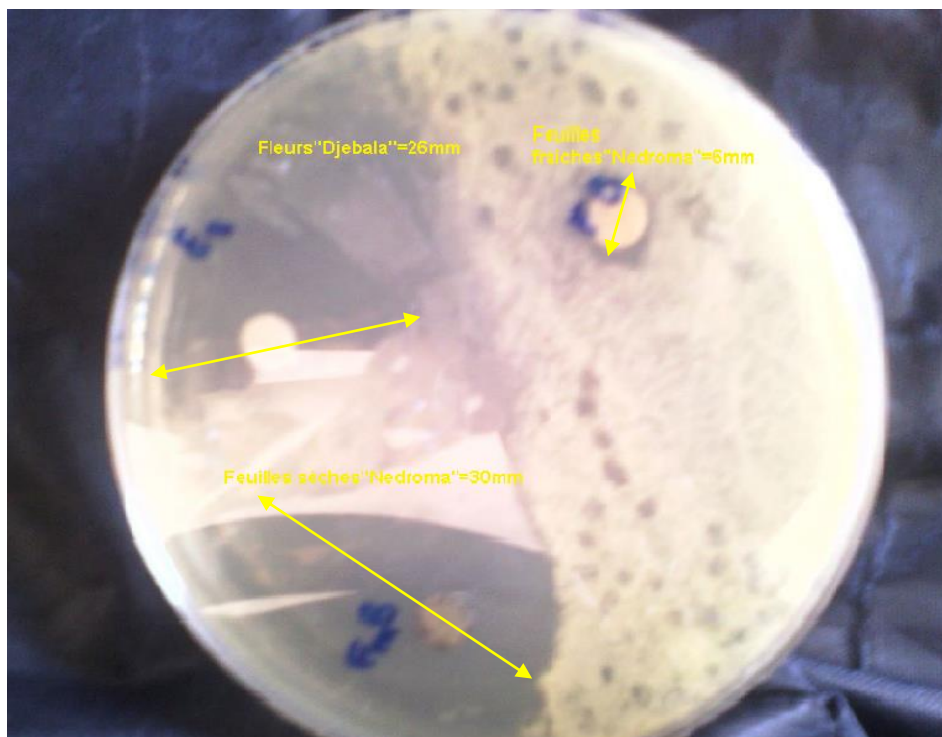
*B.cereus* ATCC10876 se manifeste sensible aux huiles essentielles des feuilles sèches « Nedroma » et les huiles essentielles des feuilles fraîches et sèches de « Djebala » de diamètres des zones d'inhibition 10mm, 13mm, 10mm respectivement.



**Figure n°13:** Effet des huiles essentielles des feuilles fraîches et sèches « Djebala » d’Erica multiflora sur la croissance de *B.cereus* ATCC10876

Alors que *E.coli* ATCC25922 se manifeste sensible que sur les feuilles fraîches de « Djebala » d’une zone d’inhibition 15mm, *E. coli* ATCC25922 (bactérie Gram -) développe aussi une résistance vis-à-vis d’un certain nombre d’huiles essentielles (**Sartoratto et al., 2004; Delamare et al., 2007; Wannissorn et al., 2005**). D’autre part, cette bactérie est très sensible vis-à-vis d’autres huiles essentielles (**Burt et Reiders, 2003 ; Bouhdid, 2005**).

*C.albicans* ATCC16404 se manifeste sensible aux huiles essentielles des fleurs et aux huiles essentielles des feuilles sèches d’Erica multiflora avec des zone d’inhibition de 26mm et 30mm respectivement. (**Figure n°15**), L’action antifongique des huiles essentielles vis-à-vis *C. albicans* est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d’une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Cox et al., 2000**).



**Figure n°14 :** effet des huiles essentielles des fleurs et des feuilles fraîches et sèches d’Erica multiflora sur la Croissance de C.albicans ATCC16404

### 3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles (méthode de contact direct)

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile a été effectuée par la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu solide.

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau n°9**

**Tableau n°9 :** Détermination de la CMI d’H.E d’Erica multiflora

	Souches			
	Concentrations (v/v)	Bacillus cereus ATCC10876	Escherichia coli ATCC25922	Candida albicans ATCC16404
HE.FSN	1/100	-		-
	1/250	+		+
	1/500	+		+
	1/1000	+		+
	1 /3000	+		+

HE.FFD	1 /100	-	+	
	1/250	-	+	
	1/500	-	+	
	1/1000	-	+	
	1/3000	+	+	
HE.FSD	1/100	-		
	1/250	+		
	1/500	+		
	1/1000	+		
	1/3000	+		
HE.FD	1/100			-
	1/250			-
	1/500			-
	1/1000			-
	1/3000			+
	Témoin	+	+	+

**V/V : le volume de l'huile essentielle sur volume de la solution d'agar**

**+ : croissance**

**- : pas de croissance**

**HE.FSN** : huiles essentielles des feuilles sèches de Nedroma.

**HE.FFD** : huiles essentielles des feuilles fraîches de Djebala.

**HE.FSD** : huiles essentielles des feuilles sèches de Djebala.

**HE.FD** : huiles essentielles des fleurs de Djebala.

D'après Les résultats représentés dans le **tableau n°09** nous avons remarquées que l'huile essentielle des feuilles et des fleurs d'*Erica multiflora* a exercé une activité inhibitrice vis-à-vis de *B.cereus ATCC10876* et de levure testée, sauf *E.coli ATCC25922* qui se révèle résistante vis-à-vis de toutes les huiles essentielles d'*Erica multiflora*.

La bactérie grame positive (*Bacillus cereus ATCC10876*) a été inhibé à partir de la concentration minimale de 1/1000 v/v pour l'huile essentielle des feuilles fraîches « Djebala » et 1/100 v/v pour l'huile essentielles des feuilles fraîches de Nedroma et feuilles sèches d'*Erica multiflora* de Djebala.

*Candida albicans* ATCC16404 a été inhibé à une concentration de 1/100 vis-à-vis l'huile essentielle des feuilles fraîches de *Nedroma*, alors que cette souche a été inhibé à une concentration de 1/1000 vis-à-vis l'huile essentielle des fleurs d'*Erica multiflora* de Djebala. Nous avons constaté que les CMI varient d'un microorganisme à l'autre. La méthode de diffusion des disques ainsi que la méthode de contact direct nous ont permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle des feuilles fraîches et sèches et des fleurs d'*Erica multiflora* de *Nedroma* et de Djebala.

Nous avons constaté que les huiles essentielles des feuilles fraîches et sèches et d'*Erica multiflora* de *Nedroma* et Djebala ont provoqué un effet inhibiteur faible que les antibiotiques testés chez *E.coli* ATCC25922, alors que les huiles essentielles des fleurs d'*Erica multiflora* se sont révélées inactive sur cette souche.

Pour *B.cereus* ATCC10876, l'effet inhibiteur le plus fort des antibiotiques testés est celui de la Gentamicine (GM) avec un diamètre de zone d'inhibition de 33mm, celle-ci est plus efficace que les huiles essentielles d'*Erica multiflora*, par contre l'huile essentielle des feuilles sèches de *Nedroma* a manifesté un effet semblable à l'Amoxicilline/ac.clavulanic.

La sensibilité des bactéries *B.cereus* ATCC10876 aux huiles essentielles des feuilles fraîches de Djebala peut s'expliquer par le fait que les composés chimiques de la plante exercent une inhibition de la croissance via plusieurs mécanismes: inhibition de la biosynthèse des protéines et des phospholipides membranaire, inhibition de leur acide nucléique (**Franklin et al., 1987; Hassan et al., 2006**)

L'activité des agents antimicrobiens sur les bactéries gram positif peut s'expliquer par l'accessibilité directe de ces molécules aux peptidoglycanes constituant la paroi, provoquant ainsi la dissolution complète de cette dernière. Les bactéries perdent alors leur rigidité et se lysent sous l'effet de leur pression osmotique interne qui rompt leur membrane cytoplasmique d'une part, d'une autre part la configuration spatiale des molécules l'empêchent de traverser les protéines de transport (porines) de la membrane externe des bactéries gram négatif, et ne peuvent pas donc atteindre le peptidoglycane de la paroi bactérienne (**Bousseboua, 2001**).

En ce qui concerne les résultats de l'antifongogramme, nous avons constaté que la souche *C.albicans* ATCC16404 s'est révélée sensible aux huiles essentielles aux feuilles sèches de

Nedroma et aux fleurs d'Erica multiflora de Djebala, de diamètre des zones d'inhibition 30mm et 26mm respectivement, l'effet inhibiteur de nos huiles essentielles supérieur à celui de l'antifongique, les zones d'inhibition obtenues sont de 25mm et 30mm de Clotrimazol et Econazol respectivement.

Concernant le champignon *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404, les antifongiques testés ont provoqué un effet inhibiteur élevé que les huiles essentielles d'Erica multiflora qui se révèle inactives sur cette souche.

Il n'est pas possible d'expliquer la cause précise des inhibitions observées; en effet, les différentes huiles essentielles contiennent un ensemble de molécules et on ne sait pas si l'inhibition est provoquée par une ou par plusieurs molécules. Cela peut s'expliquer cependant par l'accessibilité directe de la paroi des levures et ce n'est pas le cas pour les moisissures protégées par la structure mycélienne rigide, en effet, certains auteurs ont mentionnés que leur paroi est constituée de trois polysaccharides :  $\beta$ - 1,3 glucane, la chitine et la mannane associées par des liaisons chimiques (**Farkas et al., 1985**). Il est probable que les molécules contenues dans les huiles inhibent la synthèse de la chitine et agissent alors comme certains antibiotiques (**Isono et Suzuki, 1979**). D'autre part, le mécanisme d'action des agents antimicrobiens sur les levures reste mal connu (**Isono et Suzuki, 1979 et Hassan et al., 2006**)

# Conclusion

Les plantes médicinales constituent une source de nouvelle molécule à activité antibactérienne économique accessibles pour faire face à l'apparition de phénomène de résistance des germes aux antibiotiques. A ce propre. Nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés microbiologique de quelques substance de la flore algérienne.

L'étude microbiologique, la méthode de l'aromatogramme donne de très bons résultats et montre que les antibiotiques agissent de manière différente chez les souches testées. La plus grande inhibition a été remarqué par Gentamicine (GM) « 34mm » pour la souche *Escherichia coli* ATCC25922.

En ce qui concerne les résultats de l'antifongique, les deux antifongiques l'Econazol et la Clotrimazol ont provoqué la inhibition des deux souches teste. L'antifongique le plus puissant est celui de l'Econazole, les zones d'inhibition obtenues sont 36 mm pour *Aspergillus brasiliensis* ATCC10231 et 30 mm pour *Candida albicans* ATCC16404 respectivement.

L'activités antimicrobienne des huiles essentiels d'*Erica multiflora* par la méthode de diffusion, a permis de révéler un effet inhibiteur seulement sur *B.cereus* ATCC10876, *E.coli* ATCC 25922 et *Candida albicans* ATCC16404, par contre ces huiles sont montrées inactives vis-à-vis à la souches *Aspergillus brasiliensis* ATCC10231

L'huile essentielle des feuilles et des fleurs d'*Erica multiflora* a exercé une activité inhibitrice vis-à-vis de *B.cereus* ATCC10876 et de levure testée, sauf *E.coli* ATCC25922 qui se révèle résistantes vis-à-vis de toutes les huiles essentielles d'*Erica multiflora*. La methode de dilution a confirmé les résultats de l'aromatogramme. Les CMI obtenus sont comprise entre 1/100 (v/v) et 1/1000 (v/v).

En définitif, ce travail, s'il fixe des résultats certains, ouvre des perspectives dans le domaine de la recherche des pesticides, tant au niveau de la connaissance scientifique, qu'à celui d'une possibilité de valorisation de la matière végétale de nos régions.

# **Références bibliographiques**

1. **Abdesselam Z., (2006).** Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News., pp. 6-16.
2. **AFNOR (1989).** Association Française de Normalisation « huiles essentielles ». Recueil des normes françaises. *3eme Edition AFNOR*, Paris.
3. **AFNOR (1992).** Association Française de Normalisation « huiles essentielles ». Recueil des normes françaises. *4eme Edition AFNOR*, Paris.
4. **Agnamey P., Brasseur P., Cisse M. et coll (2002).** Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in African children ; a randomised, multicentre trial. *The Lancet* ; 359 : 1 365- 1 3 7 1 .
5. **Agnihotri A., Khatoon S., Shanta M. (2003).** Pharmacognosticevaluation of an antioxidant *Plantagoruscalamus* L. *Nat. Prod. Sci.*, **9**, 264-269.
6. **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008)** – Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
7. **Belaiche P. (1979)** - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
8. **Bellaiche P. (1979).** Aromatogramme. *In Traité de phytotherapie et d'aromathérapie.* Edition Maloine-S-A, tome I. pp. 9-20.
9. **Bellakhdhar J., (1997).** La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ed. IBIS Press.
10. **Besombes C. (2008).** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo- mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de Doctorat de l'Université de la Rochelle.* France.
11. **Bezanger-Beauquesne L. et M. Pinkas, (1980).** Plantes médicinales des régions tempérées. edit. Maloine.
12. **Bottin I. (2006).** Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire : cas de *Santalumaustrocaledonicum* en Nouvelle-Calédonie. Thèse de doctorat, Montpellier.
13. **Bouchonnet S. & Libong D. (2002).** Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex.
14. **Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Senhajiskli N. et Abrini J. (2005)** – L'effet antibactérien in vitro de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* vis-à-vis de souches d'origines cliniques. *Nouvelles Tendances dans l'Ingénierie Biomédicale.*

11: 142-149.

- 15. Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Senhajiskli N. et Abrini J. (2005)** – L'effet antibactérien in vitro de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* vis-à-vis de souches d'origines cliniques. *Nouvelles Tendances dans l'Ingénierie Biomédicale*. 11: 142-149.
- 16. Bourrel A. (1993).** Analyse chimique, activités biologiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, INP, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- 17. Bousseboua H. (2001; 2006).** *Eléments de microbiologie générale*. 32, 160-167
- 18. Bousseboua H. (2001; 2006).** *Eléments de microbiologie générale*. 32, 160-167
- 19. Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales* *Technique documentation* 2<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris, Pp 406, 410.
- 20. Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation*, 3<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris. 1120.
- 21. Burt S. (2004)** – Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- 22. Burt SA. and Reinders R. (2003)** - Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36: 162–167,
- 23. CA-SFM. (2010).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>.
- 24. Cavalli F., (2002).** Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat, Université de Corse Pascal Paoli.
- 25. Charpentier B., Hamon-lorleac'h F., Harlay A., Huard A., Ridoux L., & Chanselle S. (2008).** *Guide du préparateur en pharmacie*. 3<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson, 1358.
- 26. Chaumont J.P., Leger D. (1989).** Propriétés antifongique de quelques phénols et des composés chimiquement très voisins : Relation structure-activité. *Planta Med. Phyto.*, 23, 124-126.
- 27. Chemat F., Abert Vian M., Dangles O. (2007).** Essential oils as antioxidants *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 1,
- 28. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C. Gustafson J.E., Warmington J.R and Wyllie S.G. (2000)** - The mode of antimicrobial action of the essential oil of

- Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.
29. **Cronquist A. (1988).** *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. The New York Botanical Garden. New York.
  30. **De Souza E.L., Stamford T.L.M., Lima E.O., Trajano V.N. and Filho J.M.B. (2005)** – Antimicrobial effectiveness of spices : an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48(4): 559-566.
  31. **Delamare A. P. L., Ivete A., Luciana A.S. and Sergio E. (2007)** – Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. *Food Chemistry* 100 : 603-608.
  32. **Delamare A. P. L., Ivete A., Luciana A.S. and Sergio E. (2007)** – Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. *cultivated in south Brazil*. *Food Chemistry* 100 : 603-608.
  33. **Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., (2010).** *GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of Mentha pulegium grown in Morocco*. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3):pp. 191-198.
  34. **Dorman H.J.D., Deans S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
  35. **Duraffourd C., D’Hervicourt L. et Lapraz J. C. (1990)** - Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.
  36. effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
  37. **Farkas V. (1985).** Ultra structural cytology of pathogenic fungi .In: Howard .D.H. (Ed). *Fungal protoplasts .application in Biochemistry and genetics*. 3-30. Marcel Dekker New York.
  38. **Faye O., Lo M., Gaye O. et coll (1997).** Connaissances et circuits thérapeutiques relatifs au paludisme en zone rurale Sénégalaise. *Médecine tropicale* ; 57 : 161-164
  39. **Fouche J.G., Marquet A. & Hambuckers A. (2000).** Les plantes Médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman*.
  40. **French J (1651).** The Art of Distillation. *Richard Cotes Editions*, London.
  41. **Ganiere J.P., Mangion C., Péridy. (2004).** Détermination des concentrations minimales inhibitrices de la cefquinone, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution du lait. *Revue méd. Vét.* 155:8-9,411-416.

- 42. Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. (2008).** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. **19**: 835–841.
- 43. Goeb Ph, (1999).** Aromathérapie pratique et familiale. Ed. MDB.
- 44. Guba R. (2001).** Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy*, **11**, 76-83.
- 45. Guerin-Fauble V., Carret G. (1999).** L'antibiogramme, principe, méthodologie, intérêt et limites. *Journées nationales GTV-INRA*, Washington, Pp: 5-12.
- 46. Harnafia H., Bouananib N. N., Azizb M., Caidc H. S., Ghalimd N., Amrani S, (2007).** *The hypolipidaemic activity of aqueous Erica multiflora flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate*, *Journal of Ethnopharmacology*, **109**(1):156–160.
- 47. Hassan S.W., Umar R.A., Lawal M., Biblis L.S., Muhammed B.Y., Dabai Y.U (2006).** Evaluation of antibacterial activity and phyto chemical analysis of root extracts of *Boxia angustifolia*. *African Journal of Biotechnology*, **5**. (18): 1602-07.
- 48. Hassan S.W., Umar R.A., Lawal M., Biblis L.S., Muhammed B.Y., Dabai Y.U (2006).** Evaluation of antibacterial activity and phyto chemical analysis of root extracts of *Boxia angustifolia*. *African Journal of Biotechnology*, **5**. (18): 1602-07.
- 49. Hernandez-ochoa L.R. (2005).** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.
- 50. Holley R.A. and Patel D. (2005)** - Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. **22** (4): 273–292.
- 51. Horicawa.M., Nora.T. Kamei.Y. (1999).** In vitro antimethicillin.resistant *Staphylococcus aureus* activity found in extract of marine algae in digenous to the costline of Japan. *J. Antibiot*. **52**: 186-89.
- 52. Huang Guangrong., Jiang Jiaxin.,and Dai Dehui. (2008).** Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala S. Moore*. *African Journal of Biotechnol.* **7** (9): 1335-1338.
- 53. Isono., Kand., Suzuki. S. (1979).** The polyxins, pyrimidine nucleoside, peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis. *Heterocycles* **13**:333-51.
- 54. Jacob M., Pellecuer J. & Tomei R., (1979).** Centre régional d'étude et de

développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 11: pp. 26-30

55. **Joulain D., (1994)**, Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, 19, 5-17.
56. **Julien P., (2005)**. Caractérisation des Huiles Essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux *Asteraceae* endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*- docteur de l'Université de Corse.
57. **Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S. (2009)**. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed.* **16**: 79–90.
58. **Kapetanovic S., Djugumovic S., Ramic R. (1984)**. Isolement de l'huile essentielle de rose par distillation sèche. *Parfums, Cosmétiques et Arômes J.*, **56**, 77-78.
59. **Kekulé, (1866)** "Sur la constitution des substances aromatiques," *Bulletin de la Société Chimique de Paris*, (janvier 1865), 98-110; "Untersuchungen über aromatische Verbindungen," *Liebigs Annalen der Chemie*, 137, 129-36.
60. **Kempf S. Zeitouni. (2009)**. Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences *Pathologie Biologie* : *article in press*.
61. **Kron K.A., and Judd W.S, (1997)** Systematics of the *Lyonia* Group (*Andromedeae*, *Ericaceae*) and the Use of Species as Terminals in Higher-Level Cladistic Analyses. *Systematic Botany* 22(3), 479-492.
62. **Lagunez Rivera L. (2006)**. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.
63. **Lardy J-M. & Haberkorn V. (2007)**. L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Revue de Kinésithérapie*, **61**, 14-17.
64. **Lucchesi M.E. (2005)**. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes : Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline : Chimie, Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies, Pp19.
65. **Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. (2004)**. An original solvent free microwave extraction of essential oil from spices. *Flavour and Fragrance Journal*, **19**, 134-138.

- 66. Maberley D.J, (1987).** *The Plant-book. A portable dictionnary of the higher plants.* Cambridge Universty Press. Cambridge.
- 67. Maureen D., (1997).** The isolation and potential use of Glycolic Acid present in the local plant *Erica multiflora*, University of Malta, Institute of Agriculture Research.
- 68. Moreira M R., Ponce A G., de Valle C E and Roura S I.(2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce foodborn pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-LWT*, 38 : 565-570
- 69. Népomuscène M.J.(1995).** Caractérisation des huiles essentielles du bleuet nain, *vaccinium angustifolium*Aiton. Thèse de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi
- 70. Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennd K.N., Kanko C., Ahibo C. & Casanovad J., (2008).** Etude chimique et activite antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. Vol.24, №1, pp. 94-103.
- 71. Paolini J. (2005).** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et deux *Asteraceae* Endemiques de Corse: *Eupatorium cannabinum subsp. Corsicum* et *Doronicum Corsicum*. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse. France.
- 72. PellecuerJ., RousselJ.L., AndaryC.C. (1980).** Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. *RivistaItalianaEssenzo* (EPPOS),**23**,45-50.
- 73. Pellerin, P. (1991).** Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfum. Flavor.* 16,4, 37-39.
- 74. Penssini G.L., Prado Dias Filho Celso B., Nakamura V., Cortez D.A.G. (2003).** Antibacterial activity of extracts and neolignans from Piper Regnelli (Miq).C.D.C.var. pallescens (C.D.C). yunk.*Memorias do instituo Oswaldo Cruz*, **98**.
- 75. Pfaller M.A., Burmeister L., Bartlett M.S., Rinaldi M.G. (1988).** Multicenter Evaluation of Four Methods of Yeast Inoculum Preparation. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**, 1437-1441.
- 76. Pibiri M.C. (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat, Polytechniques Fédérale de Lausanne
- 77. Pibiri M.C., (2006).** Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, pp. 28-52.

- 78. Proust, B (2006).** Petite Géométrie des Parfums. Éditions du Seuil. Paris.1 vol, 126 p.
- 79. Razakarivony A.A., Andriamihaja B. & Razanamahefa B., (2009).** Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. Actes du symposium biomad. Université d'Antananarivo. 28p.
- 80. Remmal A.,Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T. & Ettayebi M. (1993).** Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J.Essent. oil. Res.*5 : pp.1179-1184
- 81. Robert (G.) - Les sens du parfum (2000).** un demi-siècle de parfumerie ou l'ode aux nez légendaires et à leurs accords sublimes. Paris : Osman Eyrolles Santé et Société, , 224 p.
- 82. Roux D. (2008).** Conseil en aromathérapie. 2<sup>ème</sup> édition, *Pro-Officina.*, 187.
- 83. Russel A. D., (1991) –** Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics : food additives and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(3): 191-201.
- 84. Sartoratto A. Machado A.L.M., Delarmelina C., Figueira G.M., Cristina M., Duarte T. and Rehder V.L.G. (2004) –** Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35 : 275-280.
- 85. Sartoratto A. Machado A.L.M., Delarmelina C., Figueira G.M., Cristina M., Duarte T. and Rehder V.L.G. (2004) –** Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35 : 275-280.
- 86. Shama H , Mohamed R, Zakaria H , Badr S, Mohamed G et Mustapha E (2011).** .Evaluation du Potentiel Antifongique des Huiles Essentielles de *Mentha Pulegium* et d'eucalyptus *Camaldulensis* dans la Lutte Biologique Contre les Champignons Responsables de la Détérioration des Pommes en Conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 80, p.824 – 836.
- 87. SivropoulouA., PapanikolaouE, NikolaouC.,KokkiniS.,Lanaras T., ArsenakisM. (1996).** Antimicrobial and cytotoxicactivities of origanum essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1202-1205.
- 88. Spichiger R.E., Savolainen V.V., and Figeat M, (2000).** *Botanique Systématique des Plantes à Fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.

89. Stevens P.F, (2001). **Angiosperm Phylogeny Website**. In Version 7, May 2006. [www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/).
90. Stevens P.F, (1971). A classification of the *Ericaceae*: subfamilies and tribes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 64, 1-53.
91. Stevens P.F., Luteyn J., Oliver E.G.H., Bell T.L., Brown E.A., Crowden R.K., George A.S., Jordan G.J., Ladd P., Lemson K., McLean C.B., Menadue Y., Pate J.S., Stace H.M., and Weiler C.M, (2004). *Ericaceae*. In *The families and genera of vascular plants*. Kubitzki K. Ed. Vol. 6. Springer-Verlag. Berlin. pp 145–194.
92. Tchamdja K.M,(1995). Etude de performance d'un extracteur artisanal pour la production d'essence de citronnelle. Mémoire d'ingénieur des travaux biologiques, ESTBA, UB, 95 p.
93. Teisseire P.J.(1991). Chimie Des Substances Odorantes. *Technique documentation Lavoisier*, Paris, Pp 14, 25-30.
94. Teusher E., Anton R. & Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Eplices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec & Doc*, Paris, 522.
95. Vedel G (2005). Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 56(4): 657-664
96. ViollonA., ChaumontJ.P. (1994). Antifungalproperties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, **128**, 151-153.
97. Wannissorn B., Jarikasseem S., Siviwangchai T. and Thubthimthed S. (2005) – Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76: 233- 236.
98. Wannissorn B., Jarikasseem S., Siviwangchai T. and Thubthimthed S. (2005) – Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76: 233- 236.
99. Web références:127- <http://maps.google.fr>
100. Wenqtang, G.; Shufen, L.; Ruixiang, Y.; Shaokun, T.; Can, Q. (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chem*. 1001,1558-1564
101. Woo.J.H., Kitamura.E., Myouga.H., Kanei.Y. (2002). An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain Ap77 is specific for *Pytium porphyrae*, a causative agent of red rad disease in porphyra SPP. *Appl. Environ.*

*Microbiol.* 68(6) : 2665-75. [www.fao.org/docrep/004/y2775f/y2775f07.htm](http://www.fao.org/docrep/004/y2775f/y2775f07.htm)).

- 102. Woo.J.H., Kitamura.E., Myouga.H., Kanei.Y. (2002).** An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain Ap77 is specific for *Pytium porphyrae*, a causative agent of red rad disease in porphyra SPP. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6) : 2665-75. [www.fao.org/docrep/004/y2775f/y2775f07.htm](http://www.fao.org/docrep/004/y2775f/y2775f07.htm)).
- 103. Yayi E., Joachin D.,Gbenou, Léon A., Ahoussi M.,Moudachirou J.C.,Chalchat. C.**
- 104. ZakaryaA.,FathallahT., Chascstrette M. (1993).** Use of multifunctional autocorrelation method to estimate molar volumes of alkanes and oxygenated compounds: Comparison between components of autocorrelation vectors and topological indices. *J. Phys. Org. Chem.*, **6**, 574-582.
- 105. ZambonelliA., D'Aurelio A.Z., Severi A.,Benvenuti E.,MaggiL.,BianchiA. (2004).** Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. *J. Essent. Oil Res.*, **16**, 69-74.
- 106. Zhiri A.(2006).** Les huiles essentielles: un pouvoir antimicrobien avéré. Natural News. Science, Nutrition, Prévention et Santé, Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, p:8.
- 107. Ziming Wang, Lan Ding, Tiechun Li, Xin Zhou, Lu Wang, Hanqi Zhang, Li Liu, Yin Li, Zhihong Liu, Hongju Wang, Hong Zeng, Hui H, (2006).** Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography A*, **1102**, 11-17
- 108. أبو زيد ن.ح. (1988) -النباتات العطرية ومنتجاتها الزراعية والدوائية. الدار العربية للنشر والتوزيع القاهرة 472 صفحة**

# **ANNEXES**

# Annexe

## 1-Milieus de culture utilisés

### 1-1-milieus de cultures solides

#### Annexe 1

##### Mueller Hinton

- Infusion de viande de boeuf..... 4g
- Hydrolysate acide de caséine.....17,5g
- Amidon de Mais.....1,5g
- Agar.....12g

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,3 et stériliser à l'autoclave 15 min à 121°C.

#### Annexe 2

##### Gélose nutritive

- Extrait de viande de boeuf.....5 à 10g
- Peptone.....10g
- Chlorure de sodium.....5g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1000 ml

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,4 et stériliser à 120°C pendant 20 min.

### 1-2-milieus de culture liquide

#### Annexe 3

##### Bouillon nutritif

- Peptone..... 10g
- Chlorure de Sodium..... 5g
- Extrait de boeuf..... 5 à 10g
- Eau distillée..... 100ml

Ajuster le pH à 7,3 et stériliser à 120°C pendant 20 min

#### **Annexe 4**

##### **-Eau physiologique**

- Chlorure de sodium..... 9g
- Eau distillée ..... 1000ml

Après dissolution de Chlorure de sodium dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7 et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 30mn.

