

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Amar Telidji - Laghouat

Faculté des sciences

Département de Biologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Etude de l'activité antibactérienne et synergique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* , *Lavandula angustifolia* et *Syzygium aromaticum* vis-à-vis de quelques souches pathogènes

Présenté par :

- BOUCHAALA Yasmine
- CHENGUITI Fatma Zohra

Devant le jury composé de :

Mme KRAZA Lamia	MCB (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Présidente
Mme BENABED Khadidja Houda	MCB (ENS, Laghouat)	Examinatrice
Mme BOUSSOUSSA Hadjer	MCA (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Promotrice

Soutenu publiquement : 30/06/2022

Résumé

Les plantes sont capables de produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires ils accumulent des métabolites secondaires parmi lesquels les huiles essentielles (HE), très utilisées pour l'Homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. L'objectif de notre travail consiste à déterminer l'activité antibactérienne et synergique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* et *Lavandula angustifolia* par deux méthodes : l'aromatogramme et la microdilution en milieu liquide. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation assurée grâce à un appareil de type Clevenger, les rendements obtenus révèlent la richesse de nos plantes en HE. Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que les huiles essentielles obtenues ont un pouvoir antimicrobien intéressant sur les germes étudiés donc ces huiles pourraient servir comme base de lutte biologique contre les germes responsables des maladies infectieuses.

Mot clés : Huile essentielle , synergie , clevenger , hydrodistillation ,pouvoir antibactérien , *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* , *Lavandula angustifolia*

Abstract

-Plants are able to produce a wide variety of natural substances. Indeed, besides the primary metabolites they accumulate secondary metabolites, including essential oils, which are widely used for human being in different fields as pharmacology or agri-food. The objective of our work is to determine the antibacterial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* and *Lavandula angustifolia*, along with the synergy between them by two methods: aromatogram and microdilution in liquid medium. The extraction of essential oils was carried out by hydrodistillation ensured by a Clevenger device. The obtained results reveal the wealth of our plants with essential oils. The results show that the obtained essential oils have an antimicrobial power of interest on the studied germs so these oils could serve as a basis for biological control of the germs responsible for infectious diseases.

Key words: essential oil, the synergy, clevenger , hydrodistillation, antibacterial power.

Rosmarinus officinalis, *Syzygium aromaticum* , *Lavandula angustifolia*.

ملخص

النباتات قادرة على إنتاج مجموعة متنوعة من المواد الطبيعية ، إلى جانب المستقبلات الأولية ، فإنها تنتج مستقبلات ثانوية من بينها الزيوت الأساسية، و التي يستخدمها البشر على نطاق واسع في مجالات مختلفة مثل علم الأدوية و زراعة الأغذية.الهدف من عملنا هو تحديد النشاط المضاد للميكروبات و التعاون بين الزيوت الأساسية : بطريقتين، طريقة الأروماتوغرام و

la microdiltion ،تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق التقطير المائي بواسطة جهاز clevenger , المردود المتحصل عليه يكشف وفرة نباتاتنا بالزيوت الأساسية.نتائج النشاط المضاد للميكروبات يبين أن الزيوت الأساسية المتحصل عليها لديها نشاط مضاد للميكروبات مثير للإهتمام على

البكتيريا المدروسة و منه فإن هذه الزيوت تصلح لتكون بمثابة أساس للمكافحة البيولوجية ضد الجراثيم المسؤولة عن الأمراض المعدية

كلمات مفتاحية : زيت اساسي,التعاون ,التقطير المائي , نشاط مضاد للميكروبات

Rosmarinus officinalis, Syzygium aromaticum , Lavandula angustifolia

Remerciement

Nous remercions tout d'abord Dieu pour nous avoir donné la santé, la volonté, la force, et le courage pour achever ce travail

Nous remercions dans un premier temps, notre directrice de mémoire Mme BOUSSOUSSA Hadjer, de nous avoir encadré, orienté, aidé et conseillé, et nous remercions également madame GUELLOUMA Fatima et toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre stage.

Nous remercions les membres des jurys Mme KRAZA Lamia et Mme BENABED Khadidja Houdda pour avoir consacré du temps pour lire et juger notre travail.

Nous remercions toute l'équipe de laboratoire de recherche

Dédicace

Je dédie ce modeste travail,

A mes chers parents, qui m'ont toujours encouragé, que dieu vous

bénisse et vous garde en bonne santé

A mon frère Nourddine et sa femme Hadjer et à mes adorables sœurs

Soumia ,Nadjet et Habiba , je vous remercie pour vos encouragements

qui m'ont été d'un grand soutien

A mes amis (es)

A tous ceux qui me sont chère et que j'ai omis de citer

Yasmine

Dédicaces

A mes chers parents, qui ont toujours été là pour moi

A ma très chère sœur, Safia

A mes très chères frères, Mohamed Fakher el din et Oussama

A mes chères, Wafa, Manel, Hasna

A mes adorables amis (es)

Fatma zohra

Liste des abréviations

ATCC	American Type Collection Culture
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CFI	Concentration Minimale Inhibitrice
CIP5	Ciprofloxacine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
HE	Huile Essentielle
HD	Hydrodistillation
MH	Muller Hinton
MHB	Muller Hinton Broth
MF	McFarland
Rdt	Rendement
R	Résistante
S	Sensible
OMS	Organisation Mondiale de la santé

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Classification de cronquist(13).....</i>	<i>6</i>
<i>Tableau 2: Classification selon l'IPNI(15).....</i>	<i>7</i>
<i>Tableau 3: Classification de cronquist(16).....</i>	<i>8</i>
<i>Tableau 4: les composés majoritaires et la classification des huiles essentielles du romarin, girofle et lavande (24) (Benarous, 2018).....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 5: le matériel végétal utilisé.....</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 6: caractéristiques et origine des microorganismes testés.....</i>	<i>18</i>
<i>Tableau 7: les diamètres de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne en milieu solide (39).....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 8: les caractéristiques des huiles essentielles obtenues.....</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 9: Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile de Romarin.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 10: Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile de girofle.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 11: résultats de l'activité antibactérienne de l'huile de lavande.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 12: résultats de l'activité antibactérienne des dilutions 1/5 et 1/10 de romarin exprimé par un diamètre de la zone en mm.....</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 13: résultats de l'activité antibactérienne des dilutions 1/5 et 1/10 de girofle exprimé par un diamètre de la zone en mm.....</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 14: résultats de l'activité antibactérienne des dilutions 1/5 et 1/10 de lavande exprimé par un diamètre de la zone en mm.....</i>	<i>30</i>
<i>Tableau 15: résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique ciprofloxacine (1).....</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 16: T résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique ciprofloxacine (2).....</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 17: concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile de romarin.....</i>	<i>36</i>
<i>Tableau 18: : concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) d'huile de girofle.....</i>	<i>37</i>
<i>Tableau 19: concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) d'huile de lavande.....</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 20: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Romarin et Girofle) et entre (Lavande et Romarin) exprimé par un diamètre de la zone en mm.....</i>	<i>41</i>

<i>Tableau 21: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Lavande et Girofle) et entre (Lavande ; Girofle et Romarin) exprimé par un diamètre de la zone en mm</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 22: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Romarin et Girofle) et entre (Lavande et Romarin) diluée à 1/5 et exprimé par un diamètre de la zone en mm</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 23: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Lavande et Girofle) et entre (Lavande ; girofle et Romarin) diluée à 1/5 et exprimé par un diamètre de la zone en mm</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 24: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Romarin et Girofle) et entre (Lavande et Romarin) diluée à 1/10 et exprimé par un diamètre de la zone en mm</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 25: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Lavande et Girofle) et entre (Lavande ; girofle et Romarin) diluée à 1/10 et exprimé par un diamètre de la zone en</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 26: résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique « ciprofloxacine » exprimé par un diamètre de zone en mm (1)</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 27: résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique « ciprofloxacine » exprimé par un diamètre de zone en mm (2)</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 28: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de synergie entre romarin et girofle</i>	<i>57</i>
<i>Tableau 29: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de synergie entre romarin et lavande</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 30: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de synergie entre lavande et girofle.....</i>	<i>59</i>
<i>Tableau 31: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de synergie entre lavande, romarin et girofle.....</i>	<i>60</i>

Liste des figures

<i>Figure 1: Rosmarinus officinalis (Romarin).....</i>	Erreur ! Signet non défini.
<i>Figure 2: Syzygium aromaticum (Girofle).....</i>	Erreur ! Signet non défini.
<i>Figure 3: Lavandula angustifolia (Lavande).....</i>	Erreur ! Signet non défini.
<i>Figure 4: Photos illustrant les trois plantes utilisées dans cette étude, (a) : R.officinaliis,</i>	17
<i>Figure 5:Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger.....</i>	19
<i>Figure 6: la différence de la couleur des trois huiles essentielles</i>	25
<i>Figure 7: Rendement en huile essentielle de Romarin (Feuilles), Girofle (Graines) et Lavande (Graines).....</i>	26
<i>Figure 8: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de P.aeruginosa</i>	32
<i>Figure 9: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de S.aureus.....</i>	32
<i>Figure 10: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de E.coli.....</i>	33
<i>Figure 11: la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis les huiles essentielles.....</i>	35
<i>Figure 12: détermination De la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour l'huile de romarin ..</i>	36
<i>Figure 13: détermination De la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour l'huile de girofle</i>	37
<i>Figure 14: détermination De la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour l'huile de lavande ..</i>	38
<i>Figure 15: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de P.aeruginosa.....</i>	42
<i>Figure 16: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de S.aureus</i>	42
<i>Figure 17: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de E.coli.....</i>	42
<i>Figure 18 : L'activité antibactérienne des huiles essentielles pures contre les trois souches : P. aeruginosa, S.aureus et E.coli.....</i>	44
<i>Figure 19 : Histogramme qui présente une comparaison des zones d'inhibition des HE testées diluées à 1/5 vis-à-vis de P.aeruginosa.....</i>	46
<i>Figure 20:Histogramme qui présente une comparaison des zones d'inhibition des HE testées diluées à 1/5 vis-à-vis de S.aureus.....</i>	46
<i>Figure 21: Histogramme qui présente une comparaison des zones d'inhibition des HE testées diluées à 1/5 vis-à-vis de E.coli.....</i>	46

<i>Figure 22: L'activité antibactérienne des dilutions 1/5 de la synergie des huiles essentielles contre les trois souches : P.aeruginosa, S.aureus et E. coli</i>	48
<i>Figure 23: Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition des HE testées diluée à 1/10 vis-à-vis de P.aeruginosa</i>	50
<i>Figure 24: Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition des HE testées diluée à 1/10 testées vis-à-vis de E.coli</i>	50
<i>Figure 25: L'activité antibactérienne des dilutions 1/10 de la synergie des huiles essentielles contre les trois souches : P.aeruginosa , S.aureus et E. coli</i>	51
<i>Figure 26: Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition de ciprofloxacine vis-à-vis de P.aeruginosa</i>	53
<i>Figure 27:Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition de ciprofloxacine vis-à-vis de S.aureus</i>	53
<i>Figure 28:Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition de ciprofloxacine vis-à-vis de E.coli</i>	53
<i>Figure 29: L'activité antibactérienne de l'antibiotique ciprofloxacine contre les trois souches : P.aeruginosa, S.aureus et E. coli</i>	54
<i>Figure 30: la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis les huiles essentielles</i>	55
<i>Figure 31: Détermination de la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour la synergie entre romarin et girofle</i>	57
<i>Figure 32: : Détermination de la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour la synergie entre lavande et romarin</i>	58
<i>Figure 33: Détermination de la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour la synergie entre lavande et girofle</i>	59
<i>Figure 34: Détermination de la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour la synergie entre les trois huiles</i>	60

Table des matières

<i>Résumé</i>	I
Abstract	
<i>Remerciement</i>	
<i>Dédicace</i>	
<i>Dédicaces</i>	
<i>Liste des abréviations</i>	I
<i>Liste des tableaux</i>	II
<i>Liste des figures</i>	IV
<i>Table des matières</i>	VI
Introduction :	1
Chapitre I : Les plantes médicinales et aromatiques	5
1.1 Généralités sur les plantes médicinales :	5
1.2 Définitions des plantes médicinales :.....	5
1.3 La phytothérapie :	5
1.4 L'aromathérapie :.....	5
1.5 Les plantes utilisées dans ce travail	6
1-5-1-Le Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	6
1-5-2Le Girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>)	7
1-5-3 a Lavande (<i>Lavandula angustifolia</i>)	7
II - Les métabolites secondaires des plantes.....	10
II-1 Les alcaloïdes	10
II-2 Les composés phénoliques	10
II-3 Les huiles essentielles	11
1- Définition	11
2- La synergie entre les huiles essentielles	11
3- Classification et la composition chimique des huiles essentielles	12
4- Activités biologiques des huiles essentielles	13
5- Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	14

6- Conditions de conservation et de stockage des huiles essentielles.....	14
I- Matériel	17
1-1- <i>Le Matériel végétal</i>	17
1-2- <i>Le Matériel microbiologique</i>	18
1-2- a- Les souches bactériennes	18
I-1 Extraction des HE par hydrodistillation	18
I-2 Calcul du rendement d'extraction.....	19
II-Étude de l'activité antibactérienne.....	20
II-1 Méthode de l'aromatogramme.....	20
II-1-a Repiquage des souches bactériennes	20
II-1-b Préparation des dilutions.....	20
II-1-c Dépôt des disques.....	21
II-1-d L'incubation	21
II-1-e Mesure de l'activité antibactérienne en milieu solide	21
II-2 Méthode de la microdilution	22
II-2-a Protocole.....	22
II-2-b Mesure de l'activité antibactérienne en milieu liquide.....	22
I- <i>Résultats</i>	24
1-1-Rendement en huiles essentielles des trois plantes étudiées	24
1-Les résultats de l'aromatogramme	27
1-1 les résultats de l'huile pure	27
I-2 Résultats des dilutions 1/5 et 1/10	29
I-3 Sensibilité à l'antibiotique « le ciprofloxacine ».....	31
II-1 Les résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-dilution.....	36
<i>Discussion générale</i>	40
Résultats de l'activité synergique entre les HE.....	41
I-Test d'inhibition en milieu solide	41
I-1 Sensibilité aux huiles essentielles pure	41
I-2 Sensibilité aux huiles essentielles diluées à 1/5	45
I-3 Sensibilité aux huiles essentielles diluées à 1/10	49
Les souches.....	49

Synergie entre le Romarin et Girofle.....	49
Synergie entre lavande et Romarin.....	49
<i>I-4 Sensibilité à l'antibiotique « le ciprofoxacine »</i>	52
II- Les résultats de l'activité synergique par la méthode de micro-dilution	56
II-1 Détermination de la CMI et CMB	56
<i>Discussion générale</i>	61
<i>Conclusion</i>	63
Références	
Annexe	

Introduction

Introduction :

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle pour traiter de nombreuses maladies. Quelque 40% des produits pharmaceutiques autorisés utilisés aujourd'hui sont issus de substances naturelles. La médecine traditionnelle occupe également une place de plus en plus importante dans le monde de la science moderne (1). Les plantes médicinales jouent un rôle essentiel dans la prévention et le traitement de différentes maladies, soit en utilisant la plante entière ou ses principes actifs, tels que les huiles essentielles.

Les plantes de façon générale se caractérisent par deux types de métabolismes. Le métabolisme primaire, qui fournit les constituants de base en quantité élevée, les plus importants (les sucres et leurs dérivés, les lipides et les protéines). Le métabolisme secondaire produit des métabolites en faibles quantités, mais dont des applications dans différents domaines en particulier à intérêt pharmaceutique et cosmétique sont de la plus grande importance (2). Les huiles essentielles font partie de ce groupe de métabolite avec les alcaloïdes et les polyphénols.

Les bactéries sont responsables de plusieurs maladies. Leur résistance aux antibiotiques est de plus en plus prononcée. Pour arrêter ce processus de synthèse-résistance, il est nécessaire de chercher une autre approche afin de diminuer ou d'éliminer les affections sans l'utilisation des produits synthétiques, donc il est évident de trouver des solutions par l'utilisation des molécules bioactives qui sont à base de plantes (3)

Les huiles essentielles (HEs) sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide (4) la plupart des végétaux renferment des HE, mais habituellement en quantité infime. Seules des plantes dites « aromatiques » en produisent en quantité importante (5). La distillation à la vapeur d'eau est le procédé le plus pratiqué dans l'industrie des arômes. Les huiles essentielles obtenues sont des produits généralement, peu polaires, volatils odoriférants, et de densité dans la plupart inférieure à celle de l'eau (6).

Notre travail a ainsi, pour objet, d'étudier l'activité antibactérienne et synergique entre des huiles essentielles extraites à partir des trois plantes médicinales de *Rosmarinus*

officinalis, *Syzygium aromaticum* et *Lavandula angustifolia* contre trois souches bactériennes multirésistantes ; (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*).

L'extraction des HES a été réalisée par hydrodistillation. Afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites et la détermination de la résistance ou la sensibilité des souches étudiées, nous avons utilisé les méthodes d'aromatogramme et la méthode de microdilution en milieu liquide avec détermination des concentrations minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB). Toutes les huiles essentielles obtenues ont un pouvoir antibactérien intéressant sur les germes étudiés, exceptée la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est révélée résistante aux HES de Romarin et de Lavande et même avec la synergie entre elles, avec l'augmentation de la sensibilité entre les trois huiles

Notre travail sera présenté comme suit :

Dans la première partie, nous avons essayé dans un premier temps de donner une synthèse bibliographique concernant les plantes aromatiques et médicinales et les méthodes d'étude de l'activité antibactérienne.

Nous avons ensuite entamé une deuxième partie qui présente nos plantes, décrit le matériel utilisé lors du travail expérimental et la méthode d'extraction des HES, ainsi que les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.

Nous avons exposé dans la troisième partie de ce mémoire l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion.

Nous terminons par conclusion générale et perspectives de ce travail.

Partie Bibliographique

Chapitre I

Les plantes médicinales et aromatiques

Chapitre I : Les plantes médicinales et aromatiques**1.1 Généralités sur les plantes médicinales :**

L'efficacité d'une plante sur notre organisme est due aux principes actifs qu'elle renferme. Un principe actif est une molécule qui va avoir un effet sur notre organisme. (7)

1.2 Définitions des plantes médicinales :

Il existe plusieurs définitions pour une plante médicinale, le plus simple est : c'est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties peut être employée dans le but de se soigner. Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, et qui présentent des effets thérapeutiques différents. (8)

Pour ANSM ,Les plantes médicinales sont des drogues végétales, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. (9) Des plantes ayant des propriétés médicamenteuses peuvent avoir également des usages alimentaires ou condimentaires, il s'agit soit des mêmes parties de plantes, soit des parties différentes (10)

1.3 La phytothérapie :

D'un point de vue étymologique, le terme "phyto" de *phytothérapie* provient du grec ancien avec le terme plus précis de "*phyton*" et signifie "végétal". La phytothérapie est donc la "thérapie par le végétal ou par le monde végétal", aujourd'hui nous considérons davantage la phytothérapie comme la "thérapie par les plantes" ou plus exactement la méthode thérapeutique utilisant des plantes médicinales dans le traitement de maladies. (11)

1.4 L'aromathérapie :

C'est une branche de la phytothérapie. Elle désigne de manière générale l'utilisation des composés aromatiques des plantes, la plupart du temps sous forme d'huiles essentielles, dans une optique de prévention et de soulagement de certains troubles, ainsi que de bien-être et d'apaisement. (12)

1.5 Les plantes utilisées dans ce travail

1-5-1-Le Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

Le *Rosmarinus officinalis* (Romarin officinal) est une espèce végétale appartenant à la famille des Lamiacées (sous-famille des Népétoïdées, tribu des Menthées) (**Tableau 1**), originaire des régions méditerranéennes, que l'on trouve sur les terrains calcaires, dans les garrigues arides et caillouteuses.(13)

Tableau 1: Classification de Cronquist(13)

Règne	Plantae
Sous-règne	Viridiplantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Astériidées
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>officinalis</i>



Figure 1: *Rosmarinus officinalis* (Romarin)

1-5-2 Le Girofle (*Syzygium aromaticum*)

Origine des îles moluques, dans l'océan indien, le giroflier, *Syzygium aromaticum*, est un arbre de 20 mètres de haut, il se développe sur des zones tropicales et maritimes aux sols bien drainés, le girofle appartient à la famille des myrtacées (Tableau 2), il est également appelé girofle. (14)

Tableau 2: Classification selon l'IPNI (15)

Règne	Plantae
Sous-règne	Viridiplantae
Infra-règne	Streptophyta
Classe	Equisetopsida
Sous-classe	Magnoliidae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Sous-famille	Myrtoideae
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i>

**Figure 2:** *Syzygium aromaticum* (Girofle)**1-5-3 a Lavande (*Lavandula angustifolia*)**

La *Lavandula angustifolia* (Lavandevraie), autrefois *Lavandula vera* ou *Lavandula officinalis*, est une espèce végétale appartenant à la famille des Lamiacées (sous-famille des Népétoïdées,

tribu des Ocimées) (**Tableau 3**), originaire du pourtour méditerranéen, que l'on trouve en Provence à l'état sauvage. (16)

Tableau 3: Classification de Cronquist (16)

Règne	Plantae
Sous-règne	Viridiplantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Astériidées
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Lavandula</i>
Espèce	<i>angustifolia</i>



Figure 3: *Lavandula angustifolia* (Lavande)

Chapitre II

Les métabolites secondaires des plantes

II - Les métabolites secondaires des plantes

Les métabolites secondaires sont des composés phytochimiques non directement impliqués dans les processus vitaux de bases (croissance, la division cellulaire, la respiration, la photosynthèse, reproduction), contrairement aux métabolites primaires. Les métabolites secondaires vont avoir des fonctions spécifiques en réponse à une adaptation à un environnement (17)

Ils ont un rôle dans :

- La protection des plantes contre ravageurs et pathogènes
- L'allélopathie (compétition plante-plante)
- La symbiose plante-microbe
- La couleur, l'odeur et le goût. Ils peuvent donc servir d'attractifs pour les pollinisateurs.

Les métabolites secondaires sont composés de trois principales catégories qui sont les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (ou composés azotés). (17)

II-1 Les alcaloïdes

Un **alcaloïde** est une substance organique d'origine végétale ayant des groupes amimiques de nature à conférer un caractère basique à la structure, et ayant de grands effets pharmacologiques par rapport à l'absorption de petites doses de substance (par exemple caféine, morphine, strychnine).

Un alcaloïde est un composé organique d'origine végétale, généralement alcalin comme le nom l'indique. Il comporte au moins un atome d'azote, généralement dans un hétérocycle (cycle composé de carbone et d'azote). Les alcaloïdes ont souvent une forte activité biologique, toxique ou thérapeutique . (18)

II-2 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils sont caractérisés par la présence de groupements phénoliques : 1 ou plusieurs cycles aromatique (benzéniques) porteurs de 1 ou plusieurs OH, Chaque classe est caractérisée par la présence d'un noyau benzoïque auquel un ou plusieurs groupes hydroxyles sont directement liés . Ils

sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines et bois). Ils sont synthétisés par les plantes soumises à des conditions difficiles (infections, blessures, radiation UV, ...) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins. **(19)**

II-3 Les huiles essentielles

1- Définition

On trouve plusieurs définitions des huiles essentielles :

- La définition selon la norme ISO 9235 (Matières premières aromatiques d'origine naturelle) : Une HE est définie comme un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. » **(20)**
- Pour la Pharmacopée européenne, l'huile essentielle est définie comme un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie. Le plus souvent, elle est séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif dans sa composition. **(21)**

2- La synergie entre les huiles essentielles

Phénomène par lequel plusieurs huiles essentielles mises en mélange agissent ensemble pour créer un effet global plus favorable que si les HE étaient utilisés séparément. De façon générale on dit qu'il y a synergie positive quand « le résultat commun, (l'efficacité thérapeutique) est meilleur que la somme attendue des résultats individuels » **(22)**

1-5-3 Classification et la composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) sont classées usuellement selon la nature chimique des principes actifs majeurs (leurs composés majoritaires), plus rarement sur le mode d'extraction, ou les effets biologiques (**Tableau 5**). On retient neuf classes principales (les carbures sesquiterpéniques et terpéniques, les alcools, les esters et alcools, les aldéhydes, les cétones, les phénols, les éthers, les peroxydes et les sulfurés) (**23**)

Tableau 4: les composés majoritaires et la classification des huiles essentielles du romarin, girofle et lavande (**24**)

L'huile essentielle	Composés majoritaires	Structures classes chimiques	classification	La famille	Nom latin de la plante
Romarin	cinéol camphre pinéne camphène bornéol	$C_{10}H_{18}O$ $C_{10}H_{16}O$ $C_{10}H_{16}$ $C_{10}H_{16}$ $C_{10}H_{18}O$	Carbure Sesquiterpéniques et terpéniques	<i>Lamiaceae</i>	Rosmarinus officinalis
Girofle	eugénol	$C_{10}H_{16}O_2$	Phénols	<i>Myrtaceae</i>	Syzygium aromaticum L
Lavande vraie	linalol acétate de linalyle terpinéol terpinènes	$C_{10}H_{18}O$ $C_{12}H_{20}O_2$ $C_{10}H_{18}O$ $C_{10}H_{18}O$	Mélange d'esters et d'alcools	<i>Lamiaceae</i>	Lavandula angustifolia

4- Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles, actuellement employées comme arômes alimentaires, sont également connues pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agent de conservation alimentaire, ou approuvés comme additifs par la Food and Drug Administration. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments ; cependant les études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne. Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. **(25)**

L'utilisation des HE dans différentes pathologies (digestive, infectieuse, ...) fait appel à leurs propriétés : anti-infectieuse, antalgique, anti-inflammatoire, sédative, antimicrobien, antispasmodique et antioxydante . **(26)**

Les HEs ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Ces dernières attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM). **(27)**

5- Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les principales propriétés des huiles essentielles sont :

- * Liquides à température ambiante. A base température certaines HE se solidifient
- * De consistance huileuse mais non grasse
- * Volatiles (ce qui les différencie des huiles fixes). Leur volatilité augmente avec la chaleur
- * Densité inférieur à celle de l'eau sauf celle de cannelle, girofle, sassafras
- * Solubles dans l'alcool, les graisses, l'éther et la plupart des solvants organiques et insolubles dans l'eau
- * Elles sont odorantes et entraînable à la vapeur d'eau
- * Elles possèdent un indice de réfraction élevé et ont souvent un pouvoir rotatoire
- * Elles ne se dissolvent pas dans l'eau
- * Elles peuvent être colorées (la plupart sont incolores)
- * Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux. C'est pour cela qu'il convient de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air (28), (29)

6- Conditions de conservation et de stockage des huiles essentielles

A cause de leur évaporation rapide, leurs sensibilités à l'air et à la lumière, et la relative instabilité des molécules constitutives des HE impliquent des précautions particulières pour leur conservation. Ces dégradations pouvant modifier les propriétés et ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle, il convient de les éviter : par l'utilisation de flacons propres et secs (30). La conservation des flacons se fait à une température comprise entre 5°C à 35°C. Les huiles essentielles pures et naturelles se conserveront, ainsi, pendant plusieurs années ; au moins 5 ans.

Partie Expérimentale

Matériels et méthode

I- Matériel

1-1-Le Matériel végétal

Notre matériel végétal est constitué de trois plantes médicinales ; le Romarin (*Rosmarinus officinalis*) : (Figure 01-a), le Girofle (*Syzygium aromaticum*) : (Figure 01-b) et la Lavande (*Lavandula angustifolia*) : (Figure 01-c). Disponibles dans le marché tout au long de l'année pour leur importance dans la tradition culinaire Algérienne et la médecine traditionnelle. Le matériel végétal utilisé est montré dans le tableau suivant :

Tableau 5: le matériel végétal utilisé

La plante	Partie de la plante utilisée
Girofle	Graines
Romarin	Feuilles
Lavande	Graines



(a)



(b)



(c)

Figure 04: Photos illustrant les trois plantes utilisées dans cette étude, (a) : *R.officinalis*,
(b) : *S.aromaticum* et (c) : *L.angustifolia*

1-2- Le Matériel microbiologique

1-2- a- Les souches bactériennes

Les trois souches bactériennes choisies au cours de cette étude sont à l'origine de plusieurs infections. Ces souches ont été fournies de l'hôpital (ElAkid Lotfi-Laghouat) il s'agit de : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Le choix des souches à tester est basé sur le caractère pathogénique et sur les études déjà réalisées et sur leur disponibilité au laboratoire.

Tableau 6: caractéristiques et origine des microorganismes testés

Nom de la souche	ATCC	Gram	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	<i>Eterobacteriaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	<i>Pseudomonadaceae</i>

I-1 Extraction des HE par hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation assurée grâce à un appareil de type Clevenger (**Figure 02**) (**31**).

Une quantité de matière végétale introduite avec l'eau dans un ballon de (2000 ml). Après installation et fermeture du montage, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant (**32**), La durée totale de l'extraction est estimée à 3h (jusqu'à ce qu'on obtienne plus d'HE et reste constant). L'huile essentielle se distingue de l'hydrolat (eau aromatique), elle sépare par sa différence de densité et de couleur. Puis récupérée et conservée dans des flacons et stockés dans un endroit frais (5°C) à l'abri de la lumière

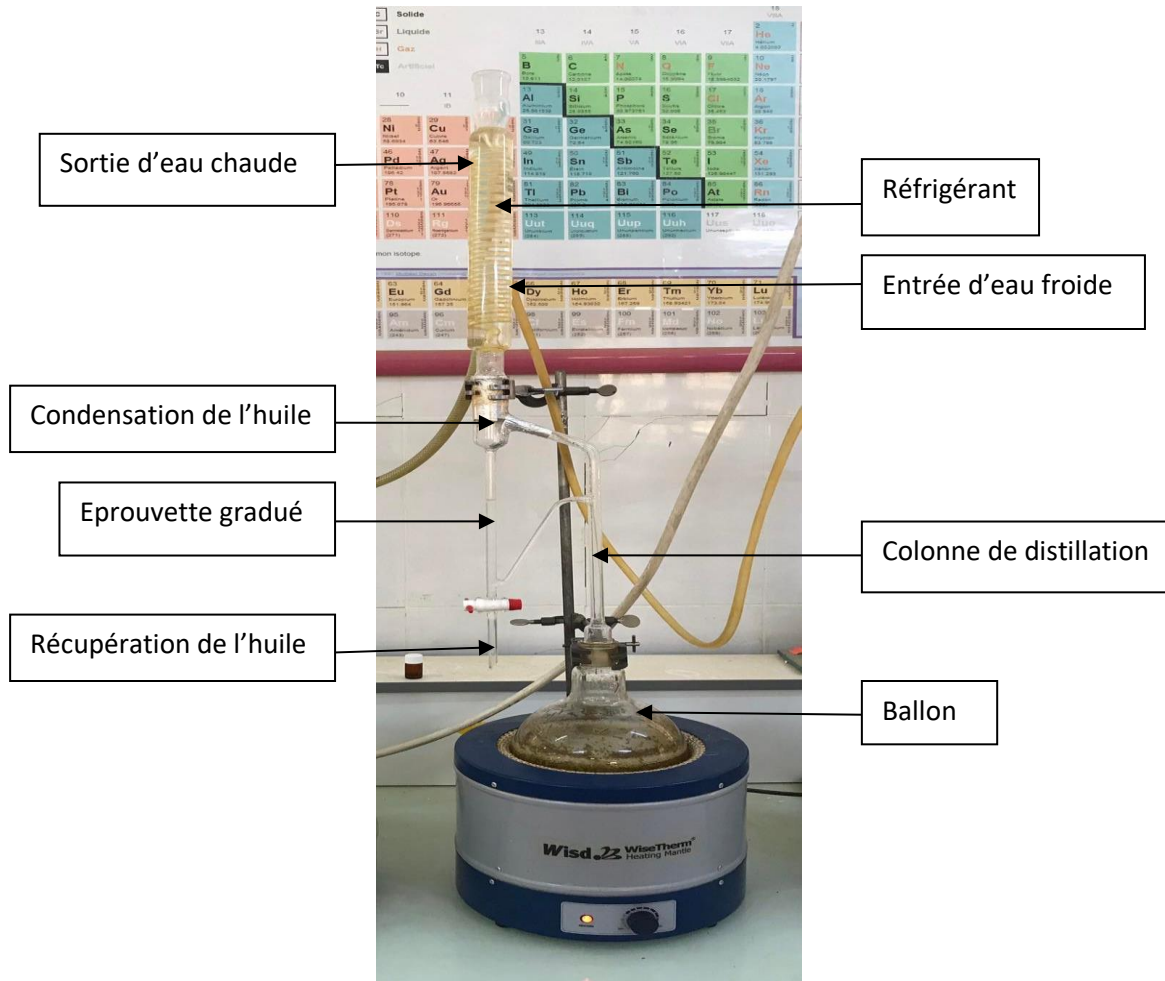


Figure 05: Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger

I-2 Calcul du rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses de l'huile essentielle et de la matière végétale séchée. Il est exprimé en pourcentage (%)

$$\mathbf{Rd\ HE = \frac{M(HE)}{MVS} \times 100 = \dots\%}$$

Rd HE = Rendement en huile essentielle (%)

MHE = masse de l'huile essentielle (g)

MVS = masse de la matière végétale sèche (g)

II-Étude de l'activité antibactérienne

Les huiles essentielles sont considérées comme agents antimicrobien à large spectre (33). L'usage excessif des médicaments de synthèse et la résistance des bactéries aux antibiotiques (34), (35) ont conduit à considérer favorablement l'utilisation des huiles essentielles en pratiques médicinales

Cette étude a été réalisée par deux méthodes pour évaluer l'activité antibactérienne par la méthode d'aromatogramme ou (la méthode des disques) et la méthode de la micro-dilution

II-1 Méthode de l'aromatogramme

La technique de l'aromatogramme a été appliquée dans le but d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Cette méthode permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactérienne vis-à-vis d'une huile essentielle donnée. La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boites de pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne à tester (36).

Ce test est effectué par dépôt d'un disque stérile de 6 mm de diamètre imprégné d'une quantité d'huile essentielle sur un milieu gélosé préalablementensemencée avec une culture microbienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (37).

II-1-a Repiquage des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées, les colonies isolées ont servi pour préparer l'inoculum (38)

II-1-b Préparation des dilutions

Cette méthode est basée sur la diminution de la concentration de l'huile essentielle, des dilutions en cascade de raison géométrique 2 ont été réalisées pour nos huiles essentielles.

11-1-c Dépôt des disques

Les disques sont fabriqués à partir du papier filtre de 6 mm de diamètre. A l'aide d'une pince, dans chaque boîte de pétri ensemencée, on applique 5 disques :

*Le premier est un disque témoin (contrôle positif : CIP5) sans HE, dilution et sans DMSO ;

*Le deuxième imbibé par (10ul) du DMSO (pour confirmer le non activité sur les germes) ;

*Le troisième est imprégné par (10ul) d'huile essentielle pure ;

*Le quatrième disque imbibé par (10ul) d'huile essentielle diluée à 1/5 par le DMSO ;

*Le cinquième est imbibé par (10ul) d'huile essentielle diluée à 1/10 par le DMSO.

11-1-d L'incubation

Dans l'étuve, pendant 18 à 24 heures à 37°C (température pour une croissance optimale des microorganismes). Les résultats sont observés le lendemain, en mesurant les diamètres autour des disques (zones d'inhibition).

11-1-e Mesure de l'activité antibactérienne en milieu solide

L'effet antibactérien de l'huile sur la souche est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition. En fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de résistante (-) pour les diamètres moins de 8 mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm ; très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm (39). Selon le tableau suivant

Tableau 7: les diamètres de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne en milieu solide (39)

Le diamètre	La sensibilité des souches
$\emptyset < 8$ mm $9 < \emptyset < 14$ mm $15 < \emptyset < 19$ mm $\emptyset > 20$ mm	Résistante (-) Sensible (+) Très sensible (++) Extrêmement sensible (+++)

II-2 Méthode de la microdilution

C'est une méthode qui nous permet de déterminer la plus petite concentration d'huile essentielle suffisante pour inhiber la croissance d'une souche bactérienne (CMI), ou de tuer le germe (CMB). (40)

II-2-a Protocole

La méthode de microdilution est effectuée avec une microplaque de 96 puits :

- Le premier puits contient : 70 ul MH + 5ul inoculum (10^8 CFU/ml) ;
- Le **deuxième puits** contient du milieu (70 μ L MH) et la substance à tester à sa plus forte concentration (pure) (25 μ L HE) + 5 μ L inoculum. Ce témoin permet de mettre en évidence une interaction éventuelle entre un ou des composants du MH et la substance testée.
- **Le reste des puits** : contiennent les différentes dilutions de nos huiles essentielles tout en suivant les mêmes conditions du deuxième puits.

Les microplaques sont par la suite incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h.

II-2-b Mesure de l'activité antibactérienne en milieu liquide

Détermination de CMI et CMB

- La CMI ou concentration minimale inhibitrice est la concentration la plus petite d'HE qui empêche les bactéries de se multiplier. C'est le paramètre le plus utilisé pour mesurer *in vitro* l'activité d'un antibiotique (41)
- La CMB correspond à la concentration en principe actif permettant de tuer 99,9 % des bactéries après 24 h d'incubation (42).

Résultats et discussion

1- Résultats

1-1-Rendement en huiles essentielles des trois plantes étudiées

Les extractions par hydrodistillation des différents organes des plantes étudiées ont fourni des huiles essentielles ayant des colorations variables allant du jaune clair au jaune relativement foncé avec de fortes et persistantes odeurs, ces éléments sont présentés dans le **Tableau ci-dessous**.

Tableau 8: les caractéristiques des huiles essentielles obtenues

La plante	La quantité de la matière végétale (g)	Le rendement (%)	La couleur
Romarin	100g	1,51%	Jaune clair
Girofle	50g	7,6%	Jaune clair
Lavande	100g	2,71%	Jaune foncé



Figure 06: la différence de la couleur des trois huiles essentielles

Les huiles obtenues par extraction à la vapeur d'eau « hydrodistillation » sont de couleur jeune clair pour l'espèce de *Syzygium aromaticum* et *Rosmarinus officinalis*, et couleur jaune foncé pour l'espèce de *Lavandula angustifolia*. Cette variation de couleur dépend à la composition chimique des plantes et les principes actifs extraits à partir de chacune.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante, les résultats ont été exprimés en pourcentage (%) (**Figure 04**).

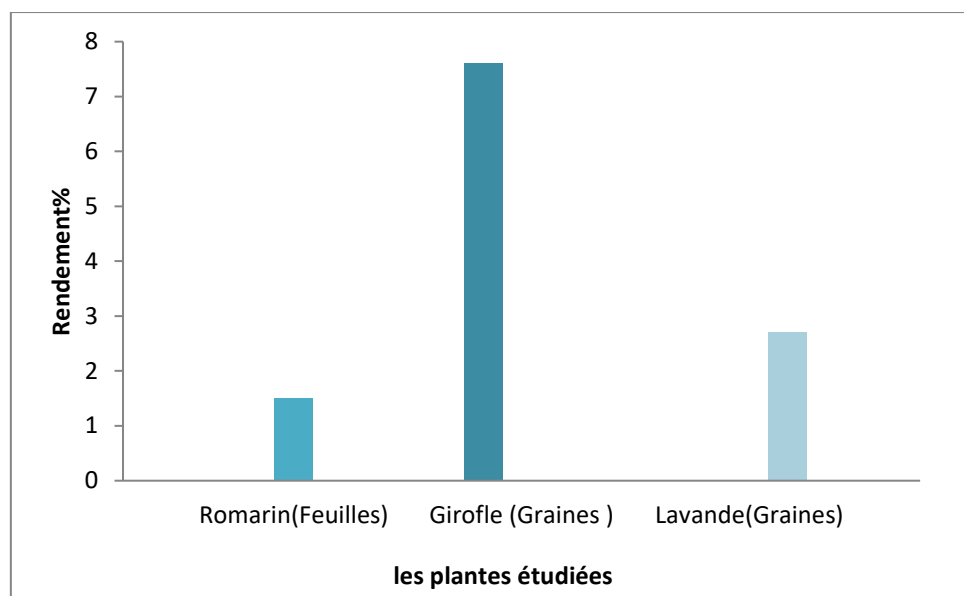


Figure 07: Rendement en huile essentielle de Romarin (Feuilles), Girofle (Graines) et Lavande (Graines)

D'après nos résultats, le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'huile essentielle de clou de girofle de 7,6 %, Ce rendement est faible par rapport à celui rapporté par **Haddouche et al (43)**, qui ont obtenus un rendement de 11,56 %, Sachant qui a utilisé la même méthode d'extraction. Suivante de l'huile essentielle de la lavande de 2,71 %, Ce rendements est plus élevé par rapport à celui de **Boughendjioua (44)** (1,5 %). Le faible rendement a été obtenu avec le romarin de 1,5 %, Ce rendement est presque le même de celui de **Boutabia et al (45)** qui ont obtenu un rendement de 1,6 %.

Cette différence dans les résultats du rendement est probablement due à plusieurs facteurs à savoir l'origine de l'espèce, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage. Facteurs climatiques (chaleur, froid), la géographie (altitude, nature du sol, taux d'exposition au soleil) et la nature des plantes aromatiques (46). Sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en huiles essentielles.

1-Les résultats de l'aromatogramme

1-1 les résultats de l'huile pure

Nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures bactériennes dans chaque boîte de pétri. Les résultats sont représentés dans les **tableaux (09, 10 et 11)**.

Tableau 9: Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile de Romarin

Les souches	Zone d'inhibition de Huile de Romarin				
	1	2	3	4	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	16	21	-	14±2,51
<i>Escherichia coli</i>	-	13	16	14	10,75±1,52

Tableau 10: Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile de girofle

Les souches	Zone d'inhibition de Huile de girofle				
	1	2	3	4	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	14	23	15	16,25± 4,57
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	30	26	20	24,5± 4,43
<i>Escherichia coli</i>	28	18	24	-	23,33± 5,03

Tableau 11: résultats de l'activité antibactérienne de l'huile de lavande

Les souches	Zone d'inhibition de Huile de lavande				
	1	2	3	4	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	22	40	35	25±8,04
<i>Escherichia coli</i>	26	20	20	22	22± 2,82

D'après les résultats mentionnés ci-dessus (**Tableaux 09,10 et 11**), on a constaté que toutes les souches testées sont sensibles aux huiles essentielles pure, sauf pour *Pseudomonas areuginosa* qui est sensible seulement à l'huile de girofle avec un diamètre d'inhibition de l'ordre de 16,25± 4,57 mm de diamètre.

-Pour l'huile de Romarin, l'activité antibactérienne la plus élevée a été obtenue contre la souche de *staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de l'ordre de 14±2,51 mm, suivie par la souche de *Echerichia coli* avec 10 ,75±1 ,52 mm de diamètre d'inhibition. Pour la souche de *Pseudomonas areuginosa* aucune activité antibactérienne n'a été observée.

-L'huile de Girofle, a fait une inhibition de la croissance bactérienne avec toutes les souches testées. Une variation dans les diamètres des zones d'inhibitions a été observée.

- Pour l'huile de Lavande, on a remarqué qu'il y'a une zone d'inhibition de l'ordre de 25± 8,04mm de diamètre contre la souche de *Staphylococcus aureus* et 22± 2,82 mm de diamètre contre la souche d'*Echerichia coli*. En revanche, nous notons qu'aucune activité antibactérienne n'est prévue avec *Pseudomonas aeruginosa*.

I-2 Résultats des dilutions 1/5 et 1/10

Les tableaux ci-dessous (**Tableaux 12-14**) résument l'ensemble des résultats obtenus avec les différentes dilutions des HEs de nos trois plantes à l'encontre des souches étudiées.

Tableau 12: résultats de l'activité antibactérienne des dilutions 1/5 et 1/10 de romarin exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Les dilutions de romarin 1/5					Les dilutions de romarin 1/10				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10	12	-	5,5 ±1,41	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 13: résultats de l'activité antibactérienne des dilutions 1/5 et 1/10 de girofle exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Les dilutions de girofle 1/5					Les dilutions de girofle 1 /10				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	14	-	15	7,25±0,70	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	24	15	15	-	18±5,19	-	-	-	-	-

Tableau 14: résultats de l'activité antibactérienne des dilutions 1/5 et 1/10 de lavande exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Les dilutions de lavande 1/5					Les dilutions de lavande 1/10				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	09	-	25	28	15,5±10,21	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D'après les résultats obtenus, on a remarqué qu'il y a une diminution dans le diamètre de la zone d'inhibition des dilutions d'HE, par rapport aux zones d'inhibitions des huiles essentielles pures.

- Les HE diluée au 1/5 semblent plus efficaces par rapport aux HE diluées au 1/10

-Les dilutions d'huile de girofle ont fait une activité antibactérienne remarquable contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa*, avec une moyenne d'inhibition de l'ordre de : 7,25±0,70

-Pour la souche *Escherichia coli*, elle était plus sensible aux dilutions 1/5 de girofle, avec une zone d'inhibition de l'ordre de 18±5,19 de diamètre.

-La souche *Staphylococcus aureus* était plus sensible aux dilutions 1/5 d'huile de lavande, avec un diamètre de 15,5±10,21 mm

I-3 Sensibilité à l'antibiotique « le ciprofloxacine »

Tableau 15: résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique ciprofloxacine (1)

Les souches	Romarin					Girofle				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	40	36	36	37,25±1,89	37	36	34	40	36,75±2,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	25	36	49	34,5±10,72	46	35	35	41	39,25±5,31
<i>Escherichia coli</i>	39	20	32	38	32,25±8,73	39	26	38	-	34,33±7,23

Tableau 16:T résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique ciprofloxacine (2)

Les souches	Lavande				
	1	2	3	4	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	38	37	39	35±6,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	29	32	39	42	35,5±6,02
<i>Escherichia coli</i>	41	33	34	38	36,5±3,69

De l'ensemble des résultats obtenus, toutes les souches ont montrés une grande sensibilité sous l'action de l'antibiotique ciprofloxacine , avec une hétérogénéité dans les résultats, et avec des zones d'inhibitions comprises entre 32,25 et 39,25mm de diamètre.

I-4 Histogrammes présentent la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis des huiles essentielles

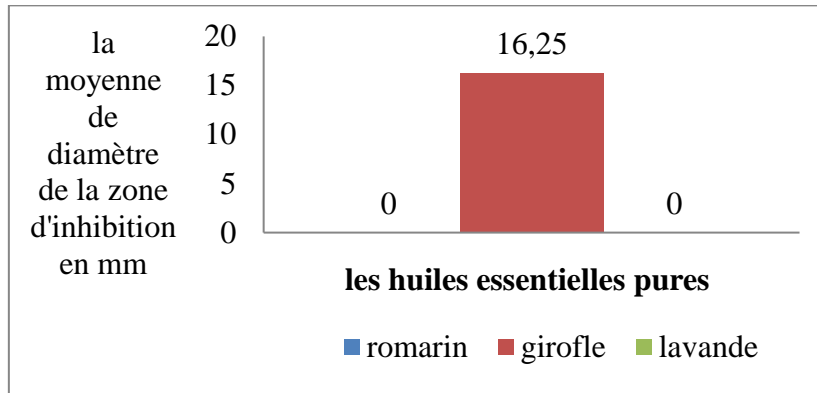


Figure 08: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de *P.aeruginosa*

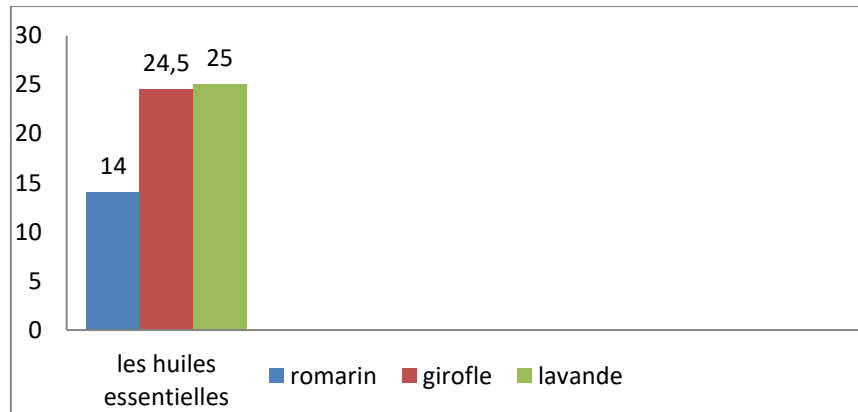


Figure 09: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de *S.aureus*

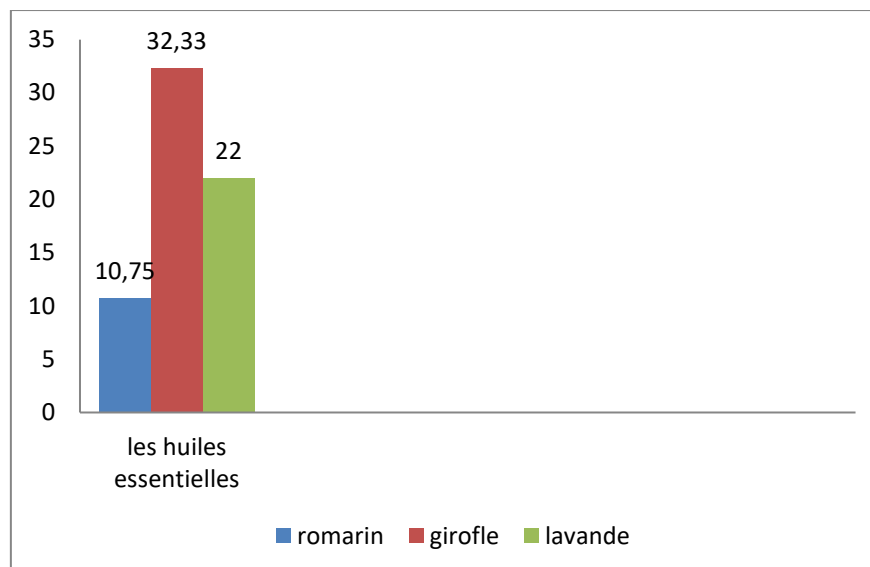


Figure 10: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de *E coli*

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles face à la souche *Pseudomonas aeruginosa* a montré qu'elle est uniquement sensible au HE de girofle (zone d'inhibition de 16,25 mm), alors qu'elle est complètement résistante face aux huiles de Romarin et Lavande.

D'après nos résultats présentés dans les histogrammes, les souches *Staphylococcus aureus* et *Eschericia coli* ont montré une grande sensibilité sous l'action des trois huiles essentielles pure, les zones d'inhibitions des huiles essentielles sont comprises entre 19,5 et 32,23 mm de diamètre.

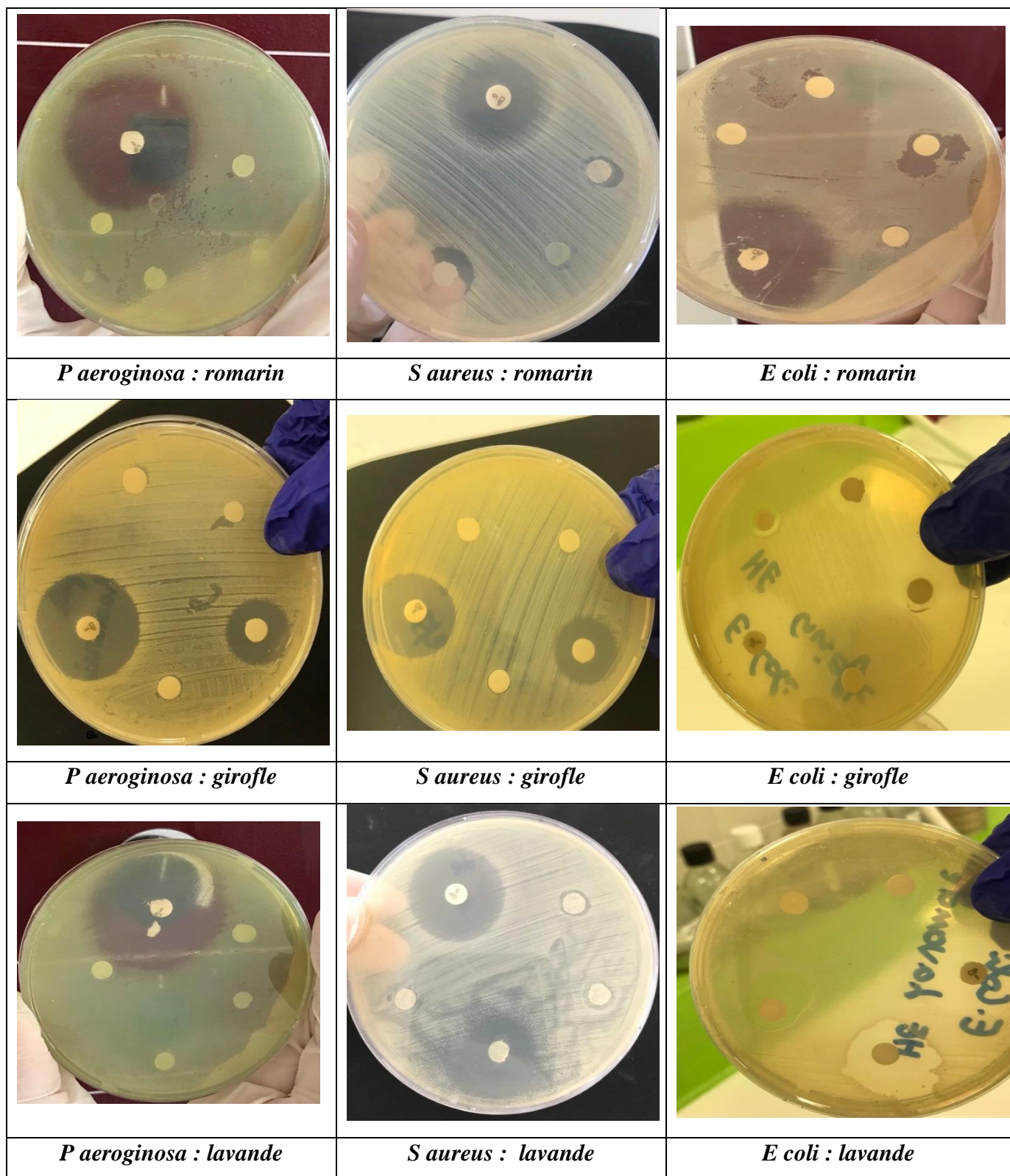


Figure 11: la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis les huiles essentielles

II-1 Les résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-dilution

En milieu liquide, l'évaluation de l'activité antibactérienne des trois huiles essentielles est effectuée sur trois souches, par la détermination de CMI et CMB, selon la méthode de micro-dilution. Les valeurs de CMI et CMB sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 17: concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile de romarin

Huile de romarin	CMB (mg /ml)	CMI (mg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	269,6425	107,857
<i>Escherichia coli</i>	269,6425	107,857
<i>Staphylococcus aureus</i>	269,6425	107,857

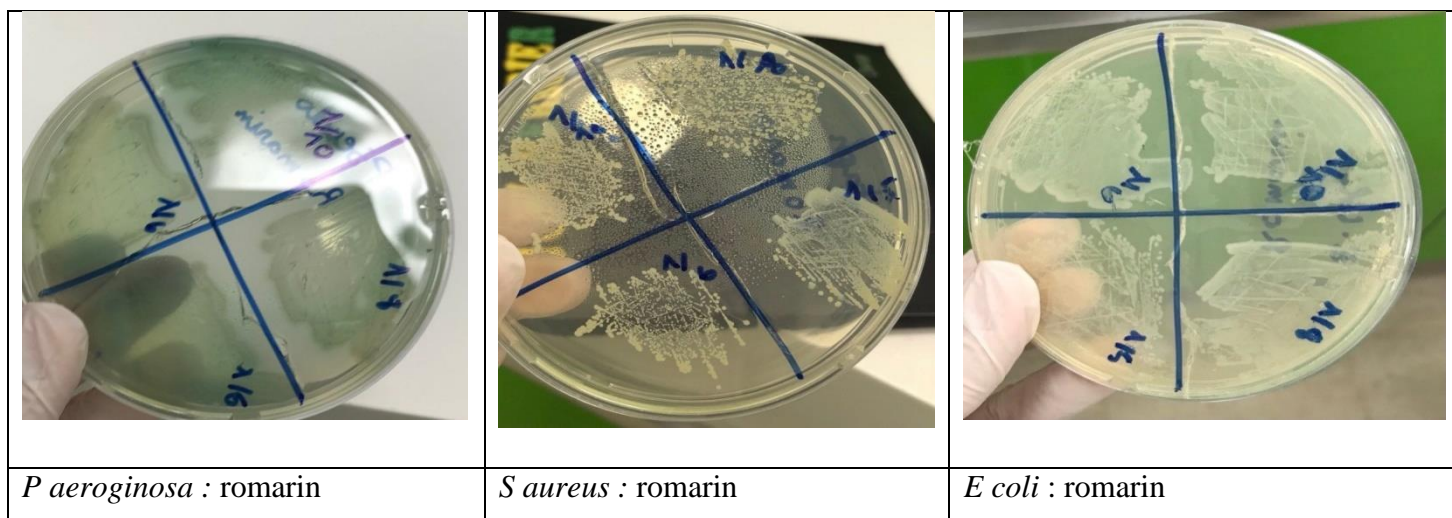


Figure 12: détermination De la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour l'huile de romarin

Tableau 18: : concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) d'huile de girofle

Huile de girofle	CMB (mg /ml)	CMI (mg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	315,6	126,24
<i>Escherichia coli</i>	126,24	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	126,24	/

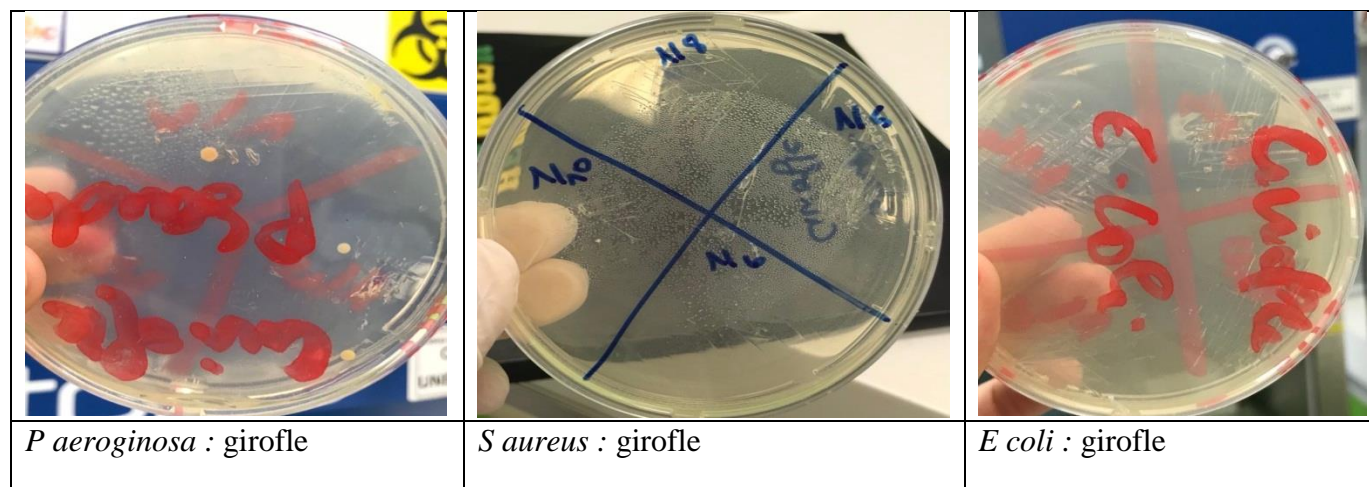


Figure 13: détermination De la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour l'huile de girofle

Tableau 19: concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) d'huile de lavande

Huile de lavande	CMB (mg /ml)	CMI (mg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	104,23
<i>Escherichia coli</i>	130,2875	104,23
<i>Staphylococcus aureus</i>	521,15	104,23

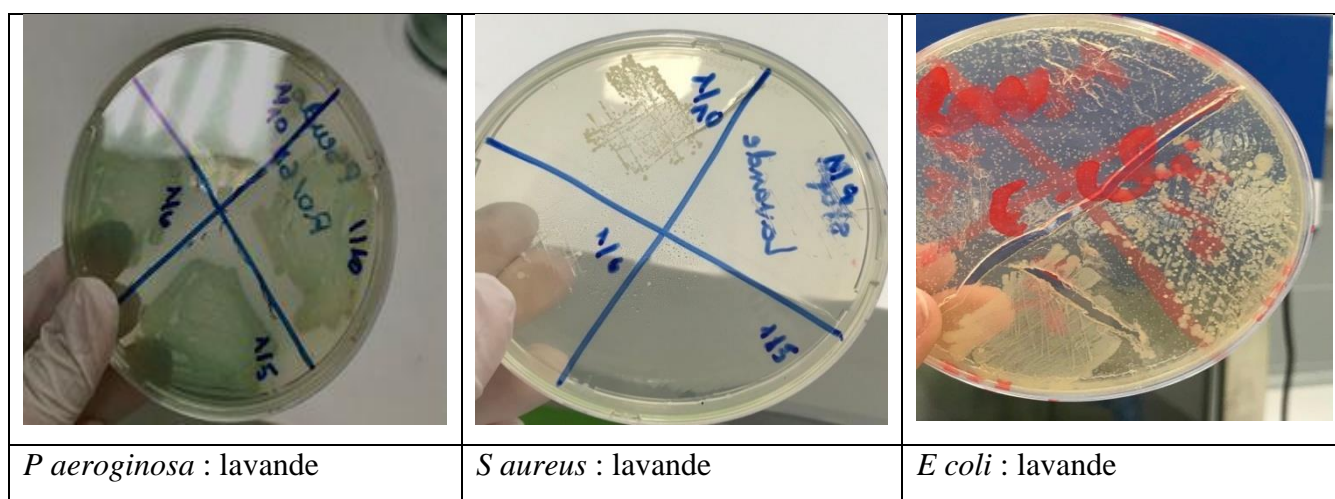


Figure 14: détermination De la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour l'huile de lavande

D'après les résultats montrés dans les tableaux, nous constatons que :

L'huile de romarin, inhibe les trois souches testées à partir d'une concentration minimale inhibitrice égale à 107,857 mg/ml, alors qu'elle devient bactéricide à partir d'une concentration égale de 269,642 mg/ml

L'huile de girofle, inhibe la souche de *Pseudomonas aeruginosa* à partir d'une concentration minimale inhibitrice de 126,24 mg/ml, alors que la concentration minimale bactéricide est égale à 315,6 mg/ml. Pour leur activité antibactérienne face au *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, on observe que la concentration minimale bactéricide est égale de 126,24 mg/ml. Il n'y a également pas de CMB pour ces deux souches.

L'huile de lavande, inhibe les trois souches à partir d'une concentration égale à 104,23 mg/ml, alors qu'il devient bactéricide face à l'*Escherichia coli* à partir d'une concentration égale à 130,2875 mg/ml.

Pour La souche *Staphylococcus aureus* la concentration minimale bactéricides a été observée à une concentration de 521,15 mg/ml.

Discussion générale

D'après ces résultats, on peut dire que les trois huiles essentielles ont une bonne activité antibactérienne contre les souches testées avec une différence dans l'efficacité.

Dans une étude faite par **Boukhatem (47)** sur l'activité antibactérienne des clous de girofle, le diamètre de la zone d'inhibition pour la souche *Escherichia coli* était 11 mm, et pour *Pseudomonas auroginosa* était 8 mm, le diamètre augmente avec l'augmentation de la concentration d'huile, Nous pouvons dire que c'est une faible activité antibactérienne Comparé à nos résultats (zone de 23,33 mm pour *Escherichia coli* et zone de 16,25 mm pour *Pseudomonas auroginosa*).

En revanche, dans l'étude faite par, **Haddouche et al (43)** sur l'activité antibactérienne des clous de girofle, le diamètre de la zone d'inhibition de *Staphylococcus aureus* était de 26mm, il est supérieur du diamètre qu'on a trouvé (24,5mm)

Dans une étude faite sur l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis*, le diamètre d'inhibition pour *S.aureus* (25923) était égale à 17,1 mm, et pour *E.coli* (sensible) 17,2 mm .(48). Dans notre étude on a marqué des zones d'inhibitions supérieure à 17 mm (23,5 mm pour *Staphylococcus aureus*, et 19,5 mm pour *Escherichia coli*). On peut dire qu'on a remarqué une très bonne activité antibactérienne pour notre huile de Romarin.

Les travaux sur l'activité antibactérienne (49) de *Lavandula angustifolia*, montre que le diamètre de la zone d'inhibition de *S.aureus* ATCC 25923 été égale à 9 mm, et pour *E.coli* ATCC 25922 été 12 mm et 8 mm de diamètre pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Par contre dans nos résultats les zones d'inhibition de *staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* été de 25 mm et 22 mm respectivement, et on a marqué aucune zone d'inhibition contre *Pseudomonas aeruginosa*. On peut dire que l'huile de lavande qu'on a utilisée dans ce travail été plus efficace contre les souches de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Résultats de l'activité synergique entre les HE

I-Test d'inhibition en milieu solide

I-1 Sensibilité aux huiles essentielles pure

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des trois plantes aromatiques a été évaluée sur trois souches bactériennes par la méthode des disques. Le DMSO (témoin négatif) est utilisé pour confirmer le non activité et sans effets sur la croissance des bactéries, le Ciprofloxacine est utilisé comme témoin positif. Les résultats des diamètres d'inhibition obtenue de l'huile pure varient de 16 ± 1 à $37,5 \pm 5,74$ mm, les résultats sont présentés dans les tableaux 20 et 21.

Tableau 20: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Romarin et Girofle) et entre (Lavande et Romarin) exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Zones d'inhibitions de la synergie entre le Romarin et Girofle					Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande et Romarin				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>P aeruginosa</i>	11	15	23	20	17,25±5,31	-	-	-	-	-
<i>S aureus</i>	17	-	15	16	16±1	20	25	15	22	20,5±4,2
<i>E coli</i>	15	16	16	20	16,75±2,21	20	22	15	17	18,5±3,1

Tableau 21: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Lavande et Girofle) et entre (Lavande ; Girofle et Romarin) exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande et Girofle					Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande, girofle et le romarin				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>P aeruginosa</i>	17	15	14	18	16±1,82	-	-	26	24	25±1,41
<i>S aureus</i>	29	21	22	24	24±3,559	36	42	30	42	37,5±5,74
<i>E coli</i>	28	26	16	17	21,75±6,13	20	20	20	23	20,75±1,5

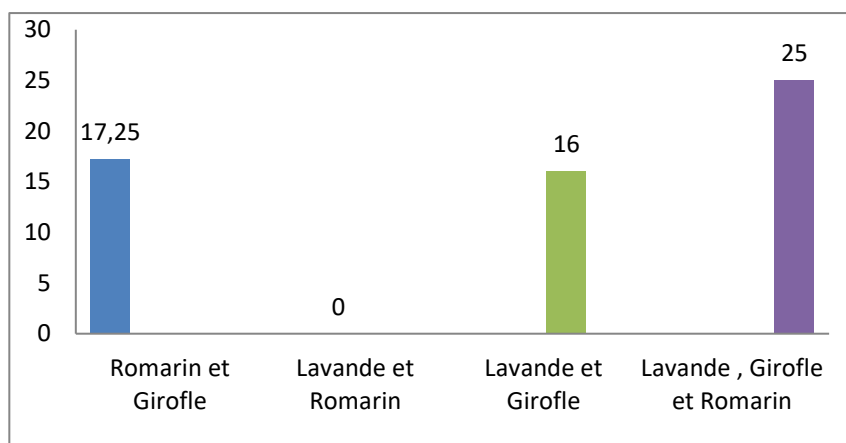


Figure 15: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de *P.aeruginosa*

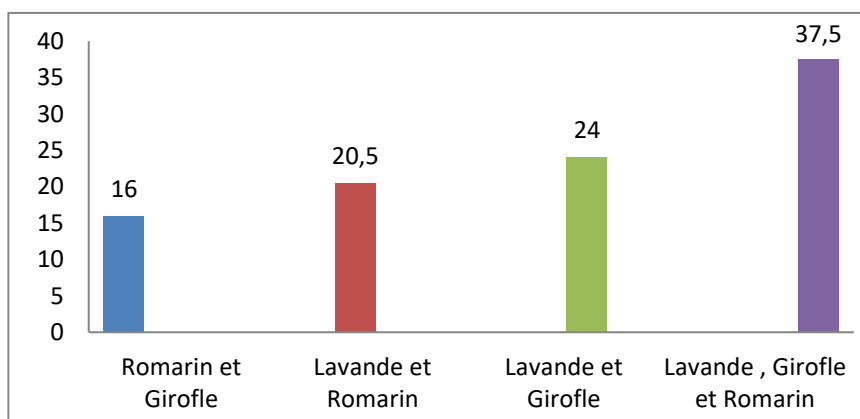


Figure 16: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de *S.aureus*

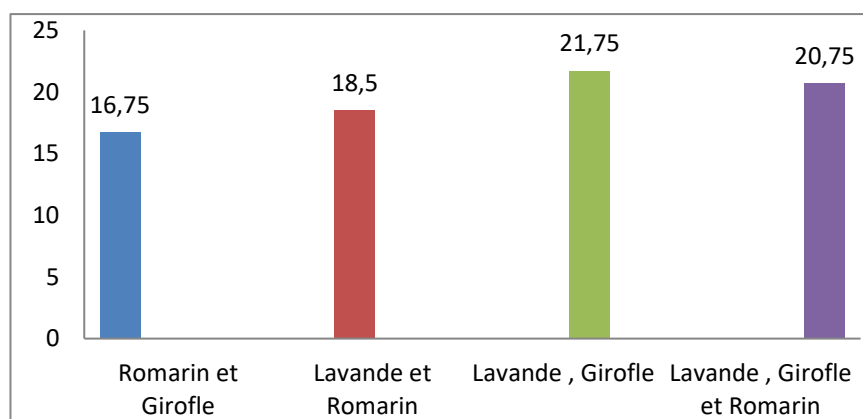


Figure 17: Histogrammes présentent une comparaison des zones d'inhibition des HE testées vis-à-vis de *E.coli*

Les tableaux 20 et 21 et les figures 15, 16 et 17 montrent les résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre les huiles essentielles. On remarque une sensibilité de *P.aeruginosa* avec la synergie entre romarin et girofle / lavande et girofle / lavande, girofle et romarin avec des diamètres qui varient de $16 \pm 1,82$ à $25 \pm 1,41$ mm. Par contre la synergie entre lavande et romarin n'a montré aucune activité sur la *P.aeruginosa*.

La souche *S aureus* a présenté une plus grande sensibilité avec un diamètre variant de 16 ± 1 à $37,5 \pm 5,74$ mm. La plus faible activité avec le romarin et girofle (16 ± 1 mm) suivi de lavande et romarin ($20,5 \pm 4,2$ mm) et / lavande et girofle ($24 \pm 3,55$ mm), on remarque une augmentation de la sensibilité avec la synergie entre les trois huiles ($37,5 \pm 5,74$ mm). *E coli* a une sensibilité de $16,75$ à $21,75$ mm, la plus grande avec lavande et girofle ($21,75 \pm 6,13$ mm) suivi par la synergie entre les trois huiles ($20,75 \pm 1,5$ mm), puis lavande et romarin ($18,5 \pm 3,1$ mm) et la plus faible avec le romarin et girofle ($16,75 \pm 2,21$ mm).

D'une manière générale, toutes les synergies des huiles testées exercent une bonne activité sur les trois bactéries (Gram positif et négatif) sauf la synergie entre lavande et romarin qui n'a marqué aucune activité sur *P aeruginosa*.

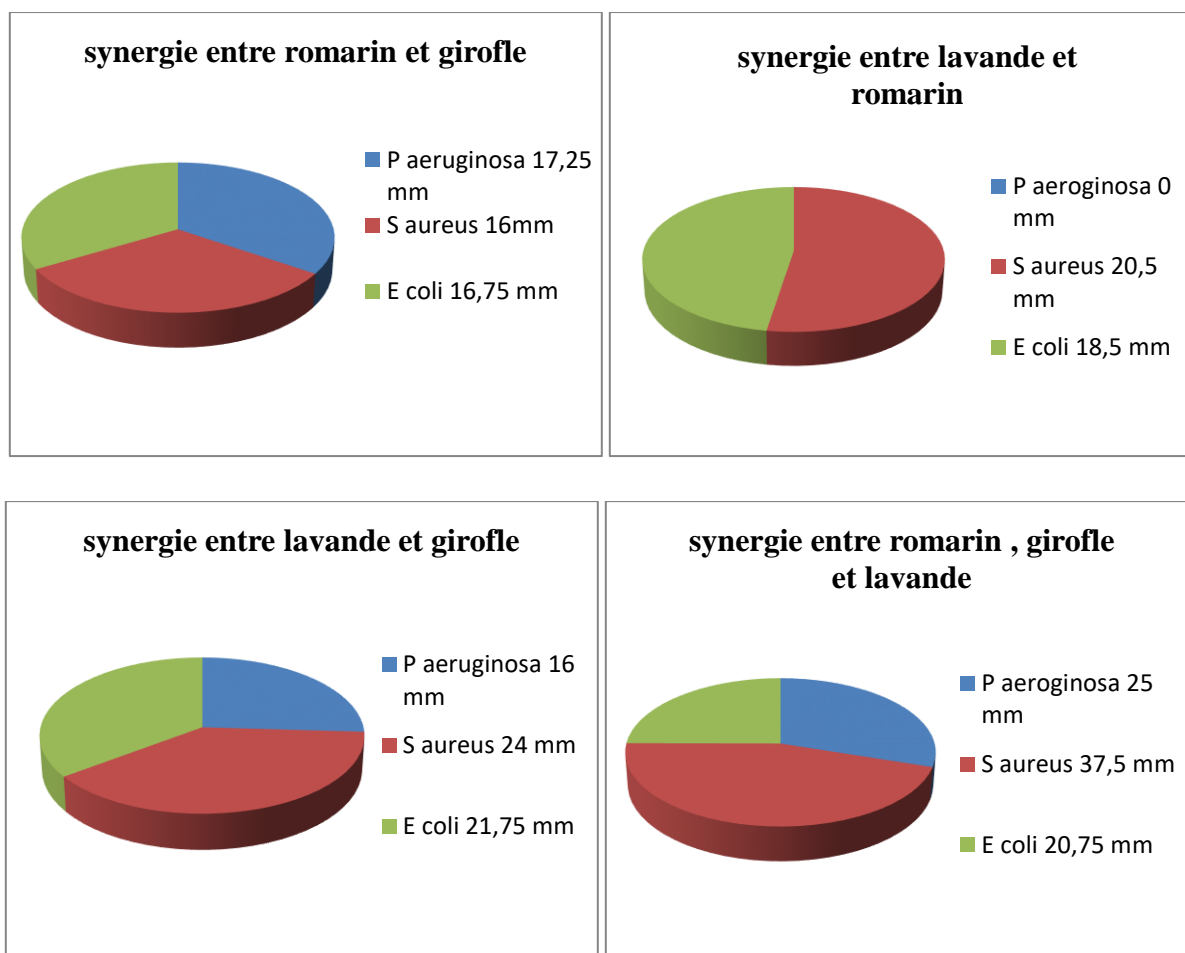


Figure 18: L'activité antibactérienne des huiles essentielles pures contre les trois souches : *P. aeruginosa*, *S.aureus* et *E.coli*

D'après nos résultats montrés dans la figure 18, on note que la synergie entre les trois huiles exerce la plus grande sensibilité avec *S aureus* par un diamètre $37,5 \pm 5,74$ mm et *P aeruginosa* ($25 \pm 1,41$ mm) mais pour *E coli* la plus grande sensibilité est avec la synergie entre lavande et girofle ($21,75 \pm 6,13$ mm)

La souche *S aureus* présente une extrême activité antibactérienne avec ces synergies par rapport à *P aeruginosa* et *E coli*

I-2 Sensibilité aux huiles essentielles diluées à 1/5

Les résultats des diamètres d'inhibition obtenue des huiles essentielles diluées à 1/5 varient de 2,75±5,5 à 12.75±2,62 mm, les résultats sont présentés dans les tableaux 22 et 23

Tableau 22: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Romarin et Girofle) et entre (Lavande et Romarin) diluée à 1/5 et exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Zones d'inhibitions de la synergie entre le Romarin et Girofle					Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande et Romarin				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>P aeruginosa</i>	-	-	12	10	5,5±6,4	-	-	-	-	-
<i>S aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E coli</i>	-	11	09	14	8,5±6,02	07	-	08	08	5,75±3,86

Tableau 23: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Lavande et Girofle) et entre (Lavande ; girofle et Romarin) diluée à 1/5 et exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande et Girofle					Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande, girofle et le romarin				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>P aeruginosa</i>	-	-	-	11	2,75±5,5	-	-	10	08	09±1,41
<i>S aureus</i>	10	08	08	-	6,5±4,43	20	-	-	-	05±10
<i>E coli</i>	15	14	10	12	12,75±2,62	-	12	13	12	09±6,05

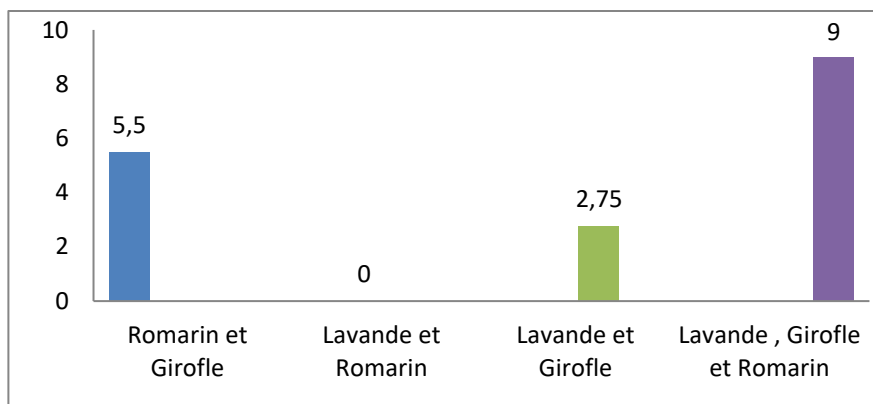


Figure 19 : Histogramme qui présente une comparaison des zones d’inhibition des HE testées diluées à 1/5 vis-à-vis de *P.aeruginosa*

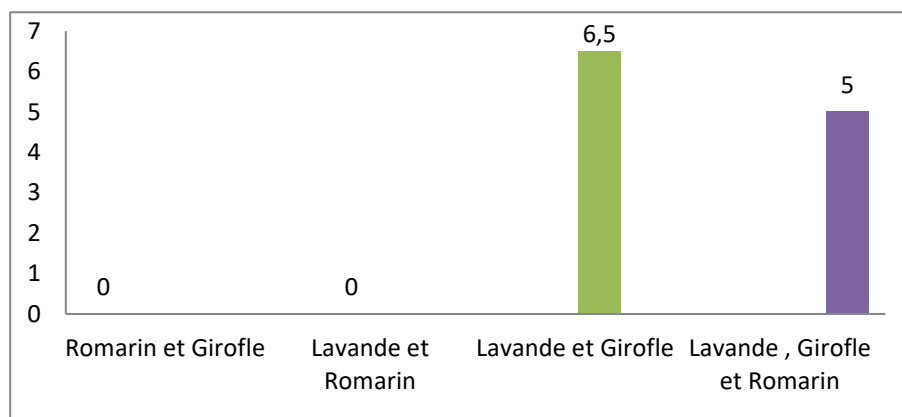


Figure 20: Histogramme qui présente une comparaison des zones d’inhibition des HE testées diluées à 1/5 vis-à-vis de *S.aureus*

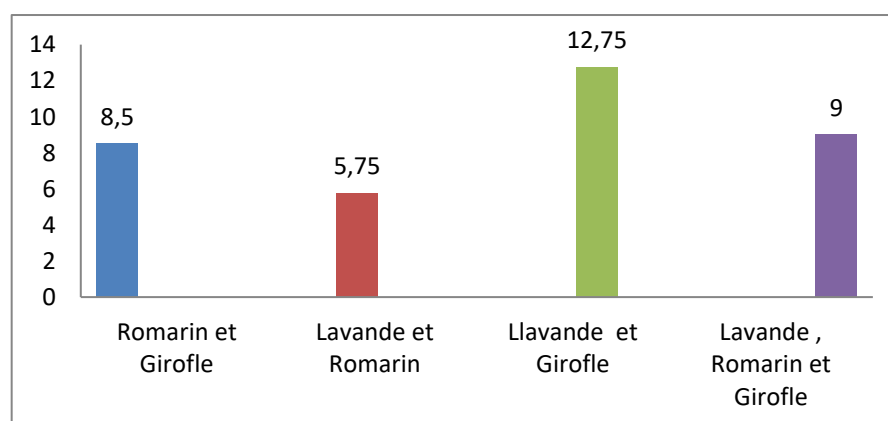


Figure 21: Histogramme qui présente une comparaison des zones d’inhibition des HE testées diluées à 1/5 vis-à-vis de *E.coli*

Les tableaux 22 et 23 montrent des diamètres des zones d'inhibition trop faible par rapport aux diamètres d'inhibitions généralement trouvés avec les synergies des huiles pures, on trouve que *P aeruginosa* a marqué une sensibilité avec la dilution de la synergie des trois huiles par un diamètre de $09\pm 1,41$ mm mais une résistance avec les autres synergies. D'autre part, la bactérie *S aureus* ne présente aucune activité. *E coli* a présenté une sensibilité de $12,75\pm 2,62$ mm de diamètre avec lavande et girofle suivi de $9\pm 6,05$ mm pour la synergie des trois huiles puis $8.5\pm 6,02$ mm pour romarin et girofle avec une résistance pour la synergie de lavande et romarin

Les diamètres d'inhibition montrent que le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles pures est inversement proportionnel aux dilutions, c'est à dire l'effet diminue avec l'augmentation de la dilution de l'huile essentielle.

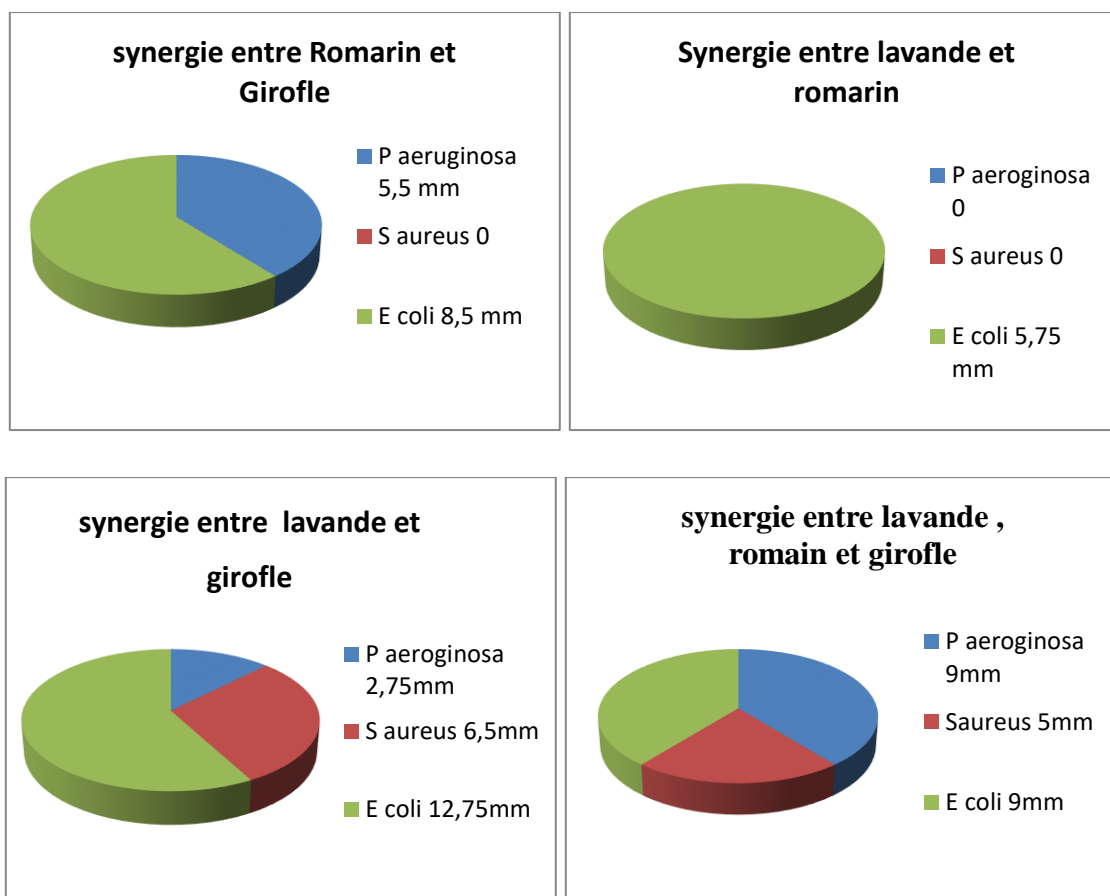


Figure 22: L'activité antibactérienne des dilutions 1/5 de la synergie des huiles essentielles contre les trois souches : *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E. coli*

En comparant les résultats des trois souches sur les dilutions de chaque synergie, on remarque que *P. aeruginosa* et *E. coli* présente une sensibilité avec la synergie entre les trois huiles par un diamètre de $09 \pm 1,41$ mm et entre lavande girofle par $12,75 \pm 2,62$ mm de diamètre respectivement. La *S. aureus* a marqué une résistance avec toutes les synergies

I-3 Sensibilité aux huiles essentielles diluées à 1/10

Les résultats des diamètres d'inhibition obtenue des huiles essentielles diluées à 1/10 varient de 2±4 à 9,5±2,08 mm et présenté dans les tableaux 24 et 25

Tableau 24: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Romarin et Girofle) et entre (Lavande et Romarin) diluée à 1/10 et exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Zones d'inhibitions de la synergie entre le Romarin et Girofle					Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande et Romarin				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>P aeruginosa</i>	-	-	08	-	2±4	-	-	-	-	-
<i>S aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E coli</i>	10	12	07	09	9,5±2,08	08	-	07	-	3,75±4,3

Tableau 25: résultats de l'activité antibactérienne de la synergie entre (Lavande et Girofle) et entre (Lavande ; girofle et Romarin) diluée à 1/10 et exprimé par un diamètre de la zone en mm

Les souches	Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande et Girofle					Zones d'inhibitions de la synergie entre lavande, girofle et le romarin				
	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>P aeruginosa</i>	-	-	-	10	2,5±5	-	-	10	08	09±1.41
<i>S aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E coli</i>	-	12	10	10	8±5,41	-	-	07	08	3,75±4,34

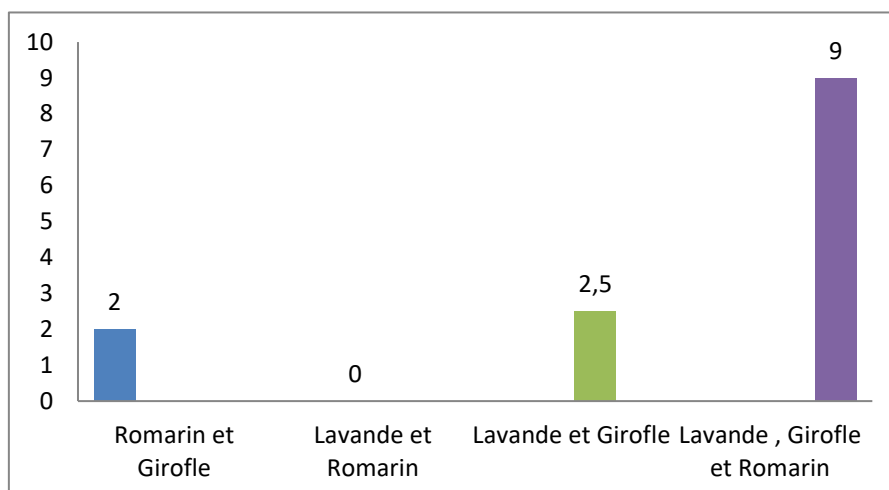


Figure 23: Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition des HE testées diluée à 1/10 vis-à-vis de *P.aeruginosa*

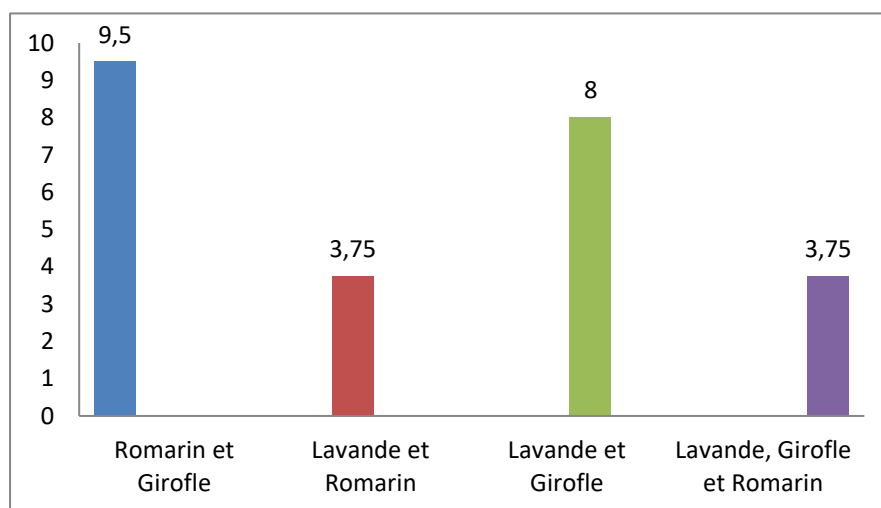


Figure 24: Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition des HE testées diluée à 1/10 testées vis-à-vis de *E.coli*

Le pouvoir antimicrobien vis-à-vis des différentes souches testées a marqué une diminution de la sensibilité avec ces dilutions. *P aeruginosa* ne présente aucune sensibilité sauf avec la dilution de la synergie entre les trois huiles par $09\pm 1,41$ mm de diamètre , avec une absence totale de le pouvoir antimicrobien de *S aureus*.

E coli exerce une sensibilité de $9,5\pm 2,08$ mm de diamètres avec le girofle et romarin suivi de $8\pm 5,41$ mm pour la lavande et girofle et une résistance pour la synergie des trois huiles et la synergie entre lavande et romarin

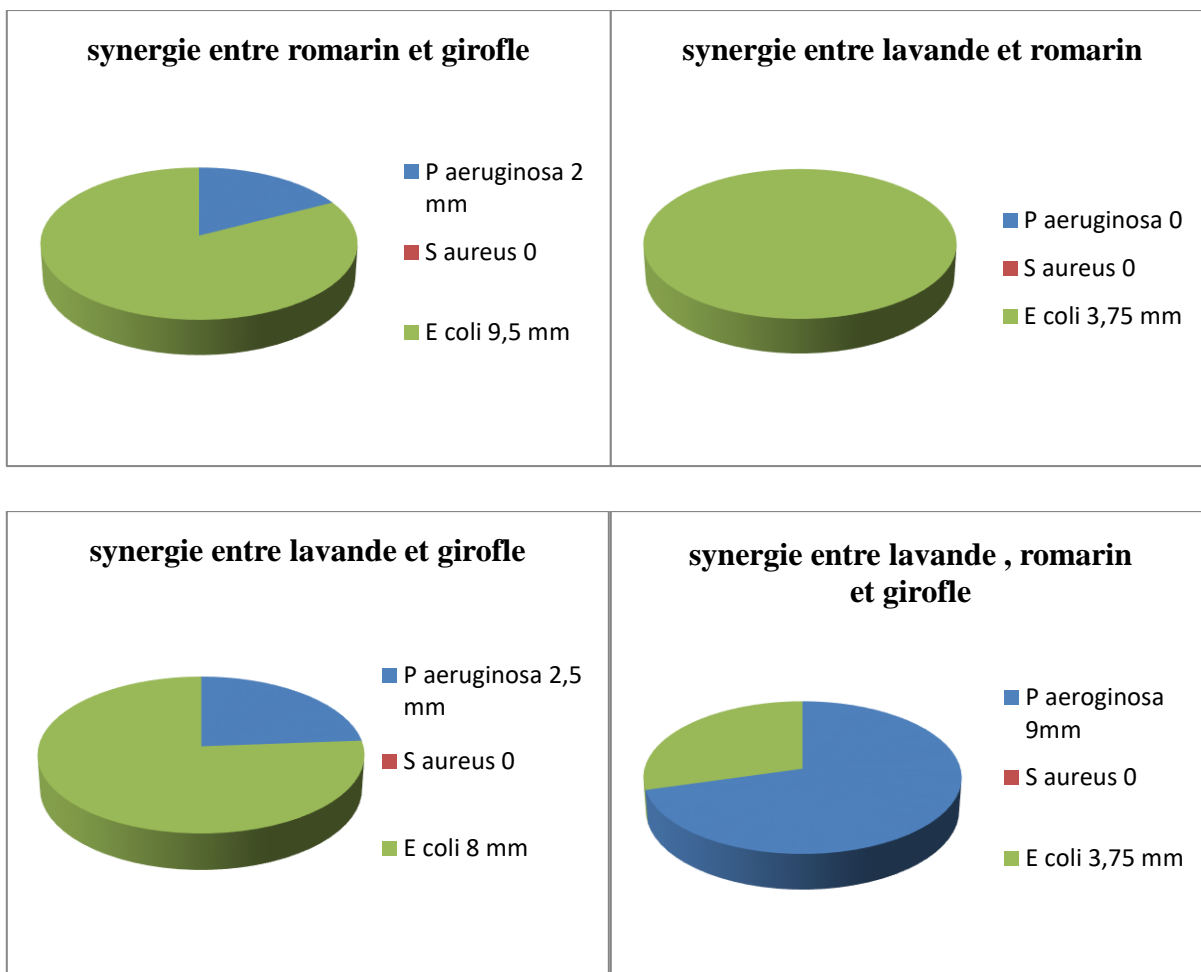


Figure 25: L'activité antibactérienne des dilutions 1/10 de la synergie des huiles essentielles contre les trois souches : *P.aeruginosa* , *S.aureus* et *E. coli*

D'après les résultats montrés dans la figure 25, il est clair que tous les germes représentent une résistance aux toutes les synergies sauf *P. aeruginosa* qui est sensible avec la synergie entre les trois huiles par un diamètre de $09 \pm 1,41$ mm et *E. coli* qui a marqué une sensibilité de $8 \pm 5,41$ mm avec la synergie entre lavande et girofle

I-4 Sensibilité à l'antibiotique « le ciprofloxacine »

Les résultats des diamètres d'inhibition obtenue de ciprofloxacine varient de 27 ± 0 à $36,5\pm 2,51$ mm les résultats sont présentés dans les tableaux 26 et 27

Tableau 26: résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique « ciprofloxacine » exprimé par un diamètre de zone en mm (1)

Les souches	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>P aeruginosa</i>	35	35	33	32	$33,75\pm 1,5$	39	37	37	33	$36,5\pm 2,51$
<i>S aureus</i>	31	-	27	28	$28,66\pm 2,08$	33	32	29	30	$31\pm 1,8$
<i>E coli</i>	33	35	35	34	$34,25\pm 0,95$	31	33	34	35	$33,25\pm 1,7$

Tableau 27: résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique « ciprofloxacine » exprimé par un diamètre de zone en mm (2)

Les souches	1	2	3	4	M	1	2	3	4	M
<i>P aeruginosa</i>	35	35	37	30	$34,25\pm 2,98$	-	-	27	27	27 ± 0
<i>S aureus</i>	30	31	30	30	$30,25\pm 0,5$	32	32	29	28	$30,25\pm 2,06$
<i>E coli</i>	36	35	32	36	$34,75\pm 1,89$	34	32	32	33	$32,75\pm 0,95$

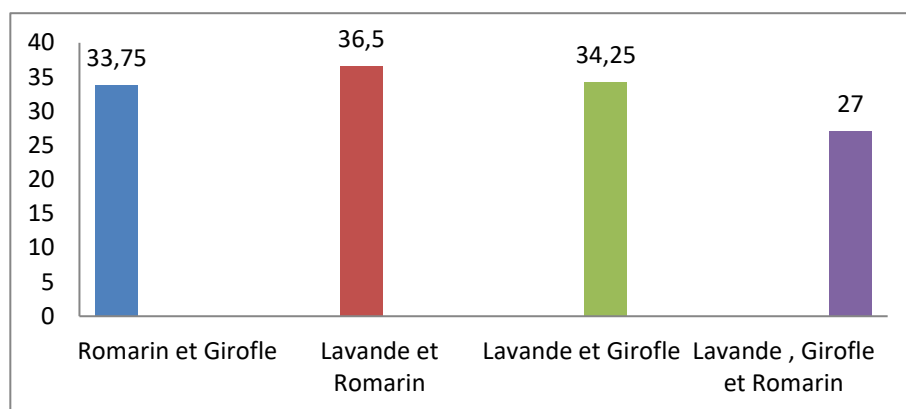


Figure 26: Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition de ciprofloxacine vis-à-vis de *P.aeruginosa*

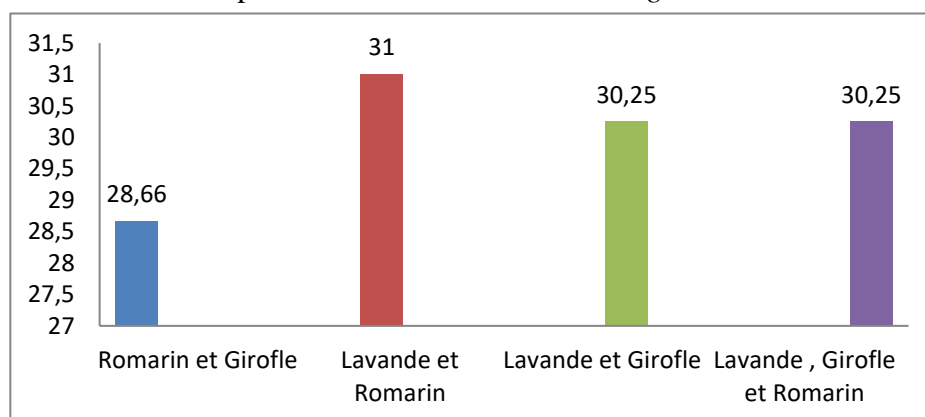


Figure 27 : Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition de ciprofloxacine vis-à-vis de *S.aureus*

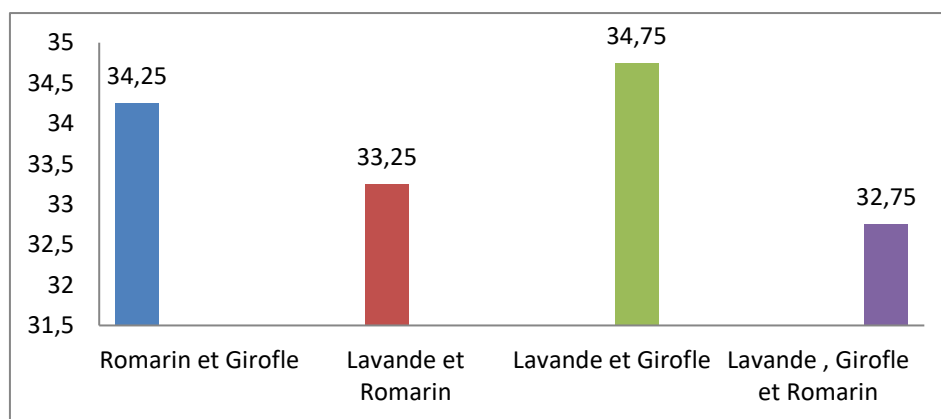


Figure 28 : Histogrammes présentant une comparaison des zones d'inhibition de ciprofloxacine vis-à-vis de *E.coli*

Les résultats de la sensibilité des germes avec le ciprofloxacine permis de constater qu'il est extrêmement sensible, les diamètres des zones d'inhibition sur *P aeruginosa* varient de 27 ± 0 mm à $36,5\pm 2,51$ mm, par ailleurs, les résultats de la sensibilité sur *S aureus* varient de $28,66\pm 2,08$ à $31\pm 1,8$ mm. Pour *E coli* les diamètres d'inhibition sont de $32,75\pm 0,95$ à $34,75\pm 1,89$ mm.

Les résultats montrent que le ciprofloxacine a exercé un très grand effet inhibiteur sur les trois souches microbiennes, ainsi que les zones d'inhibition enregistrées par la synergie entre les huiles sont inférieures de celles provoquées par l'antibiotique utilisé. Ces résultats sont nettement supérieurs de celui trouvé par EUCAST (50). La sensibilité d'*Escherichia coli* ATCC 25922 avec le ciprofloxacine est de diamètre entre 29 et 37 mm et sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 exprimé entre 25 et 33mm de diamètre

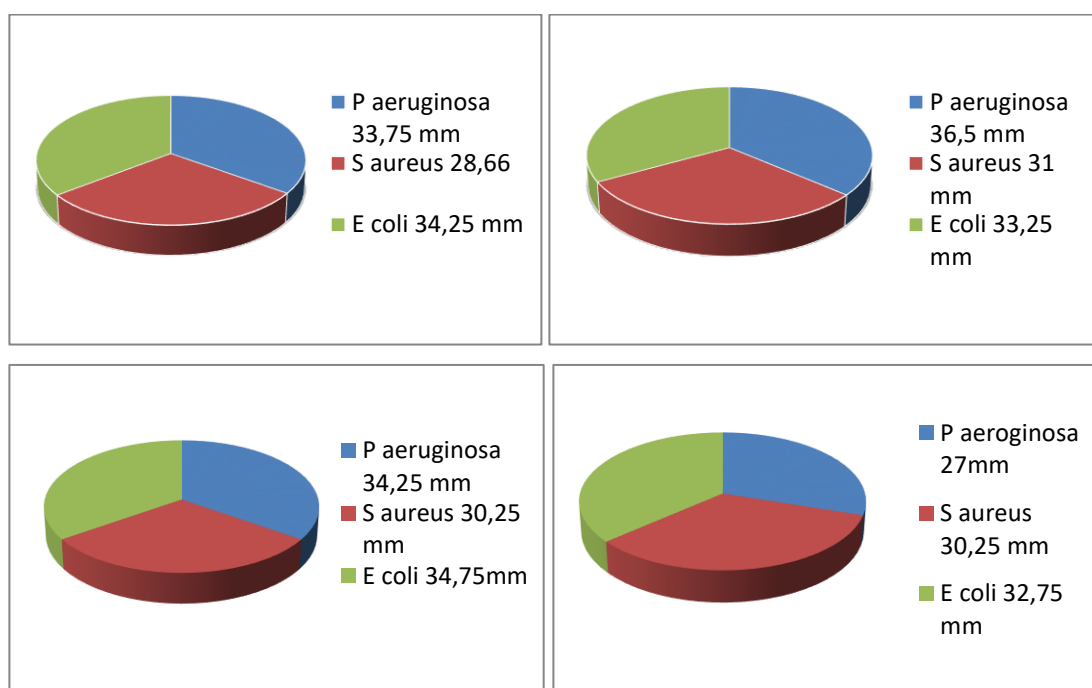


Figure 29: L'activité antibactérienne de l'antibiotique ciprofloxacine contre les trois souches : *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E. coli*

Le pouvoir antimicrobien de ciprofloxacine présenté par un très grand diamètre d'inhibition, le plus élevé est avec *P aeruginosa* qui est présenté par $36.5\pm 2,51$ mm de diamètre puis avec *E coli* par $34,75\pm 1,89$ mm et *S aureus* par $31\pm 1,8$ mm

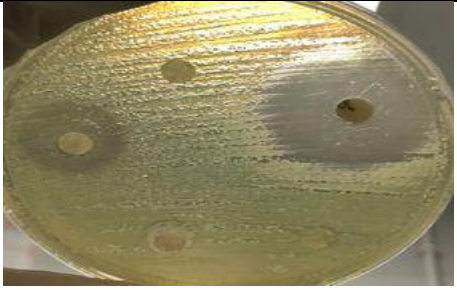
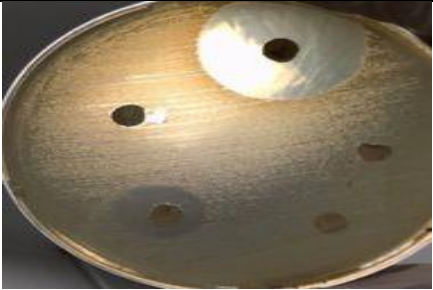
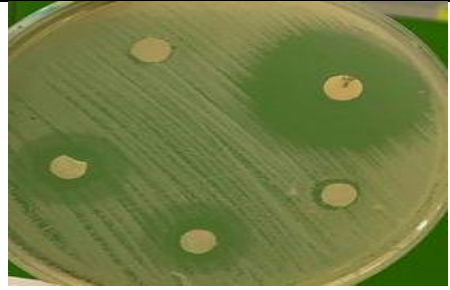


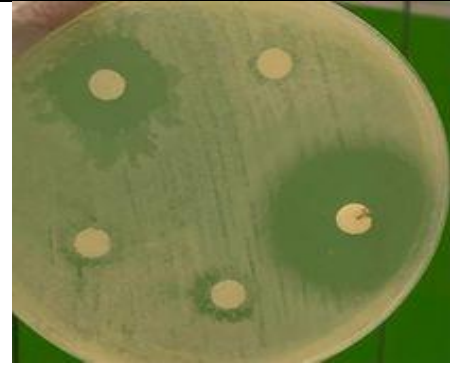

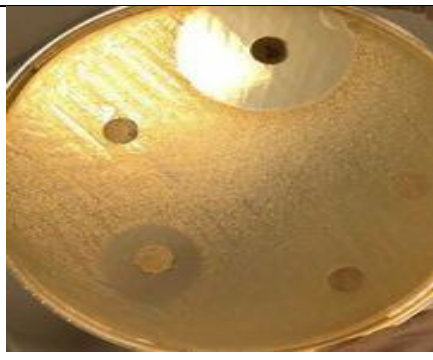

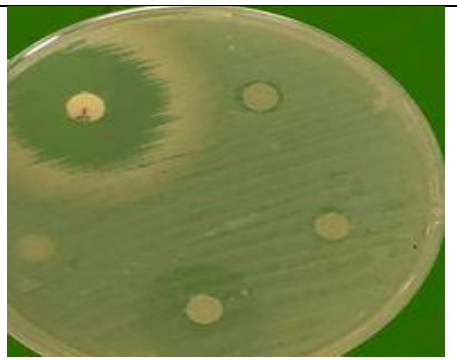
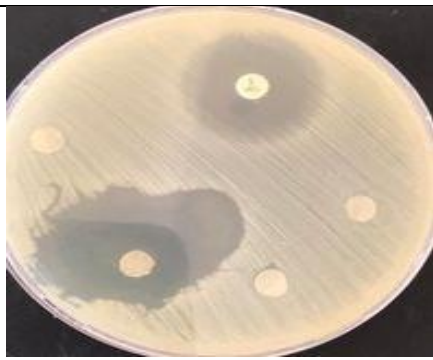
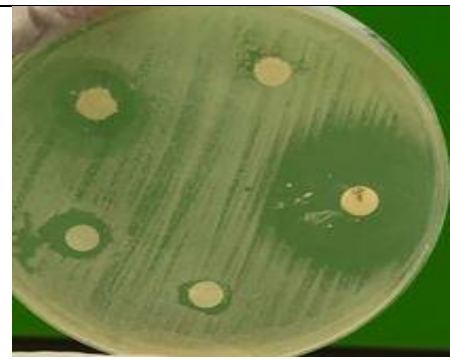
		
<i>P aeruginosa : romarin et girofle</i>	<i>S aureus : romarin et girofle</i>	<i>E coli: romarin et girofle</i>
		
<i>P aeruginosa : romarin et lavande</i>	<i>S aureus romarin et lavande</i>	<i>E coli : romarin et lavande</i>
		
<i>P aeruginosa : lavande et girofle</i>	<i>S aureus lavande et girofle</i>	<i>E coli: lavande et girofle</i>
		
<i>P aeruginosa : les trois huiles</i>	<i>S aureus : les trois huiles</i>	<i>E coli : les trois huiles</i>

Figure 30: la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis les huiles essentielles

II- Les résultats de l'activité synergique par la méthode de micro-dilution

II-1 Détermination de la CMI et CMB

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide, pour les souches qui ont présenté une importante sensibilité. La lecture se fait à l'œil nu (présence d'un trouble dans les puits), après on fait un repiquage dans des boîtes de pétri suivi d'une incubation dans l'étuve à température 37°C durant 18 à 24 heures. S'il y'a une croissance de la bactérie c'est-à-dire l'huile est inhibitrice, si non, donc c'est la CMB c'est à dire l'huile est bactéricide et capable de tuer toutes les bactéries. Les valeurs sont listées dans **les Tableaux (28-31)**. En présence de l'huile essentielle de « romarin et girofle » la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été inhibée à une concentration de 301,01 mg/ml, alors que la concentration minimale bactéricide s'avère plus élevée 602,04 mg/ml, bien que la plus faible concentration minimale bactéricide de 200,6 mg/ml a été observée pour la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une concentration minimale inhibitrice de 150,5 mg/ml. Pour *Escherichia coli* ATCC 25922, la concentration minimale bactéricide est de 120,4 mg/ml.

Pour l'huiles essentielles de « romarin et lavande », les valeurs de concentration minimale bactéricide et inhibitrice pour les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été observées à une concentration de 263,75 mg/ml et 211 mg/ml respectivement. Et pour *Escherichia coli* l'huile est bactéricide à une concentration 105.5 mg/ml

D'autre part, l'huiles essentielles « lavande et girofle » inhibe la souche *Pseudomonas aeruginosa* à une concentration 290,10 mg/ml alors que la concentration minimale bactéricide soit 580,21 mg/ml. Pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* la faible concentration minimale bactéricide est 116,04 mg/ml.

Quand on mélange les trois huiles « romarin, girofle et lavande » l'huile inhibe la *Pseudomonas aeruginosa* à une concentration de 572,03 mg/ml et devient bactéricide à 1144.07 mg/ml. La plus faible concentration minimale bactéricide de 228,8 mg/ml a été observées pour la souche *Staphylococcus aureus* et inhibé à une concentration 190.67 mg/ml ,

concernant l'activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, l'huile est inhibitrice à une concentration de 143 mg/ml alors qu'elle devient bactéricide à 190.67 mg/ml

Tableau 28: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de synergie entre romarin et girofle

	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	602,04	301,02	Synergie entre romarin et girofle
<i>Staphylococcus aureus</i>	200,68	150,5	
<i>Escherichia coli</i>	120,4	/	

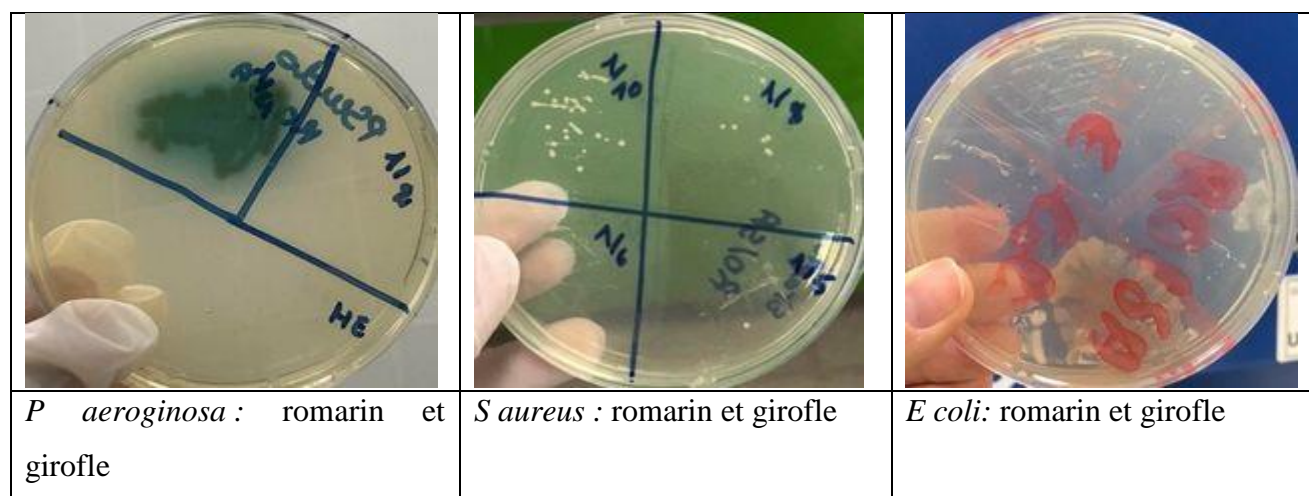


Figure 31: Détermination de la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour la synergie entre romarin et girofle

Tableau 29: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de synergie entre romarin et lavande

	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	263,75	211	Synergie entre lavande et romarin
<i>Staphylococcus aureus</i>	263,75	211	
<i>Escherichia coli</i>	105,5	/	

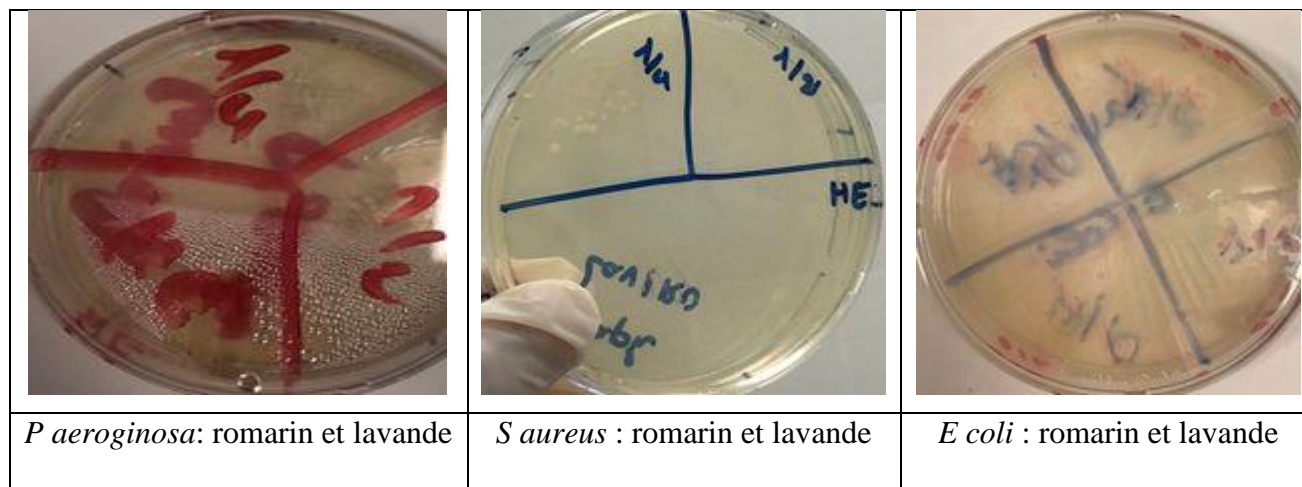


Figure 32 : Détermination de la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour la synergie entre lavande et romarin

Tableau 30: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de synergie entre lavande et girofle

	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	580,21	290,10	<i>Synergie entre lavande et girofle</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	116,04	/	
<i>Escherichia coli</i>	116,04	/	

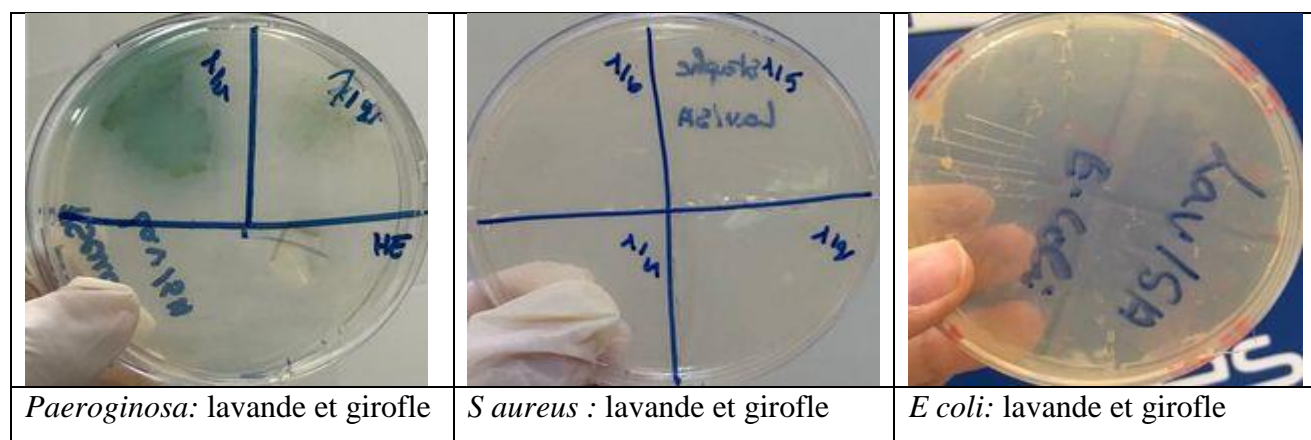


Figure 33: Détermination de la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour la synergie entre lavande et girofle

Tableau 31: Concentration minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de synergie entre lavande, romarin et girofle

	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	<i>Synergie entre romarin, lavande et girofle</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1144.07	572.03	
<i>Staphylococcus aureus</i>	228.814	190.67	
<i>Escherichia coli</i>	190.67	143	

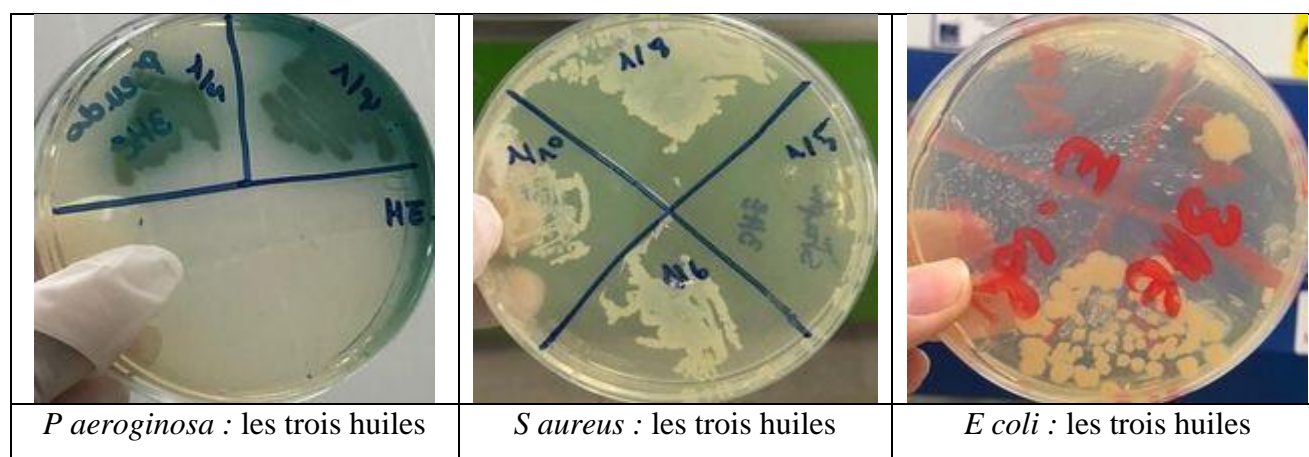


Figure 34: Détermination de la CMI et CMB par la méthode de repiquage pour la synergie entre les trois huiles

Discussion générale

D'une manière générale, les huiles essentielles obtenues ont un pouvoir antimicrobien intéressant sur les germes étudiés, la *Staphylococcus aureus* ATCC est extrêmement sensible par rapport à *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Ce qui confirme que l'effet antimicrobien de la synergie des huiles essentielles contre les souches de à Gram positives est plus prononcé que contre les souches Gram négatives

La sensibilité de *S aureus* augmente avec la synergie des trois huiles. Ainsi *P aeruginosa* a une sensibilité intéressante avec la synergie entre romarin et girofle et entre les trois huiles. D'autre part, *E coli* est plus sensible avec la synergie entre les trois huiles et entre (lavande et girofle)

Le germe *S aureus* représente toujours une résistance aux dilutions 1/5 et 1/10, par contre les souches *P aeruginosa* et *E coli* représente une sensibilité dans la dilution 1/5 que la dilution 1/10, ce qui signifie que l'efficacité de l'huile diminue avec l'augmentation de la dilution

Le pouvoir antimicrobien de la synergie entre les huiles essentielles est inférieur à celui de l'antibiotique utilisé. Ces résultats permettent de prédire que la synergie entre ces huiles pourrait servir comme base de lutte biologique contre les germes responsables des maladies infectieuses et pourrait être de ce fait, une alternative aux antibiotiques qui cherche des substances naturelles biologiquement actives

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés médicamenteuses, alimentaires ou condimentaires.

L'objectif de notre travail consistait à étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Romarin (*Rosmarinus officinalis*), de Girofle (*Syzygium aromaticum*) et de Lavande (*Lavandula angustifolia*).

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'extraction des huiles essentielles, et on a déterminé le rendement des trois plantes.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'activité antibactérienne des huiles essentielles et leurs synergies par la méthode d'aromatogramme.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'activité antibactérienne des huiles essentielles et leurs synergies par la méthode de micro-dilution en milieu liquide.

D'après nos résultats, on déduit que les trois huiles essentielles peuvent servir comme base de lutte biologique, car on a marqué un pouvoir antibactérien très important. En perspective, il serait fort intéressant de compléter cette étude, et de vérifier les propriétés biologiques de ces huiles essentielles, et leurs compositions chimiques complexes, et même étudier leur toxicité. Il veut mieux aussi de confirmer l'activité antibactérienne de nos huiles essentielles par des études *in vivo*.

Références

Références

- (1) Organization mondiale de la santé. who.int.[En ligne] Genève.[citation : 25 mars 2022.] who.int/fr/news/item/25-03-2022-who-establishes-the-global-centre-for-traditional-medicine-in-india.
- (2) Harborne J.B., 1998. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis .Third edition .ISBN: 0-412-57260-5(HB) and 0-412-57270-2(PB)
- (3) Vanden Berghe D.A. & Vlietinck, A.J., 1991- Screening for antibacterial and antiviral agents. In: Hostettmann, K. (Ed.), Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6, Assays for Bioactivity. London, Academic Press, 47-59.
- (4) Couic-Marinié F et Lobstein A. (2013 a). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques. N° 525. 3 p.
- (5) Lardry JM et Haberkorn V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither Rev; volume. 61, 14-7.
- (6) Valnet J., 2005. L'aromathérapie .Ed Maloine S.A ISBN : 2-253-03564-5
- (7) marqueverte. [En ligne] <http://www.marqueverte.com>.
- (8) futura santé. futura sciences. [En ligne] définition-plante-médicinale. <http://www.futura-sciences.com>.
- (9) ANSM. 2012.
- (10) pharmacopée française. 2000.
- (11) creapharma.ch. [En ligne] 15 03 2022. définition de la phytothérapie. <https://www.creapharma.ch/phytotherapie.htm>.
- (12) m.insphy. [En ligne] définition de l'aromathérapie. <http://m.insphy.com>.
- (13) quelleestcetteplante.fr. [En ligne] 26 02 2022. rosmarinus officinalis. <http://www.quelleestcetteplante.fr>.
- (14) futura-sciences. [En ligne] le girofle. <http://www.futura-sciences.com>.
- (15) (L.) Merr. & L.M.Perry, 1939 IPNI. International Plant Names Index. Published on the Internet <http://www.ipni.org>, The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens., consulté le 17 février 20.
- (16) quelleestcetteplante.fr. [En ligne] [Citation : 24 04 2020.] lavandula angustifolia. <http://www.quelleestcetteplante.fr.com>.

- (17) Red horticulture. [En ligne] [Citation : 17 02 2020.] les métabolites secondaires. <http://www.redhorticulture.com>.
- (18) aquaportail. [En ligne] [Citation : 04 09 2007.] définition d'alcaloïde. <http://www.aquaportail.com>.
- (19) pr.Labbani. fac.umc.edu.dz. [En ligne] les composés phénolique. <http://www.fac.umc.edu.dz.com>.
- (20) afnor. 1989.
- (21) la pharmacopée européenne. 6 ème édition. 2011.
- (22) Aromathérapie scientifique : préconisations pour la pratique Clinique, l'enseignement et la recherche. Juin 2018.
- (23) Georges Sens-Olive, « Les huiles essentielles –généralités et définitions », dans Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, éd. Maloine, 1979, p.141-142
- (24) Benarous k., (2018). Huiles essentielles, alcaloïdes et composés phénoliques. Editions universitaires europeennes.
- (25) ŠARKINAS, Antanas, MIEŽELIENĖ, Aldona, ALENČIKIENĖ, Gitana, et al. Kalendros, kmynų ir kitų augalų ekstraktų antimikrobinės savybės. Maisto chemija ir technologija, 2006, vol. 40, no 1, p. 104-112.
- (26) BESSAH, R. et BENYOUSSEF, El-Hadi. La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. Journal of Renewable Energies, 2015, vol. 18, no 3, p. 513–528-513–528.
- (27) TOHIDPOUR, Abolghasem, SATTARI, Morteza, OMIDBAIGI, Reza, et al. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Phytomedicine, 2010, vol. 17, no 2, p. 142-145.
- (28) Pharmacopée Européenne. (2010). 7e édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe
- (29) Huiles Essentielle et Aromathérapie. Au bonheur d'essence .[En ligne]29 aout 2021. <https://www.au-bonheur-dessences.com/huiles-essentielles/composition-chimique-des-huiles-essentielles/>.
- (30) Les huiles essentielles à l'officine Laurent Duval .[Enligne] 2012://[dumas.ccsd.cnrs.fr/ dumas-00713158/document](http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00713158/document).
- (31) Clevenger J., J. Am. Pharm. Assoc. 17 (1928) 345.
- (32) M.A. Randhawa and M.S. Alghamdi, 'Anticancer Activity of Nigella Sativa (Black Seed) - A Review', The American Journal of Chinese Medicine, Vol. 39, N°6, pp. 1075 – 1091, 2011.

- (33) A. Le Hir, J.C. Chaumeil and D. Brossard, 'Pharmacie Galénique: Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments', Elsevier Masson, 2009.
- (34) A.C. Sousa, C.R. Gattass, D.S. Alviano, C.S. Alviano, A.F. Blank, and P.B. Alves, 'Melissa officinalis L. Essential Oil: Antitumoral and antioxidant Activities', Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 56, N°5, pp. 677 – 681, 2004.
- (35) Wilkinson J.M., 2006- Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII.pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405 p
- (36) Chao S.C., Young D.G. & Oberg G.J., 2000- Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. J. Essent. Oil Res., 12: 639-649.
- (37) Andrews J.M., 2001-The Development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing. J. Antimicrob. Chemother., 48 (1): 29-42.
- (38) Moroh J, Bahi C,Dje K, Loukou Y, Gued-Guina F, 2008. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétique de morinda morindoides sur la croissance in vitro des souches d'Escherichia coli. Bulletin de la société royale des sciences de liège : pp44-66
- (39) Himed L., Merniz S., Bnbraham M. (2014). Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de Citrus limon (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation. Algerian Journal of Natural Products. Algeria.
- (40) chouitah , ourida. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de Glycyrrhiza glabra .thèse biochimie. Oran : université d'oran, 2011-2012,143 p.
- (41) FAUCHÈRE, Jean-Louis et AVRIL, Jean-Loup. Bactériologie générale et médicale. Ellipses, 2002.
- (42) . Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires Stéphane Fontanay, Marie-Eugénie Mougenot, Raphaël E. Duval Dans Hegel 2015/2 (N° 2), pages 109 à 118
- (43) Haddouch N. Dernani H. Etude de l'activité antibactérienne et hémolytique de l'huile. [En ligne]19 09 2018
- (44) Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de Lavandula officinalis cultivées dans la région de Skikda – Algérie .hicham : boughendjioua.2017 ; Vol.86.
- (45) Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L.de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). Boutaboia L ; Telailia S ;Boughetof I ; Guenadil F ; Chefrou A .2016.
- (46) Descamps-Marie, C. (2008). visa pour le PCEM1:biologie. Paris: Dunod

(47) fadila, boukhatem. activité antibactérienne de l'huile essentielle de deux épices:syzygium aromaticum et illicium verum. mostaganem : s.n., 2017. p. 43.

(48) Lamia BOUTABIA*1, 2, Salah TELAILIA1,2, Ismail BOUGUETOF1. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de rosmarinus officinalis l . de la région de hammamet (tébessa-algérie). el teref : s.n., 2016. p. 181.

(49) . aimen ryma, belli hayat. Etude de l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles de lavandula angustifolia mill et pinus sylvestris l et leur potentiel synergique vis à vis des souches pathogènes. tizi ouzou : s.n., 2018/2019. p. 31.

(50) Comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie .org.[En ligne] Avril 2020.https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04CASFM2020_V1.1.pdf.

(51) Gélose Mueller-Hinton.Microbiologicalmedicale.fr.[Enligne] [https:// microbiologie medicale.fr/gelose-mueller-hinton/](https://microbiologie.medicale.fr/gelose-mueller-hinton/).

Annex

Annexe**La composition chimique du Mueller-Hinton**

La composition chimique du milieu MH (pour 1L du milieu) est montré dans le tableau ci-dessous

Tableau 31 : la composition chimique du milieu Mueller- Hinton (51)

	Hydrolysate acide de caséine (peptone) 17.5 g
	Extrait de viande 2.0g
La composition chimique du milieu Mueller-	Amidon 1.5 g
Hinton	Calcium 20 à 25mg
	Magnésium 10à 12.5 mg
	Agar 15.0 g
	PH=7.4±0.2
	Eau distillée 1L

Préparation du milieu de culture Mueller Hinton pour la méthode d'aromatogramme :

La gélose Mueller-Hinton est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux bactéries.

Préparation :

- 1- Mettre dans une Erlenmeyer 38 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée
- 2- Agiter et chauffer jusqu'à la dissolution complète (jusqu'à l'ébullition)
- 3- Répartir dans des flacons
- 4- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 2h
- 5- Laisser refroidir le milieu 5 à 10min
- 6- Couler en boîtes de pétri stériles (l'épaisseur de la gélose doit être impérativement de 4 mm), et laisser solidifier sur une surface froide (au max 15min)

7-Faire sécher les boites dans le réfrigérateur pour éviter la formation de gouttelettes d'eau à la surface de la gélose

Préparation des dilutions pour la méthode d'aromatogramme :

Prenez une quantité d'huile essentielle pure diluée par le DMSO (qui est inerte sur l'activité bactérienne). Ce dernier est dilué par l'eau physiologique (1ml DMSO +9ml eau physiologique) pour éviter de geler les huiles essentielles.

Tableau 32 : Dilution du romarin

Tube	Dilution 1/5	Dilution 1/10
HE (ul)	80	80
DMSO (ul)	360	720

Remarque : prenez la même quantité pour le Girofle et Lavande

Les dilutions pour l'activité synergique

Romarin+ Girofle : dans un tube mélanger (180ul Romarin +180ul Girofle)

Prenez 80 ul du mélange dans chaque tube et ajouter une quantité du DMSO dilué

Tube	Dilution 1/5	Dilution 1/10
HE (ul)	80	80
DMSO (ul)	360	720

Romarin+ Lavande : dans un tube mélanger (180ul Romarin +180ul Lavande)

Prenez 80 ul du mélange dans chaque tube et ajouter une quantité du DMSO dilué

Tube	Dilution 1/5	Dilution 1/10
HE (ul)	80	80
DMSO (ul)	360	720

Lavande+ Girofle : dans un tube mélanger (180ul lavande+ 180ul Girofle)

Prenez 80 ul du mélange dans chaque tube et ajouter une quantité du DMSO dilué

Tube	Dilution 1/5	Dilution 1/10
HE (ul)	80	80
DMSO (ul)	360	720

Girofle +Lavande +Romarin : dans un tube mélanger (120ul Girofle +120ul Lavande+ 120ul Romarin)

Prenez 80 ul du mélange dans chaque tube et ajouter une quantité du DMSO dilué

	Dilution 1/5	Dilution 1/10
HE (ul)	80	80
DMSO (ul)	360	720

Préparation de la suspension bactérienne (méthode d'aromatogramme)

Devant le bec, prenez 1ml d'eau physiologique et le mettre dans un écouvillon stérile

Ouvrer la boîte de culture microbienne

A l'aide d'un écouvillon prélever une colonie, puis refermer la boîte de pétri

Déposer la colonie dans l'écouvillon qui contient de l'eau physiologique et agiter à l'aide d'un vortex, laisser 3min puis commencer l'ensemencement

Technique d'ensemencement en milieu solide

L'ensemencement consiste à déposer une suspension bactérienne dans un milieu de culture qui permet aux microorganismes de se multiplier rapidement

Devant le bac, prenez la boîte de pétri couler par le milieu de culture MH refroidis

Plonger un écouvillon dans la suspension et éliminer l'excès de liquide en tournant et pressant l'écouvillon contre la partie haute de la paroi du tube (la pression exercée est plus forte sur la partie haute sinon la tige de l'écouvillon se plie), et déposer une goutte de la

suspension à la surface du milieu de culture solide (tracer une ligne verticale au milieu de la boîte)

Ensemencer en stries serrées avec l'écouvillon, la totalité de la surface du milieu

Répéter l'opération 3 fois (faire tourner la boîte de pétri environ 60° à chaque fois)

Après finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose 2 à 3 fois puis fermer la boîte

Préparation du milieu de culture MHB :

1-Mettre dans une Erlenmeyer 21 g de milieu Mueller-Hinton Broth déshydraté dans 1 litre d'eau distillée

2-Agiter et chauffer jusqu'à la dissolution complète (jusqu'à l'ébullition)

3-Répartir dans des flacons

4-Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 2h

Préparation des dilutions (méthode de la microdilution)

-Dilutions de romarin, girofle et lavande

Les 3 huiles sont diluées par le DMSO. Ce dernier est dilué par l'eau distillé (1ml DMSO +9ml eau distillé) pour éviter de geler les huiles essentielles.

Tableau 33 : dilution de chaque huile essentielle seul dans le milieu liquide

<i>Tube</i>	<i>1/2</i>	<i>1/4</i>	<i>1/5</i>	<i>1/6</i>	<i>1/8</i>	<i>1/10</i>
<i>HE</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>
<i>DMSO</i>	<i>40</i>	<i>120</i>	<i>160</i>	<i>200</i>	<i>280</i>	<i>360</i>

Les dilutions pour l'activité synergique

Romarin+ Girofle : dans un tube mélanger (165ul Romarin +165ul Girofle)

Prenez 40 ul du mélange dans chaque tube et ajouter une quantité du DMSO dilué

Romarin+ Lavande : dans un tube mélanger (165ul Romarin +165ul Lavande)

Prenez 40 ul du mélange dans chaque tube et ajouter une quantité du DMSO dilué

Lavande+ Girofle : dans un tube mélanger (165ul lavande+ 165ul Girofle)

Prenez 40 ul du mélange dans chaque tube et ajouter une quantité du DMSO dilué

Girofle +Lavande +Romarin : dans un tube mélanger (110ul Girofle +110ul Lavande+ 110ul Romarin)

Prenez 40 ul du mélange dans chaque tube et ajouter une quantité du DMSO dilué

Tableau 34 : dilution de l'activité synergique en milieu liquide

<i>Tube</i>	<i>1/2</i>	<i>1/4</i>	<i>1/5</i>	<i>1/6</i>	<i>1/8</i>	<i>1/10</i>
<i>HE</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>40</i>
<i>DMSO</i>	<i>40</i>	<i>120</i>	<i>160</i>	<i>200</i>	<i>280</i>	<i>360</i>

Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum) pour la méthode de la microdilution :

Devant le bec, prenez 9ml de milieu Mueller-Hinton Broth liquide et le mettre dans un écouvillon stérile

Ouvrer la boîte de culture microbienne

A l'aide d'un écouvillon prélever deux colonies, puis refermer la boîte de pétri

Déposer la colonie dans l'écouvillon qui contient le milieu Mueller-Hinton Broth liquide et agiter à l'aide d'un vortex,

Incuber le milieu qui contient de la souche dans l'étuve à 37°C pour la croissance des microorganismes

Après 24 heures, on fait sortir les écouvillons de l'étuve, et on peut voir la troublesse du milieu Mueller-Hinton Broth liquide.

Devant le bec, et à l'aide d'une seringue on va prendre une quantité de l'inoculum (environ 1 ml) et on le met dans un écouvillon stérile, et on ajoute une quantité (environ 8 ml) de l'eau physiologique et on agite à l'aide d'un vortex. Puis on mit une quantité de l'inoculum dans la cuve

Dans un spectrophotomètre on mesure l'absorbance de notre suspension bactérienne, à longueur d'onde DO = 620 nm, elle doit être entre (0.08-0.1).

Calcul de CMI et CMB pour l'activité synergie

$$C \text{ (huile pure)} = \frac{\text{masse initial de l'huile pure 1 (mg)} + \text{masse initial de l'huile pure 2 (mg)}}{\text{voluml de l'huile pure 1 (ml)} + \text{volume de l'huile pure 2 (ml)}}$$

$$\text{Concentration (huile pure)} = \dots \text{ mg/ml}$$

$$C \text{ (mg/ml)} = \text{concentration de l'huile pure / le nombre de la dilution}$$

Calcul de CMI et CMB pour les huiles pures

$$C \text{ (huile pure)} = \frac{\text{masse initial de l'huile pure (mg)}}{\text{voluml de l'huile pure (ml)}}$$