

Introduction

L'évolution rapide des bactéries pathogènes vers la multirésistance aux antibiotiques est une des motivations essentielles à la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes. De nombreux travaux antérieurs étaient focalisés sur la mise en évidence de pouvoir anti – microbien de plantes médicinales. Ceux dont l'efficacité contre les micro-organismes pathogènes ont été prouvés, trouvent des applications pratiques dans divers domaines. Les HE constituent les extraits les plus largement exploités.

L'Algérie de part sa situation géographique et son climat exceptionnel, abrite un grand nombre de plantes médicinales et aromatiques dont la plupart est exploité dans des conditions artisanales et marginales par rapport aux modalités modernes de production et de valorisation. Ainsi, avec le regain d'intérêt que connaissent les plantes à l'échelle internationale, plusieurs voix commencent à se faire entendre en faveur d'études en profondeur de nos plantes locales dans le but de rechercher des substances naturelles actives pour une éventuelle lutte biologique contre les infections microbiennes.

A cet effet, nous nous sommes engagés à étudier l'effet antimicrobien des HE d'*Eucalyptus globulus* et *Smyrniium olusatrum*, afin de vérifier si leur pouvoir antiseptique est aussi important que celui des espèces étudiées ailleurs et également si la variabilité de la composition chimique influence l'activité antimicrobienne de ces essences. Pour ce faire, nous avons subdivisé notre travail en :

- Etude du comportement des bactéries isolées vis-à-vis des antibiotiques ;
- Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des deux huiles ;
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles en déterminant :
 - ✓ Les diamètres de la zone d'inhibition
 - ✓ Les concentrations minimales inhibitrices
 - ✓ Les concentrations minimales destructives (bactéricides et fongicides)

IV. Description des travaux d'étude de l'activité antimicrobienne des HE d'*Eucalyptus globulus* et *Smyrniium olusatrum*

IV.1. Méthodologie

L'étude de l'activité antimicrobienne des deux huiles a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie du département de Biochimie- Université Badji-Mokhtar, Annaba, sur les souches bactériennes suivantes : *Bacillus rhuriniensis*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter, freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Providencia alcalifaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Les souches fongiques : *Aspergillus niger*, *Candida albicans* et *Penicillium chrysogenum*.

IV.2. Matériel microbiologique

Nous avons choisi de travailler sur une gamme de microorganismes afin de donner une idée sur l'étendue du champ d'activité antimicrobienne de nos produits.

Les souches bactériennes et le germe fongique *Candida albicans* employés proviennent de l'institut Pasteur et de prélèvement de malades du C.H.U.- Annaba.

Les souches fongiques *Aspergillus niger* et *Penicillium chrysogenum* ont été prélevées du lac Oubaira-Elkala, Eltarf.

Les souches microbiennes ont été identifiées au département de Biochimie, université Badji-Mokhtar, Annaba.

IV.3. les milieux de culture

Le milieu de Mueller- Hinton et Sabouraud solides ont été utilisés dans la détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI et Les concentrations minimales destructives (bactéricides et fongicides) CMD des souches microbiennes vis-à-vis des témoins et des HE.

IV.4. Préparation des suspensions de micro-organismes

Les suspensions de micro-organismes sont préparées à partir des bouillons d'enrichissement des différentes souches incubées pendant 24 heures, à 37°C pour les bactéries, et à 30°C pour les levures. A 9 ml d'eau physiologique stérile, on ajoute 100 µl du bouillon.

Pour les champignons, les suspensions sont préparées à partir d'une culture de 10 jours ayant atteint le stade de sporulation sur milieu Sabouroud. Elle est préparée dans de l'eau physiologique contenant du Tween 80 et ajustée à 10⁵ UFC (unité formant colonie)/ml par comptage sur une cellule de Mallassez.

IV.5. L'Antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode de disques)

IV.5.1. Définition de l'Antibiogramme

L'Antibiogramme est un examen de laboratoire permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie prélevée chez un malade vis-à-vis de divers antibiotiques [1].

La technique utilisée dans notre travail est la technique NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standart) [2]. Cette méthode diffère selon que la bactérie soit exigeante ou non. Dans notre étude les souches bactériennes utilisées sont des bactéries non exigeantes.

Les conditions techniques suivantes doivent être respectées :

- Milieu

- Pour les bactéries, le milieu standard utilisé est le Mueller-Hinton, c'est un milieu standardisé selon les normes de l'OMS, c'est-à-dire d'une manière telle qu'il permet la croissance de nombreuses bactéries.

Pour les germes fongiques le milieu standard utilisé est le Sabouroud.

- L'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4 mm répartie uniformément.
- Les boîtes sont pré-séchées avant l'emploi [3, 4].

- Préparation des disques

Nous avons utilisé le papier Wattman N°3 coupé en disques de 6 mm de diamètre. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques, une fois préparés, sont placés dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée et autoclavés 20 mn à 120° C [4].

IV.5.2. Méthode

***Inoculum**

- L'inoculum doit être de 2 à 3. 10⁶ bactéries pour obtenir des colonies confluentes. Il est obtenu à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement. Puis on racle cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- On décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- On homogénéise la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à des DO de 0.08 à 0.1 lue à 625 nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum [3].

Pour les champignons, avec un disque d'environ 2 mm découpé dans un tapis mycélien de préculture, disposé au centre de la boîte de Pétri, face supérieure contre le nouveau milieu de culture, soit par nappage de la surface du milieu gélosé, d'une suspension de 10^5 conidies/ml.

***Ensemencement**

- On trompe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ou fongique.
- On l'essore en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche de haut en bas, en stries serrées.
- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, on recharge l'écouvillon à chaque fois.
- Préparation des dilutions utilisées pour l'antibiogramme (même dilution utilisées pour la CMI).

Application immédiate des disques [3].

***Pré-incubation**

Les boîtes sont laissées pendant 15 mn à température ambiante (sur la paillasse) [3].

***Incubation**

Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48h pour la levure et les moisissures.

***La lecture**

L'action du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du disque. Pour chaque disque, on mesure avec précision le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle.

Un produit est considéré actif, s'il donne un diamètre d'inhibition ≥ 15 mm.

Une fois l'antibiogramme est réalisé et les diamètres d'inhibition sont mesurés, on passe à la deuxième étape de l'étude de l'activité antimicrobienne ; il s'agit de la détermination de CMI [3].

***Témoins**

Des contrôles sont réalisés simultanément pour chaque essai ; Pour se faire, on utilise trois antibiotiques (tétracycline, gentamycine et amoxicilline) et un antifongique (Nystatine) comme contrôle positif.

On teste également le DMSO à la dilution ayant servi à solubiliser tous les produits actifs, comme témoin négatif.

IV.5.3. Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

*Définition

On peut définir la CMI par la concentration minimale inhibitrice ou bien la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber dans un milieu (Soit milieu liquide ou solide), toute culture visible de la souche étudiée [4, 5].

* Réalisation

Préparer une solution mère (γ) de concentration de 2000 $\mu\text{g/ml}$ en utilisant 20 mg de l'HE et en ajoutant du DMSO (20%) jusqu'à 10 ml.

A partir de cette solution mère, on réalise les différentes dilutions selon le tableau suivant :

Tableau IV.1: Les différentes dilutions de la solution mère [6,7]

Concentration initiale en $\mu\text{g/ml}$	Volume en ml	Volume d'eau distillée en ml	Concentration finale en $\mu\text{g/ml}$
2000	6.4	3.6	1280
1280	2 1 0.5 0.5	2 3 3.5 7.5	640 320 160 80
80	2 1 0.5 0.5	2 3 3.5 7.5	40 20 10 5
5	2 1 0.5 0.5	2 3 3.05 7.5	2.5 1.25 0.63 0.32

Pour avoir la concentration de 1280 $\mu\text{g/ml}$ à partir de la solution de 2000 $\mu\text{g/ml}$, on prend 6.4 ml de cette dernière à laquelle on ajoute 3.6 ml d'eau distillée.

*Procédé

- On prépare une culture en phase exponentielle en milieu liquide de la bactérie à étudier.

- On repique 0.1 ml (bacille à Gram négatif), 0.3 ml (*Staphylocoque*, *P. aeruginosa*) de la culture de 18 heures dans 120 ml de bouillon de Mueller-Hinton (ou autre bouillon adéquat pour la bactérie à étudier).
- On met à l'étuve à 37°C pendant 3 à 5 heures, jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence.
- On ajoute 1 ml de ce bouillon à 10ml de bouillon M-H, préalablement chauffé à 37°C.
- On met 2 ml de chaque dilution de la gamme de l'extrait déjà préparé dans une boîte de Pétri, en allant de la concentration la plus forte vers la concentration la plus faible.
- On ajoute 18 ml de la gélose M-H chauffé à 45°C, bien mélangée aux boîtes de Pétri.
- On laisse les boîtes pendant 30 mn à l'étuve à 37°C.
- On ensemence en strie, à l'aide d'une anse de platine ou à pipette rodée, sur toutes les boîtes contenant l'HE sans oublier la boîte témoin.
- On incube les boîtes pendant 18 h. à 37°C [6, 7].

***Lecture**

On lit les concentrations minimales inhibitrices (CMI) : Concentration d'antibiotique (HE de chaque plante pour notre cas) pour laquelle il n'ya pas de culture microbienne visible [6, 7].

IV.5.4. Détermination de la CMD (bactéricides CMB et fongicides)

La CMD a été définie comme la plus faible concentration d'antibiotique qui détruit 99.9% de l'inoculum microbien, ce qui correspond dans notre étude à un dénombrement inférieur à 10^4 à 10^2 UFC/ml après 24 heures d'incubation (l'inoculum initial est entre 10^6 et 10^8 UFC/ml) [8]. Un volume de 0,1ml de tous les tubes qui ne montrent pas de turbidité est subcultivé sur un milieu de gélose nutritif et incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.

La concentration minimale destructive (CMD) correspond à la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est observée [8, 9] (Figure IV.1).

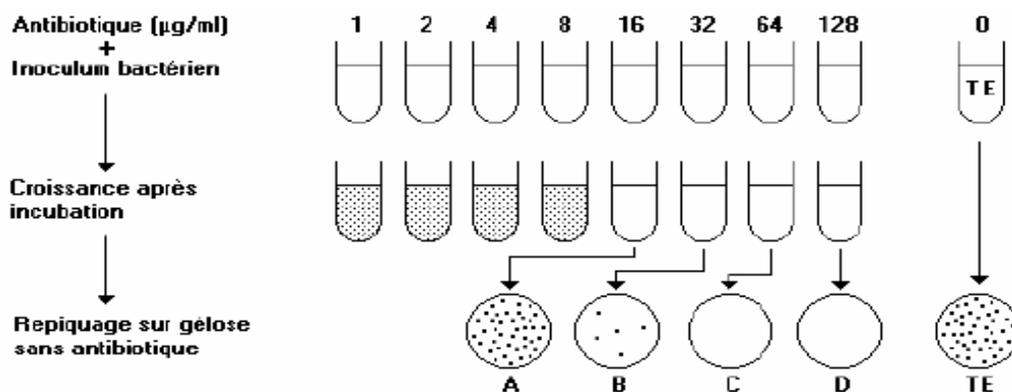


Figure IV.1: Recherche de Concentration Minimale Bactéricide (40)

IV.6. Détermination de l'activité antibactérienne et antifongique

Après 24 h. d'incubation à 37°C, on a récupéré les boîtes et on a mesuré les diamètres des zones d'inhibition par addition des témoins (Antibiotiques, Nystatine), des HE d'*Eucalyptus globulus* et du *Smyrniium olusatrum* sur les différentes souches bactériennes et fongiques testées, les résultats obtenus sont dressés dans les tableaux suivants.

IV.6.1. Résultats de l'antibiogramme des témoins

La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disques) qui permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques [10, 11].

Tableau IV.2 : Zones d'inhibition en mm en présence d'antibiotiques.

ATB	Tetracycline (30µg)		Gentamycine (10 UI)		Amoxicilline + acide Clavulanique (20/10 µg)	
	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats
<i>Citrobacter freundii</i>	19	S	30	S	-	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	R	27	S	-	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20	S	27	S	25	S
<i>Escherichia coli</i>	25	S	30	S	-	R
<i>Proteus mirabilis</i>	-	R	27	S	13	R
<i>Providencia alcalifaciens</i>	-	R	22	S	-	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12	R	22	S	-	R
<i>Bacillus rhurinziensis</i>	35	S	33	S	21	S
<i>Bacillus subtilis</i>	12	R	-	R	-	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19	S	27	S	-	R

R : Résistant ; S : Sensible

Selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM), le choix des antibiotiques testés sur les différentes espèces

bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique (Voir tableau 18) [10].

Tableau IV.3: Spectre d'activité des antibiotiques utilisés

Famille d'antibiotique	Groupe d'antibiotique	Antibiotique	Code d'antibiotique	Charge du disque	Diamètre de la zone d'inhibition	
					S	R
β-lactame	Pénicilline	Ampicilline	AM	30 µg	≥19	< 14
		<i>Amoxicilline</i>	AMX	25 µg	≥21	< 14
		Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	20/ 10 µg	≥21	< 14
Aminosides	s/g : gentamycine	Gentamicine	GM	10 µg	≥16	< 14
	Tétracycline	Doxycycline	DO	30 µg	≥19	< 17
Tétracycline		Tétracycline	TE	30 µg	≥19	< 17

Tableau IV.4: Zones d'inhibition en mm en présence de Nystatine

	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>		<i>Candida albicans</i>	
	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats
Nystatine (25 µg/ml)	33	S	22	S	14	I

I : Intermédiaire ; S : Sensible

IV.6.2. Détermination de l'aromatogramme, la CMI et la CMD de l'HE d'*E. globulus*

Tableau IV.5 : Zones d'inhibition en mm, CMI et CMD de l'HE d'*E. globulus*

Souches microbiennes	Diamètre en mm (1mg /ml)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMD ($\mu\text{g/ml}$)	DMSO
<i>Citrobacter freundii</i>	12	80	-	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	>40	-	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16	>40	-	R
<i>Escherichia coli</i>	20	20	-	R
<i>Proteus mirabilis</i>	18	40	-	R
<i>Providencia alcalifaciens</i>	12	>80	-	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20	80	-	R
<i>Bacillus rhurinsiensis</i>	32	10	10	R
<i>Bacillus subtilis</i>	R	-	-	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16	>40	160	R
<i>Aspergillus niger</i>	R	-	-	R
<i>Candida albicans</i>	15	>160	640	R
<i>Penicillium chrysogenum</i>	18	160	-	R

R : Résistant

IV.6.3. Détermination de l'aromatogramme, la CMI et la CMD de l'HE de *S. olusatrum*

Tableau IV.6: Zones d'inhibition en mm, CMI et CMD de l'HE de *S. olusatrum*

Souches microbiennes	Diamètre en mm (1mg /ml)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMD ($\mu\text{g/ml}$)	DMSO
<i>Citrobacter freundii</i>	R	-	-	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12	>80	-	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	R	-	-	R
<i>Escherichia coli</i>	R	-	-	R
<i>Proteus mirabilis</i>	R	-	-	R
<i>Providencia alcalifaciens</i>	10	160	-	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20	>80	-	R
<i>Bacillus rhurinsiensis</i>	25	20	-	R
<i>Bacillus subtilis</i>	13	80	-	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	20	-	R
<i>Aspergillus niger</i>	18	160	-	R
<i>Candida albicans</i>	15	>160	-	R
<i>Penicillium chrysogenum</i>	12	320	-	R

IV.7. Discussion des résultats

Les essais de criblage du pouvoir antimicrobien ont été réalisés par la méthode de diffusion sur gel. D'après les résultats obtenus, l'HE d'*E. globulus* semble jouir d'une activité inhibitrice particulièrement large sur les différentes classes de micro-organismes testés excepté pour *Bacillus subtilus*. Les diamètres d'inhibition sont compris entre 12 et 32 mm.

Les niveaux de sensibilité des bactéries vis-à-vis des deux types d'essences sont relativement proches à l'exception de *Citrobacter freundii* et *Enterobacter aerogenes* dont les diamètres d'inhibition sont plus faibles, 12 et 15mm respectivement, cependant la souche *Bacillus rhurinziensis* présente un diamètre plus élevé, 32 mm.

Les bactéries à Gram positif montrent des zones d'inhibition supérieures à celles observées chez les bactéries à Gram négatif et ce dans les deux chimiotypes.

Par comparaison avec les antibiotiques, tétracycline, gentamycine et amoxicilline utilisés comme témoins, les HE manifestent une action inhibitrice plus prononcée. Les souches ayant montré une résistance à l'action des antibiotiques sont vulnérables à l'action des deux types d'essences, c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia alcalifaciens*, *Enterobacter aerogenes* et *Bacillus subtilus*.

Chez les espèces fongiques, la levure *Candida albicans*, a manifesté une activité inférieure par rapport à la moisissure *Penicillium chrysogenum*. Les zones d'inhibition respectives sont comprises entre 15 et 18 mm et ce pour l'huile d'*E. globulus* : On note pour ce cas, la résistance de la souche fongique *Aspergillus niger*.

Pour l'huile de *S. olusatrum*, les zones d'inhibition pour les trois souches fongiques varient entre 12 et 18 mm, *Aspergillus niger* montre une zone d'inhibition supérieure aux autres.

On a pu déterminer le diamètre d'inhibition des huiles mais on ne peut pas se fier seulement à cette technique pour trancher définitivement de la supériorité du pouvoir antiseptique d'une essence par rapport à une autre. A l'origine de ce constat, le manque d'une bonne reproductibilité de la technique, un avis partagé par plusieurs auteurs ayant utilisés cette même méthode pour étudier le pouvoir antimicrobien des essences naturelles [12].

La quantification de l'effet inhibiteur des deux HE par détermination des CMI et des CMD, semble être le moyen le plus convenable pour comparer l'efficacité de nos essences entre elles.

Les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition ont un rapport avec les valeurs de CMI recherchées, c'est à dire que les bactéries ayant les diamètres de la zones d'inhibition les plus élevés sont celles qui possèdent les CMI les plus faibles, et les bactéries ayant les diamètres les plus faibles sont celles qui donnent les CMI les plus élevées.

Les CMI et les CMD des deux essences ont été déterminées par la méthode de diffusion sur gel. Pour le chimiotype d'*E. globulus*, les CMI sont comprises entre 10 et 80 µg/ml pour les souches bactériennes ; *Bacillus rhurinziensis* et *E. coli* possèdent les CMI les plus faibles, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerugenes*, et *Staphylococcus aureus* gravitent autour d'une même de 40 µg/ml.

Citrobacter freundii et *Providencia alcalifaciens* présentent une valeur similaire de 80µg/ml. La même valeur de CMI a été montrée par la souche *Pseudomonas aeruginosa*, apparemment elle ne concorde pas avec la valeur prometteuse de diamètre d'inhibition (20 mm), ceci s'explique par la nature de la paroi qui confère toujours une certaine résistance à cette souche vis-à-vis des agents antibactériens. En moyenne, les bactéries à Gram positif ont des CMI deux fois supérieur que cette souche à Gram négatif.

Les valeurs de CMI pour les champignons gravitent autour d'une même valeur de 160 µg/ml.

Par comparaison avec l'huile d'*E. globulus*, l'huile de *S. olusatrum* apparaît moins active.

En effet, quatre bactéries sur dix sont résistantes à cette huile. La souche *Providencia alcalifaciens* possède la valeur de CMI la plus élevée (>160 µg/ml), tandis-que les souches *Bacillus rhurinziensis* et *Staphylococcus aureus* présentent les valeurs de CMI les plus faibles et qui concordent bien avec les valeurs de leurs zones d'inhibition (20 mm).

On note des CMI inférieures pour les germes fongiques par rapport aux bactéries.

L'activité antimicrobienne de l'HE de *S. olusatrum* récoltée à Tlemcen, caractérisée par la présence du furanodienne + furanoélémente (46%), β-pinène (6.3%), furaneremophillone (12.2%) et trans-caryophyllène (6.3%) [38], semble différente de celle décrite ici.

En effet, les diamètres d'inhibition sont remarquablement faibles, ils varient entre 0 et 3,33 mm, les mêmes souches testées sont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Candida albicans*.

Concernant les CMD de l'essence d'*Eucalyptus*, les souches microbiennes semblent plus résistantes, 8 bactéries sur 10 testées ont des CMD nulles, les bactéries Gram positif, *Bacillus rhurinziensis* et *Staphylococcus aureus* sont détruites à des concentrations respectives de (10 et 160 µg/ml), la valeur bactéricide semble quatre fois plus grande que la valeur de CMI de la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* et aussi pour la souche fongique *Candida albicans*. Pour l'huile du *S. olusatrum*, les CMD des souches fongiques sont aussi nulles, donc une résistance relativement importante à la destruction, même pour la levure *Candida albicans*,

de toutes les manières, il a été rapporté que les HE sont souvent fongistatiques plutôt que fongicides [13].

Les CMI et les CMD des deux types d'essences présentées ci-dessus sont obtenues avec une moyenne d'au moins trois expérimentations indépendantes.

A partir des résultats de l'analyse chimique des deux huiles ; on a pu mettre en évidence une variabilité au niveau de la composition chimique, donnant naissance à deux chimiotypes à deux chémotypes différents.

La variabilité quant à la sensibilité des microorganismes à l'action des différents types d'essences, serait liée à la nature chimique de leurs composants majoritaires.

A la lumière des CMI et des CMD, il ressort que le chimiotype à cinéole est de loin le plus actif.

Selon la classification de Franchomme, les aromates de nature phénoliques sont les plus actifs, l'ordre d'efficacité ainsi établi est le suivant :

Phénol/ Alcool/ Cétone / Ether/hydrocarbure [14].

La comparaison du pouvoir antibactérien et antifongique des huiles de nature phénolique avec d'autres essences montre une meilleure activité antibactérienne conformément à la classification de Franchomme. En effet, la limonène premier intermédiaire cyclique dans la biosynthèse des monoterpènes oxygénés [15, 16] ne possède pas de double liaison extracyclique entre le C4 et le C7. La présence de cette liaison chez le pulégone augmente son pouvoir anti-microbien.

De même, comparé à l'oxyde de pipériténone, l'oxyde de pipéritone ne possède pas cette liaison et présente une activité généralement inférieure à celle de pulégone et de l'oxyde de pipériténone. Cette double liaison semble d'une grande importance du fait qu'elle permet d'augmenter le potentiel antimicrobien de ces monoterpènes [39].

Les résultats montrent aussi une sensibilité notable des bactéries à Gram positif par rapport aux souches à Gram négatif surtout pour l'essence de *Smyrnum*.

La différence de sensibilité des microorganismes renseigne sur un éventuel effet membranaire de ces essences. La paroi des bactéries à Gram négatif, serait moins perméable aux agents antimicrobiens en raison de sa structure complexe. La couche externe, formée de polysaccharides, de protéines et de lipides agirait comme une barrière à l'entrée de différents agents chimiques [18].

Le pouvoir antimicrobien observé chez les HE peut être attribué à l'action isolée ou conjuguée des molécules qu'elles renferment.

Dans le chapitre précédent, nous avons pu mettre en évidence la composition chimique des deux essences, ainsi les composants majoritaires ont pu être identifiés.

Le chimiotype d'*Eucalyptus globulus* est composé de 1,8-cinéole (**48,6%**), α -pinène (9,7%) globulol (10,9 %), *trans*-pinocarveol (10,7 %) et α -terpineol (6,6%).

Le chimiotype de *Smyrniium olusatrum* est composé de sabinène (27.1%), curzerène (13.7%), methyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane (12.3%), α -pinène (7.2%), cryptone (7.1%) et β -pinène (5.7%).

La majorité de ces composants sont des monoterpènes qui sont connus par leur célébrité d'activité antimicrobienne ; de plus les monoterpènes cycliques en raison de leurs caractères lipophiles ont de ce fait tendance à s'intégrer au niveau de la membrane cellulaire [19]. Ceci a pour conséquence une expansion de la membrane et une augmentation de sa fluidité, permettant ainsi un efflux plus au moins important des composants intra-cytoplasmiques, la mort microbienne s'en suit [20].

Il a été rapporté aussi que les monoterpènes possèdent des effets délétères sur les membranes mitochondriales et provoquent une inhibition du métabolisme énergétique mitochondrial, ce qui entraîne des perturbations dans un large éventail des processus physiologiques et biochimiques dans la cellule [17].

Le pouvoir antimicrobien des composants majoritaires isolés ou associés confirment leur implication dans l'effet antiseptique de ces essences ; des essais *in vitro* rapportés par certains auteurs ont révélé un large spectre d'action aussi bien contre les bactéries Gram positif et négatif que contre les champignons, on citera à l'occurrence les effets synergiques et additifs des combinaisons suivantes: Limonène/1,8-cinéole [23] ; 1,8 cinéole/aromadendrène [24] ; cinnamaldéhyde/eugénol; thymol/ eugénol; carvacrol / eugénol et thymol / carvacrol [25, 26].

Les travaux de Chebli et al. [21] et de Vilela et al. [22] ont montré que la pulégone et le 1,8-cinéole purs provoquent une inhibition de la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées que les HE dans leur totalité ; ainsi l'activité de l'HE est le résultat de ses composés majoritaires et aussi de l'effet synergique des composés minoritaires. [17].

L'effet d'antibiotique du 1,8-cinéole confère à l'HE dont elle a le composant essentiel son potentiel germicide vis-à-vis d'un grand nombre de bactéries ; on cite l'exemple de (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, et *Bacillus subtilis*) [27].

Une étude faite au Maroc, rapporte que les souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* testées par l'HE d'*E. globulus*, ont présenté respectivement des zones d'inhibition de (48.15 et 13.50 mm) et des CMI de (0.15 et 0.75 mg/ml). [28]; ces valeurs sont proches à ceux décrits par d'autres chercheurs [29-31].

Ces résultats, apparemment, ne corroborent pas avec les nôtres, les deux souches sont plus vulnérables à notre essence et présentent des CMI plus inférieures (20 et 40 µg/ml), ceci est peut être attribué à la composition chimique de notre huile.

Les chimiotypes des deux huiles renferment des composants minoritaires qui peuvent potentialiser le pouvoir antimicrobien. Il s'agit principalement de :

L' α -pinène et le β -pinène, ces deux monoterpènes hydrocarbonés connus par leur potentiel antibactérien [32], agissent aussi sur les levures en inhibant les processus de transport d'ions, le processus de la respiration et en augmentant la perméabilité membranaire [33]. En plus, leurs énantiomères limonène et linalool possèdent une activité antibactérienne très remarquable [34-36].

L' α -terpinéol figure aussi parmi nos composants minoritaires, ce chémotype a prouvé dans certains travaux son efficacité antibactérienne, elle est 8 fois plus supérieure que celle de 1,8-cinéole [37], ceci fait penser que l'effet inhibiteur de ce chémotype a été conjugué à celui du 1,8-cinéole pour notre essence d'*Eucalyptus*.

Le globulol pourrait aussi potentialiser l'activité antimicrobienne ; en effet une étude récente rapportée par Mulyaningsih et al. [24] révèle des valeurs de CMI de (1 à 4 mg/ml) vis-à-vis des souches de streptocoques, *E. faecalis* et *A. baumannii*, en présence de ce chémotype.

Références bibliographiques

- 1-Dabena, H., 1997.** Infectiologie de A à Z. Ed. Arnette, France, 500-502.
- 2- NCCL Standard for antimicrobial susceptibility testing by diffusion methods NCCLS.** 1985. Documents, 5:4.
- 3- Ericsson, H.M., Sherris, J.C., 1971.** Antimicrobial susceptibility testing-Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl., 217, 1-90.
- 4- Le minor, L., Veron, M., 1989.** Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Ed. Flammarion. Paris.
- 5- Ferron, A., 1976.** Bactériologie médical à l'usage des étudiants en médecine. 8^{ème} édition. Ed. Groun et Roques, France.
- 6- Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargas, R., 1987.** Bactériologies médicales : techniques usuelles. Edition SIMEP (2^{ème} tirage), France.
- 7-Caurvalin, P., Flandrois, J.P., Goldstein, F., Philippon, A., Sirot, J. 1988.**
L'antibiogramme automatisé mpc-vigt, Paris.
- 8-Ganiere, J.P., Mangion, C., et Peridy, M., 2004.** Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacine, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines.
Revue Méd. vétérinaire.155 (8) : 411-416
- 9-Andrews, J.M., 2001.** The development of the BSAC standardization method of disc diffusion testing. JAC. Ed: British society for antimicr. Chemother. (48) S1: 29-42
- 10-Cavallo, J.D., Chardon, H., Chidiac, C., Choutet, P., Courvalin, P., Debernath, H., Drugeon, H., Dubreuil, L., Goldstein, F.W., Jarlier, V., Lecleco, R., Nocolas-Chanoine, M.H., Phillipon, A., Quentin, C., Rouveux, B., Sirot, J., Soussy, C.J., 2007.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.1-23.
- 11-François, S., 2000.** Les antibiotiques : Respecter les bonnes pratiques. Hygiène en milieu hospitalier. 30 : 8-13.
- 12-Benouda, A., Hassar, M., Benjilali, B., 1988.** Les propriétés antiseptiques des huiles essentielles *in vitro*, testées contre des germes pathogènes hospitaliers. Fitoterapia. 2: 115-119.
- 13-Moitie, J.O., Peciulyte, D., 2004.** Fungicidal properties of pinus sylvestris L. for improvement of a quality. Medicine (Kaunas). 40; 41 : 787-794.

- 14-Franchomme, P., Penoel, D., Mars, J., Jollois, R. 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstrations, illustrations et applications d'une science médicale naturelle. (Ed. jollois).
- 15-Kjonna, R., Croteau, R., 1983,** Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other menthe spies. Arch. biochem. Biophys. 220: 79-89.
- 16-Lange, MB., Wildung, MR., Einar, J. Stauber, EJ., Sanchez, C., Pouchnik, D., Coteau, R., 2000.** Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. PNAS. 97: 62934-2939.
- 17-Shama, H., Mohamed, R., Zakaria, H., Badr, S., Mohamed, GH., Mustapha, E.L.A. 2011.** Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha Pulegium et d'Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. Bull. Soc. Royale des Sci.-Liège, Vol. 80: 824-836.
- 18-Russel, A. chopra, D. 1996.** Understanding antibacterial action and resistance. 2nd ed. Ellis Horwood, Chichester, England.
- 19-Grundy, DL., et Stille, CC., 1985.** Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide. Pesticide Biochem. and physiol. 23:383-388.
- 20-Sikkema, J., de Bont, J.A.M., boelman, B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. of Bacter. 269: 8022-8028.
- 21- Chebli, B., Achouri, M., Idrissi, H.L.M., Hmamouchi, M., 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr, J. Ethnopharmacol., 89: 165-169.
- 22- Vilela, G. R., Almeida, G. S., Regitano, D'arce M. A. B., Moraes, M. H.D., Brito, J. O. 2009.** Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare, J. Stored Prod. Res., 45: 108-111.
- 23- Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., Özek, T., Demirci, B., Başer, K.H.C. 2007.** Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity. South African J. Botany 73: 441-448.

- 24- **Mulyaningsih, S., Frank, S., Zimmermann, S., Jürgen Reichling, Michael, W., 2010.** Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13):1061-1066.
- 25- **Iten, F., Saller, R., Abel, G., Reichling, J., 2009.** Additive antimicrobial effects of the active compounds of the essential oil of *thymus vulgaris*- chemotype carvacrol. *Planta Med.* 75: 1231-1236.
- 26- **Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P., Xu, J., 2009.** Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *J. Food Sci.* 74: 379-383.
- 27- **Sivropoulou, A. Nicolaou, C., Papanikolaou, E., Dokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1997.** Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. of Agric. and Food Chemistry.*, 45: 3197-3201.
- 28- **Derwich, E., Benziane, Z., Taouil, R., Senhaji, O., Touzani, M., 2010.** Comparative Essential oil Composition of Leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a Traditional Herbal Medicine in Morocco. *Amer.-Euras. J. of Sust. Agric.*, 4(1): 47-54.
- 29- **Raho Ghalem, B., Benali, M., 2008.** Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African J. of Pharmacy and Pharmacology* 2(10): 211-215.
- 30- **Trivedi, N.A., Hotchandani, S.C., 2004.** A study of the antimicrobial activity of oil of *Eucalyptus*. *Indian J. Pharmacol.* 36: 93-94.
- 31- **Gamal, A.M., Sabrin, R.M.I. 2007.** Eucalyptone G, a new phloroglucinol derivative and other constituents from *Eucalyptus globulus* Labill . *ARKIVOC Inter. J. Org. Chem.* : 281-291.
- 32- **Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 308-316.
- 33- **Salvador, U., Ramirez, J., Pena, A., 1985.** Effects of β -pinen on Yeast membrane Functions. *J. of Bacteriology*, 161, No 3: 1195-1200.
- 34- **Magiatis, P., Melliou, E. Skaltsounis, A., Chinou, I., Mitaku, S., 1999.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. Chia, *Planta Med.*, 65: 749-752.

- 35-Koji, Y.K., Yamamoto, T., Kawai Y., Inoue, N., 2004.** Enhancement of antilisterial activity of essentials oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microb.*, 21: 283-289.
- 36-Filipowicz, N., Kamiński, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M. 2003.** Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components, *Phytoh. Res.*, 17: 227-231.
- 37- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H., 2001.** Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 565-573.
- 38- Mohammedi, Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, thèse pour l'obtention du diplôme de Magistère en biologie. Univ. Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.
- 39- Oumzil, H., 2002.** Etude du spectre d'activité antimicrobienne et du mécanisme d'action des huiles essentielles de *Mentha suaveolens* EHRH. Thèse de Doctorat, Université Mohamed V-.Agdal, Maroc.
- 40.**http://pedagogie.acmontpellier.fr/Disciplines/sti/biotechn/documents/protocoles/Antibiogramme_en_milieu_liquide.htm