

# **ÉVALUATION DE L'EFFET INHIBITEUR DES HUILES ESSENTIELLES DE *LAVANDULA LATIFOLIA* VIS-À-VIS DE *CORYNEBACTERIUM AMMONIAGENES* ATCC 6872 ET DE SON MUTANT *CH31*.**

*Benine Mohamed Lamine*

*Azzi Ismahame*

*Larbi Daouadji Kelthoum*

*Kanoun Khadouja*

*Abbouni Bouziane*

Laboratoire de Microbiologie Moléculaire Proteomics et Santé,  
Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,  
Université Djillali Liabés de Sidi Bel Abbés

---

## **Abstract**

The abusive use of antibiotics in human and veterinary medicine create a selective pressure on bacterial populations, This produces the emergence of multi-resistant bacterial strains leading to treatment failures and an additional cost anti-infective treatments. These findings call for finding other alternative treatments.

The aim of this study is the evaluation of the antibacterial properties of the essential oils of the leaves of *Lavandula latifolia* harvested from Sidi Bel Abbes region (Algeria), which were evaluated against *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 and its *CH31* mutant, by the using agar well diffusion method and by the study of bacterial growth in the absence and the presence of essential oils.

The obtained results showed that the antibacterial activity of the essential oils of the leaves of *Lavandula latifolia* at various concentrations has indicated an excellent antibacterial activity by *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 and its *CH31* mutant, with a average values of  $I_{50} = 0.06$  mM et  $I_{50} = 0.1$  mM respectively. Furthermore, the study of *CH31* mutant growth in the absence (control) and in the presence of the essential oils of the leaves of *Lavandula latifolia* has manifested a considerable biomass reduction accompanied with unbalanced growth after adding of the crude extract.

---

**Keywords:** Essential oils, *Corynebacterium ammoniagenes*, antibacterial activity, *Lavandula latifolia*.

---

### Résumé

L'usage abusif d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, créant une pression de sélection sur les populations bactériennes, cette force engendre l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes menant aux échecs thérapeutiques et à un surcoût des traitements anti-infectieux. Ces constats appellent à trouver d'autres alternatives de soins.

L'objectif de travail bute l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites des feuilles de *Lavandula latifolia*, récoltées de la région de Sidi Bel abbés (Algérie).

Par l'utilisation de la technique de diffusion sur la gélose et l'étude du suivi de la cinétique de croissance mutant *CH31* sur milieu de culture liquide Seed en absence et en présence des huiles essentielles de *Lavandula latifolia*.

Les résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Lavandula latifolia* obtenus vis-à-vis *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et son *CH31* mutant ont montré une importante inhibition de la prolifération des souches testées avec des valeurs inhibitrices moyennes  $I_{50} = 0.06$  mM et  $I_{50} = 0.1$  mM respectivement.

L'étude du suivi de la cinétique de croissance du mutant *CH31* en absence et en présence des huiles essentielles de *Lavandula latifolia* a manifesté une réduction considérable de la biomasse bactérienne, accompagnée avec une croissance déséquilibrée après l'ajout des huiles essentielles de *Lavandula latifolia*.

---

**Mots clés :** Huiles essentielles, *Corynebacterium ammoniagenes*, activité antibactérienne, *Lavandula latifolia*.

### Introduction

Jadis utilisée comme parfum pour les bains et l'entretien du linge, comme plante ornementale, la lavande « *Lavandula latifolia* » de la famille des lamiacées, arbuste largement répandu en région méditerranéenne, à feuilles persistantes, atteint souvent presque 1m de longueur. Elle est caractérisée par son odeur camphrée, ses feuilles violacées disposées en spatule, fleurit dans 3 à 4 semaines plus tard que la lavande vraie. Elle croit sur les montagnes incultes de l'Algérie, en lieux arides.

L'arsenal thérapeutique déployé dans le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces produits a entraîné l'émergence de souches multi résistantes. La progression de la

multi-résistance et l'absence de perspectives de découvertes de nouveaux antibiotiques, oriente les recherches vers l'exploitation des vertus médicinales des plantes afin d'en soutirer des principes actifs. Produits comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont utilisées dans la parfumerie comme substances aromatisantes ou parfumantes, dans l'industries alimentaire comme agents antimicrobiens en médecine populaire (Baudoux, 2000).

Des études antérieures ont confirmé in vitro l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles (Cassella et al., 2002 ; Hammer et al., 1999).

Les huiles essentielles de *Lavandula latifolia* sont composées essentiellement d'oxydes terpéniques : 1,8-cinéole (28.58 %), mono terphénols : linalol (50.43 %),  $\alpha$ -terpinéol (1.11 %), gamma-terpinéol, mono terpènes et en état de traces de  $\beta$ -pinène, camphre,  $\alpha$ -pinène, myrcène, limonène, Sesquiterpènes :  $\beta$ -caryophyllène (1.83 %), Cétones : camphre (12.25 %), (Baratta et al., 1998 ; Zayyad et al., 2014 ; Gary , 1997).

Les huiles sont utilisées depuis longtemps pour tonifier les voies digestives, stimuler l'estomac, le foie et la vésicule biliaire ainsi que pour traiter les débilités atoniques, les flatulences, les colites, le météorisme.et les infections respiratoires telles que le rhume et bronchite (Bardeau et al., 1976).

## **Matériels et méthodes**

### **Préparation du milieu de culture**

*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant CH31 dérivé de cette souche sauvage sont des souches industrielles utilisées dans la production des nucléotides et les exhausteurs de gout (Abbouni et al., 2003). Le milieu de culture utilisé pour l'étude de la croissance de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant CH31 dérivé de cette souche sauvage est Seed (Abbouni et al., 2003). Il est réparti sous un volume de 100 mL en fioles Erlenmeyer de 500 mL, puis stérilisé à 121°C, pendant 20 mn.

### **Isolement et conservation des souches bactériennes**

Les deux souches nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Université de Hannover, fraîchement recueillies sur gélose en boîte de Pétri, conservées ensuite dans une solution de glycérol à 20% à une température de 4°C.

### **L'ensemencement et conditions de culture**

Les deux souches sont inoculées séparément dans un nouveau milieu de culture Seed. Les pré-cultures sont inoculées à partir d'un prélèvement provenant d'une culture de 18 h sur gélose nutritive à 37°C.

L'ensemencement étant fait à une densité optique (DO) initiale de 0.5 correspondant à une biomasse de  $4,5$  à  $5.10^7$  bactéries par 1 ml de volume. Les cultures sont ensuite incubées à  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **Préparation des dilutions des huiles essentielles**

Des dilutions à différentes concentrations ont été préparées afin mesurer la force d'inhibition des huiles essentielles de *Lavandula latifolia* extraite à une température de  $4^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière selon les conditions du protocole utilisé dans des études similaires (Kanoun et al., 2014). Elles sont ensuite solubilisées dans une quantité minimale d'alcool éthylique à 96 %, pour l'obtention des concentrations suivantes : 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM. Des témoins avec ou sans alcool éthylique ont été réalisés (Moroh et al., 2008). Par ailleurs, la concentration minimale inhibitrice est déterminée selon la méthode décrite par Andrews (2001).

### **Mesure de la cinétique de croissance**

La détermination de la croissance bactérienne s'effectue en mesurant les densités optiques d'une suspension de cellules bactériennes, à l'aide d'un spectrophotomètre visible, à une longueur d'onde de 578 nm, en utilisant une micro-cuvette en plastique de 1 cm de trajet optique. Le blanc est réalisé pour chaque mesure spectrophotométrie.

### **Méthode de diffusion sur gélose nutritive**

La technique de diffusion en gélose est la plus souvent utilisée pour étudier l'effet antibactérien des huiles essentielles. Pour ce faire, les souches bactériennes de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant *CH31* dérivé de cette souche sauvage sont étalées sur gélose nutritive. Une culture en nappe a été choisie pour assurer un tapis homogène de colonies bien distinctes à la surface de la gélose. Des disques de papier buvard stérilisés, imprégnés des huiles essentielles à différentes concentrations de *Lavandula latifolia* à tester, déposés sur la surface de la gélose nutritive, préalablement ensemencée en nappe avec culture pure de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant *CH31* dérivé de cette souche sauvage. L'incubation est réalisée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 18-20 h. L'activité antibactérienne est mise en évidence par la manifestation de zones d'inhibitions autour des disques, révélant une sensibilité des souches aux principes actifs contenus dans l'huile essentielle. Des témoins ont été introduits dans les boîtes gélosées, le témoin négatif (disque non chargé d'huile essentielle) et le témoin positif (disque imprégné à saturation par de l'alcool éthylique à 96%) (Modzelewska et al., 2005).

## Résultats et Discussions

la stabilité de la souche mutant CH31 est effectuée par ensemencement sur la gélose de Seed, incubée à une température de 30°C. Les colonies obtenues après le délai d'incubation de 24 h sont utilisées pour l'étude de l'effet des huiles essentielles de *Lavandula latifolia* sur la croissance du mutant CH31 (Figure 2).

### Mise en évidence des activités antibactériennes des huiles essentielles de *Lavandula latifolia*

Une mise en évidence des activités antibactériennes des huiles essentielles extraites des feuilles de *Lavandula latifolia* récoltées de la région de Sidi Bel Abbés chez *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant CH31 dérivé de cette souche sauvage, identifiées au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université de Hannover a été effectuée.

Dans le but de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Lavandula latifolia* vis-à-vis *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant CH31 dérivé de cette souche sauvage, la technique de l'aromatogramme a été utilisée.

Cette technique permet de déceler le pouvoir bactéricide, bactériostatique des huiles essentielles de *Lavandula latifolia* sur la croissance bactérienne. La présence d'un pouvoir inhibiteur se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques chargés des huiles essentielles.

Ahmad et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, Dorman et ses collaborateurs (2000) ont suggéré que certains composants chimiques manifestent des propriétés bactéricides.

Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles de *Lavandula latifolia* possèdent une activité antibactérienne très importante et très variable selon la bactérie mise en cause. Les cellules de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant dérivé de cette souche sauvage ont manifesté une sensibilité considérable aux huiles essentielles de *Lavandula latifolia* avec des valeurs inhibitrices moyennes de  $I_{50} = 0.06$  mM et  $I_{50} = 0.1$  mM respectivement (Figure 1, Figure 2). Dès lors, une étude de la cinétique de croissance du mutant CH31 en absence et en présence d'huile essentielle de *Lavandula latifolia* a corroboré l'effet inhibiteur sur la croissance de la souche mutante CH31 (Figure 3). Les valeurs des densités optiques enregistrées sont justifiées par à une forte production de biomasse lors de l'inoculation de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant CH31 dans le milieu de culture Seed et pouvant aller jusqu'à une densité optique de 100 dans leurs utilisations industrielles (Abbouni et al., 2003).

D'autre part, une observation au microscope électronique de la souche mutante *CH31* montre l'effet inhibiteur observable par l'augmentation de la taille des cellules bactériennes (forme filamenteuse) dû essentiellement au blocage de l'activité enzymatiques des protéines impliquées dans la division des cellules (Figure 4). Actuellement, les études se focalisent sur la recherche de molécule pouvant inhiber la l'activité enzymatique de la ribonucléotide reductase et de la protéine FslZ intervenant dans le processus de division cellulaire (Grenga, 2010 ; Den Blaauwen et al., 2014)

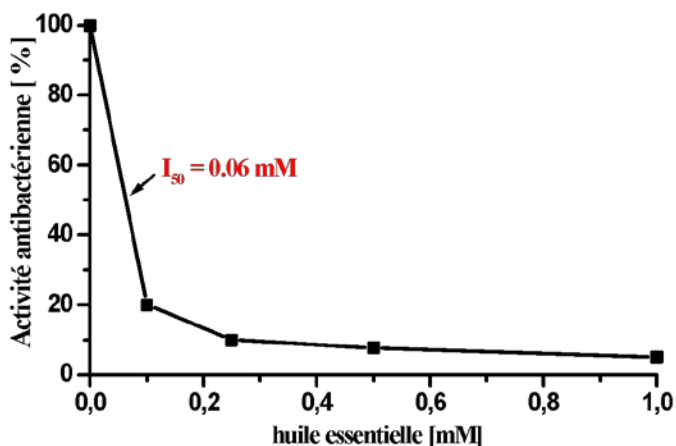


Figure 1 : Activité antibactérienne des essentielles de *Lavandula latifolia* vis-à-vis de *Corynebacterium ammoniagenes*.

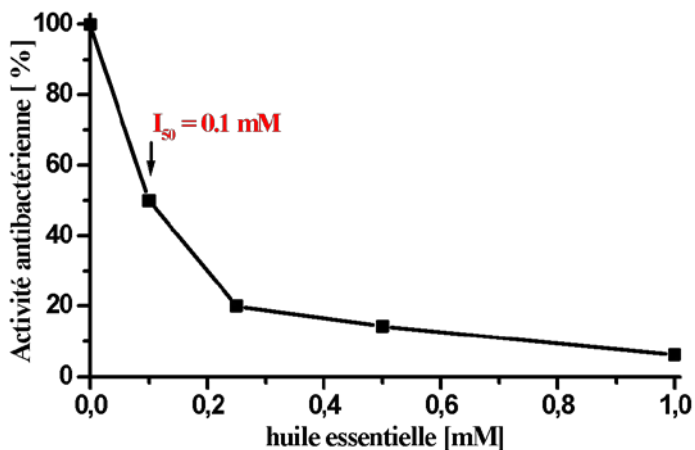


Figure 2 : Activité antibactérienne des essentielles de *Lavandula latifolia* vis-à-vis du mutant *CH31* de *Corynebacterium ammoniagenes*.

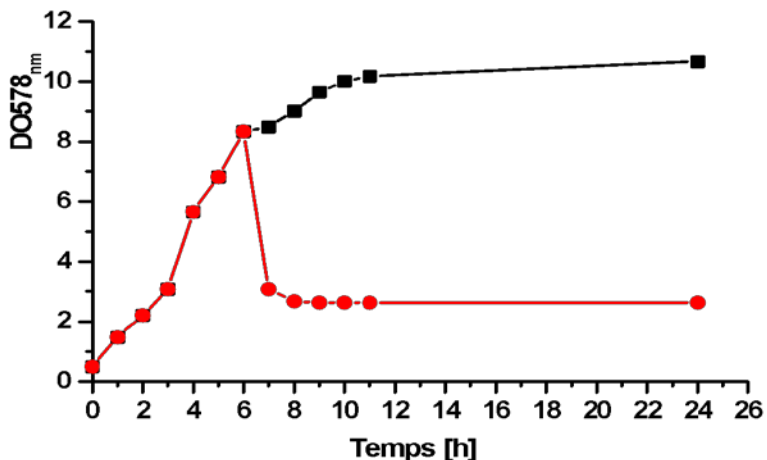


Figure 3 : Étude du suivi de la cinétique de croissance de mutant CH31 dérivé de *Corynebacterium ammoniagenes* en absence (—■—) et en présence (—●—) des essentielles de *Lavandula latifolia*.

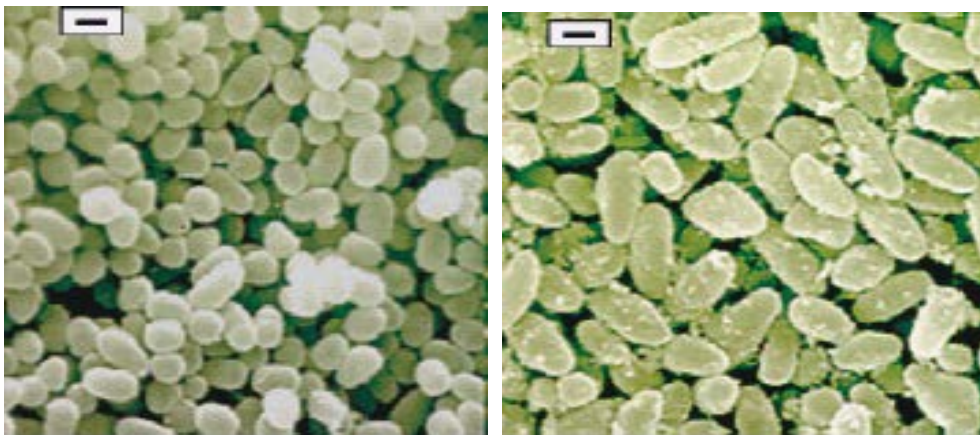


Figure 4 : Observation en microscope électronique des mutants *CH31* dérivés de *Corynebacterium ammoniagenes* en absence (a), en présence (b) de l'agent inhibiteur (Hydroxyurée).

## Conclusion

Les huiles essentielles de *Lavandula latifolia* sont des substances aromatiques, d'une composition chimique très complexe, ce qui leur confère des propriétés antibactérienne très intéressantes à mettre à profit comme matières actives dans le domaine de la lutte contre certains germes pathogènes.

Les tests de l'activité antibactérienne réalisés par la technique de diffusion sur la gélosé nutritive ont permis d'évaluer l'activité huiles essentielles de *Lavandula latifolia*.

L'importante action antibactérienne démontrée par l'huile essentielle de *Lavandula latifolia* est en relation avec sa forte teneur en carvacrol et en thymol 30.53 et 27.5% respectivement . Ces composés phénoliques sont réputés avoir une grande action antibactérienne (Ultee et al., 1999 ; Ultee et al., 2000 ; Ettayebi, 1999). L'identification des composés chimiques des huiles essentielles extraites des feuilles de *Lavandula latifolia* par les méthodes chromatographiques (CPG, CPG/MS) reste une étape indispensable pour la caractérisation des molécules responsables des activités antibactériennes. La sensibilité de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 et du mutant *CH31* dérivé de cette souche sauvage aux huiles essentielles de *Lavandula latifolia* suggère sa possible utilisation en thérapeutique comme alternative naturelle aux agents chimio-thérapeutiques dont le spectre d'action est en réduction continue.

### References:

- Abbouni B., Elhariry H., Auling G. Arrest of cell cycle by inhibition of ribonucleotide reductase induces accumulation of NAD<sup>+</sup> by Mn<sup>2+</sup>-supplemented growth of *Corynebacterium ammoniagenes*. Biotechnology Letters, 25(2): 143-147, 2003.
- Abbouni B., Elhariry H., Auling G. Overproduction of NAD<sup>+</sup> and 5'-inosine monophosphate in the presence of 10 μMn<sup>2+</sup> by a mutant of *Corynebacterium ammoniagenes* with thermosensitive nucleotide Reduction (nrds) after temperature shift. Archives of Microbiology, 182: 119-125, 2004..
- Ahmad N. Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. J. Drug. Target, Dec, 13(10): 555-561, 2005.
- Andrews J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother, 48 Suppl 1: 5-16, 2001.
- Baudoux D. L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. AMYRIS ed, ed. Atlantica. 2000.
- Baratta M.T. Chemical composition and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. The Journal of Essential Oil Research, 10: 618-627, 1998.
- Bardeau F., et Fesneau, M.. *La médecine aromatique : Propriétés d'utilisations des huiles essentielles végétales* (Vol. 2). Paris, 1976.
- Cassella S., Cassella J.P., Smith I. Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection. The International Journal of Aromatherapy, 12: 2-15, 2002.
- Den Blaauwen T., Andreu J.M., Monasterio O. Bacterial cell division proteins as antibiotic targets. Bioorganic Chemistry, 55(0): 27-38, 2014.



- Dorman H.J.D. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316, 2000.
- Ettayebi K., Yamani J.E., Rossi-Hassani B.D. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS, Microbiology Letters*, 183: 191-195, 1999.
- Gary A.R.P. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res*, 9: 67-75, 1997.
- Grenga L. *FtsQ* interaction mutants: a way to identify new antibacterial targets. *New Biotechnology*, 27(6): 870-881, 2010.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Appl. Microbiol*, 86: 985-990, 1999.
- Kanoun K., Abbouni B., Benine M.L., Benmahdi F.Z., Maarouf B. Étude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorces de *Punica granatum* linn sur deux souches phytopathogènes : *ascocyhta rabiei* (pass.) labr. et *fusarium oxysporum f.sp.radicis –lycopersici*. *European Scientific Journal*, 10(12), 2014.
- Modzelewska S.K.S., Kumar Khan SR. Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Curr. Med.Chem.- Anti-cancer Agents*, 5: 477-499, 2005.
- Moroh J.L.A., Bahi C., Djec K., Loukou Y.G., Guede-Guina F. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morindaorindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 77: 44-61, 2008.
- Ultee A., Kets E.P.W., Smid E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. And Env. Microbiol*, 4606-4610, 1999.
- Ultee A., Slump R.A., Steging G., Smid E.J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J of Food Protection*, 620-624, 2000.
- Zayyad N., Farah, A., Bahhoun, J.. Chemical analysis and antibacterial activity of essential oils from three species of *Thymus* : *Thymus zygis*, *T. algeriensis*, and *T. bleicherianus*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 83, 118 -132, 2014.