

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE



UNIVERS ABOU BEKR BELKAID TLEMEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET

DE LA VIE DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

**Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au
biomédical et à l'environnement « LAMAABE »**

Mémoire

Présentée par

M^{elle} Boutchiche Amina

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique
en Biologie Option : Microbiologie

**Etude comparative de quelques méthodes d'évaluation de la concentration
minimale inhibitrices des extraits de plantes**

Soutenu le 14/08/2017

Devant le jury

Président	Bendahou Mourad	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Senouci bereksi mohamed	Maitre assistant A	U. de Tlemcen
Encadreur	Khadir Abdelmounaim	Maitre de conférences B	U. d'Oran

Année Universitaire : 2016 – 2017

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE



UNIVERS ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET

DE LA VIE DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

**Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au
biomédical et à l'environnement « LAMAABE »**

Mémoire

Présentée par

M^{elle} Boutchiche Amina

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique
en Biologie Option : Microbiologie

**Etude comparative de quelques méthodes d'évaluation de la concentration
minimale inhibitrices des extraits de plantes**

Soutenu le 14/08/2017

Devant le jury

Président	Bendahou Mourad	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Senouci bereksi mohamed	Maitre assistant A	U. de Tlemcen
Encadreur	Khadir Abdelmounaim	Maitre de conférences B	U. d'Oran

Année Universitaire : 2016 – 2017

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A ma mère

*A mes chers frères :
Fatima Zahra et Mohamed*

A ma grande famille, mes amis et collègues

Et toutes les personnes que j'estime

Boutchiche Amina

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à mon promoteur monsieur KHADIR Abdelmounaim Maitre de conférences B à l'université d'Oran 1, Ahmed Ben Bala, pour ses précieux conseils et sa disponibilité.

J'adresse mes remerciements et mes respects à monsieur Bendahou Mourad, professeur à l'université ABB de Tlemcen, pour ces conseils précieux et pour avoir accepté de présider le jury de cette mémoire.

Un grand merci à monsieur Senouci bereksi Mohamed Maitre assistant A pour avoir accepté d'examiner cette mémoire.

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

الملخص

العنوان دراسة مقارنة لبعض الطرق تقييم التركيز المثبط لأدنى للمستخلصات النباتية

في السنوات الأخيرة تزايد الاهتمام في البحث و تطوير عوامل مضادة للجراثيم جديدة من مصادر مختلف لمكافحة مقاومة الميكروبات و لذلك فقد تم منح عناية خاصة للطرق فحص و تقييم الأنشطة المضادة للميكروبات في دراستنا قمنا بتحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط للزيوت الأساسية *Ammoides Verticillata* بواسطة ثلاثة طرق أجار صفيحة بمفردها و صفيحة معالجة بريسازورين و أظهرت النتائج و المقارنة بين هذه الطرق الثلاث أن الصفيحة المعالجة بريسازورين هي أكثر الطرق فعالية

الكلمات المفتاحية الزيوت الأساسية ريسازورين التركيز المثبط الأدنى .

Résumé :

Titre : Etude comparative de quelques méthodes d'évaluation de la concentration minimale inhibitrice des extraits de plantes.

Au cours des dernières années, l'intérêt grandissant pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne. Par conséquent, une attention particulière a été accordée aux méthodes de dépistage et d'évaluation des activités antimicrobiennes. Dans notre travail nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle d'*Ammoides verticilata* par trois méthodes : sur gélose, sur microplaque et sur microplaque avec résazurine. Les résultats et la comparaison entre ces trois méthodes ont montré que la méthode de microplaque avec résazurine est la plus efficace.

Mots clés: l'huile essentielle, résazurine, la concentration minimale inhibitrice.

Abstract :

Title: Comparative study of some methods for the evaluation of the minimum inhibitory concentration of plant extracts.

In recent years, the growing interest in research and development of new antimicrobial agents from various sources to combat microbial resistance. Therefore, particular attention has been paid to methods of screening and evaluating antimicrobial activities. In our work we determined the minimal inhibitory concentration of the essential oil of *Ammoides verticilata* by three methods: on agar, on microplate and on microplate with resazurin. The results and the comparison of these three methods showed that the microplate method with resazurin is the most effective.

Key words: essential oil, resazurin, minimal inhibitory concentration.

Sommaire

Introduction.....	1
Partie I. Synthèse bibliographique.....	2
I. Les plantes médicinales.....	2
1. Historique.....	2
2. Définitions.....	2
3. Formes d'utilisation des extraits des plantes médicinales.....	2
II. Les extraits des plantes.....	3
1. Composition chimique des plantes.....	3
2. Les composés organiques volatils (COV).....	3
3. Composés organiques non volatils (CONV).....	4
4. Activité antimicrobienne des extraits des plantes.....	5
5. Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes.....	6
5.1. Méthodes de diffusion d'agar.....	7
6. La concentration minimale inhibitrice.....	9
7. Méthodes de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice.....	9
7.1. La dilution en bouillon.....	9
7.2. La dilution en gélose.....	12
7.3. La méthode de diffusion et de dilution.....	12
Partie II. Matériels et methods.....	14
1. Matériel.....	14
1.1 Matériels biologique.....	14
1.2. Matériels végétales.....	14
1.3. Les milieux de culture et les solvants.....	14
2. Méthodes.....	15
2.1. Mode Obtention des huiles essentielles.....	15
2.2. Préparation de la suspension microbienne (l'inoculum), Repiquage et Conservation des.....	15
souches	
2.3. Tests de confirmation des souches.....	16
2.4. Tests d'activité antimicrobienne.....	16
2.4.1. Criblage des huiles essentielles par la technique de l'aromatogramme.....	16
2.4.2. Techniques de détermination de la CMI des huiles essentielles.....	17
2.4.2.1. Technique de macrodilution en milieu solide.....	17
2.4.2.2. Détermination de la CMI par la méthode de microplaque.....	18

2.4.2.3. Technique de CMI sur microplaque en utilisant le colorant fluoresçant résazurine.....	18
Partie III. Résultats et discussions.....	20
1. Les résultats.....	20
1.1. Extraction de l'huile essentielle.....	20
1.2. Observation microscopique.....	20
1.3. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	20
1.3.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose.....	20
1.3.2. Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.....	22
1.3.3. Détermination de la CMI sur microplaque.....	23
1.3.4. Comparaison des différentes méthodes d'évaluation la concentration minimal inhibitrice des extraits des plantes	26
2. Discussion	27
Conclusion	30
References	31
Annexe	36

Liste des tableaux

Tableau (1) :	Observation microscopique de 4 souches de reference.....	20
Tableau (2) :	Diamètre d'inhibition en (mm) provoqués par <i>l'Ammoides Verticillata</i>	20
Tableau (3) :	concentration minimale inhibitrice CMI obtenues par la méthode de dilution en milieu gélosé.....	22
Tableau (4) :	Les valeurs des cconcentration miniales inhibitrice obtenue par microplaque.	24
Tableau (5) :	Comparaison de concentration minimal inhibitrice obtenue par microplaquet sur gélosé	26

Liste des Figures

Figure (1) :	Action des huiles essentielles et de leur constituant sur la cellule bactérienne...	6
Figure (2) :	Principe de la méthode de diffusion par disque.....	7
Figure (3) :	Illustration de la méthode de Microatmosphère.....	8
Figure (4) :	méthode de détermination de la CMI.....	9
Figure (5) :	Exemple de la détermination de la CMI par la méthode de macrodilution.....	10
Figure (6) :	Représentation graphique du protocole de micro-dilution de bouillon recommandé par CLSI.....	11
Figure (7) :	Les cellules vivantes actives provoquent une réduction de la resazurine (violette) à la résorufin (rose-incolore).....	12
Figure (8) :	Schématique Diagramme montrant la MIC à l'intersection de la croissance de l'organisme et de la bande d'étalonnage.....	13
Figure (9) :	L'appareil d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation «Clevenger »	15
Figure (10) :	Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de pétri.....	17
Figure (11) :	Le Procédures de la méthode de microdilution aidée par résazurine.....	19
Figure (12) :	Effet d' <i>A. Verticillata</i> sur <i>E. coli</i>	22
Figure (13) :	Détermination de la CMI des souches étudié vis-à-vis d' <i>A. Verticillata</i> par la méthode de dilution en milieu solide.....	23
Figure (14) :	Résultats sur microplaque montrant les différentes dilutions testées de l'huile essentielle d' <i>A.V</i>	25
Figure (15) :	changement de couleur au niveau des puits de la microplaque en présence d'activité bactérienne sous l'effet de résazurine.....	26

Liste des abbreviations

A

A.V : Ammoides Verticillata

B

BHIB : Bouillon de cœur de cerveau

BN : Bouillon nutritif

C

CLSI : Institut de normes clinique et de laboratoire

CMI : concentration minimale

inhibitrice **CONV** : composés

organiques non volatils **COV** :

composés organiques volatils

D

DMSO : Dimethyl sulfoxyde

DO : densité optique

E

E.coli : Escherichia coli

H

H.E : huile essentielle

L

L. monocytogenes : Listeria monocytogenes

N

NCCLS : comité national pour les normes de
laboratoire clinique M

MH : Müller-Hinton

MHB : bouillon Müller-Hinton

P

P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa

S

S. aureus : Staphylococcus aureus

Introduction

Introduction

L'échec de l'antibiothérapie est parmi les événements non souhaitables survenant lors des traitements de diverses pathologies telles que les interventions chirurgicales ou les maladies infectieuses, ces échecs sont dus généralement au développement de résistances aux antibiotiques par les microorganismes.

Plusieurs mécanismes sont responsables de cette résistance parmi lesquels les enzymes dégradant les antibiotiques, les mutations affectant les cibles des antibiotiques et les systèmes d'efflux actif qui dégagent l'antibiotique à l'extérieur de la cellule. Mis à part les mutations, la plupart des mécanismes de résistance sont dus aux gènes de résistance qui sont véhiculés par des transposons, intégrants, bactériophages et conjugaison bactérienne.

Afin de lutter contre cette résistance aux antibiotiques, la recherche de nouveaux agents antimicrobiens est un axe de recherche d'actualité qui vise la sélection et l'évaluation de divers molécules ou extraits naturelles pour le but de la mise en évidence de nouveaux antibiotiques.

Le criblage des molécules antimicrobiennes nécessite des méthodes et des protocoles permettant une évaluation précise de l'effet antimicrobien avec des valeurs de concentration requises. La détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) reste le moyen le plus adéquat pour savoir si cet agent antimicrobien a bon effet contre les microorganismes du fait que c'est la plus petite concentration permettant l'inhibition de toute croissance visible et sachant qu'un bon antibiotique c'est la molécule qui a un bon effet contre les microorganisme a faible dose ce qui permet de lutter contre l'agent pathogène en prenant soin sur l'organisme traité surtout de point de vue toxicité.

Plusieurs auteurs ont publié des méthodes permettant la détermination de la CMI cependant, certaines méthodes présentent des limites et des inconvénients.

L'objectif de notre travail, c'est évalué l'efficacité de trois techniques les plus utilisés pour la détermination de CMI des extraits végétaux notamment les huiles essentielles et de comparer les résultats pour le but de savoir la méthode la plus efficace de point de vue précision et simplicité de réalisation

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

I. Les plantes médicinales

1. Historique

L'histoire des plantes médicinales est très ancienne et est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque, et romaine (**Lardry and Haberkorn, 2007**). Depuis l'antiquité, les hommes ont utilisé les plantes qu'ils avaient à leur disposition à divers fins ; massages, bains, hygiène, santé et diététique. Les arabes sont les premiers qui ont développé la technique de distillation des plantes, permettant ainsi d'extraire l'huile essentielle il ya de cela plus de mille ans (**Jollois et al., 2001**). Les musulmans ont repris l'utilisation de ces plantes en thérapeutique. En particulier Ibn sina qui produit la première huile essentielle pure, il s'agissait de «*Rosa centifolia*» (**Jollois et al., 2001**). Au cours de la dernière décennie, l'intérêt pour les médicaments issus de plantes, en particulier les phytothérapeutiques, a augmenté de façon expressive (**Calixto, 2000**).

2. Définitions

Plantes médicinales: On appelle plantes médicinales tout plantes renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir soulager ou guérir les maladies (**Iserin et al., 2001**).

Phytothérapie: C'est une thérapie qui consiste à utiliser les plantes ou bien ses dérivée après l'extraction de leurs principes actifs purs (**Gazengel and Orecchioni, 1999**).

Aromathérapie: peut se définir comme une thérapie naturelle qui utilise les extraits de plantes aromatiques pour soigner ou prévenir les maladies; elle s'intègre dans le cadre de la phytothérapie (**Lardry and Haberkorn, 2007**).

3 Formes d'utilisation des extraits des plantes médicinales

On estime qu'il existe entre 250 000 et 500 000 espèces de plantes sur Terre (**Borris, 1996**). La plupart de ces types de plantes possèdent des propriétés thérapeutiques, car ils contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (**Iserin et al., 2001**). Ils sont utilisées en nature (tisanes) ou sous forme de préparations galéniques (poudre, teinture, extraits, etc.....) ; un mélange naturel de plusieurs composés (huiles essentielles...) ; soit un composé organique chimiquement pur obtenue par extraction à partir d'une plante(**Gazengel and Orecchioni, 1999**).

I. Les extraits des plantes

II-1 Composition chimique des plantes

Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des acides nucléiques et des hydrates de carbone. De plus les plantes synthétisent une gamme extraordinaire d'autres composés appelés « Métabolites secondaires », qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement, la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, ainsi que la défense contre les prédateurs et les pathogènes (Small and Catling, 2000).

Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (Iserin *et al.*, 2001), Cette composition est constituée de deux fractions : La première fraction dite volatil (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; elle appartient aux métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle (Soualeh and Soulimani, 2016). La deuxième fraction dite : composés organiques non volatils (CONV) elle constitue essentiellement de coumarines, flavonoïdes, ainsi de phénols ou poly phénols et jouent un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (Proestos *et al.*, 2006).

II-2 Les composés organiques volatils

II-2.1. Huiles essentielles

Le terme huile essentielle (H.Es) dérive de l'expression latine: «Quinta essentia», qui signifie le composant efficace d'une drogue. Un nom donné par le médecin suisse et l'alchimiste, Paracelsus von Hohenheim (Baby and George, 2009). Ce sont des substances volatiles et odorantes contenue dans les végétaux supérieurs. Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines (Jean, 2009). Elles sont caractérisées par leurs solubilités dans les solvants organiques (éther, alcools, hexane etc...)

II-2.2. Méthodes d'obtention des huiles essentielles

Il existe de nombreux technique d'extraction des huiles essentielles tel que la distillation par entraînement à la vapeur, l'extraction par les solvants volatils, l'extraction au CO2 supercritique et l'extraction par micro-onde mais la technique de référence la plus utilisées c'est l'hydrodistillation.

- **L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation est une méthode d'extraction dont le rôle est d'entraîner les composés volatiles des produits naturels avec la vapeur d'eau. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Ce procédé utilise l'appareil de type « Clevenger » qui est la technique la plus utilisée à l'échelle des laboratoires d'extraction d'huiles essentielles (**Benkaci–Ali *et al.*, 2007; Hudaib and Aburjai, 2007**).

II-2.3. La composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent principalement à deux grandes familles des composés chimiques : le groupe des terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2013**).

- **Groupe des terpénoïdes.**

Ce sont des hydrocarbures aliphatiques. Il comprend des monoterpènes (10 atomes de carbone dans la molécule), des sesquiterpènes (15 atomes de carbone), des diterpènes (20 atomes de carbone)... Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiple de 5 atomes de carbone de formule générale $[C_5H_8]_n$. La molécule de base est l'isoprène (**Bakkali *et al.*, 2008**). Ils peuvent être saturés ou insaturés, cyclique ou acyclique. Ils peuvent également être accompagnés de leurs dérivés oxygénés: alcools, esters, éthers, aldéhydes, cétones, etc... (**Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2013**).

- **Groupe des composés aromatiques**

Une autre classe de composés volatils. Il s'agit des dérivés du phénylpropane. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres (**Bakkali *et al.*, 2008**).

II-3 Composés organiques non volatils (CONV)

Ce sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Proestos *et al.*, 2006**).

a- Les composés phénoliques

Les produits phénoliques des plantes sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester)(**Grayer and Harborne, 1994**). Les principales classes de composants phénoliques sont: les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (**Jean, 2009**).

b- les terpènes

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅ H₈) reconnue par Wallach dès 1887(**Lamarti et al., 1994**).

c- les alcaloïdes

Définis comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes ont une structure complexe. Leur atome d'azote est inclus dans le système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique significative ; pour certains auteurs, ils sont issus du seul règne végétal. Ils existent à l'état de sels et ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé (**Jean, 2009**).

4- Activité antimicrobienne des extraits des plantes

4.1. Les huiles essentielles comme agent antimicrobiens

Depuis l'antiquité, les huiles essentielles ont été considérées comme des agents antimicrobiens les plus efficaces dans les plantes (**Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2013**). De nombreuses huiles ont été définies comme des antibactériennes en raison de leur composition chimique et en particulier la nature des principaux composés volatils (**Cowan, 1999; Burt, 2004**).

4.1.1 Mode d'action antimicrobien des HE

Le mode d'action des huiles essentielles dépend des propriétés des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la bicouche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne (**Souza et al., 2006**). Cela peut entraîner un changement de conformation de la membrane, une inhibition de la respiration et

une altération des processus de transport ionique, une perturbation des protéines intégrées dans la membrane, aussi une inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN des protéines et des polysaccharides. Les constituants d'huile peuvent également traverser les membranes cellulaires, pénétrer l'intérieur de la cellule et interagir avec des sites intracellulaires critiques pour une activité antibactérienne (**Trombetta *et al.*, 2005**).

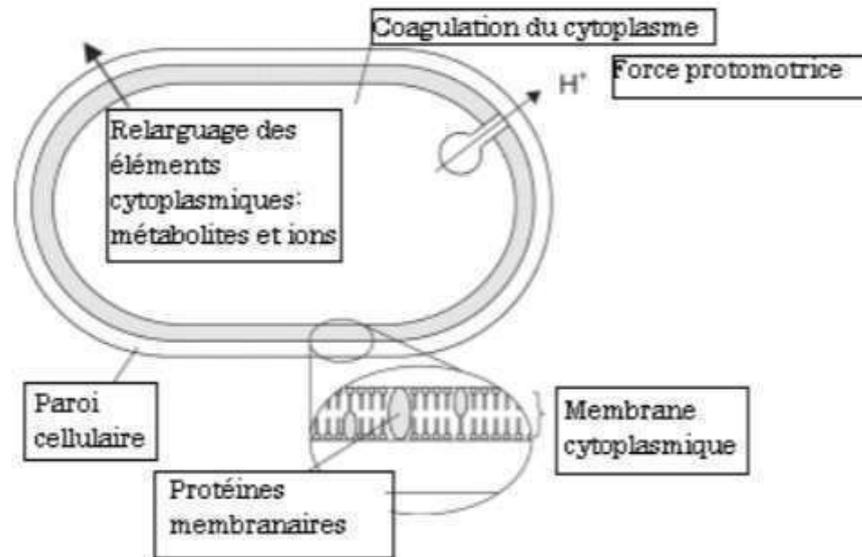


Figure (1): Action des huiles essentielles et de leur constituant sur la cellule bactérienne

(**Burt, 2004**)

4.2 Principaux composés phénoliques à pouvoir antimicrobien

La majorité des substances élaborées par les plantes ayant des activités inhibitrices des micro-organismes dont la plupart sont des phénols ou leurs dérivés dont au moins 12 000 ont été isolés, un nombre estimé à moins de 10% du total. Dans de nombreux cas, ces substances servent de mécanismes de défense des plantes contre la prédation par des microorganismes, des insectes et des herbivores. Certains, comme les terpénoïdes, donnent aux plantes leurs odeurs; Autres quinones et tanins. (**Cowan, 1999**).

5. Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles (HE) a été démontrée par de nombreuses méthodes (**Remmal *et al.*, 1993**), qui peuvent être classés dans des méthodes de dilution qui génèrent des résultats de concentration minimale inhibitrice CMI et des méthodes de diffusion de disque qui génèrent un résultat de diamètre de zone (**Jorgensen and Turnidge, 2015**).

5.1 Méthodes de diffusion d'agar

Dans le test de diffusion en gélose, l'huile essentielle à tester est placée sur une surface d'agar. Deux techniques existent: dans la première, l'huile essentielle est placée sur un disque papier; Dans le second, un trou est creusé en surface de gélose et l'huile essentielle est placée dans le trou (**Baser and Buchbauer, 2015**).

5.1.1 Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

La méthode de diffusion sur disque, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme mise au point par Schroeder et Messing en 1949. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues (**Bachiri et al., 2016**). Dans cette méthode, les disques de papier filtrant stérilisés de 6 mm sont saturés avec un extrait de plante stérilisé filtré de la concentration souhaitée. Les disques imprégnés sont ensuite placés sur la surface d'un milieu d'agar solide approprié comme Mueller Hinton. Les médias ont été pré inoculés avec des organismes d'essai. La taille standard de l'inoculum est de 1×10^8 UFC / ml de bactéries pour les plaques de diffusion d'inoculation qui est égale à la norme de turbidité McFarland 0.5. Certains chercheurs imprègnent le disque en papier avec l'extrait végétal avant de mettre les plaques inoculées tandis que d'autres préfèrent après. Les plaques sont ensuite incubées pendant 24 h à 37 ° C (bactéries) et 48 h à 25 ° C (champignons). Après l'incubation, le diamètre de la zone est mesuré au millimètre entier le plus proche au point où il y a une réduction importante de la croissance de 80% (**Das et al., 2010**).

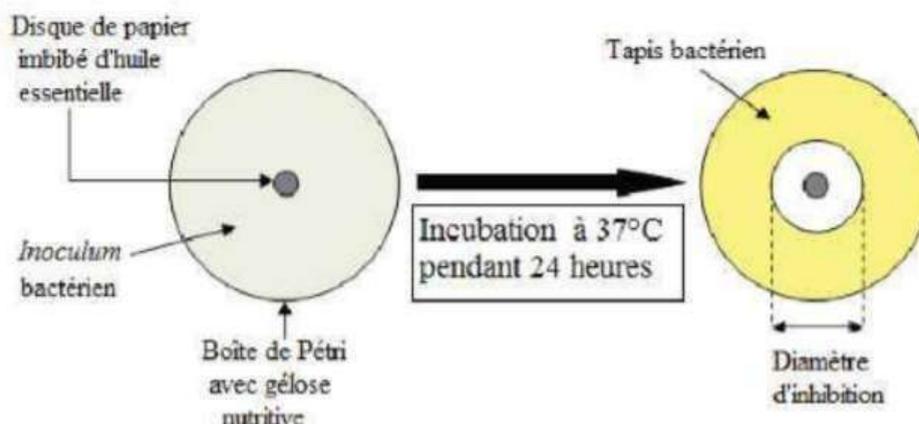


Figure (2) : Principe de la méthode de diffusion par disque (**Ganou, 1993**)

- **Intérêt de l'aromatogramme**

Il permet un choix judicieux, en adaptant la prescription d'essences à chaque syndrome infectieux. Il permet une aromathérapie véritablement sur mesure et appropriée à chaque cas particulier (**Gazengel and Orecchioni, 1999**).

5.1.2. Technique de diffusion en puits

Le principe de cette technique est similaire à celui de la diffusion sur disque. Elle consiste à creuser un trou de 6 à 8 mm de diamètre dans la gélose. Un volume fixe d'extrait végétal est ensuite introduit dans le puits d'agar perforé et incubé à une température et une durée optimales en fonction du microorganisme testé (**Das et al., 2010**).

5.1.3. Méthode de micro-atmosphère

Cette technique est rapportée par Allegrini et Simeon de Buochberg 1972. Elle consiste à cultiver les microorganismes à testés dans des boîtes de Pétri sur un milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (**Lahlou, 2004**).

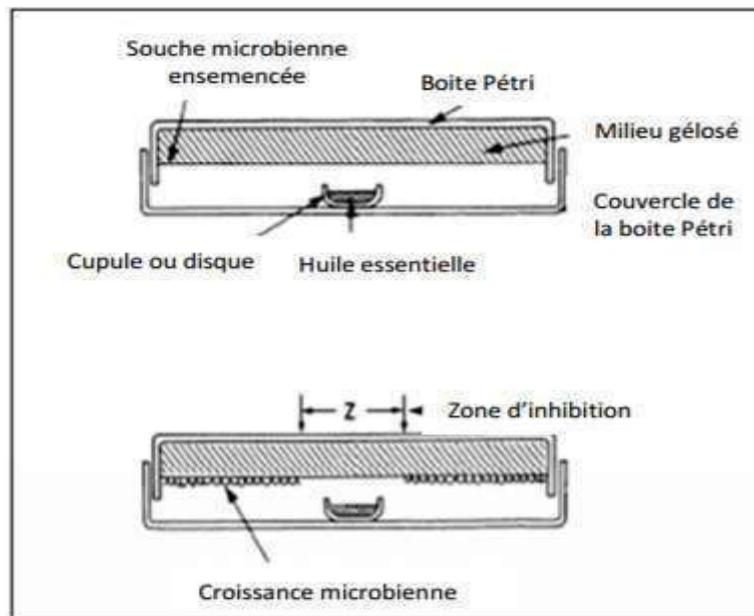


Figure (3) : Illustration de la méthode de Microatmosphère (Boukhatem et al., 2014)

6 La concentration minimale inhibitrice CMI

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration d'antimicrobiens qui inhibera la croissance visible des microorganismes après une incubation durant la 18-24 (Andrews, 2001). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories: "sensible" ; "résistante" ; "intermédiaire"(Genné and Siegrist Hans, 2003).

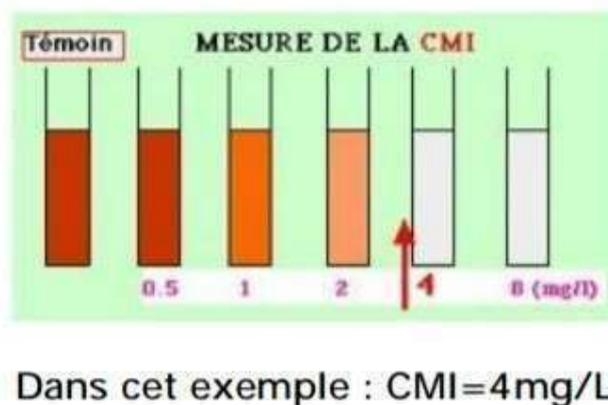


Figure (4) : méthode de détermination de la CMI

7. Méthodes de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de concentration minimales CMI d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure (Rios *et al.*, 1988) Car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution d'agar) ou dans le bouillon (la microdilution ou la macrodilution). Ces méthodes peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne in vitro contre les bactéries et les champignons (Balouiri *et al.*, 2016).

5.1. La dilution en bouillon

La technique standardisée de dilution en milieu liquide développée par le «comité national pour les normes de laboratoire clinique» NCCLS ou plus récemment nommé CLSI «Institut de normes clinique et de laboratoire» reste la méthode de référence la plus utilisée (Abbes *et al.*, 2011). La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes à

essai contenant un volume supérieur à 1,0 ml (habituellement 2 ml) (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration de 96 puits (microdilution) (Jorgensen and Turnidge, 2015).

5.1.1. La méthode de macrodilution

La méthode de macro-dilution était parmi les premières à être développée et sert toujours de méthode de référence. Le principe de base de ce dosage est le même que le dosage de la micro-dilution au bouillon. Mais le test est effectué dans des tubes à essai contenant des concentrations différentes de l'agent antimicrobien avec le même volume. Les tubes sont inoculés avec des microorganismes d'essai à des concentrations standard. Tous les tubes de dosage doivent être incubés pendant 18-24 h dans un incubateur d'air ambiant à 35-37 ° C. Après l'incubation, les tubes sont examinés pour détecter les changements de turbidité comme indicateur de croissance. La CMI de l'extrait de plante peut être déterminée par la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui inhibera la croissance visible du microorganisme testé (Schwalbe *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2010).

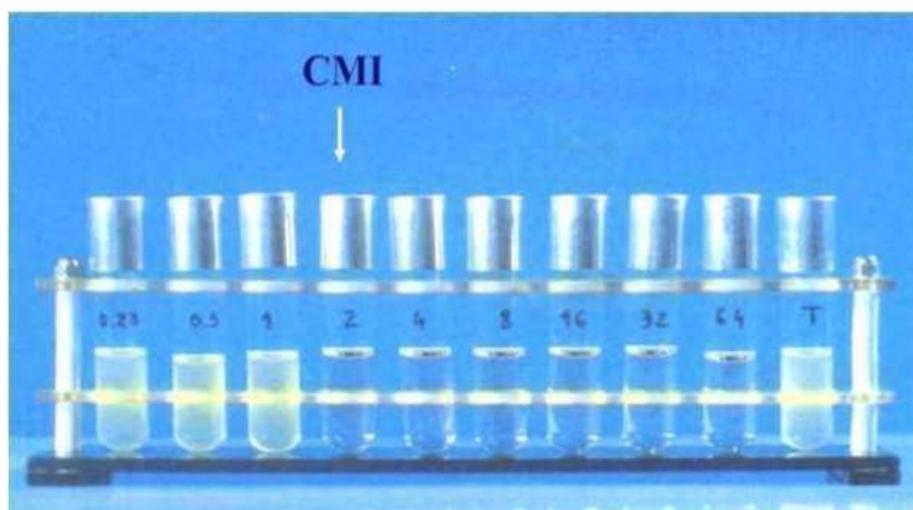


Figure (5) : Exemple de la détermination de la CMI par la méthode de macrodilution (Anonyme 1,2012)

5.1.2. La méthode de microdilution

C'est une méthode plus simple et plus économique que la méthode de macrodilution au bouillon. Elle est maintenant considérée comme la méthode internationale de test de sensibilité de référence (Schwalbe *et al.*, 2007). Cette technique repose sur l'utilisation d'un émulsifiant ou un solvant dans le milieu d'essai pour assurer le contact entre les microorganisme

d'essai et l'agent pour la durée de l'expérience. Les agents les plus utilisés sont tween 80, tween 20, éthanol et le DMSO. Après 18-24h d'incubation, la mesure de la turbidité peuvent être déterminés visuellement, ou par spectrophotométrie, soit l'utilisation d'un indicateur de viabilité cellulaire (eg : sels de tétrazolium ou le colorant de résazurine). (Wilkinson, 2006; Elshikh *et al.*, 2016).

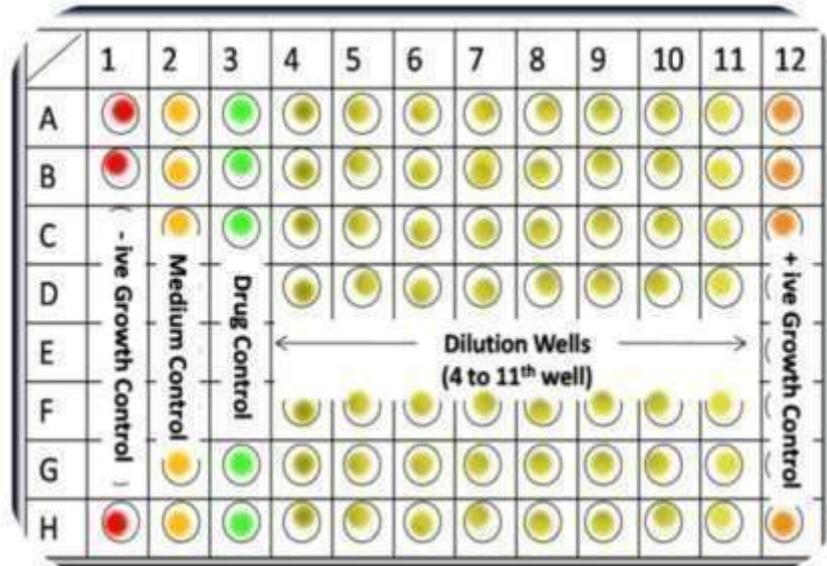


Figure (6) : Représentation graphique du protocole de micro-dilution de bouillon recommandé par CLSI (Pandey *et al.*, 2016)

- **Le test à la résazurine**

Le test de la resazurine, présenté par Mann et Markham en 1998, est un dosage unique de microdilution de bouillon approprié pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne et la détermination du CMI des huiles essentielles. Ce dosage utilise un stabilisant chimiquement et microbien inerte et un indicateur capable de prédire de manière fiable la CMI soit visuellement soit à l'aide d'un appareil spécifique (Baby and George, 2009).

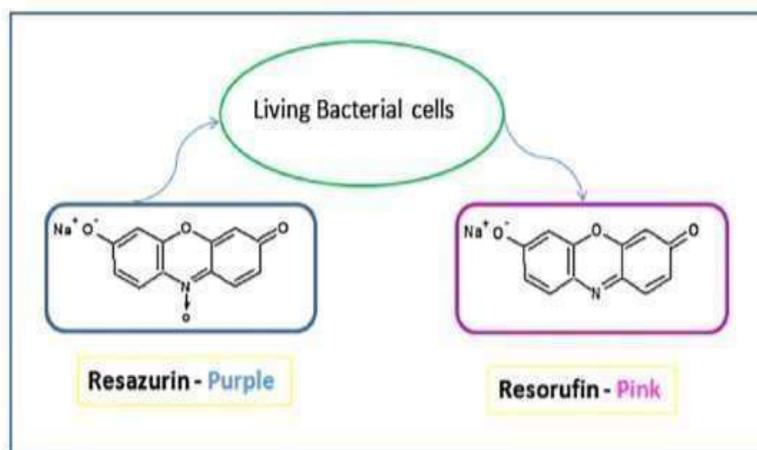


Figure (7) : Les cellules vivantes actives provoquent une réduction de la resazurine (violette) à la résorufin (rose-incolore) (Elshikh *et al.*, 2016)

La résazurine est un indicateur de réduction de l'oxydation utilisé pour l'évaluation de la croissance cellulaire, en particulier dans divers tests de cytotoxicité. C'est un colorant bleu non-fluorescent et non toxique qui devient rose et fluorescent lorsqu'il est réduit à la réduction des oxydoréductases dans les cellules viables (Sarker *et al.*, 2007).

5.2. La dilution en gélose

Cette technique a été effectuée par Baron et Bruckner 1984 pour déterminer la susceptibilité des bactéries anaérobiques à l'aide de la dilution d'agar (Rios *et al.*, 1988). Dans cette méthode, la substance d'essai est incorporée à des concentrations connues dans la gélose et, une fois définies, des bactéries sont appliquées sur sa surface. De cette façon, un grand nombre de bactéries peuvent être criblées dans une seule opération de dosage. Les boîtes sont incubées pendant 24 h ou plus et la croissance des bactéries sur le mélange extrait / agar est marquée soit présente ou absente. Les points finaux des CMI sont enregistrés comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance dans des conditions d'incubation appropriées (Wilkinson, 2006; Balouiri *et al.*, 2016).

5.3. La méthode de diffusion et de dilution

5.3.1. E-test

E-test est une technique basée sur la combinaison de deux concepts : diffusion du disque et de la dilution de gélose. Elle a été développée en Suède et présentée à la communauté scientifique lors de la conférence Interscience sur les agents antimicrobiens et la

chimiothérapie (ICAAC) en 1988. Elle consiste en l'application d'une bandelette imprégnée de concentration croissante d'un antibiotique sur un inoculum bactérien standardisé. Après 24h d'incubation, la CMI se lit à l'intersection entre la bandelette et la zone d'ellipse d'inhibition de la culture. Cette technique est réalisable au quotidien au laboratoire de bactériologie (Joly-Guillou, 2006; Schwalbe *et al.*, 2007).

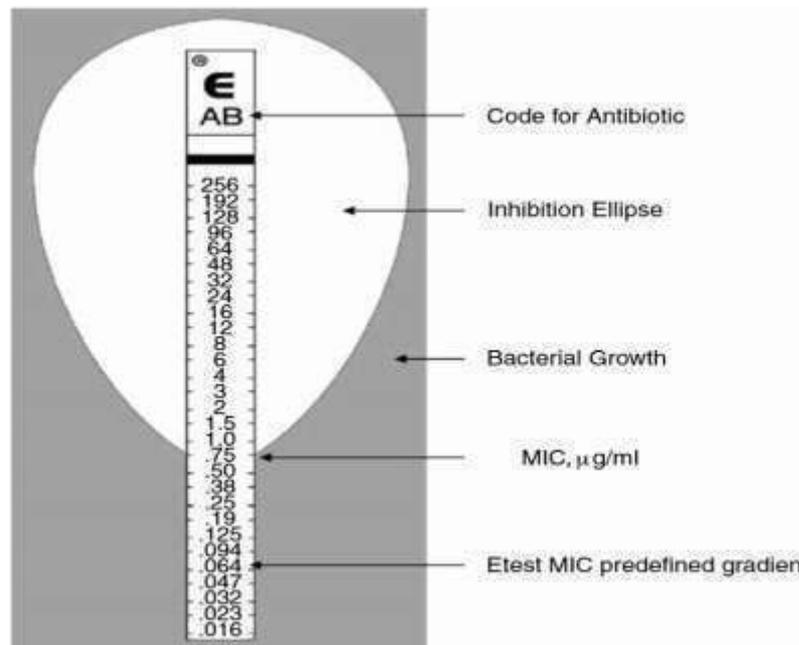


Figure (8) : Schématique Diagramme montrant la MIC à l'intersection de la croissance de l'organisme et de la bande d'étalonnage (Schwalbe *et al.*, 2007).

Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou-Bekr Bekaid-Tlemcen entre le 01/03/2017 et le 30/04/2017.

1. Matériels

1.1 Matériels biologique

1.1.2 Souches de référence

Dans cette étude quatre souches bactériennes de référence ont été choisies dont deux à Gram positif qui sont *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 et deux à Gram négatif qui sont *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.2 Matériels végétales

Dans notre travail nous avons utilisé les parties aériennes d'*Ammoides verticillata* qui ont subi des extractions pour l'obtention de l'huile essentielle. La récolte de la plante a été faite en Juin 2014. L'identification botanique a été faite en constituant un herbier et le déposant dans notre laboratoire et en consultant des botanistes du laboratoire Écologie de Gestion des Écosystèmes Naturels.

1.3 Les milieux de culture et les solvants

Pour les cultures bactériennes, nous avons utilisé les milieux liquides et solides suivants :

3.1.1 Milieux de culture liquides :

- Bouillon nutritif (BN)
- Bouillon de coeur de cerveau BHIB

3.1.2 Milieux de culture solides :

- Gélose nutritive
- Gélose Mueller Hinton
- Gélose Mac Conkey : c'est un milieu sélectif pour les bacilles Gram négatifs
- Gélose Chapman il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus aureus*

3.1.3 Produit chimiques et solvants :

- l'eau distillée stérile pour préparer les dilutions des huiles essentielles
- le Tween 80% : pour solubiliser l'huile essentielle
- le DMSO : Dimethyl sulfoxyde
- résaurine
- Violet de Gentiane
- Lugol

- Alcool et Fuchsine.

2. Les méthodes

2.1. Mode Obtention des huiles essentielles

Une quantité de plante (fleurs et tige) sèche est introduite dans un ballon de 2 litres contenant une quantité suffisante d'eau placé au-dessus d'une source de chaleur pendant 3h. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Ce procédé utilise l'appareil de type « Clevenger » qui est la technique la plus couramment utilisée à l'échelle des laboratoires d'extraction d'huiles essentielles. La conservation de l'HE s'est faite à 4 °C (Khadir *et al.*, 2013).



Figure (9) : L'appareil d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation « Clevenger »

2.2. Préparation de la suspension microbienne (l'inoculum), Repiquage et Conservation des souches

- **Revivification des souches**

On aensemencé 5ml de bouillon nutritif à partir des souches bactériennes conservées. Ces derniers sont incubés à une température de 37°C pendant 24h. Cette étape contribue à l'enrichissement et la revivification des souches.

□ **Repiquage**

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries de manière à obtenir des colonies isolées, puis incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. Cette étape permet la purification des souches bactériennes.

□ **Conservation des souches**

A partir des jeunes cultures (18-24h) sur bouillon nutritif, on aensemencé des tubes inclinés à l'aide de pipette pasteur, puis incubé 24h à 37°C. Après l'incubation, on ajoute 3ml de BHIB contenant 15 % de glycérol dans chaque tube après une agitation au vortex on la déposé 2ml dans un tube à eppendorf cette opération à été répété 3 fois donc pour chaque souche on a conservé 3 tube à eppendorf dans le congélateur à une température de - 4°C pour évité le risque de les perdre.

Remarque : le glycérol c'est un cryoprotecteur qui empêche l'éclatement des cellules pendant la conservation.

2.3. Tests de confirmation des souches

Les souches bactériennes utilisées : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* sont des souches déjà identifiées et référenciées. Nous avons vérifié leur pureté par quelques tests incluant :

2.3.1. Examen macroscopique

Il permet d'observer la taille, la forme, la couleur et l'aspect des colonies

2.3.2. Examen microscopique

□ **Etat frais**

Cette technique permet d'observer les bactéries à l'état vivant pour examiner leur morphologie et leur mobilité.

□ **Coloration de gram**

Cet examen permet d'observer la forme des bactéries (cocci, bacille, cocobacille) ainsi que le type de coloration de Gram positif ou négatif

2.4. Tests d'activité antimicrobienne

2.4.1 Criblage des huiles essentielles par la technique de l'aromatogramme

Un disque de papier filtre stérile (Whatman) de 6 mm de diamètre imprégné de 2 µl de l'HE brute à été déposé sur milieu Mueller-Hinton (MH) préalablement ensemencé à partir d'une suspension bactérienne de concentration équivalente $\approx 10^8$ UFC (DO = 0,1- 0.08 à 590nm).

Après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures, les résultats sont lus par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm).

La même méthode est utilisée pour tester l'huile seulement que le disque a été imbibé avec 4µl, 10µl de l'huile utilisée. L'expérience a été réalisée en trois exemplaires (**Khadir et al., 2016**)

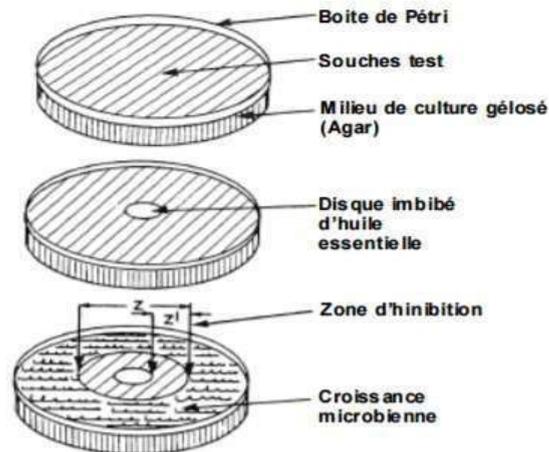


Figure (10) : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de pétri (**Boukhatem et al., 2014**)

2.4.2. Techniques de détermination de la CMI des huiles essentielles

2.4.2.1. Technique de macrodilution en milieu solide

Les CMI de l'HE extraite sur les souches étudiées ont été déterminées par méthode d'incorporation en milieu gélosé selon les recommandations du CLSI (**Benjlali and Ayadi, 1986; Kempf et al., 2011**). Une gamme de dilution a été préparée à partir d'une solution mère contenant 2 ml d'huile essentielle et de tween 80 dilués ensemble dans l'eau distillée. Les autres solutions filles contenaient déjà un mélange de Tween 80 – eau distillée (dans la même concentration que la solution mère), dans un volume total égalant à la moitié du volume total de la solution mère, pour garder la concentration de Tween 80 constante. Le contenu de chaque tube versé dans une boîte de Pétri stérile contenant 18 ml de gélose MH, après une agitation de 15 secondes laissé à refroidir près du bec benzène.

Ensuite, sur gélose Müller-Hinton on a ensemencé les souches préalablement préparée à une concentration $\approx 10^8$ UFC/ml (DO = 0,1- 0,08 à 590nm). Après incubation à 35 °C pendant 24h, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait.

2.4.2.2. Détermination de la CMI par la méthode de microplaque

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées à l'aide des plaques de microtitration à 96 puits. Une série de dilution d'huile essentielle à 1/2 a été préparée dans le bouillon Müller-Hinton en ajoutant le Tween 80 pour une concentration de 10 % (v/v) dans le but d'avoir une miscibilité totale de l'huile dans le bouillon. Une deuxième solution dite blanche a été préparée avec le bouillon Müller-Hinton et le Tween 80 avec une concentration de 10 %. Cette solution a été utilisée pour compléter les dilutions successives de la première solution qui contient l'huile essentielle et afin que la concentration de Tween 80 reste la même à 1 % dans les différentes concentrations préparées.

L'inoculum à 10^8 UFC/ml a été dilué à 1/1 00 pour avoir la concentration de 10^5 UFC/ml ensuite, 180µl de la suspension bactérienne à 10^5 UFC/ml a été déposé à l'intérieur des puits de la microplaque et on ajoute 20µl d'HE pour chaque concentration. On laisse deux rangées verticales représentent les témoins :

Les puits de la première rangée verticale sont remplis par 200 µl de bouillon Müller-Hinton comme premier témoin négatif. Les puits de la deuxième rangée verticale sont remplis par 200 µl de la suspension microbienne standardisée à 10^5 UFC/ml comme témoin positif.

Après incubation des plaques à 37 °C pendant 18- 24 h les CMI sont déterminées comme la plus faible concentration pour laquelle la croissance microbienne n'est pas observée à l'œil nu (**Khadir et al., 2013**).

2.4.2.3. Technique de CMI sur microplaque en utilisant le colorant fluoresçant résazurine

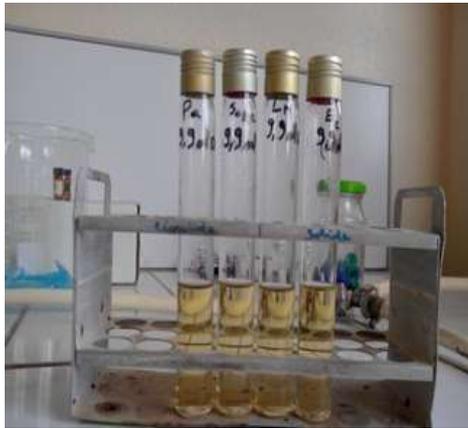
La détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles par la méthode de **résazurine** a été réalisée selon le protocole de (**Sarker et al., 2007**). 40% d'huile essentielle est dissoute dans le bouillon Müller-Hinton en ajoutant 100µl de DMSO pour une concentration de 10 % (v/v). Des dilutions successives ont été effectuées dans le milieu MHB contenant une concentration en DMSO de 10% (v/v). En microplaque, 160µl de la suspension bactérienne à 10^5 UFC/ml ont été déposés à l'intérieur des puits. Ensuite, 20µl de la solution de l'huile essentielle a été ajouté. Suivant, 10µl de résazurine ont été déposés dans chaque puits. Finalement, on laisse deux rangées verticales représentent les témoins : Les puits de la première rangée sont remplis par 160µl de bouillon Müller-Hinton et 10 µl de la résazurine représente le témoin négatif et les puits de la deuxième rangée sont remplis par 160 µl de la suspension microbienne standardisée à 10^5 UFC/ml et 10 µl de la résazurine comme témoin positif. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 heures.



La dilution d'huile essentielle A. V.



Standardisation des suspensions bactériennes (DO = 0.1-0.08)



Faire une dilution supplémentaire



Inoculation de la microplaque

Figure (11): Le Procédures de la méthode de microdilution aidée par résazurine

Résultats et discussion

1. Les résultats

1. 1. Extraction de l'huile essentielle

L'obtention de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a donné une huile très aromatique, liquide de couleur jaune foncée et de saveur forte et piquante de 4%.

2. Observation microscopique :

Tableau (1) : observation microscopique de 4 souches de référence

Les souches	La forme	La mobilité	Gram
<i>S. aureus</i>	sphérique	immobiles	positif
<i>L. monocytogenes</i>	bacilles droits	immobiles	positif
<i>E.coli</i>	Cocco bacille	Mobile	négatif
<i>p. aeruginosa</i>	droite	Mobile	négatif

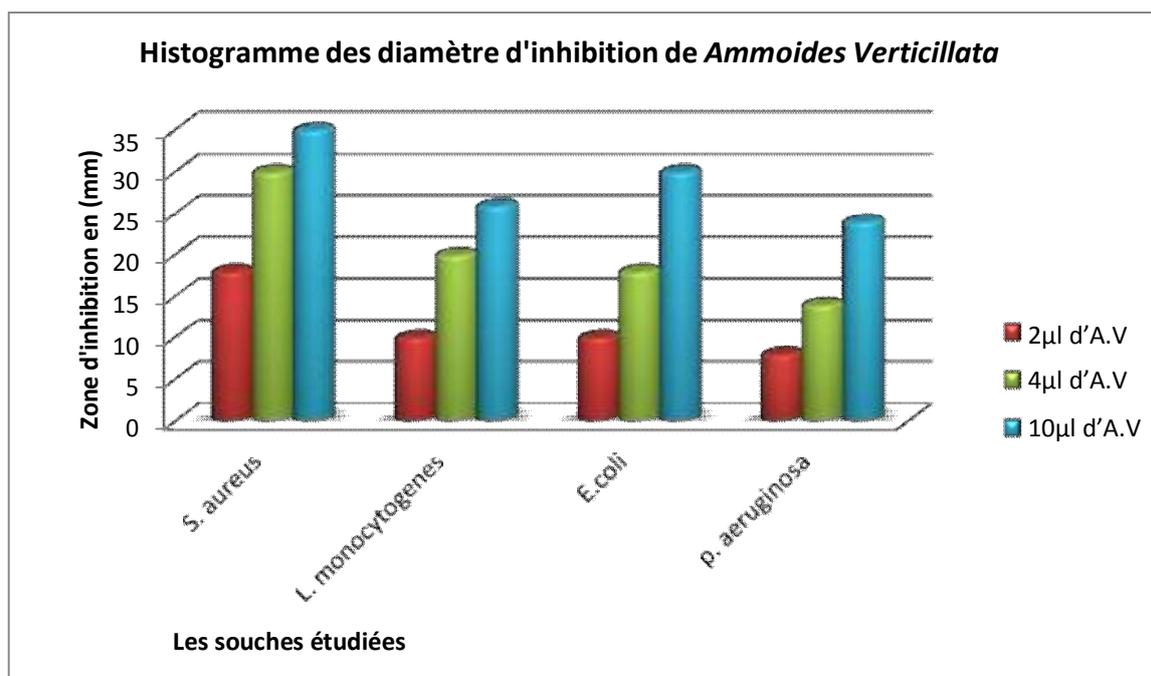
3. Résultats de l'activité antimicrobienne

Résultats de la méthode de diffusion sur gélose

L'activité antibactérienne de l'HE d'*A.V.* a été réalisée, in vitro, sur des souches bactériennes de référence. Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions sont présentés dans le tableau (02) et sous forme d'histogramme figure (12)

Tableau (2): Diamètre d'inhibition en (mm) provoqués par *l'Ammoides Verticillata*

Les souches	Quantité HE ($\mu\text{L}/\text{disque}$)		
	2 μl	4 μl	10 μl
pour les bactéries à Gram +			
<i>S. aureus</i>	18	30	35
<i>L. monocytogenes</i>	10	20	26
pour les bactéries à Gram -			
<i>E.coli</i>	10	18	30
<i>P. aeruginosa</i>	8	14	24



D'après les résultats ci-dessus on constate que l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a montré une activité inhibitrice sur toutes les souches de référence Gram positif et Gram négatif. Pour le volume de 2µl, les diamètres d'inhibition étaient faibles pour trois souches, avec des valeurs entre 8mm à 10mm, *P. aeruginosa* était la souche la plus résistante avec un diamètre de 8mm Par contre *S. aureus* ATCC 25923 était très sensibles avec un diamètre d'inhibition de 18mm.

Concernant le volume 4µl, les diamètres d'inhibition étaient moyens pour trois souches, avec des valeurs entre 14 et 30 mm, la souche. *P. aeruginosa* était toujours la souche la plus résistante avec un diamètre de 14mm alors que la souche de *S. aureus* ATCC 25923 gardait sa sensibilité avec un diamètre d'inhibition de 30 mm.

Des résultats similaires ont été obtenus par (Abdelouahid and Bekhechi, 2004) Qui ont étudié l'effet inhibiteur de l'HE d'*A. verticillata* sur *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *L. monocytogène* ATCC 19115.

Le volume 10µl a montré une augmentation de tous diamètres qui allait de 24 à 35 mm avec la même succession. Selon (Ponce et al., 2003) une huile donnant un diamètre supérieur à 20 mm signifie que la souche est excrément sensible et donc pour *S. aureus* le volume 2µl est suffisant pour observer l'activité antimicrobienne alors que pour les autres souches ce n'est pas le cas, *P. aeruginosa* est presque résistant avec 2µl alors que pour 4µl une sensibilité modéré

est apparue. Ces résultats montrent qu'il faut utiliser des volumes moyens autour de 4 μ l pour évaluer la sensibilité des souches aux huiles essentielle ou bien tester plusieurs volumes.



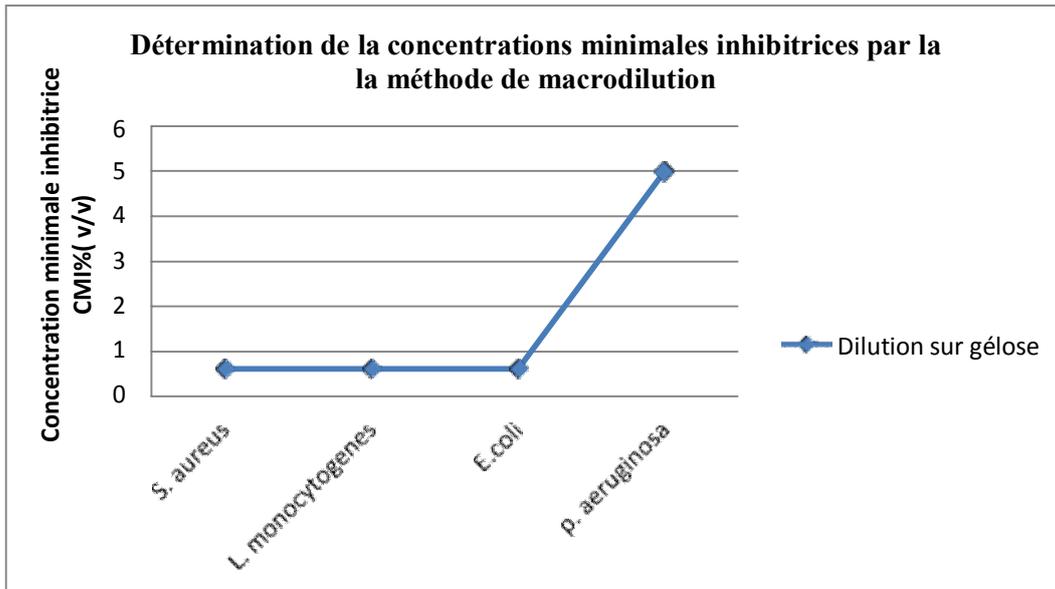
Figure (12): Effet d'*A. Verticillata* sur *E. coli*

Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'HE *A. Verticillata* vis-à-vis des souches étudiées sont présentés dans le tableau (03) et figure (13) et sous forme d'histogramme

Tableau (03): concentration minimale inhibitrice CMI obtenues par la méthode de dilution en milieu gélosé

Les souches	Concentration minimale inhibitrice CMI % (V/V)
pour les bactéries Gram +	
<i>S. aureus</i>	0.62
<i>L. monocytogenes</i>	0.62
pour les bactéries Gram -	
<i>E.coli</i>	0.62
<i>p. aeruginosa</i>	5



Pour les concentrations de 0.035%, 0.075%, 0.15% et 0.3% toutes les souches ont poussé, mais à 0.62% les souches *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 25923 sont toutes inhibées, ce qui indique que la CMI de ces dernières souches et de 0.62%. Tandis que *P. aeruginosa* ATCC 27853 put résister jusqu'à une concentration de 5% là où il y a une inhibition totale de celle-ci. Un exemple des résultats obtenus est montré dans la figure (13).



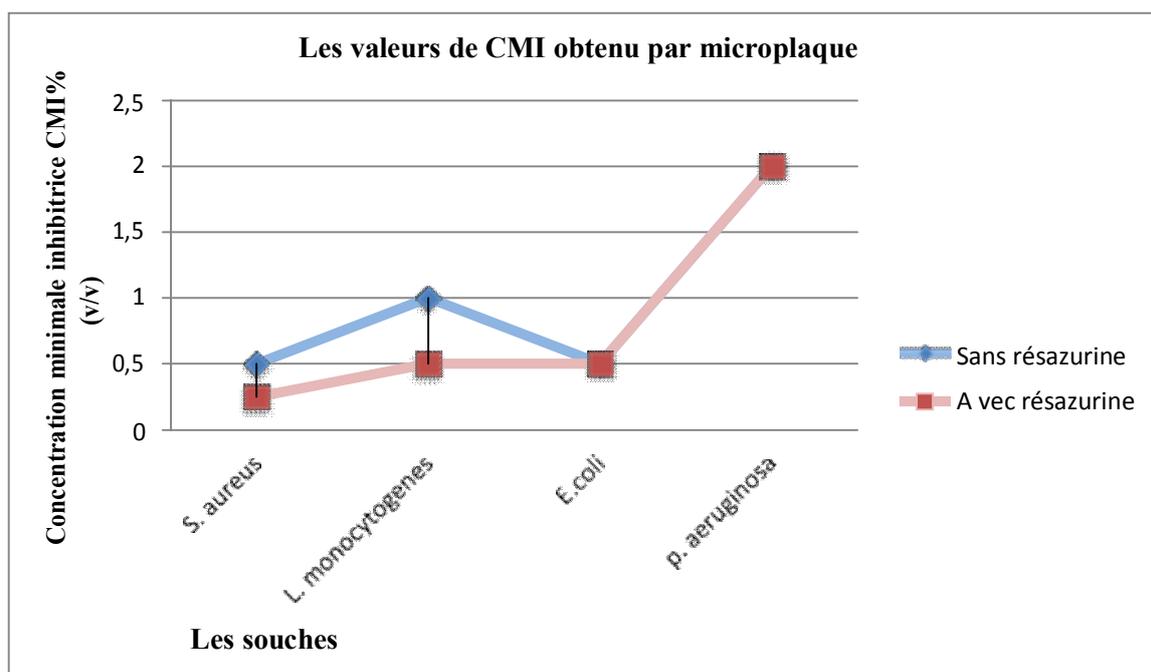
Figure (13) : Détermination de la CMI des souches étudié vis-à-vis d'*A. Verticillata* par la méthode de dilution en milieu solide

Détermination de la CMI sur microplaque

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des quatre souches de référence sont présentés dans le tableau (04) ainsi dans l'histogramme.

Tableau (04): Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices CMI obtenues sur microplaque

Concentration minimale inhibitrice CMI % (V/V)		
Les souches	Sans résazurine	Avec résazurine
pour les bactéries Gram +		
<i>S. aureus</i>	0.5	0.25
<i>L. monocytogenes</i>	1	0.5
pour les bactéries Gram -		
<i>E.coli</i>	0.5	0.5
<i>P. aeruginosa</i>	2	2



La méthode de microplaque nous a permis d'obtenir des valeurs de concentrations minimales inhibitrices qui était dans un intervalle compris de 0,25 jusqu'à 2% Avec résazurine et de de 0,5 jusqu'à 2% sans résazurine. *S. aureus* était l'espèce ayant la CMI la plus faible entre 0,25 et 0,5 % avec et sans résazurine respectivement, suivi par *E.coli* ou nous avons obtenus le même résultat 0,5 % avec et sans résazurine. Alors que pour la souche de *L. monocytogenes*

les valeurs obtenues étaient compris entre 0,5 et 1% et en fin nous avons obtenus la même valeur pour l'espèce *P. aeruginosa* qui était le l'ordre de 2%.

Lors de la méthode de microplaque sans résazurine nous avons fait la lecture grâce aux troubles de croissance en observant les puits qui nous a permis de déterminer la CMI (voir figure 14)

La nouvelle méthode de résazurine a montré une efficacité puisque elle est facile à lire, grace au colorant fluoresçant résazurine. Ce dernier il est non toxique pour les cellules bactériennes et il devient rose et fluorescent lorsqu'il y a une réaction oxydoréductases, en raison de la réduction d'oxygène et la production d'acide (voir figure 15) Les puits de couleur rose indiquent qu'il y a une croissance microbienne. Tandis que, les puits de couleur bleus indiquent qu'il y a une inhibition de la croissance microbienne (**Sarker *et al.*, 2007**).

Tous les bactéries testées dans cette étude ont réduits le résazurine et ont donné des points finaux nettement définis (CMI). Ces résultats presque identique avec la méthode de microdilution définie sans résazurine.

Un exemple des résultats obtenus est montré dans la figure (15)

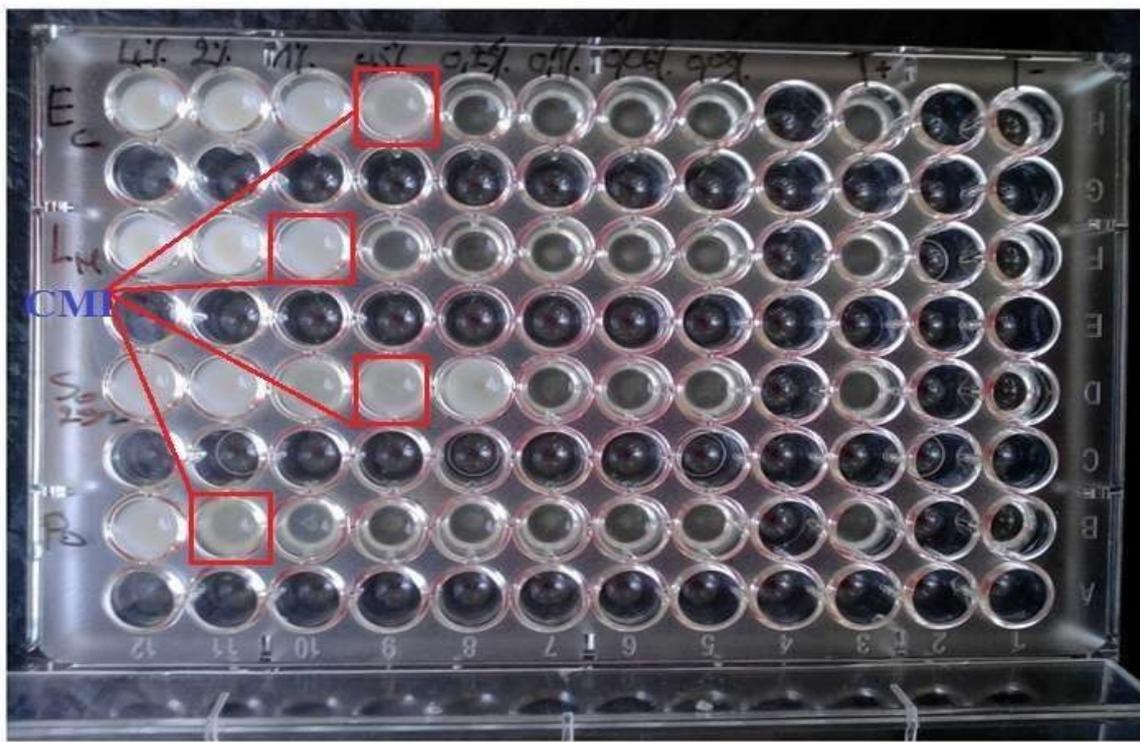


Figure (14):Résultats sur microplaque montrant les différentes dilutions testées de l'huile essentielle d'*A. V.*

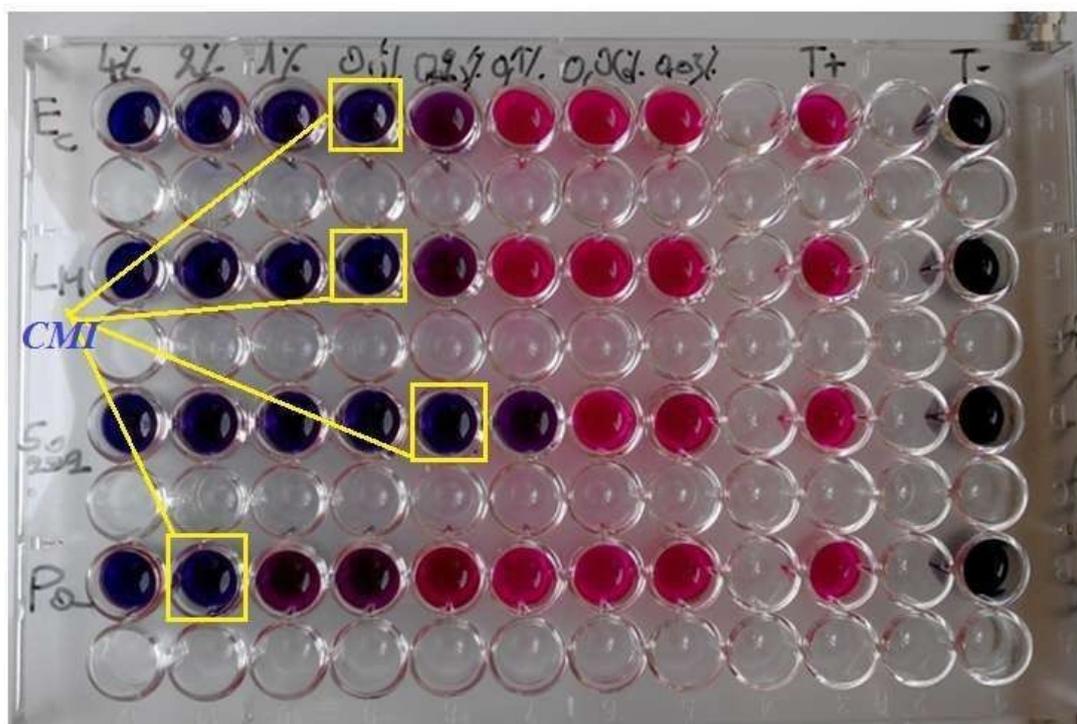
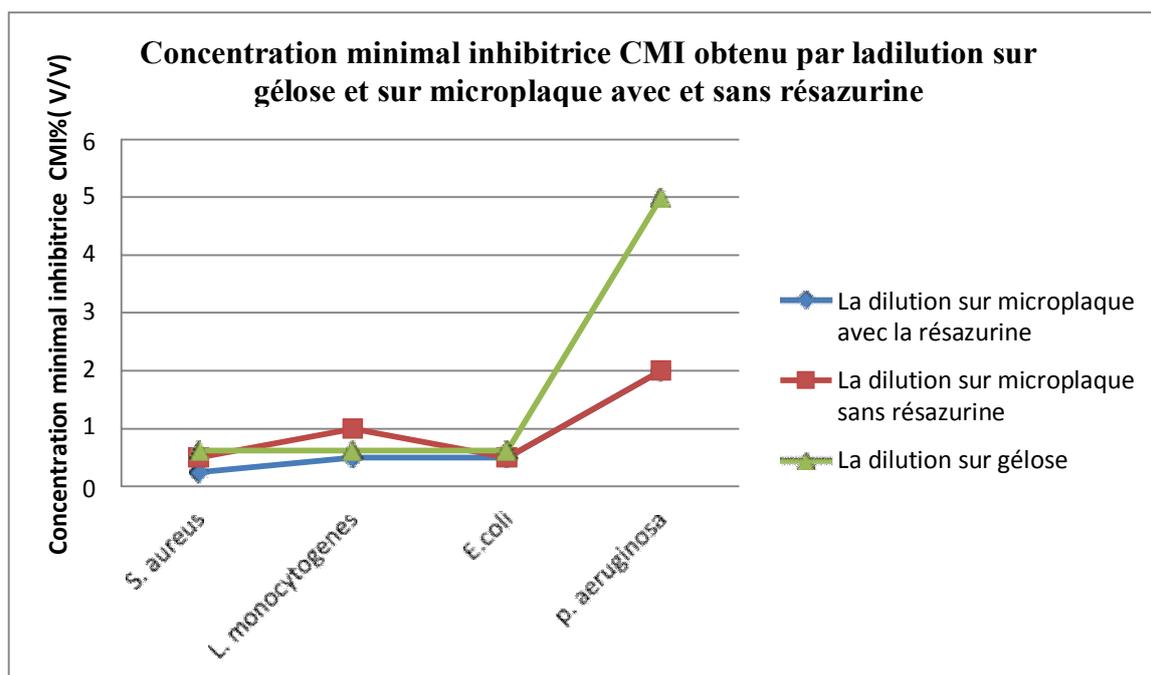


Figure (15): changement de couleur au niveau des puits de la microplaque en présence d'activité bactérienne sous l'effet de résazurine

Comparaison des différentes méthodes d'évaluation la concentration minimale inhibitrice des extraits des plantes

Tableau (05) : Comparaison des concentration minimale inhibitrice CMI obtenue par microplaque et sur gélose

Les souches	Concentrations minimales inhibitrices CMI (%v/v)		
	La dilution sur microplaque avec Résazurine	La dilution sur gélose	La dilution sur microplaque sans Résazurine
<i>S. aureus</i>	0.25	0.62	0.5
<i>L. monocytogenes</i>	0.5	0.62	1
<i>E.coli</i>	0.5	0.62	0.5
<i>p. aeruginosa</i>	2	5	2



D'après la comparaison entre les résultats des concentrations minimales inhibitrices des trois méthodes on constate que les valeurs des CMI déterminées par la méthode de la resazurine étaient systématiquement inférieurs à ceux qui obtenus par les autres méthodes. ce qui indique que la méthode de la résazurine est plus sensible que la méthode de dilution de la gélose. Tandisque les valeurs des CMI déterminé avec et sans résasurine sont presque identique.

C'est résultats peuvent être expliqués par le fait que l'une des raisons pour lesquelles il existe une relation d'accord modéré entre la dilution d'agar et la microdiution de bouillon lors de l'examen des CMI de HE est probablement que les solutions de HE ont un contact plus étroit avec les bactéries qui poussent dans les puits de la microplaque dans la méthode de microdilution au bouillon; Par conséquent, l'HE de *A.V.* pourrait inhiber la croissance bactérienne complètement et efficacement. En revanche, dans la méthode de dilution en agar, les bactéries ont été inoculées avec l'anse de platine, qui ne peuvent pas avoir un contact total avec le mélange d'HE et la gélose

2. Discussion

La technique de diffusion sur gélose est un bon moyen pour détecter la sensibilité d'une souche a une huile essentielle ou un autres extrait végétal, elle permet de tester plusieurs composés contre un seul microorganisme. Cependant l'ajout d'une autre méthode plus précise

telque la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est obligatoire car parfois l'extrait végétal ou l'huile essentielle a des polarités des composés naturels différentes qui peuvent affecter la diffusion des composés sur le milieu de culture (**Klančnik et al., 2010**) En raison de ces préoccupations, la diffusion du disque peut ne pas être appropriée pour déterminer l'activité antimicrobienne des composés naturels sans la détermination de la CMI.

Pour la détermination quantitative de l'activité antibactérienne sous forme de valeurs de concentrations, la méthode de dilution en agar est une bonne méthode qui évalue l'effet antimicrobien beaucoup mieux que la méthode de diffusion (**Klančnik et al., 2010**). L'avantage de cette technique c'est la dispersion des composants lipophiles des huiles essentielles dans le milieu de croissance grâce à l'addition d'un émulsifions le tween 80.

En plus, incluent la possibilité de tester simultanément la susceptibilité d'un certain nombre de souches dans une boîte, et la capacité de tester la sensibilité des organismes fastidiques puisque l'agar avec des suppléments est capable de soutenir adéquatement la croissance bactérienne. Aussi elle permet d'observer la croissance bactérienne sur la boîte de pétri et donc le résultat est plus clair que d'autres méthodes.

Les inconvénients majeurs du système de dilution de gélose sont associés aux tâches à forte intensité de main-d'œuvre consistant à préparer et à diriger le contrôle de qualité des boîtes contenant les agents naturels. De plus, en l'absence d'une interface informatisée pour l'analyse des données, comme c'est le cas des lecteurs de microplaques. (**Schwalbe et al., 2007**). Aussi, parmi les inconvénients de la méthode de la macrodilution ont été la tâche fastidieuse et manuelle de préparer les solutions d'agents antimicrobiens naturels pour chaque test, la possibilité d'erreurs dans la préparation des solutions antibiotiques et la quantité relativement importante de réactifs et d'espace requise pour chaque test (**Jorgensen and Turnidge, 2015**). En fin le grand problème qui se pose avec cette méthode de détermination de CMI, c'est le volume de l'agent antimicrobien naturel, puisque certains comme les huiles essentielles sont obtenues lors des extractions avec des volumes extrêmement infimes et par conséquent les tester avec des techniques nécessitant des grands volumes et quasiment impossible d'où la nécessité de chercher une autre méthode qui permet d'utiliser des petits volumes.

Contrairement à la méthode de CMI sur milieu gélosé, la CMI sur microplaque nécessite des petites quantités d'huiles essentielles. Parmi les inconvénients de cette technique, l'impossibilité de tester certaines huiles ayant des couleurs très sombres qui rend très difficile l'observation de la croissance microbienne.

La méthode de CMI sur microplaque contenant l'indicateur fluorescent résazurine semble une méthode prometteuse, car en plus des avantages de la technique de microplaque, elle a l'aptitude à distinguer facilement les puits possédant la croissance microbienne par le changement de la couleur de résazurine.

Conclusion générale

Conclusion

Ce travail décrit les principales méthodes utilisées dans l'évaluation de la concentration minimale inhibitrice des extraits de plantes; nous avons choisi la plante aromatique *Ammoides verticilata* du fait de sa disponibilité, son activité remarquable et aussi son rendement abondant. D'après les résultats obtenus, chaque méthode présente des avantages et des limites. La méthode de CMI sur milieu gélosé a montré une clarté des résultats comme nous pouvons observer directement la croissance microbienne sous forme de colonies, cependant cette technique présente deux limites claires c'est que le risque de contamination est élevé par rapport aux autres méthodes surtout si les boîtes de pétri contenant le Muller-Hinton ne sont pas bien séchées et aussi cette méthode ne nécessite des quantités énormes d'huiles essentielles ce qui n'est pas évident pour toutes les plantes comme certains ont des rendements d'huiles faibles.

La méthode de CMI sur microplaque a montré un avantage c'est que des petites quantités d'huiles sont utilisées dont l'avantage de cette méthode par rapport à la première qui consomme énormément d'huiles, cependant la lecture des résultats est un peu difficile surtout pour les débutants puisque les puits sont petits et l'observation de la croissance microbienne est délicate, aussi l'utilisation de twwen 80 engendre la formation d'une solution laiteuse ce qui gêne l'observation de la croissance microbienne. Parmi les inconvénients de cette technique on a aussi l'impossibilité de tester certaines huiles ayant des couleurs très sombres qui rend très difficile à observer la croissance microbienne.

La méthode de CMI sur microplaque contenant l'indicateur fluorescent résazurine semble une méthode prometteuse, car en plus des avantages de la technique de microplaque, elle a l'aptitude à distinguer facilement les puits possédant la croissance microbienne par le changement de la couleur de résazurine.

La détermination de la CMI est une étape indispensable pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne d'une substance, pour cela les chercheurs doivent utiliser les bons protocoles qui déterminent la CMI avec une bonne précision, moins d'erreurs et en obtenant des résultats reproductibles. Notre travail a permis une analyse des résultats obtenus par les trois méthodes utilisées et on recommande l'utilisation de la méthode de microplaque avec résazurine, car elle donne des résultats reproductibles et précis.

Références

Références Bibliographiques :

Abbes, S., Trabelsi, H., Amouri, I., Sallemi, H., Nej, S., Fatma, C., Makni, F., Ayadi, A., 2011. Methods for studying the in vitro susceptibility of *Candida* spp. to antifungals. *Annales de biologie clinique*, pp. 635-642.

Abdelmounaïm, K., Mourad, B., Fethi, B., Chafika, B., Djamel-Eddine, A., Alin, M., Julien, P., Jymy, D., Jean, C., 2013. Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants.

Abdelouahid, D., Bekhechi, C., 2004. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*. *Nûnkha*), *Biol et Santé* 4, 1-10.

Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 48, 5-16.

Anonyme 1. Site web : www.Microbe-edu.org/

Anonyme 2. (2010). <http://acnbh.org/arcs2011/antibiogramme-H-Chardon.pdf>.

Baby, S., George, V., 2009. Essential oils and new antimicrobial strategies. *New strategies combating bacterial infection*, 165-203.

Bachiri, L., Echchegadda, G., Ibjibjen, J., Nassiri, L., 2016. Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc: «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *European Scientific Journal*, ESJ 12.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology* 46, 446-475.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.

Baser, K.H.C., Buchbauer, G., 2015. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press.

Benkaci–Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2007. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour and fragrance journal* 22, 148-153.

Borris, R.P., 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of ethnopharmacology* 51, 29-38.

Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Taibi, H., Djamel, T., 2014. Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse [Potential application of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil as antibacterial drug in aromatherapy]. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 8, 1418.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.

Calixto, J., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 179-189.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12, 564-582.

Das, K., Tiwari, R., Shrivastava, D., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research* 4, 104-111.

Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., Banat, I.M., 2016. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology letters* 38, 1015.

Ganou, L., 1993. Contribution à l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles.

Gazengel, J.-M., Orecchioni, A.-M., 1999. *Le préparateur en pharmacie. Guide théorique et pratique*. 2ème.

Genné, D., Siegrist Hans, H., 2003. De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Med Suisse*, pp. 464-468.

Grayer, R.J., Harborne, J.B., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry* 37, 19-42.

Hudaib, M., Aburjai, T., 2007. Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan. *Flavour and fragrance journal* 22, 322-327.

Iserin, P., Masson, M., Restillini, J., 2001. *Larousse des plantes médicinales, identification, préparation et*. Jean, B., 2009. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.).

- Lavoisier.Jollois, R., Pénoël, D., Franchomme, P., Mars, J., 2001. L'aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles: fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Jollois.
- Joly-Guillou, M.-L., 2006. Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation* 15, 237-240.
- Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D., 2015. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. American Society of Microbiology, pp. 1253-1273.
- Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F., 2013. La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer Science & Business Media.
- Kim, S.H., No, H.K., Prinyawiwatkul, W., 2007. Effect of Molecular Weight, Type of Chitosan, and Chitosan Solution pH on the Shelf-Life and Quality of Coated Eggs. *Journal of food science* 72, S044-S048.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S.S., 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods* 81, 121-126.
- Lahlou, M., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy research* 18, 435-448.
- Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J., 1994. Biogénèse des Monoterpènes–II–La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 133, 79-99.
- Lang, G., Buchbauer, G., 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and fragrance journal* 27, 13-39.
- Laouer, H., Zerroug, M.M., Sahli, F., Chaker, A.N., Valentini, G., Ferretti, G., Grande, M., Anaya, J., 2003. Composition and antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 15, 135-138.
- Lardry, J.-M., Haberkorn, V., 2007. L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesithérapie, la revue* 7, 14-17.
- Mann, C., Markham, J., 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of applied microbiology* 84, 538-544.

- Mann, C., Markham, J., 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of applied microbiology* 84, 538-544.
- Pandey, M., Pandey, A., Kumar, R., Pathak, A., Dikshit, A., 2016. A Comparative antimicrobial analysis of *Tridax procumbens* L. various extracts on waterborne bacterial pathogens. *International Current Pharmaceutical Journal* 5, 22-26.
- Ponce, A., Fritz, R., Del Valle, C., Roura, S., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology* 36, 679-684.
- Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M., 2006. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry* 95, 44-52.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., Tantaoui-Elaraki, A., 1993. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research* 5, 179-184.
- Rios, J., Recio, M., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology* 23, 127-149.
- Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y., 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321-324.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C., 2007. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Crc Press.
- Small, E., Catling, P.M., 2000. *Les cultures médicinales canadiennes*. NRC Research Press.
- Soualeh, N., Soulimani, R., 2016. Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie* 14, 44-57.
- Souza, E.L.d., Stamford, T.L.M., Lima, E.d.O., 2006. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae) essential oil. *Brazilian journal of microbiology* 37, 527-532.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 2474-2478.

Wilkinson, J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs*, 157-171.

Wilkins, T.D., Thiel, T., 1973. Modified broth-disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 3, 350-356.

Annexe

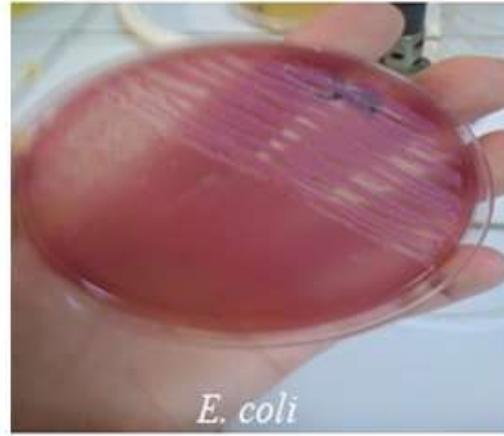
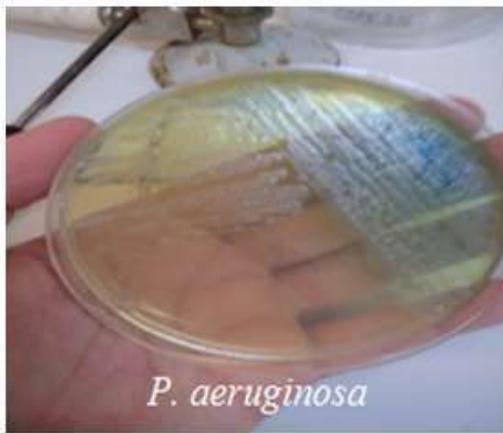


Figure : Aspect macroscopique des bactéries après 24h d'incubation



Figure : Effet d'*Ammoides Verticillata* sur les souches étudiées

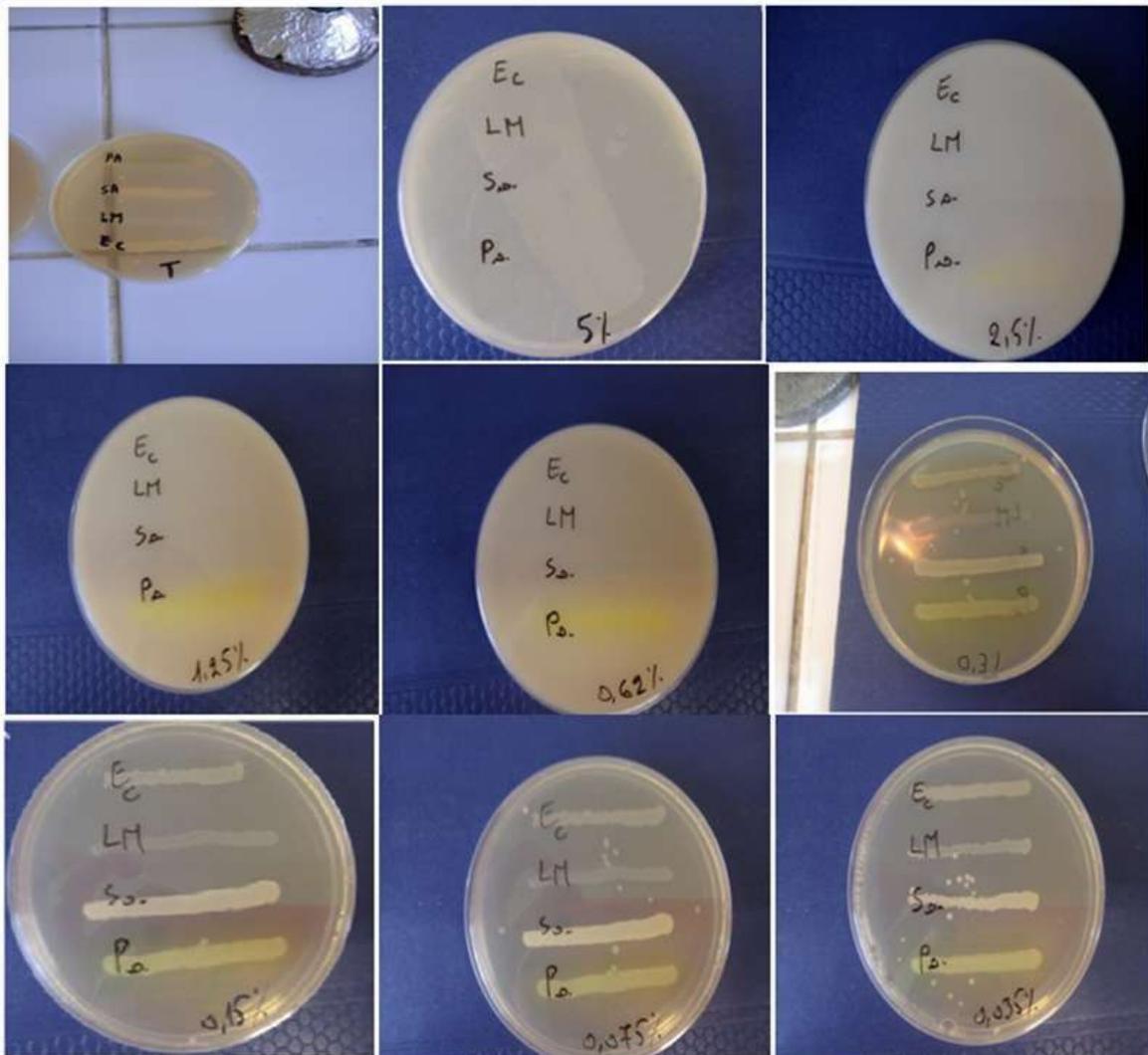


Figure : Détermination de la CMI des souches étudié vis-à-vis d'*Ammoides Verticillata* par la méthode de dilution en milieu solide

الملخص

العنوان دراسة مقارنة لبعض الطرق تقييم التركيز المثبط لأدنى للمستخلصات النباتية

في السنوات الأخيرة تزايد الاهتمام في البحث و تطوير عوامل مضادة للجراثيم جديدة من مصادر مختلف لمكافحة مقاومة الميكروبات و لذلك فقد تم منح عناية خاصة للطرق فحص و تقييم الأنشطة المضادة للميكروبات في دراستنا قمنا بتحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط للزيوت الأساسية *Ammoides Verticillata* بواسطة ثلاثة طرق أجار صفيحة بمفردها و صفيحة معالجة بريسازورين و أظهرت النتائج و المقارنة بين هذه الطرق الثلاث أن الصفيحة المعالجة بريسازورين هي أكثر الطرق فعالية

الكلمات المفتاحية الزيوت الأساسية ريسازورين التركيز المثبط الأدنى .

Résumé :

Titre : Etude comparative de quelques méthodes d'évaluation de la concentration minimale inhibitrices des extraits de plantes.

Au cours des dernières années, l'intérêt grandissant pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne. Par conséquent, une attention particulière a été accordée aux méthodes de dépistage et d'évaluation des activités antimicrobiennes. Dans notre travail nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle d'*Ammoides verticilata* par trois méthodes : sur gélose, sur microplaque et sur microplaque avec résazurine. Les résultats et la comparaison entre ces trois méthodes ont montré que la méthode de microplaque avec résazurine est la plus efficace.

Mots clés: l'huile essentielle, résazurine, la concentration minimale inhibitrice.

Abstract :

Title: Comparative study of some methods for the evaluation of the minimum inhibitory concentration of plant extracts.

In recent years, the growing interest in research and development of new antimicrobial agents from various sources to combat microbial resistance. Therefore, particular attention has been paid to methods of screening and evaluating antimicrobial activities. In our work we determined the minimal inhibitory concentration of the essential oil of *Ammoides verticilata* by three methods: on agar, on microplate and on microplate with resazurin. The results and the comparison of these three methods showed that the microplate method with resazurin is the most effective.

Key words: essential oil, resazurin, minimal inhibitory concentration.