



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun –Tiaret–

Faculté Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Filière : Sciences biologiques

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

**BELARBI Hayat**

**AKKOUSA Leila.**

**BARKAT Nihad Fadhila**

*Thème*

**Activité antimicrobienne du Poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalérate) (PHBV) incorporé de l'huile essentielle de clou de girofle**

**Jury :**

**Président : Dr. YEZLI. W**

**Examinatrice : Dr. BOUBKEUR .B**

**Encadrant : Dr. MEDJEBEUR .N**

**Grade :**

**MCA**

**MCA**

**MCB**

**Année universitaire 2021/2022**

## ***Remerciement***

*Nous tenons à remercier Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la Patience pour achever ce travail, et à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail en particulier à*

*Notre promotrice Mme « **MEDJEBEUR. N** » que nous remercions pour ça bienveillance, son aide, son soutien, et ces précieux conseils qui ont amélioré la réalisation de ce mémoire.*

*Nous remercions également les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer notre travail, tout particulièrement :*

***Dr «YEZLI. W »** pour accepter de présider ce jury.*

***Mme «BOUBKEUR. B »** d'avoir accepté d'être l'examinatrice de notre travail.*

*Nous exprimons ainsi notre profonde gratitude à;*

*L'équipe du laboratoire **Hygiène et pathologie animale l'université IBN- Khaldoun Tiaret** en particulier **Mme Leila, Mr Abdali Mustafa, Mr Doucene Radhouane, Mme Rachida** pour leurs aides et assistances.*

*En fin nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de  
Cet humble mémoire de fin d'études.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents pour leurs endurance, leur Amours, leurs sacrifices et leurs encouragements. Que ce Travail soit, pour eux, un témoignage de ma Profonde affection et tendresse*

*A mes frères Wadjih, Imad, Djawed*

*A ma sœur Hiba*

*A toute la famille Belarbi et Boukhtach*

*À mes collègues Nihad et Leila*

*A tous mes chères amies, Sara, Sadia, Ikram*

*À toute la promotion 2021/2022 de Master II « Biotechnologie Microbienne »*

*À tous mes professeurs qui m'ont soutenu et guidé tout au long de mon parcours Académique*

*Hayat*

## *Dédicace*

*Je remercie tout d'abord, Allah, le tout puissant et clément de m'avoir aidé à réaliser  
ce travail.*

*Je dédie ensuite ce fameux travail aux plus exceptionnels qui existent dans le monde*

*Mes parents,*

*Toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études Qu'Allah*

*Je les garde*

*Je dédie également à tous ceux qui m'aiment et spécialement*

*A mes chères frères*

*A toute ma familleAKKOUSSA et BOURAS sans exception.*

*À mes collègues Nihad et Hayat*

*Pour ma chère amie : ASMA HACHEMI*

*Enfin, je dédie ce travail à toute personne qui m'a aidé de le réaliser de près ou de*

*Loin Sans exception*

*Leila*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma chère mère*

*Le plus beau cadeau que le Bon Dieu m'a offert, Aucune dédicace ne serait été assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Elle a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. Qui est toujours un exemple pour moi, et qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les bonnes. Que dieu la garde et la protège.*

*A mes cher Frères Chamsseddin et Yacine.*

*A mes collègues Akkoussa Liela et Belarbi Hayat.*

*Je tiens également à dédier cette œuvre à tous mes collègues de biotechnologie microbienne promotion 2022.*

*A tous mes chers amis sur tous Asma et tous mes proches que j'aime.*

*A tous la famille Barkat et Medjeded*

*Et a tous ce que j'aurais oublié de citer mais Ils sont toujours présents dans mon cœur.*

*Nihad Fadhila*

# *Table de matières*

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

*Liste des abréviations*

*Introduction*

## *Chapitre I : MATERIEL ET METHODES*

1.	Objectif de travail .....	04
2.	Durée et lieu de travail.....	04
3.	Matériel et produit.....	04
3.1.	Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV).....	05
3.2.	Huile essentiel de clou de girofle .....	05
3.3.	Micro-organismes .....	06
3.3.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	06
3.3.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	06
3.3.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	07
3.3.4.	<i>Fusarium Oxysporum</i> .....	07
3.3.5.	<i>Aspergillus niger</i> .....	07
4.	Protocole expérimental.....	08
5.	Méthodes.....	09
5.1.	Préparation des films de PHBV.....	09
5.2.	Identification des micro-organismes.....	10
5.2.1.	Examen macroscopique.....	10
5.2.2.	Examen microscopique.....	10
5.2.3.	Identification biochimique.....	11
5.2.3.1.	Test Catalase.....	11

5.2.3.2. Test d'Oxydase.....	11
5.2.3.3. Test ONPG.....	12
5.2.3.4. Test d'indole.....	12
5.3. Préparation des suspensions bactériennes.....	13
5.4. Préparation des suspensions fongiques.....	13
5.5. Activité antimicrobienne.....	13

## ***Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION***

1. Identification des souches bactériennes et fongiques.....	15
1.1. Observation macroscopique .....	15
1.2. Identification microscopique .....	16
1.3. Résultats des tests biochimiques.....	19
1.3.1. Test catalase.....	19
1.3.2. Test d'oxydase.....	19
1.3.3. ONPG.....	19
1.3.4. Etude de l'uréase , indole et TDA.....	20
2. Activité antibactérienne de PHBV incorporé de HECG.....	20
3. Activité antifongique du PHBV incorporé de HECG.....	23

***Conclusion***

***Référence bibliographique***

***Annexes***

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau n°01</b> : Appareillage, verrerie et produits utilisés.....	<b>04</b>
<b>Tableau n°02</b> : Résultats d'identification des souches bactériennes.....	<b>20</b>
<b>Tableau n°03</b> : Diamètres des zones d'inhibition des trois souches étudiées (mm).....	<b>23</b>
<b>Tableau n°04</b> : Diamètre de la zone inhibitrice des deux souches fongiques (mm).....	<b>25</b>

## *Liste des figures*

<b>Figure n° 01:</b> Structure chimique de PHBV.....	<b>05</b>
<b>Figure n° 02 :</b> Huile essentiel de clou de girofle.....	<b>06</b>
<b>Figure n° 03 :</b> Schéma du protocole expérimental.....	<b>08</b>
<b>Figure n° 04:</b> Etapes de préparation d'un film de PHBV.....	<b>10</b>
<b>Figure n°05:</b> Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus niger</i> sur milieu PDA.....	<b>15</b>
<b>Figure n°06 :</b> Aspect macroscopique de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	<b>16</b>
<b>Figure n°07:</b> Aspect microscopique du <i>staphylococcus aureus</i> après la coloration de Gram.....	<b>16</b>
<b>Figure n°08:</b> Aspect microscopique du <i>Pseudomonas auruegenosa</i> après la coloration de Gram.....	<b>17</b>
<b>Figure n°09 :</b> Aspect microscopique d' <i>Escherichia coli</i> après la coloration de Gram...	<b>17</b>
<b>Figure n°10 :</b> Aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> (×40) et (×100).....	<b>18</b>
<b>Figure n°11</b> Aspect microscopique du <i>Fusarium Oxysporum</i> (×40).....	<b>18</b>
<b>Figure n°12</b> Résultat du test catalase.....	<b>19</b>
<b>Figure n°13 :</b> Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HECG sur <i>S. aureus</i> (E1, E2, E3).....	<b>21</b>
<b>Figure n°14 :</b> Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HECG sur <i>E. Coli</i> (E1, E2, E3).....	<b>22</b>
<b>Figure n°15 :</b> Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HECG sur <i>P. aeruginosa</i> (E1, E2, E3).....	<b>22</b>
<b>Figure n°16 :</b> Résultats de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HECG Sur <i>Fusarium oxysporum</i> .....	<b>24</b>
<b>Figure n°17 :</b> Résultats de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HECG sur <i>Aspergillus niger</i> .....	<b>24</b>

## *Liste des abréviations*

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	Peroxyde D'Hydrogène
<b>ONPG :</b>	Orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside
<b>PDA :</b>	Potato Dextrose Agar
<b>HECG :</b>	Huile essentiel de clou de girofle
<b><i>P.aeruginosa:</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b><i>F.oxysporum:</i></b>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b><i>E. coli :</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>A. niger :</i></b>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>PHA :</b>	Les poly (hydroxyalcanoates )
<b>PHBV :</b>	Le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)
<b>TDA :</b>	Tryptophane désaminase
<b>U. V :</b>	Ultra-violet
<b>GN :</b>	Gélose nutritif
<b>EMB :</b>	Eosin Methylene Blue
<b>HV :</b>	Hydroxyvalerate
<b>CH<sub>4</sub> :</b>	Le méthane

## ***Résumé***

Le Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV) est considéré comme un matériau d'emballage renouvelable, recyclable et biodégradable.

La présente étude vise à déterminer l'activité antimicrobienne du PHBV incorporé de l'huile essentielle de Clou de girofle par la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé contre trois souches bactériennes et deux souches fongiques.

Les résultats montrent que ces films incorporés de cette huile essentielle exercent une forte activité sur les champignons par rapport aux bactéries.

Les films contenant 20% d'HECG ont montré une grande activité antimicrobienne.

*S. aureus* ATTC25923 est la souche extrêmement sensible avec des zones d'inhibition de (0 - 15 mm), par contre une inhibition de (0-12mm) pour les souches *P. aeruginosa* ATTC9027 et *E. coli* ATTC25922.

L'activité antifongique des films testés a donné des résultats très intéressants, une zone d'inhibition maximale de 42mm a été obtenue avec la souche *F. oxysporum* en contact avec le PHBV20 (20%) et un diamètre d'inhibition de 36 mm pour la souche *A. niger* avec la même concentration.

**Mots clés :** Activité antimicrobienne, Zone d'inhibition, PHBV, Huile essentielle de clou de girofle

## ***Abstract***

Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) is considered as a renewable, recyclable and biodegradable packaging material.

The present study aims to determine the antimicrobial activity of PHBV incorporated with Clove essential oil by agar medium disc diffusion technique against three bacterial and two fungal strains.

The results show that these films incorporated with this essential oil exert a strong activity on fungi compared to bacteria.

Films containing 20% HECG showed high antimicrobial activity.

*S. aureus* ATCC25923 is the highly sensitive strain with inhibition zones of (0 -15 mm), compared to inhibition of (0-12mm) for *P. aeruginosa* ATCC9027 and *E. coli* ATCC25922.

The antifungal activity of the tested films gave very interesting results, a maximum inhibition zone of 42mm was obtained with the *F. oxysporum* strain in contact with PHBV20 (20%) and an inhibition diameter of 36mm for the *A. niger* strain with the same concentration

**Key words:** Antimicrobial activity, Zone of inhibition, PHBV, Clove essential oil.

يعتبر البولوي (3 - هيدروكسيبيترات - كو-3- هيدروكسيفاليرات ) مادة تغليف متجددة وقابلة لإعادة التدوير وقابلة للتحلل.

الغرض من هذه الدراسة هو تحديد النشاط المضاد للميكروبات لـ PHBV المدمج في زيت القرنفل العطري من خلال تقنية انتشار الأقراص على وسط أغار ضد بعض البكتيريا والفطريات .  
تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات للأغلفة البلاستيكية PHBV المدمجة من HECG ضد ثلاث سلالات بكتيرية وسلالتين فطريتين بطريقة انتشار الأقراص على وسط أغار .  
تظهر النتائج أن هذه الاغلفة البلاستيكية المضمنة من هذا الزيت العطري تمارس نشاطاً قوياً على الفطريات مقارنة بالبكتيريا.

أظهرت الاغلفة البلاستيكية التي تحتوي على 20% من HECG نشاطاً مضاداً للبكتيريا أكبر من تلك التي تم إعدادها بنسبة 10% و 5% و 2% HECG

*S. aureus* ATCC25923 هي سلالة حساسة للغاية مع مناطق تثبيط كبيرة من (0-15 مم). لوحظت فعالية منخفضة *P.aeruginosa* ATCC9027 (0-12 مم) و *E.coli* ATCC25922 (0-12 مم).

أثناء النشاط المضاد للفطريات، تظهر النتائج أن هذه الاغلفة البلاستيكية المضمنة في HECG تمارس حساسية أعلى مع جميع التركيزات التي تم اختبارها ، تم الحصول على أعلى منطقة تثبيط تبلغ 42 ملم على *F oxysporum* بنسبة (20%) PHBV20 وقطر تثبيط يبلغ 36 ملم بالنسبة لـ *A. niger* بنفس التركيز.

**الكلمات المفتاحية:** النشاط المضاد للميكروبات ، منطقة التثبيط ، زيت القرنفل العطري ، بولي(3- هيدروكسيبيترات - كو-3- هيدروكسيفاليرات)

# *Introduction*

Au cours des dernières années, les problèmes environnementaux sont de plus en plus préoccupants. En effet, les polymères principalement utilisés dans les emballages plastiques proviennent de sources non renouvelables et non biodégradables. La décomposition de matériaux nécessite des années et sont donc associés à des problèmes de pollution de l'environnement extrêmement complexes (**Olabarrieta *et al.*, 2001**).

Utiliser des polymères biodégradables est un moyen de limiter la pollution environnementale. Le développement de tels matériaux nécessite cependant des travaux de recherche, notamment pour améliorer leurs propriétés et les rendre plus conformes aux spécifications du matériau d'emballage.

Un polymère est une macromolécule constitué par enchainement d'un grand nombre de monomères liés entre eux par des liaisons covalentes. D'une manière générale le terme biodégradable s'applique aux polymères issus de ressources renouvelables ou non qui est définit comme la susceptibilité d'un matériau à se dégrader sous une activité biologique et qui va être décomposé progressivement en eau, CO<sub>2</sub> et/ou CH<sub>4</sub> et donnera lieu à l'apparition d'une nouvelle biomasse (**Ontanille et Ghanou, 2013**).

L'étude des biopolymères bactériens comme, les polyhydroxyalcanoates (PHAs) a été initiée en 1970 selon l'étude menée par Chen en 2009. Les PHAs ont tout de suite été abordé comme substituant du plastique conventionnel notamment dans les domaines les plus susceptibles comme la médecine et le secteur d'alimentation.

Les polyhydroxyalcanoates sont une famille de biopolyesters produits par de nombreuses bactéries stockés sous forme de source de carbone et d'énergie dans des vésicules intracellulaires. Pour de nombreuses bactéries, les PHA fournissent aussi une résistance contre la carence du milieu ou à l'apport insuffisant d'une ou de plusieurs substances nécessaires à leur croissance et équilibre, permettant ainsi aux bactéries de survivre dans les conditions les plus défavorables, le PHA est le seul bio polymère connu à ce jour pouvant être synthétisé dans un environnement peu exigeant.

La production de bioplastique de type PHA est considérée comme la plus simple parmi tous les autres bios polymères. De nombreux copolymères ont également vu le jour tel que le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)(PHBV) (**Verlinden *et al.*, 2007**).

Le plastique est principalement utilisé dans l'emballage alimentaire dont le but d'isoler les aliments de l'environnement extérieur et de les protéger contre la détérioration par des processus physiques (chocs, absorption d'odeurs, transfert de vapeur d'eau...), chimiques (ex : oxydation) et/ou biologiques (ex :

Contamination par des micro-organismes altérants ou pathogènes). Ces différents facteurs si ils ne sont pas maîtrisés, peuvent non seulement réduire la durée de vie des aliments mais aussi affecter la santé du consommateur lorsque les aliments sont contaminés par des micro-organismes potentiellement responsables de toxi-infections d'origine alimentaire (**CE 10/2011**).

L'altération rapide des produits par des microorganismes est devenue un problème croissant. Ainsi, pour préserver l'environnement, la qualité de la nourriture et la fraîcheur des produits, il est nécessaire d'identifier les matériaux optimaux, les conservateurs actifs et les technologies d'emballage innovantes. D'où l'émergence de l'emballage alimentaire actif comme solutions aux problèmes mentionnés (**CE 10/2011**).

Une bonne conservation des aliments est une exigence indispensable pour la sécurité du consommateur. Aujourd'hui, les efforts de recherche visant à améliorer les performances de l'emballage et l'environnement (**Conte et al., 2013**).

Les emballages passifs ont quatre fonctions principales : la sécurité des aliments, la protection, la praticité et la communication tandis que les emballages actifs offrent une protection active libérant en permanence des composés essentiels tels que des antioxydants, des agents antimicrobiens, des enzymes, des arômes et des produits nutraceutiques (**Jamshidian, 2011**).

L'emballage actif, grâce à ses concepts innovants et son interaction avec les aliments et l'environnement, prolonge la durée de conservation des aliments, préserve la saveur et réduit les niveaux d'additifs et de conservateurs dans les formulations alimentaires, tout en maintenant la qualité du produit.

Ainsi, la plupart des emballages actifs plastiques rencontrés dans la littérature permettent l'incorporation d'actifs synthétiques et artificiels dans leurs systèmes. Cependant, ces substances sont associées à une variété d'effets néfastes sur la santé humaine, parfois cancérigènes car elles migrent à travers les emballages alimentaires vers les aliments emballés, puis dans le corps du consommateur. Par conséquent, de nouvelles alternatives à partir de sources naturelles ont été étudiées, telles que l'utilisation d'huiles essentielles et d'extraits de plantes aromatiques et médicinales (**Ozdemir et Floros, 2004**).

L'emballage antimicrobien est un système qui peut tuer ou inhiber la croissance des micro-organismes et prolonger la durée de vie des produits alimentaires périssables et/ou renforcer la sécurité de ces produits (**Han, 2003**).

Les huiles essentielles et les extraits de plantes aromatiques et médicinales sont généralement considérés comme sûrs (GRAS) par la Food and Drug Administration des États-Unis. Ils ont été

Largement étudiés non seulement parce qu'il s'agit de produits naturels, mais aussi en raison de leurs propriétés biologiques, nutritionnelles prouvées et de leurs bienfaits pour l'alimentation et la santé humaine. En raison de leurs propriétés biologiques, ils ont été largement étudiés et développés. En général, les principaux composants bioactifs des huiles essentielles et des extraits sont principalement responsables de leur bio activité. Une variété d'huiles essentielles et d'extraits de différentes plantes aromatiques ont été utilisées dans la fabrication d'emballages alimentaires actifs.

Les principales causes de contamination microbienne des aliments sont : l'air, l'eau, la thermo soudure inadéquate, les déchirures ou les plis du matériau d'emballage. Des basses températures de stockage, de faibles niveaux d'humidité ou l'utilisation de conservateurs peuvent limiter la croissance microbienne (**Robertson, 2013**).

Les aliments peuvent être contaminés principalement par deux sortes de microorganismes, (Bactéries et champignons), qui se développent au détriment de ces aliments, en les rendant le plus souvent impropres à la consommation. Les microorganismes les plus répandus dans la contamination des aliments sont ; *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aerueginosa* , *Aspergillus Niger*, *Fusarium Oxysporum*.....

Notre travail a pour but d'étudier l'utilité de cette combinaison en associant le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) PHBV à l'huile essentielle de clou de girofle et déterminer si cette huile assure la protection nécessaire pour les aliments contre certains agents microbiens.

# *Chapitre I*

## ***MATÉRIEL & METHODES***

## 1. Objectif du travail

L'objectif de ce travail est de développer des films antimicrobiens à base de PHBV incorporés de l'huile de clou de girofle, dans le but de protéger l'aliment emballé de la détérioration microbienne et des dommages fongiques que peut subir l'aliment durant la période de conservation.

## 2. Durée et lieu de travail

Notre travail pratique a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche : Hygiène et pathologie animale l'université IBN- Khaldoun Tiaret, pendant une période qui s'étale du 22 février au 29 mars.

## 3. Matériel et produits

Plusieurs produits et matériels ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, ils sont récapitulés dans le tableau 01.

**Tableau n° 01 : Appareillage, verrerie et produits utilisés.**

Matériel laboratoire	Appareillages	Produits	Milieus de culture
Béchers	Agitateur magnétique	Eau distillée	Gélose nutritif
Flacons stériles	Autoclave	Disques ONPG	PDA
Lames	Bain marie	Disques Oxydase	Chapman
Pinces	Bec bunsen	Chloroforme	King A
Pipettes Pasteur	Etuve	Eau physiologique	EMB
Tubes à essai	Microscope	PHBV	Sabouraud
Boîtes de Petri	Vortex	Huile essentiels de clou de girofle	
Anse de platine	Spectrophotomètre	Eau oxygénée	
Seringues stériles	Centrifugeuse	Fuchsine	
Ecouvillons	Pied à coulisse	Lugol	
		Violet de gentiane	
		Gentamicine	

### 3.1. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV)

Le PHBV est un sujet de grand intérêt pour les chercheurs et les industriels pour plusieurs raisons, notamment son origine naturelle, sa biodégradabilité et sa biocompatibilité ( **Elain *et al.*, 2016**). Les propriétés du PHBV dépendent du rapport de masse des deux monomères. L'acide 3-hydroxybutyrique apporte de la rigidité, tandis que le 3- acide hydroxyvalérique favorisent la souplesse. Augmentation du rapport entre l'acide 3- hydroxybutyrate et l'acide 3-hydroxyvalérate provoquent la cristallinité (**Sudesh, *et al.*, 2000**).

Le PHBV utilisé dans cette étude se présente sous forme de granules de couleur beige, contenant 8 mol % de l'hydroxyvalerate (HV), commercialisé par Aldrich (Germany).

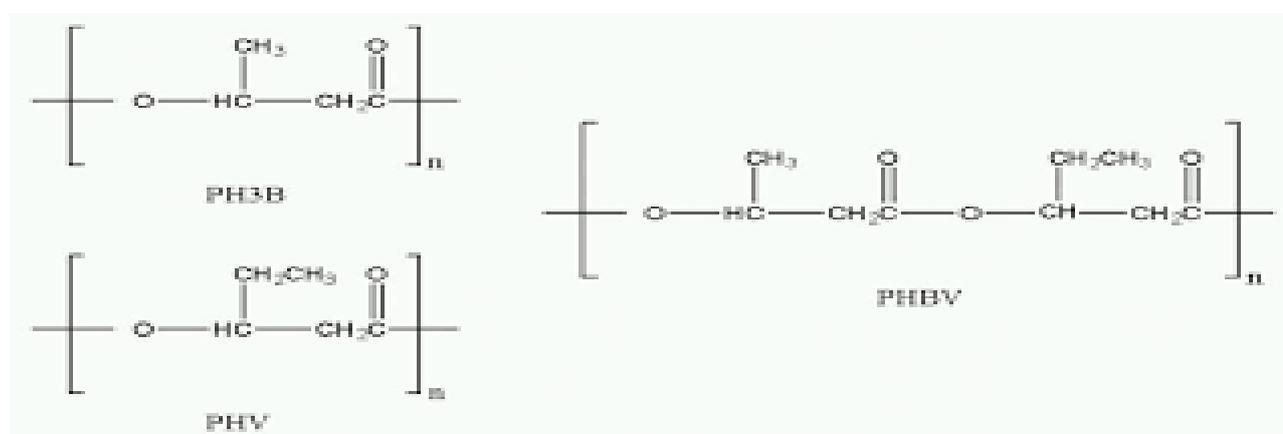


Figure n°1 : Structure chimique du PHBV

### 3.2. Huile essentielle de clou de girofle

Deux types d'huiles essentielles sont utilisées dans ce travail :

- Huile essentielle de clou de girofle Arkopharma Bio N° 13 France.
- Huile essentielle de clou de girofle Zeitipharm Algérie.



**Figure n°02** : Huile essentielle de Clou de girofle (A : HECG, Arkopharma Bio N° 13 France.  
B : HECG , Zeitipharm Algérie).

### 3.3. Micro-organismes

Dans cette étude trois espèces bactériennes et deux espèces fongiques ont été étudiées il s'agit de :

#### 3.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Autrement connu sous le nom de Bacille pyocyanique, est une bactérie à Gram négative aérobie stricte, ubiquitaire, Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire saprophyte et naturellement résistante aux antibiotiques, *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste, très résistante, se distingue par sa grande adaptabilité aux différentes contraintes environnementales (Léon et Michel. 1990).

#### 3.3.2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4  $\mu\text{m}$  de long. C'est une bactérie fine et allongée à extrémité arrondie, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe, non exigeant sur gélose ordinaire, il donne des colonies lisses, brillantes et homogènes. Sa température de croissance optimale est de 37 °C (Oulymata, 2007)

#### 3.3.3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est une bactérie très fréquente à l'état commensal et pathogène chez l'homme, appelé Staphylocoque. C'est une bactérie Gram positive de forme sphérique arrondie regroupées en amas.

### 3.3.4. *Fusarium oxysporum*

L'espèce *Fusarium oxysporum* est bien représentée parmi les communautés de champignons telluriques dans chaque type de sol dans le monde. Cette espèce est aussi considérée comme un constituant normal des communautés fongiques de la rhizosphère des plantes (**Burgess, 1981 ; Gordon et Martyn, 1997**).

Toutes les souches de *F. oxysporum* sont saprophytes et capables de croître et de survivre pendant de longues périodes sur la matière organique du sol et de la rhizosphère de nombreuses espèces végétales (**Garrett, 1970**).

### 3.3.5. *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* est l'un des plus importants micro-organismes utilisés en biotechnologie. Il a été utilisé en fermentation industrielle pour produire de l'acide citrique et gluconique ou des enzymes. *A. niger* est généralement considéré comme un champignon non pathogène largement répandu dans la nature (**Schuster et al., 2002**). La souche utilisée elle a été fourni par le laboratoire de microbiologie faculté SNV Tiaret.

#### 4. Protocole expérimentale

Le diagramme suivant représente les différentes étapes de notre étude.

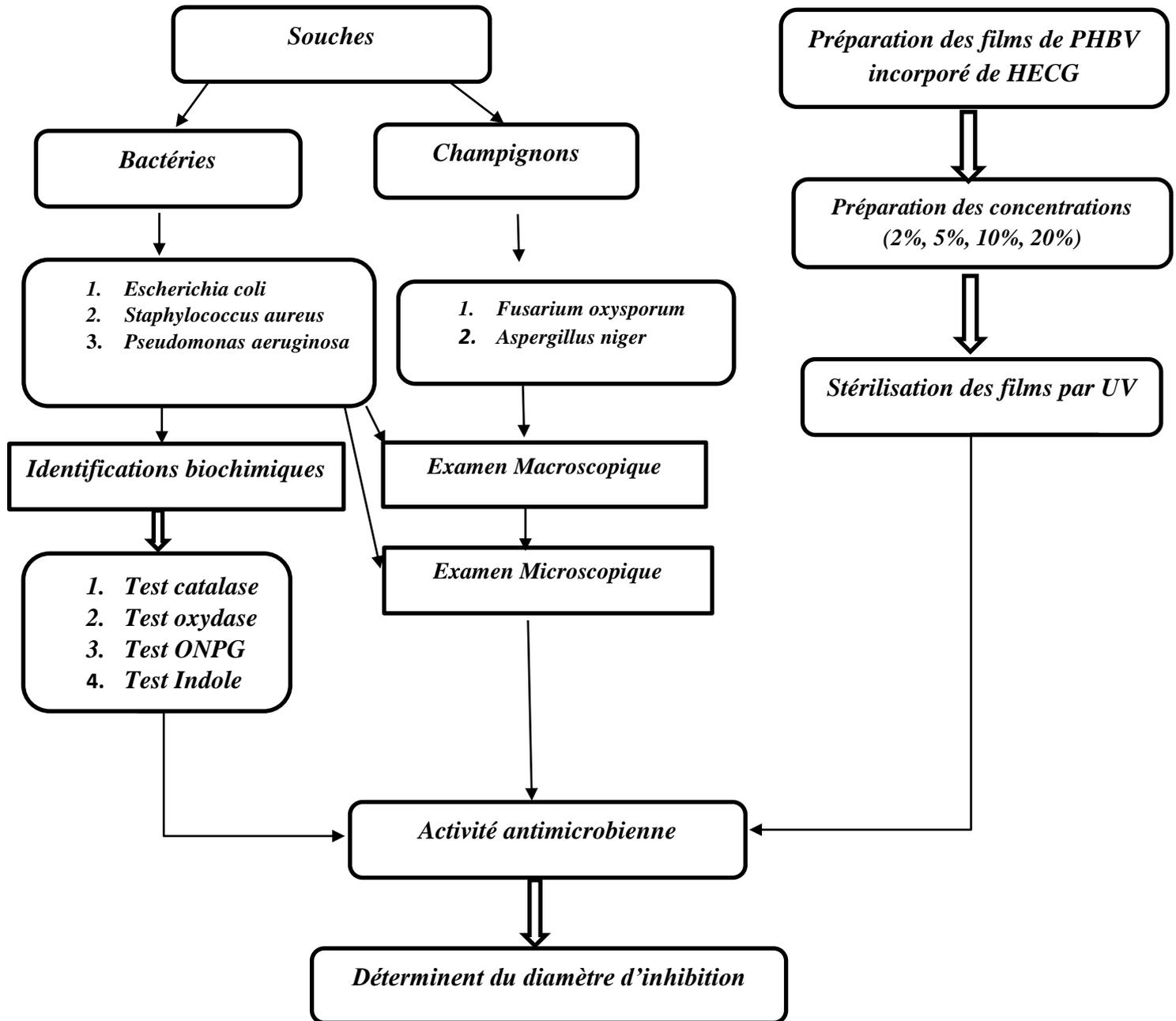


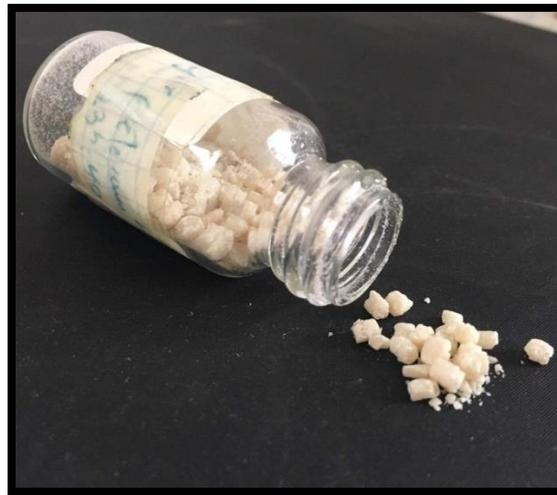
Figure n°03 : Schéma du protocole expérimental.

### 5. Méthodes

#### 5.1. Préparation des films de PHBV

La préparation des films de PHBV a été réalisée par la technique de dissolution dans un solvant, elle consiste à faire dissoudre les particules de PHBV dans le chloroforme. Pour cela, il faut diluer 5g de PHBV dans 100 ml de chloroforme, recouverte par du papier aluminium pour minimiser l'évaporation du solvant puis homogénéiser sous agitation magnétique dans un bécher à une température de 60°C. La solution obtenue a été filtrée, partagée, puis différentes concentrations (2%, 5%, 10%, 20%) d'huile essentielle de clou de girofle Arkopharma Bio N° 13 ont été ajoutées et agitées afin d'étudier l'activité antibactérienne. Et des concentrations de (5%, 10%, 20%) d'huile essentielle de clou de girofle de Zeitipharm ont été préparées pour étudier l'activité antifongique. Les mélanges obtenus sont versés dans des boîtes de Petri en verre. Ces dernières sont recouvertes de papier aluminium perforé et laissées pendant 72h (temps nécessaire à l'évaporation du solvant et formation d'un film fin et sec).

Les films de PHBV incorporés de l'huile de clou de girofle, une fois formés, ont été rangés et mis au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation pour les conserver et éviter toute réaction de photo-oxydation (Altaee *et al.*, 2016).





**Figure n°04** : Etapes de préparation d'un film de PHBV

## 5.2. Identification des micro-organismes

Afin de confirmer les souches microbiennes utilisées, certains tests microbiologiques ont été effectués.

### 5.2.1. Examen macroscopique

En observant l'aspect macroscopique des colonies, il est possible de réaliser la première orientation des résultats vers la caractérisation et l'identification, en tenant compte des critères suivants : la taille, la forme et la couleur des colonies (**Larpent, 1997**).

### 5.2.2. Examen microscopique

Pour s'assurer de la pureté des bactéries, nous avons utilisé la coloration de Gram. Cette technique permet de distinguer les bactéries Gram-positives et Gram-négatives en fonction de la structure chimique de la paroi cellulaire. On peut également voir la forme des bactéries (Bacilles,

cocci, etc....), le mode de leur regroupement (regroupement sous une forme unique ou différente) et la présence de spores intracellulaires dans le cas des bactéries sporogènes (Clair, 2007).

Dans le cas des champignons, il suffit d'utiliser la technique du drapeau pour observer la structure du mycélium et la morphologie des spores. Pour cela, il faut placer un morceau de scotch sur la culture de champignons à identifier, la fixer sur une lame et l'observer directement avec un microscope optique. (Chabasse, 2002)

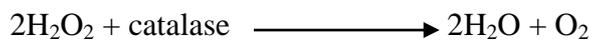
### 5.2.3. Identification biochimique

#### 5.2.3.1. Test Catalase

##### *Principe*

Ce test permet de détecter l'enzyme bactérienne, la catalase. Il aide également à distinguer les bactéries aérobies et anaérobies obligatoires, car les anaérobies sont généralement connus par l'absence de la catalase. Cette enzyme permet de neutraliser l'effet bactéricide du peroxyde d'hydrogène.

La catalase favorise la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène



Cette réaction est mise en évidence par la formation rapide de bulles (Karen, 2010).

##### *Technique*

- ✓ Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame propre.
- ✓ Déposer à l'aide de l'anse de platine une colonie isolée de la souche à tester.
- ✓ Observer l'apparition des bulles, (Le dégagement de gaz se traduit par la formation des bulles d'air sous l'action de l'enzyme à tester) (Leyral et vierling, 2007)

#### 5.2.3.2. Test d'Oxydase

##### *Principe*

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : **la phénylène diamine oxydase** des bactéries. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactive (le N- diméthyle paraphénylène diamine) (Guillaume, 2004).

##### *Technique*

- ✓ Placer un disque d'oxydase sur une lame et imbibé avec une goutte d'eau distillée stérile.
- ✓ Avec l'anse de platine déposer une colonie sur le disque.

- ✓ La lecture après 30 secondes ;( Le changement de couleur indique le résultat positif, si le disque prend une couleur violette, l'oxydase est positive, si le disque reste incolore l'oxydase est négative).

### 5.2.3.3. Test ONPG

#### *Principe*

L'O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) est structurellement similaire au lactose (c'est un analogue du lactose), sauf que l'orthonitrophényl a été remplacé par le glucose. Lors de l'hydrolyse sous l'action de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, l'ONPG se scinde en deux radicaux, le galactose et l'ornitrophénol, ce dernier donne une couleur jaune, fournissant une preuve visuelle de l'hydrolyse (**AL-Thobaiti et al., 2021**).

#### *Technique*

Les souches sont mises en suspension dans des tubes contenant 2ml d'eau physiologique stérile, un disque d'ONPG est mis dans la suspension. La coloration jaune traduit l'hydrolyse d'ONPG après incubation à 37°C pendant 24 à 48h (**Guiraud, 1998**).

### 5.2.3.4. Test d'indole

#### *Principe*

Le milieu urée-indole est un milieu qui permet de réaliser un ensemble de tests utilisé dans l'identification des bactéries.

#### *Technique*

- ✓ A partir d'une culture pureensemencer à l'aide d'une anse de platine stérile le milieu urée-indole par une colonie bactérienne, cette étape est suivie par une incubation à 37°C pendant 24h. Une lecture directe de l'uréase, enzyme hydrolysant l'urée se traduit par une coloration rouge due à une alcalinisation du milieu
- ✓ Après la lecture de l'urée, on procède à la lecture de l'indole sur le même tube. L'indole produit est révélé par le réactif de Kovax , si l'espèce bactérienne est indole + ; un anneau rouge apparait à la surface du milieu , si elle est indole - ; il y un anneau jaune ou le milieu demeure inchangée.
- ✓ La présence de tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par addition de perchlorure de fer qui provoque une coloration brune rouge du milieu en cas de réaction positive ( **Boussena, 2020**).

### 5.3. Préparation des suspensions bactériennes

Les suspensions bactériennes utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne sont standardisées à (0,5 Mc Farland) qui correspond à une concentration de  $10^6$  à  $10^7$  germe/ml et une densité optique comprise entre (0,08 et 0,1), ont été préparées (**Piton et Fontanier, 1990**). Pour cela, chaque culture bactérienne doit êtreensemencée sur gélose nutritive et incubée à 37 °C pendant 24h pour obtenir des colonies isolées. Prélever 4 à 5 colonies et les transférer dans un tube d'eau physiologique puis préparer les dilutions et mesurer la densité optique à 625 nm à l'aide d'un spectrophotomètre ; choisir la dilution correspondant à la concentration bactérienne désirée (**kouame, 2011**).

### 5.4. Préparation des suspensions fongiques

Pour la préparation de la suspension fongique, des cultures de champignons de 72h ont été utilisées. En premier lieu les cultures fongiques ont été émergées par l'eau physiologique stérile, ensuite les mycéliums sont raclés de la surface du milieu de culture, le tout est mis dans un bécher stérile. Cette solution a été centrifugé, le surnageant a été récupéré. Ensuite des suspensions dilutions de spores sont préparées à partir de cette solution. La suspension fongique choisit doit être d'une concentration de  $10^6$  spores/ml, qui correspond à une densité optique de 0.06 à 0.13 à une longueur d'onde de 630nm (**saadi, 2008**).

### 5.5. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des films a été évaluée par la méthode de diffusion par disque sur gélose Muller-Hinton et milieu PDAensemencé avec des suspensions microbiennes standardisées à 0,5 Mc Farland pour les bactéries et  $10^6$  spores/ml pour les champignons (les souches étudiées sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* , *Fusarium Oxysporum*).

Les Films de PHBV incorporé de l'huile essentielle de clou de girofle à raison de différentes concentrations (2%, 5%, 10%, 20%) ont été découpés en disques d'environ 6 mm de diamètre,

Des disques de PHBV sans l'HECG témoin négatif et des disques de gentamicine comme témoin positif sont aussi utilisés.

Tous les disques sont stérilisés à l'UV et déposés stérilement sur la surface de la gélose Mueller Hintonensemencé par des suspensions bactériennes et milieu PDAensemencé par des suspensions de spores fongiques. Puis les boites sont incubées à 37 °C pendant 24h (bactéries) et à 30 °C pendant 3jours à 7 jours pour les (champignons).

- ✓ La lecture se fait en déposant la boîte sur un fond noir et en utilisant une lumière Réfléchie.

- ✓ Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (système de lecture automatisé) appliqué sur le fond de la boîte de Petri fermée
  - ✓ mentionner le diamètre de la zone d'inhibition pour chaque souche.
- 
- $\emptyset = 0$  : Pas d'activité antibactérienne.
  - $\emptyset \leq 10\text{mm}$  Activité réduite.
  - $10 < \emptyset \leq 12\text{mm}$  : Activité significative.
  - $12 < \emptyset \leq 15\text{mm}$  : Activité modérément significative.
  - $15 < \emptyset \leq 20\text{mm}$  : Activité très significative.
  - $20\text{mm} < \emptyset$  : Activité fortement significative. (**Rsaissi et al., 2013**)

*Chapitre II*  
***RÉSULTATS & DISCUSSION***

## ***II. Résultats et discussion***

### **1. Identification des souches bactériennes et fongiques**

#### **1.1. Observation macroscopique**

Les colonies bactériennes étudiées sont de petite taille, de forme arrondie ou lenticulaire. La croissance de ces bactéries apparaît sous forme de trouble homogène dans le milieu de culture liquide.

*Observation macroscopique des champignons :*

- Les colonies d'*Aspergillus niger* ont un aspect laineux et granuleux avec un relief d'aspect plissé et mou.
- La couleur des colonies apparaît blanche, ensuite jaune et à la fin noirâtre et le verso présente une coloration jaune pâle.



**Figure n°05 :** Aspect macroscopique d'*Aspergillus niger* sur milieu PDA.

- Les colonies de *Fusarium oxysprum* sont souvent roses, jaunes, rouges ou violettes. mycélium est incolore.

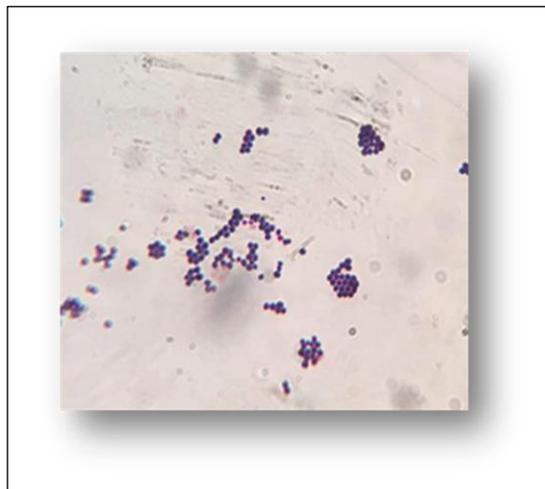


**Figure n°06** : Aspect macroscopique de *Fusarium oxysporum*.

### 1.2. Identification microscopique

#### - *Staphylococcus aureus*

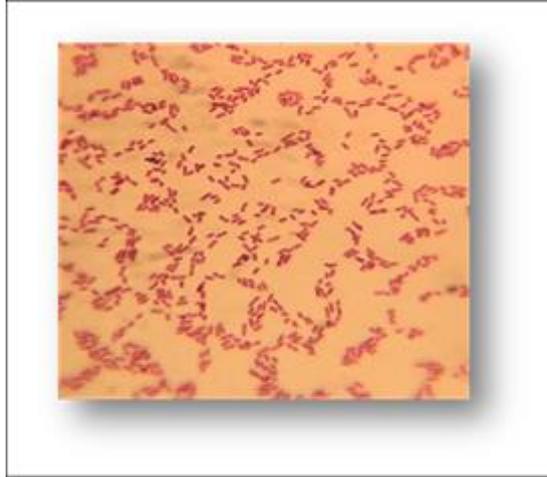
*S. aureus* est une bactérie Gram positif de forme Cocci regroupé en grappe de raisin.



**Figure n° 07** : Aspect microscopique de *Staphylococcus aureus* après la coloration de Gram.

### - *Pseudomonas aeruginosa*

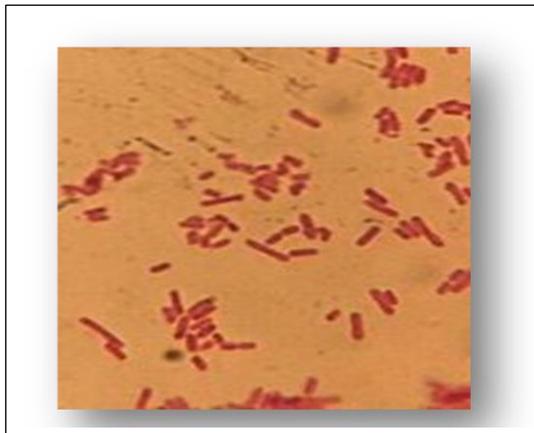
L'observation microscopique des cellules après la coloration de Gram à montrer des bactéries de forme bacillaire non sporulés, droits et mobiles à Gram-négative



**Figure n°08** : Aspect microscopique du *Pseudomonas aeruginosa* après la coloration de Gram.

### - *Escherichia coli*

Après la réalisation de la coloration de Gram, les cellules sont sous forme bâtonnets allongés (coccobacilles) a Gram négative.

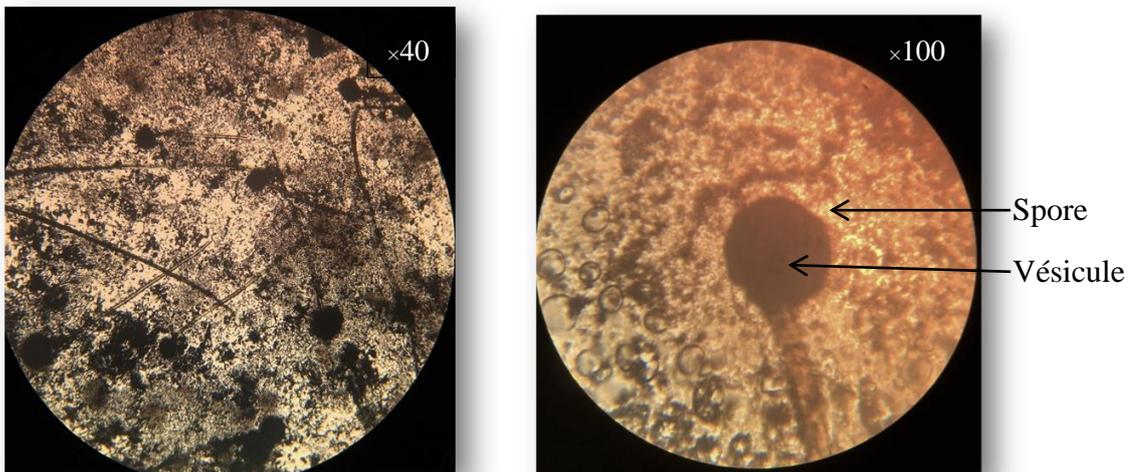


**Figure n°09** : Aspect microscopique d'*Escherichia coli* après la coloration de Gram.

### - *Aspergillus niger*

Le thalle d'*Aspergillus niger* possède un appareil végétatif constitué de Filaments (les hyphes). Cloisonné (septé). Les spores, sont le produit de reproduction asexuée. Les spores (les conidies) d'*Aspergillus niger* sont exogènes formés par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée.

L'espèce étudiée possède des amérospores qui sont unicellulaires de petite taille et cet aspect est distingué selon la forme et les modalités de septation (**Diguta, 2010**).



**Figure n°10** : Aspect microscopique d'*Aspergillus niger* ( $\times 40$ ) et ( $\times 100$ ).

### - *Fusarium Oxysporum*

L'examen direct au microscope montre des filaments mycéliens septés de 3 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre, réguliers, souvent associés à des chlamydo-spores. On peut visualiser des phialides, des macroconidies pluricellulaires arquées, des microconidies unicellulaires ou bicellulaires regroupés le plus souvent en bouquet et des chlamydo-spores solitaires ou en chaînes, intercalaires ou terminales.



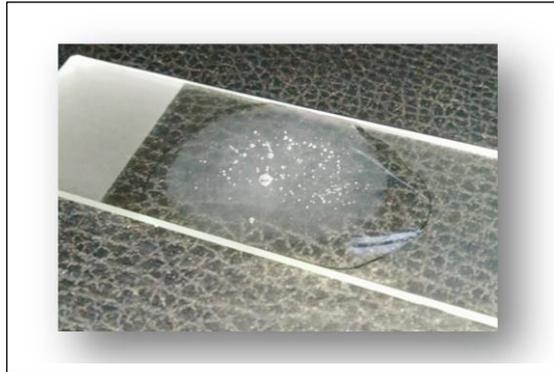
**Figure n°11** : Aspect microscopique du *Fusarium Oxysporum* ( $\times 40$ ).

### 1.3. Résultats des tests biochimiques

#### 1.3.1. Test catalase

Toutes les souches étudiées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) possèdent une réaction positive se traduisant par un dégagement de gaz (oxygène).

Selon **Clave, (2015)** (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) sont catalase positive.



**Figure n°12** : Résultat du test catalase.

#### 1.3.2. Test d'oxydase

Le test oxydase a montré que les deux souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* sont oxydase négative par contre *Pseudomonas aeruginosa* la couleur change vers le violet donc oxydase positive.

#### 1.3.3. ONPG

Concernant le test ONPG il a été remarqué que la couleur du disque ne vire pas vers le jaune pour les souches (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) donc le test est négatif. Par contre pour *Pseudomonas aeruginosa* la couleur du disque change vers le jaune ce qui indique un test positif.

#### 1.3.4. Etude de l'uréase, indole et TDA

Pour l'étude de la production d'uréase (enzyme hydrolysant l'urée) il a été remarqué une coloration rouge violacé dans un seul bouillon (*P. aeruginosa*) donc cette souche est uréase (+) et aucun changement de couleur dans les deux autres bouillons (*E. coli*, *S. aureus*) donc uréase (-).

La production d'indole est mise en évidence par l'addition du Kovax qui agit avec l'indole en donnant une coloration rouge dans la partie supérieur (anneau rouge), les résultats ont montré que (*S. aureus*) est indole (+), par contre (*E. coli*, *S. aureus*) sont indole (-)

La recherche de la TDA a donné un résultat négatif pour les trois souches.

Tous les résultats des tests biochimiques réalisés sur les trois souches sont résumés dans le tableau n°03.

**Tableau n°02 : Résultats d'identification des souches bactériennes.**

Les souches Les tests	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Catalase	(+)	(+)	(+)
Oxydase	(-)	(-)	(+)
ONPG	(-)	(-)	(+)
Urée	(-)	(-)	(+)
indole	(-)	(+)	(-)
TDA	(-)	(-)	(-)

### 2. Activité antibactérienne de PHBV incorporé de HECG

L'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HECG a été étudiée sur trois souches bactériennes par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. Les résultats montrent que ces films incorporés de cette huile essentielle exercent une forte activité sur les bactéries à Gram positif.

Les films contenant 20 % d'HECG présentaient une activité antibactérienne plus importante que ceux préparés avec 10%, 5% et 2% d'HECG.

*S. aureus* est la souche extrêmement sensible avec des grandes zones d'inhibition dans les trois essais par rapport aux autres souches bactériennes.

Les films additionnés de l'HECG montrent des zones d'inhibitions de (0 -15 mm) avec la bactérie *S. aureus* ATCC25923 suivi par *E. coli* ATCC25922 (0- 12mm) et *P. aeruginosa* ATCC9027 (0 - 12 mm) (Figure 13, 14, 15 et tableau n°04).

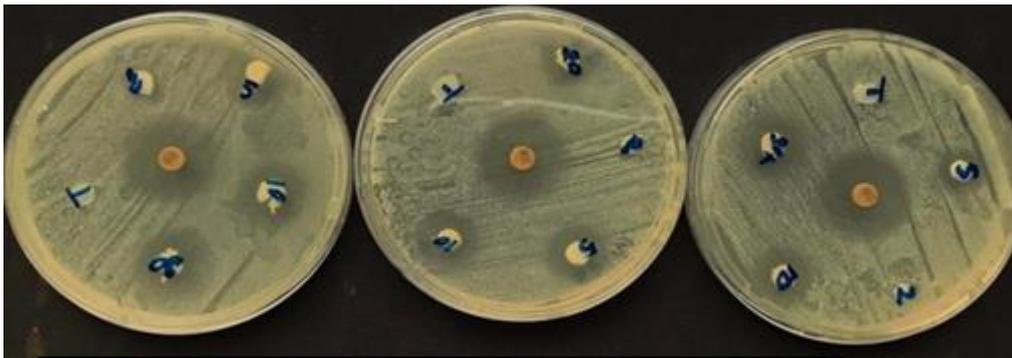
La zone d'inhibition maximale est de 15 mm obtenue avec la souche *S. aureus* pour une concentration de 20% d' HECG.

Dans cette étude des disques de Gentamycine ont été utilisé comme témoin positif, une zone d'inhibition très important de 22 mm a été obtenue avec la souche *S. aureus*, par contre une très faible efficacité a été observé contre la souche *P. aeruginosa* et *E. coli* (8 mm) pour les deux bactéries. Les films de (PHBV) sans l'HECG comme témoin négative ne donnent aucune inhibition contre les trois souches testées.

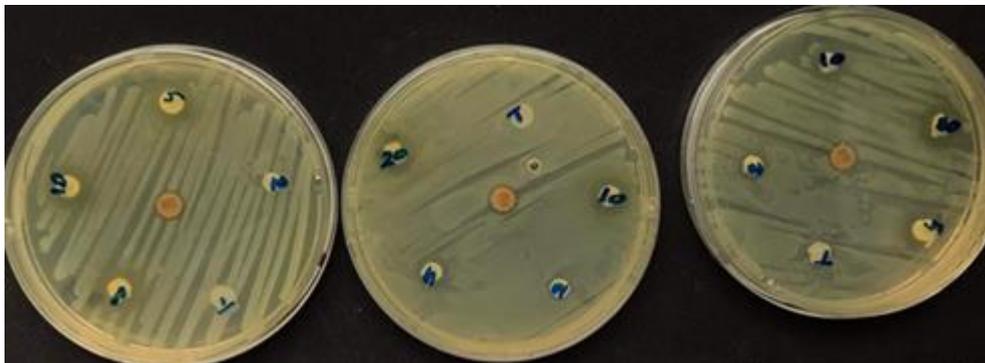
Selon **Da Costa *et al.*, (2020)**, l'activité antimicrobienne des films de PHBV contenant de huile essentielle d'origan a été évaluée sur la base des normes industrielles japonaise (JIS Z 2801:2000), la plus forte inhibition été obtenue avec *Staphylococcus aureus* (16 mm).

Les résultats obtenus des tests d'activité antibactérienne sur *d'E. Coli* indiquent une sensibilité plus en moins remarquable avec trois concentrations d'HECG. PHBV20 (20%) présente une zone d'inhibition de 12mm, PHBV10 (10%) et PHBV5 (5%) ont données des diamètres d'inhibitions au voisinage de 10 mm, par contre le PHBV2 (2%) n'exerce aucune inhibition sur cette souche (Figure 14 et tableau n°04).

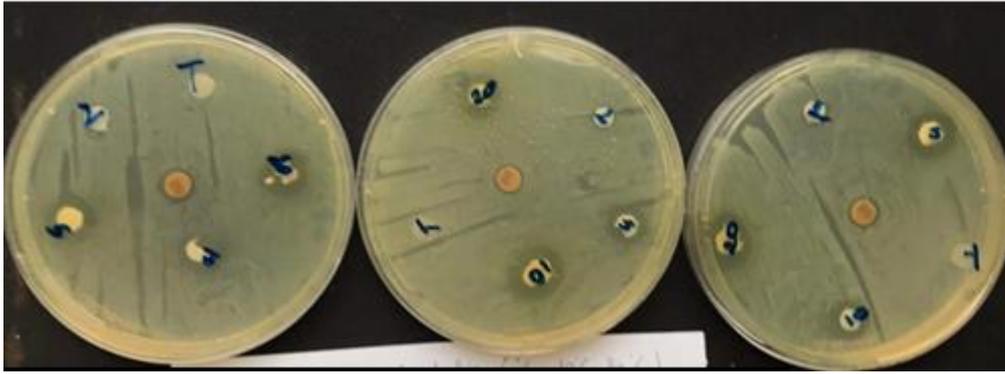
En comparant les différents résultats obtenues de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HECG sur *E. coli* et *P. aeruginosa*, on peut dire que les zones d'inhibitions sont presque semblable ; dont le diamètre d'inhibition est de 12 mm pour PHBV20 (20%) par contre PHBV10 (10%) , PHBV5(5%) et PHBV2(2%) les zones d'inhibitions sont respectivement 11, 11 et 0 mm (Figure14,15 et tableau n°04).



**Figure n°13** : Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HECG sur *S. aureus* (E1, E2, E3)



**Figure n°14** : Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HECG sur *E. Coli* (E1, E2, E3).



**Figure n°15** : Résultats de l'activité antibactérienne des films de PHBV incorporés de l'HECG sur *P. aeruginosa* (E1, E2, E3).

L'étude de **Saikumari et al., (2016)** a montré que l'HECG a une activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 7mm a une concentration de 100µl .

D'après les résultats obtenus, il apparaît que toutes les souches bactériennes testées sont inhibées par l'HECG avec des diamètres d'inhibitions variables plus au moins significatif.

**Chaiane et al., (2020)** ont remarqué dans leur étude que l'activité antimicrobienne des films de PHB incorporés de 20% de l'eugénol (PHB20) a montré une activité antimicrobienne uniquement contre *Salmonella sp.* Par contre les films du PHB40 sont actif contre *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* .

D'après **Ponce et al., (2003)**, toutes les souches bactériennes sont sensibles à l'huile essentielle de clou de girofle.

D'après nos résultats, il est clair que la bactérie *S. aureus* ATCC25923 à Gram positif donne des zones d'inhibition plus grandes que celles d'*E. Coli* ATCC25922 et *P. aeruginosa* ATCC9027 à Gram négatif. Ainsi que les films contenant des concentrations importantes d'HECG présentait une activité plus élevée.

Selon **Abdallah (2017)**, la variation de sensibilité entre les bactéries Gram positif et Gram négatif est due à la différence structurelle de la paroi bactérienne, la paroi des bactéries à Gram négatif a une structure en multicouche liée par une membrane cellulaire externe par contre la paroi cellulaire des Gram positif est constituée par une seule couche.

**Tableaux n° 03** : Diamètres des zones d'inhibition des trois souches étudiées (mm).

Concentration HECG	2%	5%	10%	20%	T positif Gentamycine
Bactéries	Diamètre des zones d'inhibitions en mm				
<i>E. coli</i>	0	11 ± 1.97	10 ± 1.68	12 ± 1.14	8 ± 0.25
<i>S.aureus</i>	0	12 ± 1.64	14 ± 2.27	15 ± 2,11	22 ± 0.93
<i>P.aeruginosa</i>	0	11 ± 0,81	11 ± 0,90	12 ± 1.76	8 ± 0.31

### 3. Activité antifongique du PHBV incorporé de HECG

L'activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HECG à raison de (5%, 10%, 20%) a été étudiée aussi contre deux souches fongiques par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé (Milieu PDA). Les résultats montrent que ces films incorporés de cette huile essentielle exercent une forte activité sur les champignons étudiés par rapport aux espèces bactériennes.

Les zones d'inhibition des espèces fongiques étudiées augmentent au fur et à mesure avec l'augmentation de la concentration en l'huile essentielle dans les films.

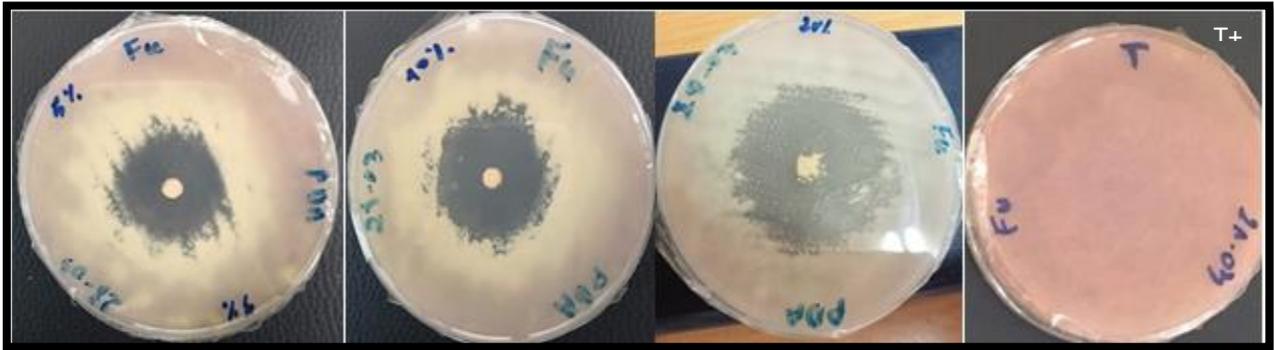
L'activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HECG sur *F. oxysporum* MG973096 est plus élevée que celle exercé sur *Aspergillus niger*.

La zone d'inhibition maximale est de 42 mm obtenue avec *F. oxysporum* MG973096 pour une concentration de 20% d' HECG, par contre la zone d'inhibition minimale 27mm a été détectée avec *A. niger* en contact avec des films de PHBV incorporée de 5% de l'HECG.

Les films additionnés de l'HECG montrent des zones d'inhibitions de (35-42mm) avec *F. oxysporum* MG973096 suivi par *A. niger* (27- 36 mm). Le témoin ne donne aucune inhibition contre les deux souches testées (Tableau n°04).

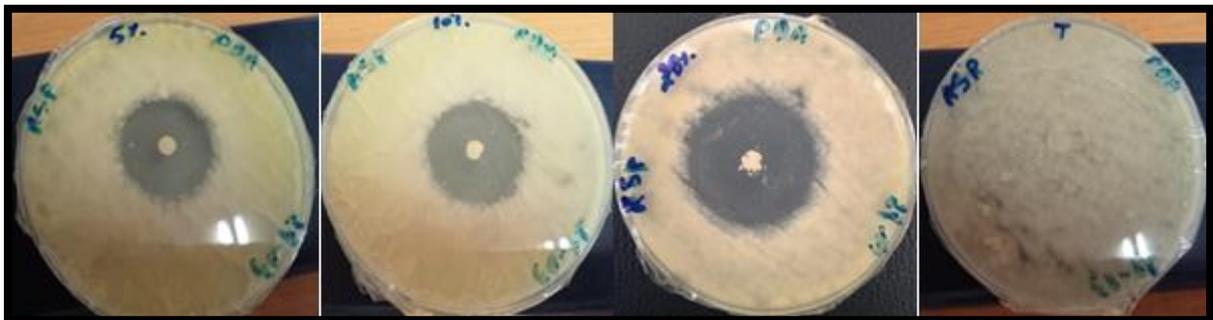
Les résultats obtenus des tests d'activité antifongique sur *F. oxysporum* MG973096 indiquent une sensibilité plus forte avec toutes les concentrations testées, PHBV20 (20%) présente une zone

d'inhibition de 42mm, PHBV10 (10%) a donné un diamètre d'inhibition de 38mm ensuite le PHBV5 (5%) un diamètre de 35mm (Figure 16, tableau n°04).



**Figure n°16 :** Résultats de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HECG Sur *Fusarium oxysporum*.

En comparant les différents résultats obtenus de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HECG sur les deux souches, on peut dire que les zones d'inhibitions d'*A. niger* sont plus au moins inférieure par rapport à *F. oxysporum* un diamètre d'inhibition de 36mm a été obtenu pour PHBV20 (20%) par contre PHBV10 (10%) et PHBV5 (5%) les zones d'inhibitions sont respectivement 28 et 27mm (Fig17 et tableau n°05).



**Figure n°17 :** Résultats de l'activité antifongique des films de PHBV incorporés de l'HECG sur *Aspergillus niger*.

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques ont été mis en évidence par de nombreux auteurs, et cela contre les moisissures allergisantes. Des travaux similaires ont été réalisés et ont démontré que les huiles essentielles du clou de girofle présentent une activité antifongique « in vitro » (Danielle, 2011)

Les résultats de Abd el azim et al., (2014) ont montré que l'extrait méthanoïque de clou de girofle a une forte activité antifongique contre *Trichoderma sp* et une activités modérées contre *F. oxysporum*, *A. niger* et *Penicillium sp*.

**Tableaux n°04** : Diamètre de la zone inhibitrice des deux souches fongiques (mm).

<i>Champignons</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. niger</i>
<i>Concentrations</i>	Diamètre des zones d'inhibitions en mm	
5%	35	27
10%	38	28
20%	42	36
T (PHBV) sans l'HECG	0	0

# *Conclusion*

### Conclusion

Ces dernières années l'industrie alimentaire développe de nouveaux systèmes d'emballage antimicrobiens grâce à l'incorporation d'huile essentielle ou de leurs principaux composés dans des films.

Cette approche permet de prolonger la durée de conservation des denrées alimentaires et améliorer la sécurité du consommateur. Plusieurs recherches ont montré que l'huile essentielle de clou de girofle a une activité antioxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne contre les champignons et un large éventail de bactéries Gram-négatifs et Gram-positifs.

Pour cette raison ce travail a été réalisé afin d'évaluer l'activité antimicrobienne du PHBV incorporé de HECG et prouver leur efficacité contre certains microorganismes.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a permis de montrer une activité inhibitrice contre les trois souches bactériennes (*S. aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC9027) et deux souches fongiques (*F. oxysporum* MG973096 et *Aspergillus niger*).

A la lumière des résultats obtenus, l'activité antimicrobienne des films de PHBV contenant de HECG étaient plus efficaces contre les champignons qui sont révélées plus sensibles que les bactéries.

A partir de nos résultats, on peut conclure que l'incorporation d'HECG dans des matrices polymères pour emballage alimentaire est très prometteuse.

En perspective, il serait fort intéressant de compléter ce travail par une étude In vivo afin de vérifier les propriétés biologiques de cette huile essentielle comme un agent antimicrobien pour des applications industrielles telles que la conservation des produits pharmaceutiques et alimentaires.

*Références*  
*Bibliographiques*

### A

**Abdallah E.M . (2017).** Antibacterial Activity of Fruit Methanol Extract of *Ziziphus spina-christi* from Sudan. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(5): 38-44.

**Abd El Azim M.H.M, El-Mesallamy A.M.D, El-Gerby M, Awad A . (2014).** (Anti-Tumor, Antioxidant and Antimicrobial and the Phenolic Constituents of Clove Flower Buds (*Syzygium aromaticum* ) *Microbial & Biochemical Technology.*

**Altaee N, El-Hiti G.A, Fahdil A, Sudesh K, Youssef E . (2016).** Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil.

**AL-Thobaiti B.M, Abada E, ElGayar K . (2021).** *Modern journal of microbial Biology.* Pages:117.

### B

**Boussena S . (2020).** Manuel des travaux pratique de bactériologie, institut des sciences vétérinaires, Département Animale, université Biskra.

**Burgess L.W . (1981).** General Ecology of the Fusaria. In: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ, eds. *Fusarium: diseases, biology and taxonomy.* University Park, PA, USA: The Pennsylvania State University Press, pages : 225–235.

### C

**Chabasse D. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier n°25 de formation de biologie médicale, Pages : 25-27.

**Chaiane R.R, Da Silva K.C, Bagnara B.E, Bittencourt P.R, Koschevic M.T, Tayla da Serantoni T.F, Marco Antonio Utrera Martines M.A, Caon T, Martelli S.M . (2020).** Biodegradation of Polyhydroxybutyrate films incorporated with eugenol in different soil types. Chemical and Environmental engineering. Doi. CSCEE100014.

**Claire K . (2007).** Les différentes bactéries .Gram et sa coloration.

**Clave D. (2015).** Expert biologiste –Bactériologie, CHU Toulouse. Fiche technique Bactériologie 153.

**Conte A, Angiolillo L, Mastromatteo M, et Del Nobile M.A . (2013).** Technological Options of Packaging to Control Food Quality. In Food Industry, édité par Innocenzo Muzzalupo. InTech. January 16.

### D

**Da Costa R.C, Daitx T.S, Mauler R.S, Da Silva N.M, Miotto M , Crespo J.S , Carli L.N .(2020).** Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-based nanocomposites for antimicrobial active food packaging containing oregano essential oil .Food Packaging and Shelf Life.

**Danielle C. (2011).** Fiche Technique Bacteriologie: Enterobacter cloacae. Laboratoire de Bactériologie Hygiène Toulouse. Pages : 1-2.

**Deroiné M, César G, Le Duigou A, Davies P, Bruzaud S . (2015).** Natural Degradation and Biodegradation of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Liquid and Solid Marine Environments .journal of polymers and the environment 23,493-505.

**Diguta C. F . (2010).** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin.

### **E**

**Elain A, Le Grand A, Corre Y.M, Le Fellic M, Hachet N, Le Tilly V, Loulerguec P Audicc J.L, Bruzaud S . (2016).** Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Industrial Crops and Products* Pages : 1–5.

### **G**

**Garrett S.D . (1970).** Pathogenic root-infection fungi. London, UK: Cambridge University Press.

**Gordon T.R, Martyn R.D . (1997).** The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology* 35: Pages : 111–128.

**Guiraud J.P . (1998).** Microbiologie alimentaire, Dunod, Paris, Pages : 72 et 74.

**Guillaume P.Y . (2004).** La microbiologie: les tests enzymatiques, antibiotiques et immunologiques, (en ligne). Lyon, France.

### **H**

**Han J. H . (2003).** Antimicrobial food packaging. In CRC Press LLC, 50770.

### J

**Jamshidian M . (2011).** Inclusion et libération de molécules antioxydants dans un emballage à base d'Acide Poly Lactique en contact alimentaire (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).

**Joffin J.N, le yral G. (2006)** .Microbiologie technique, Tome 1 : dictionnaire des techniques,France ,4eme edition CRDP d'aquitaire.

### K

**Karen R . (2010).** American society for Microbiology, ,1213(1), Pages : 1-4.

**Kouame D . (2011).** Biotechnologie alimentaire : travaux pratiques.

### L

**Larpent J.P, Larpent-Gourgaud M . (1997).** Technique de microbiologie 3eme Ed.

**Léon L.M , Michel V . (1990).** Bactériologie médicale. 2ème édition. Paris : Flammarion édition ; Pages : 567-73.

**Leyral G, Vierling E . (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et technique .Wolters Kluwer.

### Q

**Olabarrieta I, Forsström D, Gedde U.W, Hedenqvist M.S . (2001).** Transport properties of chitosan and whey blended with poly ( $\epsilon$ -caprolactone) assessed by standard permeability measurements and microcalorimetry, *Polymer (Guildf)* vol. 42, no. 9, Pages: 4401–4408.

**Ontanille M, ghanou Y .(2013).** Chimie et physico-chimie des polymères, 3eme édition, Ed: DUNOD.

**Oulymata G . (2007).** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à gram negative. Thèse Dakar: Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

**Ozdemir M, Floros J.D . (2004).** Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 185–193.

### P

**Piton C, Fontanierb C .(1990).** caractérisation d'une collection de souches de bactéries coryneformes de la morge du gruyère de comté.

**Ponce A.G, Fritz R, Del Valle C, Roura S.I . (2003).** Antimicrobial Activity of Essential Oils on the Native Microflora of Organic Swiss chard. *Food Science and Technology*, 36(7), Pages: 679-684.

### R

**Robertson G.L . (2013).** Shelf-life of foods, *Food Packaging: Principles and Practice*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, Pages : 329\_366.

**Rsaissi N, Bouchache M . (2013).** La lutte chimique contre le *jujubier*. Programme National de transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA), DERD (Ed) Rabat.



**Saadi Z . (2008).** Etude de la dégradation fongique des polymères : cinétique de dégradation des polymères et caractérisation des sous –produit de dégradation – Etude de l’écotoxicité de ces polymères.

**Saikumari D, Shiva Rani S.K and Neeti S . (2016).** Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* L. (clove).pages : 485- 487.

**Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J , van Dijck P .(2002).** On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59,426–435.

**Sudesh k, Abe H, Doi Y . (2000).** Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates : biological polyesters, Pages : 1503–1555.



**Verlinden R.A.J, Hill D.J, Kenward M.A, Williams C.D, Radecka I . (2007).** Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates . School of Applied Sciences, University of Wolverhampton, Wolverhampton, UK.

# *Annexes*

## Annexe n°01

Composition des milieux de culture utilisés selon (Guiraud, 1998).

## Milieu Chapman

Peptone :.....	10,0 g
Extrait de viande de bœuf :.....	1,0 g
Chlorure de sodium :.....	75,0 g
Mannitol :.....	10,0 g
Rouge de phénol :.....	0,025g
Agar-Agar :.....	15,0 g
pH 7,4. Autoclaver 15 minutes à 120C°.	

## Milieu EMB

Peptone :.....	10,0 g
Lactose :.....	10,0 g
Éosine :.....	0,4 g
Bleu de méthylène :.....	0,0625g
hydrogénophosphate de potassium :.....	2, 0 g
Agar-Agar :.....	15,0 g
pH = 6, 8 . Autoclaver 15 minutes à 120C°.	

## Milieu King A

Peptone dite "A" .....	20,0g
Glycérol .....	10,0g
Sulfate de potassium.....	10,0g
Chlorure de magnésium .....	1,4 g
Agar purifié.....	12,0g
pH = 7, 2. Autoclaver 15 minutes à 120C°.	

### **Milieu GN**

Extrait de viande .....	1, 0g
Extrait de levure .....	2, 0g
Peptone .....	5, 0g
Chlorure de sodium .....	5, 0g
Agar .....	15, 0g

pH = 7, 4 .Autoclaver 15 minutes à 120C°.

### **Mueller Hinton (Gélose Pour Antibiogramme)**

Extrait de viande .....	2g
Hydrolysate acide de caséine .....	17,5g
Amidon .....	1,5g
Agar .....	10g

PH 7,4. Autoclaver 15mn à 120C°.

### **Milieu PDA**

Agar agar .....	20g
Dextrose .....	10g
Levures .....	2g
Peptone .....	1g

PH 5,6 Autoclaver 15mn à 120C°.

### **Milieu Sabouraud**

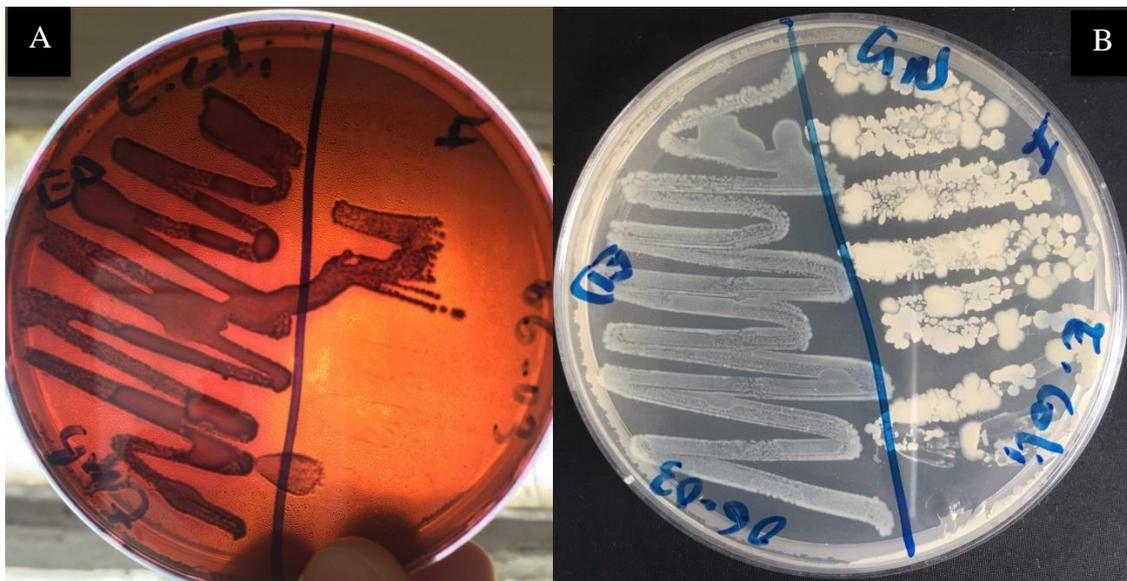
Peptones .....	10g
Glucose (ou Dextrose) .....	40g
Agar agar .....	15g

PH 5,6 Autoclaver 15mn à 120C°

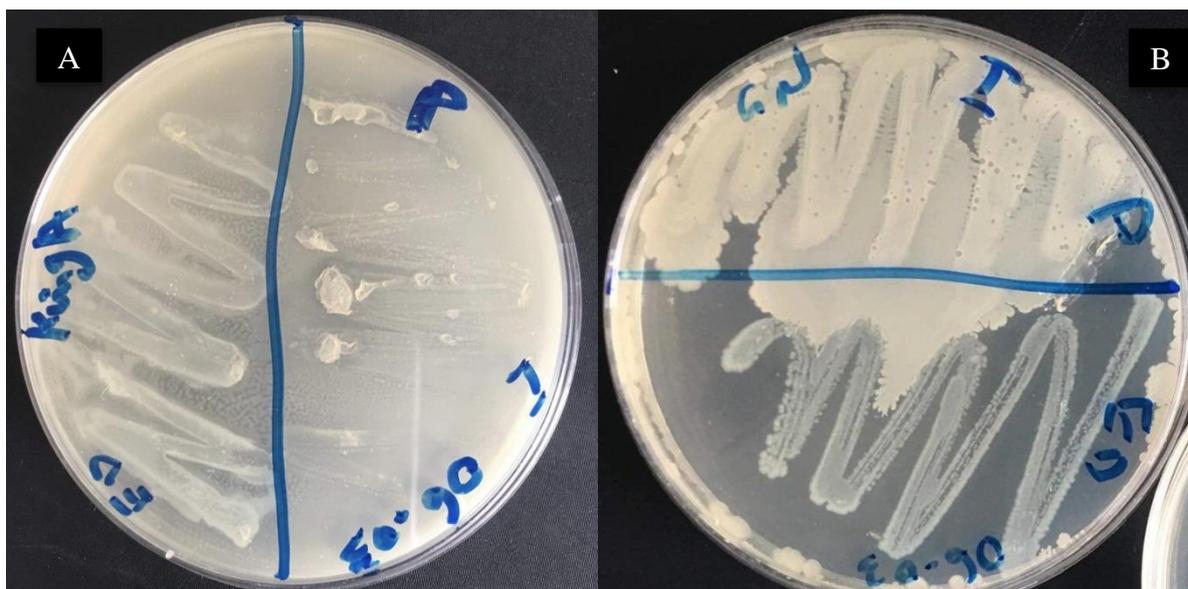
## Annexe n°02



**Figure n°01** : Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur milieu (A : Chapman / B : GN).



**Figure n°02** : Aspect des colonies d'*E. Coli* sur milieu (A :EMB / B :GN).



**Figure n°03** : Aspect des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu (A : KingA / B :GN).

## **Annexe n°03**

### **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est une étape essentielle pour la détermination des souches. Elle permet de visualiser facilement les bactéries et de donner des indications sur le type de paroi, leurs formes et leurs tailles.

- ✓ déposer la culture bactérienne sur une lame propre
- ✓ fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen.
- ✓ recouvrir le frottis avec la solution de cristal violet ou (violet de gentiane), laissé agir une minute
- ✓ rejeter le colorant puis laver à l'eau distillée
- ✓ recouvrir la préparation par le Lugol, laisser agir une minute.
- ✓ rejeter le Lugol puis laver à l'eau distillée.
- ✓ décolorer avec l'alcool.
- ✓ rincer à l'eau distillé et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir quelques secondes.
- ✓ rejeter la fuchsine, lavée abondamment, égoutté, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres.
- ✓ Observer au microscope en utilisant l'objectif(x40) ou bien l'objectif (x100) en ajoutant une goutte d'huile d'immersion (**Joffin et al. 2006**).

## Annexe n°04

Figure n°04 : Résultats d'identification d'*E. Coli* par galerie Api 20<sup>E</sup>.

API 20 E V4.1		<a href="#">Impression</a>	<a href="#">Export</a>	<a href="#">Nouveau test</a>	<a href="#">Modification</a>
REFERENCE	DATE				
	12/03/22				
COMMENTAIRE					
<b>FAIBLE DISCRIMINATION</b>					
Galerie	API 20 E V4.1				
Profil	7 1 4 4 7 5 2				
Note(s)	CONFIRMER PAR DES TESTS SEROLOGIQUES				
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre		
Escherichia coli 1	94.2	0.35	ADH 1%	INO 1%	
Salmonella spp	5.5	0.16	ONPG 1%	H2S 83%	IND 1%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre		
Salmonella choleraesuis ssp arizonae	0.1	0.0	CIT 75%	H2S 99%	IND 1% INO 0%
Test(s) complémentaire(s)	GLYCEROLac	5KG	LACTOSEac		
Escherichia coli	70%	24%	60%		
Salmonella enteritidis	-	NT	-		
Salmonella ser.Paratyphi B	-	NT	-		

Figure n°05 : Fiche de résultats de galerie Api 20<sup>E</sup>.

Annexe n°05



**Figure n°06** : Antibiotique Gentamicine commercial.

Annexe n°06



Figure n°07 : Pied à coulisse

## Annexe n°07

**Tableaux n°01** : Diamètres des zones d'inhibitions des souches bactériennes étudiées (mm).

	<i>les souches les essais</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2%	E1	0	0	0
	E2	0	0	0
	E3	0	0	0
5%	E1	12,92	12,69	11,49
	E2	8,98	13,39	10,07
	E3	11,11	10,25	11,49
10%	E1	12,54	17,33	11,73
	E2	10,66	14,5	11,82
	E3	9,18	12,82	10,21
20%	E1	13,67	17,52	12,04
	E2	11,65	14,6	10,57
	E3	11,71	13,4	14,08
T POSITIF (Gentamicine)	E1	8,35	23	8,52
	E2	8,51	22,8	7,94
	E3	8,01	21,29	8,46
T NEGATIVE (PHBV)	E1	0	0	0
	E2	0	0	0
	E3	0	0	0