République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biotechnologie Microbienne

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de deux plantes aromatiques locales de la famille des Cupressaceae et Pinaceae

Présenté par :

GHERSA Fatiha & GHILAS Kahina

Soutenu le : **14 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mme. LAINCER F.	MAA	Président
M. BELHADI D.	MAA	Encadreur
Mme. BELHAMICHE N.	MAA	Examinatrice
M. ADJAOUD A.	MAA	Co-encadreur

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Nos vifs remerciements sont en premier lieu pour Allah pour nous avoir protégées, guidées et orientées durant toute notre vie et tout au long de notre parcours universitaire, à LUI nous croyons et à son destin nous admettons.

Nous adressons nos remerciements à Mr Ramdani qui nous a accueillies au laboratoire de biologie des sols et qui a largement collaboré pour la réalisation de ce travail.

Nous remercions Mr Belhadi et Mr Adjaoud pour leurs orientations, dévouements et disponibilités.

Nos remerciements sont également pour les membres de juré de nous avoir faites l'honneur de juger ce travail.

Nous remercions toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce mémoire.

FATIHA ET KAHINA

Dédicaces

Ce modeste travail est le fruit de mes efforts et mes sacrifices pendant mon parcours universitaire que je dédie :

***A** mes parents monsieur **Mohand Arab GHERSA** et madame **Malika MEKHZEM GHERSA** que dieu les protège. En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissante. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.*

A** mon enfant, mon amie, ma joie, ma force, ma confiance, mon espoir, mon inspiration à la jumelle de mon âme,ma sœur **Djamila.

A** mon cher et unique frère **lakhdar.

***A** vous qui avez cru en moi, qui m'avez encouragée, qui avez pris ma main dès mon enfance et tracé mon chemin estudiantin, à vous qui m'avez marquée à jamais et m'avez donnée exemple de persévérance et de sérieux, à vous qui m'avez apprise le gout de l'effort et la joie d'accomplissement et du succès, à vous mon cher enseignant du cycle primaire **Mr OUCHERIAH Allaoua**. Grâce à vous je suis parvenue à savoir que dans les nuits les plus noires il y a toujours un espoir qui brille quelque part.Que vous trouviez ici l'expression de ma gratitude et ma profonde reconnaissance que je ne pourrai jamais exprimer complètement.*

***A** ma camarade, mon amie et ma binôme kahina, merci pour tout ce qu'on a partagé ensemble les beaux ou les tristes moments, merci pour ton écoute, tes conseils et ta tendresse.*

***A** tous mes amis et tous ceux qui me sont chers.*

Fatiha

Dédicaces

En guise de reconnaissance

Je dédie ce travail à mes chers parents que DIEU les protège et les garde en santé.

A mes chères sœurs Djawida, Malika, Karima, Djazira, Ouazna

A mon Cher frère Khalef

A mes beaux frères Bouzid, Kamal, Djaafar

Pour leur soutien multiforme.

A mes neveux et nièces

A ma chère amie Khalida pour les beaux et les mauvais moments qu'on a partagés ensemble, pour sa compréhension et son soutien indéfectible.

A ma copine et binôme Fatiha pour sa patience et sa tolérance durant la réalisation de ce mémoire et à toute sa famille.

A tous ceux qui m'ont aidée à réaliser ce travail

A toutes mes amies.

A tous ceux qui me sont chers.

Kahina

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 01

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1- Huiles essentielles 03

I.1.1-Définition 03

I.1.2-Localisation et répartition 04

I.1.3. Propriétés physiques 04

I.1.4-Facteurs de variabilité des huiles essentielles ..... 04.

I.1.5-Méthodes d'extraction 05

I.1.6-Biosynthèse des huiles essentielles 06

I.1.7-Utilisation des huiles essentielles 07

I.1.8 -Toxicité des huiles essentielles 07

I.2-Activités microbiennes des huiles essentielles 08

I.2.1.Activité antifongique 08

I.2.2.Activité antivirale 08

I.2.3.Activité antiparasitaire 08

I.2.4.Activité antibactérienne 08

I.3.Les principales méthodes de détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles 09

I.3.1- Les techniques en milieu liquide 09

I.3.1.1.Méthode des disques de Sarbach 09

I.3.1.2.Méthode de Maruzuella 09

I.3.2.Techniques en milieu solide..... 09

I.3.2.1.Méthode de microatmosphère..... 09

I.3.2.2.Méthode de Morel et Rochaix..... 10

I.3.2.3.Méthode de Vincent 10

I.4.Modes d'action des huiles essentielles 10

Chapitre II: Matériel et méthodes

II.1.Matériel..... 11

II.1.1.Matériel végétal 11

II.1.2.Souches bactériennes..... 12

II.2.Méthodes 12

II.2.1.Récolte et séchage 12

II.2.2.Extraction..... 12

II.2.3.Détermination du rendement 13

II.3.Recherche de l'activité antibactérienne..... 13

II.3.1.Préparation des pré cultures..... 13

II.3.2.Méthode de diffusion (Vincent) ..... ……13

II.3.3. Détermination de la CMI et de la CMB..... 14

II.3.3.1.Méthode de dilution (sur milieu gélose)..... 14

II.3.3.2.Méthode de microdilution (sur milieu liquide)..... 15

Chapitre III: Résultats et discussion

III.1. Rendement en huiles essentielles 17

III.2.Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées 20

III.2.1.Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Juniperus sabina*..... 20

III.2.2.Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pinus nigra* 22

III.2.3.Evaluation de la sensibilité des souches testées 23

III.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles 28

III.3.1.Méthode de dilution 28

a) *Juniperus sabina*..... 28

b) *Pinus nigra* 28

III.3.2. Méthode de microdilution 29

III.4.Nature de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées 30

Conclusion 31

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau I : Rendement en huile essentielle des deux plantes étudiées 17

Tableau II : Rendements en huile essentielle de quelques espèces de *Juniperus* 18

Tableau III: Rendements en huile essentielle de quelques espèces de *Pinus* 19

Tableau IV: Diamètres moyens des zones d'inhibition de l'huile de *Juniperus sabina*..... 20

Tableau V: Diamètres moyens des zones d'inhibition de l'huile de *Pinus nigra*..... 22

Tableau VI : Nature de la sensibilité des souches vis-à-vis des deux huiles essentielles..... 24

TableauVII : Les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* 28

Tableau VIII : Les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Pinus nigra* 29

Tableau IX : Nature de l'activité des huiles essentielles de *Juniperus sabina* et *Pinus nigra* 30

Liste des figures

Photographie 01 : *Juniperus sabina* 11

Photographie 02:*Pinus nigra* 11

Figure 03: Détermination de la concentration minimale inhibitrice par la méthode de microplaque 16

Figure 04 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* ..... 21.

Figure 05 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pinus nigra* 23

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de la Normalisation

ARN : Acide ribonucléique

ATPase: Adénosine Triphosphate Synthétase

ATCC: American Type Culture Collection

BTM: Bromothymole

CMB: Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DL_{50} : Dose létale inhibant 50% de la population microbienne

DMSO: Dimethylsulfoxyde

HE : Huile essentielle

IT : Inhibition totale

ml : Millilitre

MH : Milieu de Mueller Hinton

mm: Millimètre

NCCB: Netherlands Culture Collection of Bacteria

UFC : Unité formant colonie

µl : Microlitre

Depuis l'antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Qu'est-ce qui les a guidés à employer une plante plutôt qu'une autre? Le hasard? La religion? La superstition? L'expérience, certainement (Iserin, 2001).

Les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives (Iserin, 2001). L'histoire des substances naturelles s'identifie en partie à celle de la pharmacie, dont une discipline, la pharmacognosie, étudie les poisons et les remèdes naturels, ou par extension la plupart des substances biologiquement actives (Mohammedi, 2013).

Il y a quelques décennies, les maladies infectieuses semblaient maîtrisées grâce à la généralisation des mesures d'hygiène et à l'utilisation des antibiotiques et des vaccins. Les progrès scientifiques et technologiques laissaient même croire à une possible éradication de nombreuses pathologies (Okusa, 2012).

Depuis leur découverte au début du 20ème siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies incurables. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme (Guinoiseau, 2010).

En devenant insensibles à tout traitement, ces bactéries limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour, finalement, conduire à une impasse thérapeutique (Guinoiseau, 2010).

La découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries. L'exploration des ressources naturelles apparaît comme prometteuse car celles-ci constituent, par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives (Guinoiseau, 2010).

En effet, les plantes sont souvent caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles connues depuis longtemps pour leurs activités antiseptiques et thérapeutiques dans la médecine populaire (Selles, 2012). Les huiles essentielles produites comme métabolites secondaires (Zhiri et Boudoux, 2005) ont été élaborées à partir de plantes aromatiques pour se soigner, pour conjurer le mauvais sort,

aromatiser les aliments et les conserver. Elles ont été recommandées également pour le plaisir et la détente que procure leur pratique régulière (Selles, 2012).

Les huiles essentielles ont beaucoup à offrir. Plusieurs recherches scientifiques confirment que certaines peuvent être analgésiques, calmantes, cicatrisantes, alors que d'autres sont bactéricides, fongicides, virucides… (Turbide 2010).

L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries (Iserin, 2001).

L'Algérie comme tout pays méditerranéen se distingue d'une biodiversité forestière incontestable représentée remarquablement par les ressources naturelles qui constituent un réservoir d'agents thérapeutiques notamment en phytothérapie favorisée par sa riche et diversifiée flore aromatique.

C'est ainsi que nous nous sommes fixées comme objectif dans ce présent travail d'étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de deux espèces appartenant à deux familles botaniques différentes, la famille des Cupressaceae représentée par l'espèce *Juniperus sabina* L et la famille des Pinaceae représentée par l'espèce *Pinus nigra*.

Le document est scindé sur trois chapitres : le premier chapitre est une synthèse bibliographique dans laquelle nous regroupons et présentons l'essentiel de notre requête et investigation sur la matière végétale valorisée utilisée comme modèle pour l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles tirés d'une littérature variée. Dans Le deuxième chapitre, nous détaillons le matériel végétal utilisé, le procédé d'extraction de ses huiles essentielles et ensuite l'étude de l'activité antibactérienne.

Les résultats sont finalement donnés, détaillés, analysés et discutés dans le troisième et dernier chapitre.

I.1.Les huiles essentielles

Dans toutes les civilisations de l'antiquité, la mention des arômes est présente .D'abord, on se servit des plantes entières pour apporter soulagement et bien-être (sous forme de cataplasmes, infusions, macérations, décoctions). Ensuite, l'homme s'est intéressé à « détacher de son support» le principe aromatique d'une plante (Lardry et Haberkorn, 2007).

Les pharaons utilisaient l'embaumement, avec un mélange d'huiles aromatiques de cèdre et de basilic, qui manifestait une pratique assez sûre des plantes aromatiques (Lardry et Haberkorn, 2007).

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums (Helal, 2011).

I.1.1.Définition

Une huile essentielle peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste (Attou, 2008).

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes (Lamamra, 2007).

Pour la 8ème édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont «des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation» (Bruneton, 2009).

La norme francaise AFNOR NF T75-006 (févier 1998) définit l'huiles essentielle comme «un produit obtenu à partir d'une matière premiere végétale, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» (Bruneton, 1999).

I.1.2.Répartition, localisation

Les huiles essentielles n'éxistent quasiment que chez les végétaux supérieurs.Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de famille, (ex :Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae…). Elles peuvent etre stockées dans tous les organes végétaux :les fleurs, les feuilles et moins souvent les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits et les graines.(Anton et Lobstein, 2005 ;Bruneton ,2009).

I.1.3. Propriétés physiques

Liquide à temperature ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes , elles ne sont que très rarement colorées. La plupart des huiles essentielles ont une densité inférieure à celle de l'eau et sont entrainable à la vapeur d'eau.Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques, les huiles fixes et la vaseline ; très altérables, elles s'oxydent au contact de l'air et de lumière. Elles se conservent dans des flacons propres et secs en alluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté antiactinique et stockées à l'abri de la chaleur et de la lumiere (Bruneton, 2009 ; Hellal, 2011).

I.1.4.Facteurs de variabilité des huiles essentielles :

- **Facteurs d'environnement**

La composition en huiles essentielles dépend du sol et de ses paramètres, du climat (température et lumière) et techniques sylvicoles (densité de plantation, irrigation, utilisation d'engrais,…) (Mapola, 2003).

- **Chémotype**

Une même plante aromatique, botaniquement définie, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développera (Lamamra, 2007).

- **Influence du cycle végétatif**

Les différents composants d'huile essentielle peuvent varier de façon remarquable tout au long du cycle végétatif en rapport avec l'âge de la plante et la période de récolte ou la saison (Mapola, 2003).

- **Influence du procédé d'extraction**

Au cours de l'extraction, les constituants des huiles essentielles connus pour être fragiles, sont soumis aux effets combines d'un milieu aqueux, de son acidité et de sa température, et peuvent subir des conversions chimiques essentielles (Bruneton, 1999).

La composition d'une huile essentielle varie aussi en fonction du temps d'extraction, des traitements préliminaires (transport, durée de séchage et de stockage du matériel végétal) (Selles, 2012).

I.1.5.Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Ces techniques d'extraction reposent toutes sur le même principe, basé sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère (Herzi, 2013).

Selon l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et la pharmacopée européenne l'hydro-distillation est la méthode la plus indiquée pour l'extraction d'une huile essentielle et le contrôle de sa qualité (Selles, 2012).

Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal dans un ballon contenant de l'eau distillée qui est ensuite portée à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (El Haib, 2011).

Il existe de nouvelles méthodes qui sont utilisées, telles que l'extraction assisté par micro-onde, extraction par des solvants organiques et l'extraction par les gaz supercritiques (Bruneton, 1999).

I.1.6. Biosynthèse des huiles essentielles

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles (Bouguerra, 2012).

Ces constituants appartiennent,de facon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogéniques distinctes : le groupe des terpènes d'une part et celui des composés aromatiques dérivés du phénylpropane,beaucoup moin frequents d'autre part (Bruneton, 2009).

Les composés terpéniques constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal et les principaux constituants des huiles essentielles. Ils sont synthétisés à partir d'un précurseur unique appelé l'isopentenyl pyrophosphate (IPP). Cette unité isoprénique à 5 atomes de carbone peut être synthétisée dans le cytoplasme via la voie du mévalonate ou dans les plastides via la voie non mévalonique (la voie de déoxy xylulose phosphate) (annexe V).

La voie du mévalonate consiste en la condensation de deux molécules d'acetyl CoA pour former l'acetoacétyl CoA qui se transforme après une chaine des réactions enzymatiques et consommatrices d'énergie en mévalonate 5-diphosphate, puis une réaction de décarboxylation permet de transformer ce dernier en IPP (annexe V).

Alors que pour la voie non mévalonique, la condensation tête à tête deglyceraldehyde3-phosphate avec le pyruvate conduit à la formation de 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) qui subit à une chaine des réactions enzymatiques aboutissent par la suite à la formation de 1-hydroxy-2-methyl-2(E) butenyl-4PP (HMBPP), qui sous l'action de HMBPP réductase se transforme en IPP (Lemaoui, 2011 ; Ngakegni-Limbili., 2012).

L'isopentényl pyrophosphate est isomérisé par l'isopentényl diphosphate isomérase en diméthylallyl pyrophosphate(DMAPP) (Bruneton, 1999).

Après la synthèse de l'unité isoprénique, des réactions de condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isopréniques aboutissent à formation des différentes classes terpéniques ; des monoterpènes C10 (issus de la condensation de 2unités isoprénique), dessesquiterpènes C15 (3 unités isoprénique), des diterpènes C20 (4 unités isoprénique) et des triterpènes C30 (6 unités isoprénique) (Lemaoui, 2011).

Pour chaque classe de terpène, des différentes réactions chimiques, cyclisation fonctionnalisation, réarrangement…etc., permettent de former diverses structures terpéniques à partir d'un précurseur unique (Bruneton, 1999).

I.1.7.Utilisation des huiles essentielles :

I.1.7.1.Agro-alimentaire

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires. Le carvacrol, est additionné à différents produits alimentaires pour rehausser le goût et empêcher le développement des contaminants alimentaires (Rhayour, 2002).

I.1.7.2.Pharmacie

Leur application est dans les inhalants, les embrocations et les savons. Elles peuvent également être utilisées pour leur activité antiseptique et antimicrobienne. Les pommades, crèmes, gels à base d'huiles essentielles sont destinés à soulager les entorses, les courbatures, les allergies articulaires ou musculaires et sont administrées par voie externe (Mapola, 2003).

I.1.7.3.Parfumerie et cosmétologie

L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (Rhayour, 2002).

I.1.8.Toxicité des huiles essentielles

La majorité des constituants des huiles essentielles sont lipophiles donc rapidement absorbés par voie pulmonaire, cutanée ou digestive. Il convient donc d'être vigilant quant aux doses utilisées. En générale, par voie orale, la toxicité aiguë des huiles essentielles est faible. Leur DL_{50} est entre 2 et 5 g /kg (anis, eucalyptus, etc.) ou supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande…etc.). Une quinzaine, ont une DL_{50} comprise entre 1 et 2 g /kg (Basilic, Estragon etc.). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/), Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg) et celle de la moutarde (0,34 g/kg).La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue quelle que soit la voie d'administration : les éventuels effets secondaires ne sont que rarement signalés (Bruneton, 1999). Parmi ces effets, citons : des allergisants ou hypersensibilisants, photosensibilisants dus aux furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou à doses massives (Lamamra, 2007).

I.2.Activités microbiennes des huiles essentielles

A côté de leur propriété carminative, antiradicalaire, hépatoprotectrice (Lobstein 2005), anticarcinogène (Bruneton, 1999) herbicide, insecticide (Tripathi et Upadhyay, 2009) allélopathique, spasmolytique et sédative, irritante etc. (Bruneton, 1999) ; d'autres activités très importantes sont démontrées jusqu'à présent à savoir l'activité antioxidante, l'activité anti inflammatoire et la plus importante reste l'activité antimicrobienne. On constate ainsi :

I.2.1.Activité antifongique

Rahouti et *al*, (2011) ont rapporté que l'huile essentielle *d'Eucalyptus camaldulensis* et de *Menthapulegium* inhibient totalement pour des concentrations de 30µl et 10µl respectivement, la croissance d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium expansum ;* champignons responsables de la pourriture des pommes en conservation.

I.2.2.Activité antivirale

Tkachenko en 2007 a démontré l'activité antivirale des HEs extraites des fruits et des racines de *Heracleum lehmannianum, Heracleum ponticum, Heracleum aconitifolium* appartenant à la famille des Apiaceae contre influenza types A et B testés *in vivo* sur des souris par voies orale, intranasale et par inhalation.

D'autre part, des extraits de *Thymus vulgaris* ont montré une activité antivirale très importante contre HSV-1 and HSV-2 (Behravan et *al*, 2011).

I.2.3.Activité antiparasitaire

L'huile essentielle *d'Artemisia herba-alba Asso* (Asteraceae) a été éprouvée pour son activité antileishmanienne vis-à-vis de deux espèces de Leishmania *Leishmania tropica* et *Leishmania major* à une concentration de 2 µg/ml (Hatimi et *al*, 2000).

I.2.4.Activité antibactérienne

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881.Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à une autre et d'une souche bactérienne à une autre (Ben Ayache.2013).

L'étude menée par Kaloustian et *al* en 2008 montre notamment l'activité antibactérienne de six huiles essentielles *(Lavandula angustifolia, Lavandula latifolia, Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis, Thymus vulgaris chémotype carvacrol, Thymus*

zygis chémotype thymol) ont été testés sur deux souches *: Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et qui ont montré une grande sensibilité vis-à-vis de ces huiles essentielles.

De leur côté, Mansouri et *al* en 2011 ont démontré l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *plectranthus aromaticus* à des faibles concentrations de 1/500 v/v contre quatre bactéries pathogènes : *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*.

I.3. Les principales méthodes de détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles:

I.3.1.Les techniques en milieu liquide

I.3.1.1. Méthode des disques de Sarbach

L'essence à différentes concentrations est déposée sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, puis placé dans des tubes à essai qui contient chacun un certain volume de bouillon nutritif ensemencé et une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation. L'action bactéricide totale est confirmée par repiquage en milieu liquide (Rhayour, 2002).

I.3.1.2.Méthode de Maruzuella

Elle permet l'étude du pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'HE dans l'éthanol. Les solutions mères sont préparées dans l'éthanol 95%, la solution alcoolique est ensuite répartie à différentes doses dans le milieu liquide préalablement ensemencé. Après d'incubation, on effectue des subcultures qui permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (Rhayour 2002).

I.3.2.Techniques en milieu solide

I.3.2.1. Méthode de microatmosphère

L'huile essentielle est déposée sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle d'une boite de Pétri préalablement ensemencée puis incubée couvercle en bas. L'évaporation des substances volatiles agit ou non sur la croissance des germes (Rhayour ,2002 ; Rahouti et *al*, 2011).

I.3.2.2. Méthode de Morel et Rochaix

L'huile essentielle est solubilisée dans l'alcool à différentes concentrations et incorporée dans un milieu gélosé ensemencé, puis coulé en boîtes de Pétri. L'alcool faciliterait la diffusion de l'essence dans le milieu (Rhayour, 2002).

I.3.2.3. Méthode de Vincent (diffusion sur agar)

Appelée aussi technique de l'antibiogramme. Le principe de cette méthode est la migration de l'huile essentielle par diffusion dans la gélose. Une quantité de l'HE est déposée sur des disques de papier filtre de 10 mm de diamètre. L'ensemble est mis sur des boite de Pétri contenant la gélose Muller-Hinton préalablement ensemencés. Après incubation la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour des disques. L'HE peut être versée dans un puits préparé sur la gélose au lieu des disques (Rhayour, 2002).

I.4.Mode d'action des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont hydrophobes. Leurs constituants se solubilisent dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires et entraîne la mort cellulaire (Guinoiseau, 2010).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP. Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, de RNA, des protéines et des polysaccharides (Faleiro, 2011 ; Bouguerra, 2012).

II.1.Matériel

II.1.1.Matériel végétal

Le matériel est présenté par le genévrier sabine et le pin noir. Leurs classifications sont présentées ci-dessous :

- **Classification**

Juniperus sabina

Règne: Plantae

Phylum: Pinophyta

Classe: Pinopsida

Ordre: Pinales

Famille: Cupressaceae

Genre: Juniperus

Espèce: *Juniperus sabina*

Photographie 01 : *Juniperus sabina*

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=juniperus+sabina consulté le 19/05/2015

Pinus nigra

Règne : Plantae

Phylum : Pinophyta

Classe : Pinopsida

Ordre : Pinales

Famille : Pinaceae

Genre : Pinus

Espèce :*Pinus nigra*

http://eol.org/pages/1061736/hierarchy_entre 57311291/overview consulté le 19/05/2015

Photographie 02: *Pinus nigra*

II.1.2.Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Juniperus sabina* et *Pinus nigra* a été évaluée sur cinq souches bactériennes dont trois à Gram négatif et deux à Gram positif :

- **Souches à Gram négatif :** *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones et *Escherichia coli* NCCB 1 (annexe V)
- **Souches à Gram positif :** *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline (annexe V)

II.2.Méthodes

II.2.1.Récolte et séchage

Le matériel végétal (feuilles), fraîchement récolté, a été débarrassé des mauvaises herbes, séché à l'ombre dans un endroit aéré, sec et à l'abri de la lumière et de toute pollution, puis coupé en parties fines.

II.2.2.Extraction

L'hydrodistillation est le procédé suivi pour extraire les huiles essentielles du végétal au moyen d'un dispositif d'extraction de type Clevenger (annexe IV). Elle consiste à mettre 100 g du végétal coupé en fines parties dans un ballon en verre avec une quantité d'eau distillée suffisante pour recouvrir la matière végétale. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile qui se dégagent passent à travers le serpentin de refroidissement en verre où aura lieu la condensation (Laouer, 2004).

L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile. Enfin, l'huile obtenue est conservée dans des flacons opaques bien scellés à une température basse (4°C). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début de l'ébullition (Laouer, 2004).

II.2.3.Détermination du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport de poids d'huile essentielle extraite (Pd HE) sur le poids sec de la matière végétale (Pd M.V.S.). Ce rapport permet d'estimer la production en huile essentielle des plantes (Williams et Lusunzi, 1994).

$$R\% = \frac{Pd_{HE}}{Pd_{M.V.S}}$$

II.3. Recherche de l'activité antibactérienne

II.3.1. Préparation des pré cultures

Une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland (10^8 UFC/ml) a été préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Cet inoculum sert à ensemencer la gélose de Mueller Hinton coulée dans des boites de Pétri sur une épaisseur de 4mm (qui correspond à20 ml pour les boites de 90 mm de diamètre) puis séchées à l'étuve à 37°C avant l'emploi.

L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage, il consiste à tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer à l'intérieur du tube puis le frotter à trois reprises sur toute la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boite à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution homogène de l'inoculum. Pour chaque souche testée, 8 boites de Pétri, (2 boites pour chaque dilution et 2 boites pour les témoins positif et négatif) ont été utilisées.

II.3.2.Méthode de diffusion (Vincent)

L'étude de l'activité antibactérienne est réalisée par le test de diffusion sur agar (annexe II). Des disques de papier Wattman de 6mm de diamètre ont été préparés, stérilisés puis déposés à la surface des boites ensemencées. 10 µl de l'huile essentielle diluée dans du DMSO à1/2, 1/5 et 1/10 (v/v) sont déposés à la surface des disques. La même quantité de pénicilline G et de DMSO sont utilisés comme témoin positif et négatif respectivement.

Afin de garantir des résultats reproductibles, chaque trois dépôts de l'huile essentielle de concentration similaire ont été placés dans la même boite, le test est répété deux fois pour avoir des résultats fiables. Apres 24 h d'incubation à 37°C, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré. (Louer, 2004).

II.3.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)

II.3.3.1.Méthode de dilution (sur milieu gélosé)

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice à partir d'une gamme de concentrations de l'huile essentielle dans le milieu de culture. D'après la méthode décrite par Benjilali (1986) et rapportée par Billerbeck et *al*, (2002), une solution de tween 80 à 10% a été préparée dans l'eau distillée, et stérilisée à 120°C pendant 20 minutes, est utilisée pour la préparation des dilutions.

La solution mère obtenue à partir du mélange de 1.25 ml de la solution de tween 80 à 10% et 1.25 ml de l'huile essentielle est agitée pendant 1 à 2 minutes afin de disperser l'huile, puis utilisée pour la préparation des séries de dilutions dans de l'eau distillée stérile. La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à 0.25, 0.125, 0.062, 0.031 et 0.015%. 1ml de chaque dilution est alors incorporé à 39 ml du milieu de culture Mueller Hinton maintenus en surfusion. Les mélanges sont immédiatement répartis dans deux boites de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 20 ml de milieu par boite. Après solidification, l'inoculation des géloses contenant l'huile essentielle est effectuée à partir d'une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland, sous forme de stries espacées et parallèles (annexe III).

Après incubation à 37°C pendant 24 h, on note pour chaque souche la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la plus petite concentration pour laquelle aucun développement n'est visible.

Pour déterminer la nature de l'effet (bactéricide ou bactériostatique) ; à partir de la boite contenant la CMI, gratter une petite quantité de la gélose à partir de la strie sans croissance, puis procéder au repiquage dans un tube de bouillon nutritif et observer la présence ou l'absence d'un trouble après 24 heures d'incubation à 37°C (Billerbeck et *al*, 2002).

II.3.3.2.Méthode de microdilution (sur milieu liquide)

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée par la méthode de microdilution sur bouillon en utilisant des plaques en polystyrène de 96 puits (figure 03). Les extraits des huiles ont été dissous dans le DMSO (8 mg/100 µl) puis dilués dans 1900 µl de bouillon Mueller Hinton. La solution de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* (200 µl) a été transférée dans les trois premiers puits de la première colonne, et la solution de l'huile essentielle de *Pinus nigra* (200 µl) a été transférée dans les trois derniers puits. Une solution d'antibiotique (pénicilline G) a été préparée à raison de 20 µl /180 µl (MH), puis répartie dans les deux puits intercalés entre les trois premiers puits de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* et ceux de l'huile essentielle de *Pinus nigra*. Le bouillon Mueller Hinton additionné de bleu de bromothymol (100 µl) a été réparti dans les puits de la 2ème colonne jusqu'à la 12ème colonne. Une série de dilution de 1/100 a été réalisée de la 1ère colonne jusqu'à la 10ème colonne. Des cultures bactériennes jeunes (18 heures) ont été suspendues dans l'eau physiologique de façon à obtenir une turbidité de 0.5 Mc Farland, puis inoculées à partir de la 2ème colonne jusqu'à la 11^{éme} colonne à raison de 100 µl par puits. La 11ème colonne de la plaque qui contient le milieu Mueller Hinton additionnée de bleu de bromothymol mais sans l'huile essentielle et ensemencé avec la suspension bactérienne, sert de témoin positif. La 12ème colonne qui contient uniquement le milieu Mueller Hinton additionnée de bleu de bromothymol est utilisée comme témoin négatif.

Après 24 h d'incubation à 37°C, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée comme étant la plus faible concentration de l'huile essentielle qui inhibe complètement la croissance bactérienne visuelle. La concentration minimale bactéricide (CMB) est considérée comme la plus faible concentration qui ne donne aucune croissance bactérienne, elle a été mise en évidence en transférant à partir des puits de croissance négative une goutte dans des tubes de bouillon nutritif, et observer la présence ou l'absence d'un trouble après 24h d'incubation à 37°C (Yakhlef et *al*, 2011 ; Okusa, 2012).

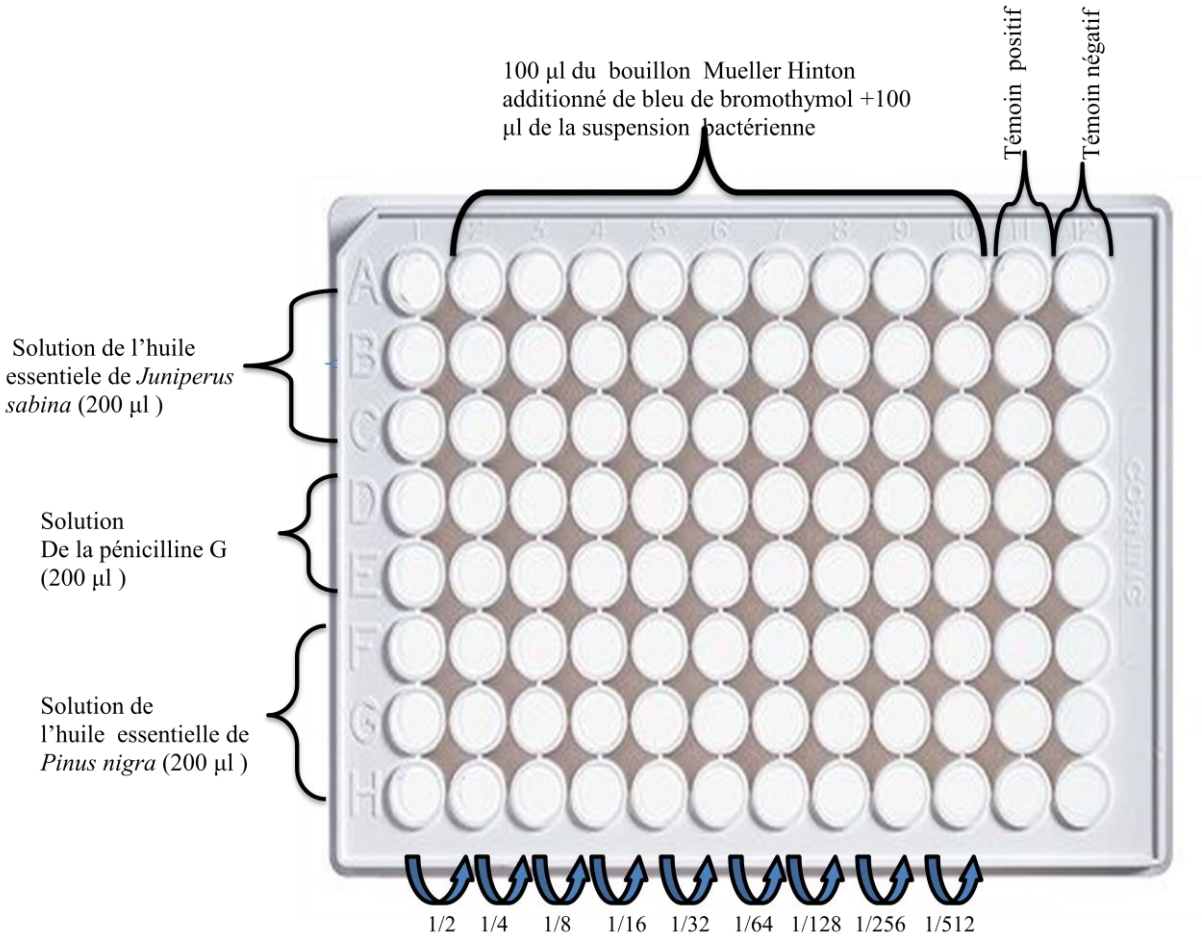


Figure 03: Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode des microplaques

III.1. Rendements en huiles essentielles

Le tableau ci-dessous présente les résultats des rendements en huiles essentielles des deux espèces étudiés.

Tableau I **:** Rendement en huile essentielle des deux plantes étudiées

Espèces	Rendements (%)
Juniperus sabina (feuilles)	0.39
Pinus nigra (aiguilles)	0.47

L'huile essentielle de genévrier sabine est d'une couleur jaune pâle avec une odeur piquante. Durant notre étude et après extraction; il a présenté un rendement de 0.39 %. Ce rendement est inférieur à celui que nous avons obtenu avec le pin noir (Tableau I).

Le tableau II montre que le rendement obtenu avec *Juniperus sabina* est nettement supérieur à celui obtenu par Verykokidou et *al*, (1996) avec *Juniperus oxycedrus* (0.15%) en Grèce et *Juniperus communis ssp. Communis* (0.19%) obtenu en Italie cité par Angioni et *al*, (2003) ainsi que *Juniperus communis* (0.23%) obtenu par Mansouri et *al*, (2011) au Maroc.

Il est par contre proche du rendement de *Juniperus drupacea* (0.45%) de la Grèce par Verykokidou et *al*, (1996).

Néanmoins, le rendement de *Juniperus sabina* est clairement très faible comparé à celui de la même espèce *Juniperus sabina* (1.6%) obtenu en France par Pages et *al*, (1996). Il inférieur aussi à celui de l'espèce *Juniperus communis* (0.5%) de l'Iran obtenu par Mirza et *al*, (2003) et de sa sous espèce *Juniperus communis L ssp. nana* (0.78%) obtenu par Marongiu et *al*, (2005) en Italie.

Le rendement de l'huile essentielle du genévrier sabine étudié est largement inférieur à celui de *Juniperus phoenicea* (0.61%) de la Grèce par Verykokidou et *al*, (1996), et de la même espèce obtenue en Tunisie avec un rendement qui varie de 0,51% à 1,35 % par Medini et *al*, (2009).Il est inférieur également à celui de ses sous espèces *Juniperus phoenicea ssp.lycia* (1,10±0,03%) et *Juniperus phoenicea ssp. turbinata* (1.02%) obtenu au Maroc par Mansouri et *al*,(2011).

Tableau II **:** Rendements en huile essentielle de quelques espèces de *Juniperus*

Plantes	Rendements (%)	Pays et références
Juniperus sbina	0 ,39	Présente étude
Juniperus excelsa ssp polycarpos	1	Iran (Zadeth -Kheyyat et *al*, 2011)
Juniperus sabina	1.6	France (Pages et *al*, 1996)
Juniperus oxycedrus	0,15	Grèce (Verykokidou et *al*, 1996)
Juniperus communis	0,5	Iran (Mirza et *al*, 2003)
Juniperus phoenicea	0,51-1,35	Tunisie (Medini et *al*, 2009)
Juniperus macropoda	0,5-1 ,2	Inde (Bagchi et *al*, 2005)
Juniperus communis L.ssp nana	0,78	Italie (Sardinia) (Marongiu et *a*l, 2005)
Juniperus communis .ssp communis	0.19± 0,04	Italie (Sardinia) (Angioni et *al ,2003)*
Juniperus phoenicea ssp turbinata	1,02 ± 0,02	Maroc (Mansouri et *al*, 2011)
Juniperus phoenicea	0,61	Grèce (Verykokidou et *al*, 1996)
Juniperus communis	0,23±0,02	Maroc (Mansouri et *al*, 2011)
Juniperus phoeniceassp.lycia	1,10±0,03	Maroc (Mansouri et *al*, 2011)
Juniperus drupacea	0,45	Grèce (Verykokidou et *al*, 1996)

L'huile extraite des feuilles du pin noir se présente sous une couleur jaune claire avec une odeur de résine. Elle présente un rendement de 0.47% (Tableau I). Ce rendement est très faible par rapport à celui de l'espèce *Pinus pinastar* de l'Algerie (Boumerdes) qui est de 0.61% (Ait Mimoune et *al*, 2013) et celui de l'espèce *Pinus nigra ssp. dalmatica* de Croatie qui est de l'ordre de 0.77 % (Politeo et *al*, 2011). Le rendement de *Pinus nigra* est également inférieur à celui obtenu par l'espèce *Pinus sylvestris* (0.8%) en Chine par Yang et *al*, (2011) et ceux des espèces *Pinus ponderosa* et *Pinus brutia* de la Tunisie ayant des rendements de (0.9%) et (1.1%) respectivement (Ismail et *al*, 2014).

Le rendement obtenu de l'huile essentielle de *Pinus nigra* est proche des rendements en huiles essentielles de l'espèce *Pinus halepensis* en Algérie (Sidi Feredj) qui présente

(0.52%) (Dob et *al*, 2005), et de l'espèce *Pinus nigra arnold* en Turquie qui varie de 0.44% à 0,51 % selon, les régions et les saisons de récolte (Sezik et *al*, 2010).

Tableau III **:** Rendements en huile essentielle de quelques espèces de *Pinus*

Plantes	Rendements (%)	Pays et références
Pinus nigra	0.47	Présente étude
Pinus halepensis	0.52	Algérie (Dob et *al*, 2005)
Pinus densiflora	0.304	Corée (Ju-Sang et *al*, 2011)
Pinus thunbergi	0 .296	Corée (Ju-Sang et *al*, 2011)
Pinus nigra arnold	0.06-1.03	Turquie (Sezik et *al*, 2010)
Pinus nigra ssp.dalmatica	0.77	Croatie (Politeo et *al*, 2011)
Pinus nigra ssp.pallusiana	0.2-0.5	Turquie (Ucar et *al*, 2004)
Pinus nigrassppyramidata	0.2-0.5	Turquie (Ucar et *al*, 2004)
Pinus pinastar	0.61	Algérie (Ait Mimoune et *al*, 2013)
Pinus koraiensis	1.2	Chine (Yang et *al*, 2011)
Pinus sylvestris	0.8	Chine (Yang et *al*, 2011)
Pinus brutia	1.1	Tunisie (Ismail et *al*, 2014)
Pinus ponderosa	0.9	Tunisie (Ismail et *al*, 2014)

Les rendements obtenus avec les deux espèces *Pinus nigra et Juniperus sabina* présentent des différences plus au moins remarquables à travers le monde comparés à ceux obtenus avec des mêmes espèces ainsi que d'autres espèces appartenant au même genre. Cette différence serait due à plusieurs facteurs déterminants : l'origine géographique (Bagchi et *al*, 2005 ; Sezik et *al*, 2010), les variations des espèces elles-mêmes et les chimiotypes (Ucar et al, 2004 ; Ismail et *al*, 2014), les facteurs climatiques à savoir la température et l'humidité (Achak et Romane, 2009), la variation saisonnière pour la période de récolte (Sezik et *al*, 2010), la composition chimique des huiles essentielles des différentes espèces (Bruneton, 1999 ; Lahlou 2004 ; Bakkali et *al* ,2008), et l'influence des organes producteurs des huiles essentielles dans la plante, le stade de croissance, la méthode d'extraction appliquée et les caractéristiques du sol (Bruneton, 1999 ; Svoboda, 2000 ; Burt 2004 ; Emami et *al*, 2011). Le rendement dépend également des conditions de culture, le prétraitement des plantes, le rapport de l'eau dans les feuilles et la durée d'extraction (Ait Mimoune et *al*, 2013).

III.2.Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées

Les aromatogrammes réalisés ont révélé l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles contre les différentes souches bactériennes testées. Leurs activités potentielles sont évaluées qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition à différentes dilutions.

Les résultats obtenus montrent que l'effet antibactérien est proportionnel à la concentration de l'huile essentielle.

III.2.1.Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Juniperus sabina*

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés sont présentés dans le tableau IV :

Tableau IV: Diamètres moyens des zones d'inhibition de l'huile de *Juniperus sabina*

Dilutions (v/v) / Souches	1 /2	1/5	1/10
***Escherichia coli* NCCB 1**	9,75 ± 0,81*	7 ,03 ± 0,19*	6,35 ± 0,14*
***Escherichia coli* ATCC 25922**	8.5 ± 0.07*	7,91 ± 0,43*	7,41 ±0,21*
***Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones**	13,02 ± 0,33*	8,29 ± 0,14*	7,58 ± 0,10*
***Bacillus subtilis* ATCC 6633**	7,40 ± 0,15*	7,15 ± 0,45*	6,38 ± 0,05*
***Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline**	7,17 ± 0,4*	6,39 ± 0,13*	6,26 ± 0,12*

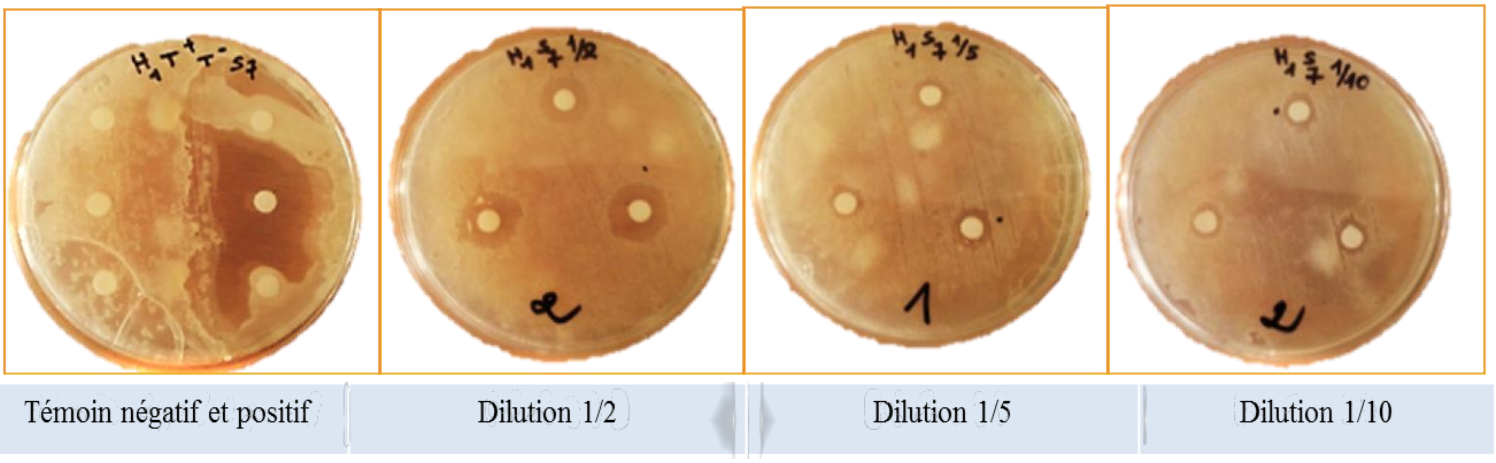
* : Moyenne de trois répétitions (mm) ± écart type

L'huile essentielle de *Juniperus sabina* révèle une activité majeure vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones qui, dans les deux dilutions 1/2 et 1/5 présente des diamètres d'inhibition de 13.02 ± 0.33 mm et 8.29 ± 0.14 mm respectivement.

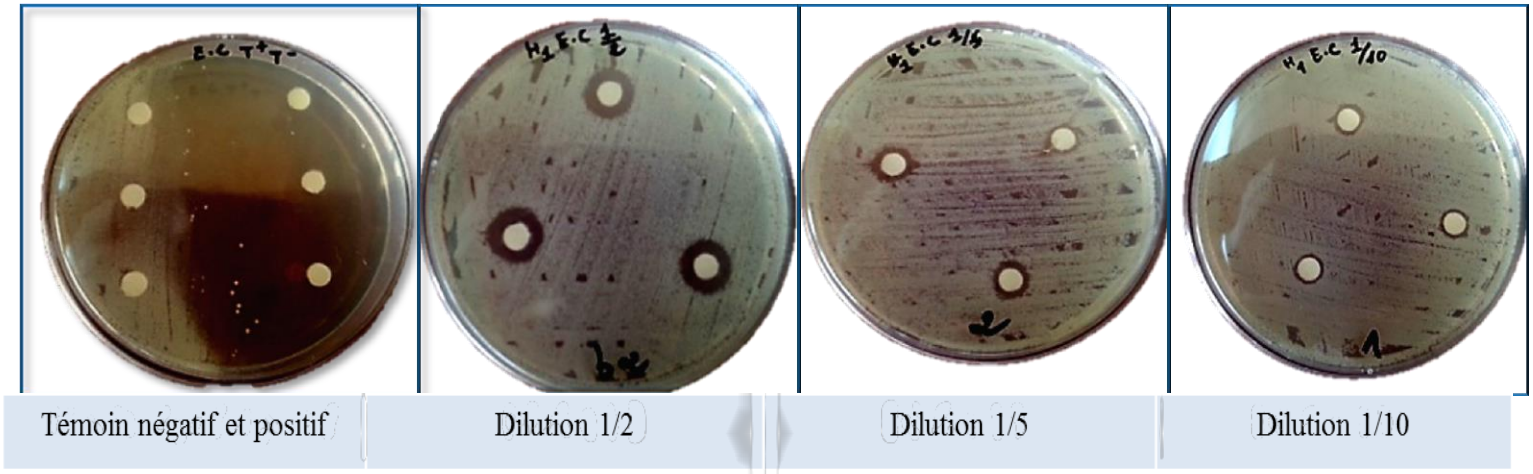
Cette huile agit également sur *Escherichia coli* NCCB 1 et *Escherichia coli* ATCC 25922 dont les diamètres d'inhibition sont 9.75 ± 0.81 mm et 8.5 ± 0.07 mm respectivement à la dilution 1/2. A la dilution 1/5 et 1/10, l'activité de l'huile essentielle est très faible elle présente un diamètre d'inhibition qui varie de 6.35 ± 0.14 mm à 7.91±0.43 mm.

L'activité de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* sur les souches à Gram^{+} (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 est très faible comparée à celle observée avec les Gram^{-}, les diamètres d'inhibition observés varies de 6.26±0,12mm à 7, 40 ± 0,15mm.

Les souches les plus sensibles à l'huile de *Juniperus sabina* (*Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones et *Escherichia coli* NCCB 1 sont présentées dans la figures 4 :



A : *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones



B : *Escherichia coli* NCCB 1

Figure 04 **:** Mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* (A: *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones, B: *Escherichia coli* NCCB1)

III.2.2.Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pinus nigra*

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés sont présentés dans le tableau V :

Tableau V: Diamètres moyens des zones d'inhibition (mm) de l'huile de *Pinus nigra*

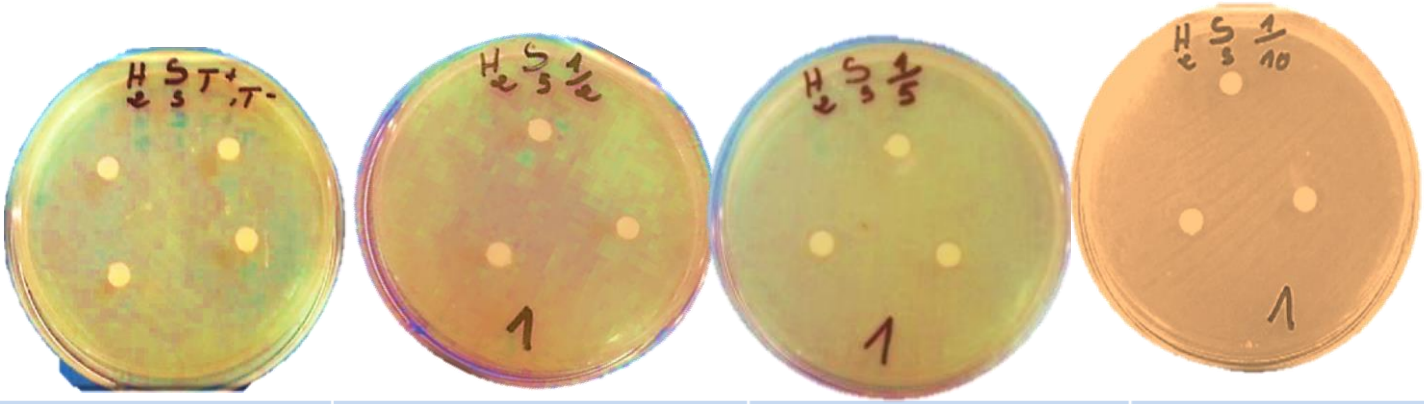
Dilutions v/v / Souches	1/2	1/5	1/10
***Escherichia coli* NCCB 1**	6	6	6
***Escherichia coli* ATCC 25922**	6	6	6
***Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones**	IT*	14.09 ±1.02	9.52 ± 0.09
***Bacillus subtilis* ATCC 6633**	6	6	6
***Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline**	IT*	9.10 ± 0.27	8,03 ± 0 .47

IT*= Inhibition totale

L'aromatogramme montre que l'huile essentielle de *Pinus nigra* exerce son activité maximale sur *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones qui est complètement inhibée à la dilution 1/2 et montre une sensibilité remarquable avec les dilutions 1/5 et 1/10 avec des diamètres d'inhibition de l'ordre de 14,09±1.02 mm et 9,52±0.09 mm respectivement. Par contre, elle ne présente aucune activité à l'égard des souches *Escherichia coli* NCCB 1 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

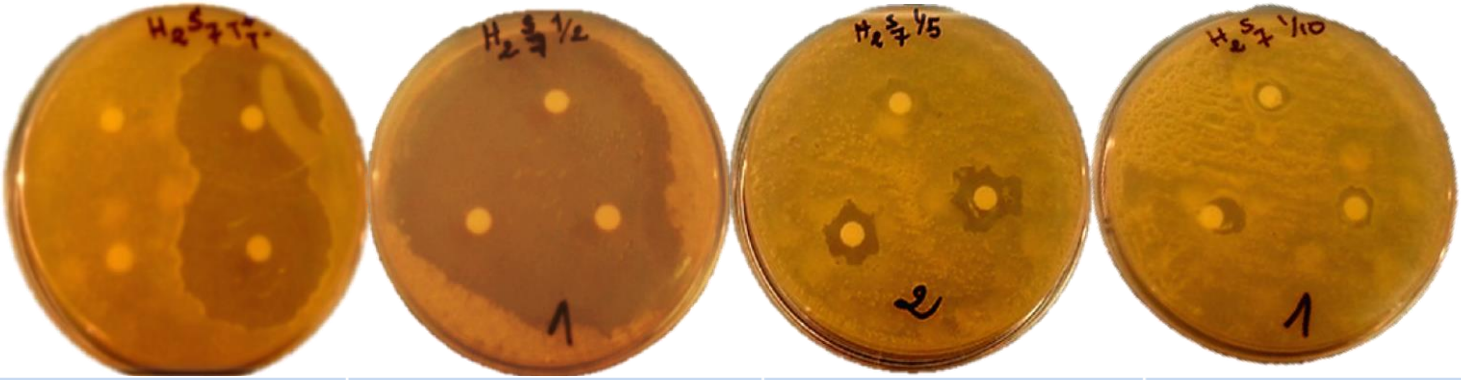
D'autre part, cette huile essentielle manifeste une forte activité aussi vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 qui est complètement inhibé à la dilution 1/2 et révèle une sensibilité pour les dilutions 1/5 et 1/10 respectivement.

La figure 5 illustre l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Pinus nigra* vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.



Témoin négatif et positif	Dilution 1/2	Dilution 1/5	Dilution 1/10

A :*S. aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline



Témoin négatif et positif	Dilution 1/2	Dilution 1/5	Dilution 1/10

B : *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones

Figure 05 **:** Mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pinus nigra*(A : *S.aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline, B : *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones.

III.2.3.Evaluation de la sensibilité des souches testées

D'après (Harzallah-Skhiri et *al*, 2011), un germe est considéré « non sensible » pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm, « sensible » pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, « très sensible » pour un diamètre entre 14 et 20 mm, et « extrêmement sensible » pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm.

Tableau VI : Nature de la sensibilité des souches vis-à-vis des deux huiles essentielles

Huiles essentielles / Souches	*Juniperus sabina*			*Pinus nigra*		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
***Escherichia coli* NCCB 1**	+	-	-	-	-	-
***Escherichia coli* ATCC 25922**	+	-	-	-	-	-
***Bacillus subtilis* ATCC 6633**	-	-	-	-	-	-
***S aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline**	-	-	-	+++	+	+
***Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones**	+	+	-	+++	++	+

- : Non sensible ; + : Sensible ; + + : très sensible; + + + ; Extrêmement sensible

D'après les normes données dans le tableau ci-dessus, la sensibilité des souches bactériennes testées est variable à l'égard de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* et celle de *Pinus nigra*.

Suivant ces résultats, l'huile essentielle de *Juniperus sabina* est quantitativement active sur les différentes souches testées par rapport à celle de *Pinus nigra*, cependant, il est à noter que cette dernière est qualitativement plus active bien qu'uniquement sur les deux souches *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline.

Ainsi, mis à part *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones qui s'est manifestée extrêmement sensible, toutes les autres souches ont montré une certaine sensibilité même faiblement remarquable vis-à-vis de l'huile essentielle de *Juniperus sabina*. En revanche, trois souches (*Escherichia coli* NCCB1, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633) se manifestent très résistantes à l'égard de l'huile essentielle de *Pinus nigra* qui exerce une activité inhibitrice importante contre *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones.

L'effet antibactérien exercé par l'huile essentielle de *Juniperus sabina* vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones est importante. Cette souche est

sensible à une dilution de 1/2 (V/V) avec un diamètre d'inhibition de 13.02 mm. Des résultats similaires sont observés par Derwich et *al* (2010) au Maroc, l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* testée sur *Klebsiella pneumoniae* elle présente un diamètre d'inhibition de 14 mm.

D'autre part, nous avons constaté que l'huile essentielle de genévrier sabine est active sur *Escherichia coli* NCCB1 et *Escherichia coli* ATCC 25922 dont les diamètres d'inhibition sont 9.75 et 8.5 (v/v) respectivement à la dilution1/2. Il semble que cette souche présente des sensibilités plus intéressantes à l'égard des huiles essentielles des autres espèces de *Juniperus*. En effet, *Escherichia coli* ATCC 25922 étudié à Kosovo est extrêmement sensible à l'huile essentielle de *Juniperus communis* avec des diamètres d'inhibition de 25,28 mm et 39 mm variant celant les concentrations (Haziri et *al*, 2013). L'étude de Derwich et *al*, (2010) a rapporté qu'*Escherichia coli* aussi est extrêmement sensible pour l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* dont le diamètre d'inhibition est de l'ordre de 34 mm.

Une activité similaire à celle obtenue avec l'huile essentielle de *Juniperus sabina* sur *Escherichia coli* ATCC 25922 a été rapportée en Algerie par Bekhechi et *al*, (2010) en utilisant 15 µl de la solution de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*.

Staphylococcus aureus ATCC 43300 résistant à la méthicilline s'est manifesté insensible vis-à-vis de l'huile essentielle de *Juniperus sabina*, alors que Derwich et *al*, (2010) a montré que *Staphylococcus aureus* est très sensible à l'égard de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* avec un diamètre d'inhibition de 24 mm.

De même, Haziri et *al*, (2013) ont rapporté une importante activité de l'huile essentielle de *Juniperus communis* sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec des diamètres d'inhibition de 16,23 mm et 29 mm en utilisant respectivement les concentrations 1mg/ml, 3mg/ml et 5mg/ml de la solution de cette l'huile essentielle.

En revanche, l'activité de l'HE de *Juniperus communis* L sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 est modérée (11mm) et intéressante sur *Staphylococcus aureus* MFBF avec un diamètre d'inhibition de 14 mm, mais pour une concentration de 40 µl de l'huile essentielle (Pepeljnjak et *al*, 2005).

L'huile essentielle de *Juniperus sabina* n'est pas active sur *Bacillus subtilis* ATCC 6633.Un résultat similaire a été rapporté en Croatie par Pepeljnjak et *al*, (2005) avec l'huile

essentielle de *Juniperus communis* L sur *Bacillus subtilis* NCTC 8236 avec seulement un diamètre d'inhibition de 10 mm en utilisant 40 µl de la solution de l'huile essentielle.

Cette différence dans l'activité antibactérienne serait due à la différence des espèces de *Juniperus* testées ainsi qu'à la composition chimique de leurs huiles essentielles (Abdelouahab et Amadou, 2012).

L'huile essentielle de *Pinus nigra* présente une meilleure activité que celle de *Juniperus sabina* sur deux espèces. En effet, *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline ont été totalement inhibés à la dilution 1/2 (v/v). Ces résultats sont d'une grande importance et très intéressants par rapport aux à ceux des autres études.

D'après l'étude de Diğrak et *al*, (1999) en Turquie, l'huile essentielle de *Pinus nigra* semble exercer une activité moins importante sur *Klebsiella* FMC3 (13 mm).Contrairement à ce que nous avons observé avec *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones totalement inhibée avec l'huile essentielle de *Pinus nigra*.*Staphylococcus cowan*1 (12 mm) est moins sensible aussi que *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline totalement inhibé par l'huile essentielle de *Pinus nigra*. L'huile essentielle de *Pinus nigra* n'est pas active sur *Escherichia coli* PM. Le résultat est similaire à celui observé sur *Escherichia coli* NCCB1 et *Escherichia coli* ATCC 25922 lors de cette étude. *Bacillus subtilis* IMG22 (13 mm) se montre sensible à l'égard de l'huile essentielle de *Pinus nigra,* au contraire de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 qui est résistante dans la présente étude.

D'autre part, l'huile essentielle de *Pinus nigra ssp. Dalmatica* de la Croatie utilisée à différente concentration (5µl, 10µl et 20µl) n'as présenté aucune activité sur *Klebsiella* FNSST 017 et *Escherichia coli* FNSST 112 mais une forte activité contre *Staphylococcus* ATCC 25923 avec des diamètres d'inhibition allant jusqu'à 37 mm à 20µl de l'huile essentielle utilisée (Politeo et *al*, 2011).

Selon Miron et *al*, (2013) *Staphylococcus* aureus ATCC 25923 est très sensible vis-à-vis de l'huile essentielle de *Pinus cembra L* de la Roumanie avec un diamètre d'inhibition de 22 mm mais en utilisant 30µl de la solution de l'huile essentielle. Tandis qu' *Escherichia coli* ATCC 25922 s'est montrée résistante.

Finalement *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* manifestent des sensibilités plus au moins importantes vis-à-vis de l'huile essentielle de *Pinus pinaster* avec des diamètres d'inhibition respectivement de 13 mm, 10 mm et 8 mm, mais l'importance de cette activité serait due à la concentration de la solution de l'huile essentielle utilisée (40µl) (Ait Mimoune et *al,* 2013).

Globalement, les souches de *Klebsiella* et *Staphylococcus* présentent toujours des sensibilités à l'égard des huiles essentielles des pins testés avec des variabilités qui dépendent de la concentration de la solution de l'huile essentielle utilisée ainsi que du sérotype de la souche utilisée. Toutes les espèces d'*Escherichia coli* sont résistantes à l'égard de toutes les huiles essentielles testées, ceci conforte les résultats que nous avons obtenus.

Il a été souligné dans plusieurs études que les bactéries Gram + sont plus sensibles que les bactéries Gram- cependant, certains auteurs suggèrent que les Gram+ sont plutôt plus résistants aux huiles essentielles que les Gram- (Dorman et Deans ,2000).

Comme il a été rapporté auparavant, le mode d'action principal des huiles essentielles consiste en la lyse de la paroi bactérienne du fait de leurs propriétés lipophiles. La paroi des bactéries à Gram- est moins épaisse, elle est constituée de deux membranes plasmiques séparées par une couche de pepetidoglycane, alors que celle des bactéries à Gram+ est formée d'une seule membrane cellulaire et plusieurs couches de peptidoglycane (Fauchéreet Avril, 2002).

Chaque souche microbienne répond de manière variable aux différents composés des huiles essentielles, d'après Burt (2004), la variation de la composition chimique des huiles essentielles est suffisante pour causer la variabilité dans le degré de susceptibilité des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif. A cela s'ajoute que les interactions synergiques, additionnelles et antagonistes entres les composés des huiles essentielles qui influencent surement sur l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles (Burt ,2004).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Juniperus sabina* et *Pinus nigra* obtenue dans cette étude semble être indépendante du type de Gram vu que la sensibilité des souches a été observée au même temps chez les $Gram^+$ et chez les $Gram^-$ vis-à-vis des deux huiles essentielle testées.

III.3. Les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles :

III.3-1-Méthode de dilution :

A-*Juniperus sabina* :

Après 24 h d'incubation à 37°C, les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* ont été déterminées. Uniquement les souches faisant preuve d'une activité antibactérienne importante ont été prises en considération. Les concentrations minimales inhibitrices de cette huile sont données dans le tableau VII:

Tableau VII : Les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Juniperus sabina*

Souches	Concentrations minimales inhibitrices
***Escherichia coli* NCCB 1**	≥0,0625 %
***Escherichia coli* ATCC 25922**	≥0,0625%
***Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones**	≥0,0625%

La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* qui agissent sur toutes les souches testées *Escherichia coli* NCCB 1, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones est ≥ 0.0625%.

Cette concentration minimale inhibitrice obtenue semble être moins significatives par rapport à celle rapportées par Mansouri et *al* (2011) au Maroc avec l'huile essentielle de *Juniperus communis* qui agit sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec une concentration moins de 0.004%.

B-*Pinus nigra* :

Les concentrations minimales inhibitrices dans le cas de *Pinus nigra* sont uniquement observées chez les souches se manifestant sensibles. Les résultats sont dans le tableau VIII:

Tableau VIII : Les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle de *Pinus nigra*.

Souches	CMI
***S .aureus* ATCC 43300 résistante à la méthicilline**	**≥0,125%**
***Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones**	**≥0,125%**

Les deux souches *S .aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline et *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones ont montré la même concentration minimale inhibitrice qui est ≥ 0.125%.

Les résultats obtenus dans cette étude sont moins importants par rapport à ceux de Politeo et *al* (2011) en Croatie obtenus avec *Pinus nigra ssp. damatica* bien que la même espèce et la même concentration de la solution de l'huile ont été utilisées.la concentration minimale inhibitrice de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la miticilline est ≥ 0.125% alors que celle de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est de 0.03%.Par contre, la concentration minimale inhibitrice de *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones obtenue dans la présente étude est plus intéressante que celle de *Klebsiella* FNSST 017 (3.2%).

III.3.2- Méthode de microdilution :

Les concentrations minimales inhibitrices des deux huiles essentielles de *Juniperus sabina* et *Pinus nigra* n'ont pas pu être déterminées par cette méthode, car les concentrations recommandées dans le protocole adopté par Yakhlef et *al* (2011) et Okusa (2012) sont très faibles.

III.4. Nature de l'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées

Tableau IX : Nature de l'activité des huiles essentielles de *Juniperus sabina* et *Pinus nigra*

Huiles essentielles / Souches	*Juniperus sabina*	*Pinus nigra*
***Escherichia coli* NCCB 1**	Bactéricide	inactive
***Escherichia coli* ATCC 25922**	Bactéricide	inactive
***Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones**	bactériostatique	Bactéricide
***Bacillus subtilis* ATCC 6633**	inactive	inactive
***S. aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline**	inactive	Bactéricide

La détermination de la nature de l'activité antibactérienne pour *Juniperus sabina* a été effectuée à partir des boites à dilution 0.125% et celle de 0.0625%, mais pour *Pinus nigra* à partir de celles à dilution 0.25% et 0.125% présentant une inhibition visible de la croissance. Les résultats sont présentés dans le tableau IX :

L'huile essentielle de *Juniperus sabina* exerce une activité bactéricide sur *Escherichia coli* NCCB 1 et *Escherichia coli* ATCC 25922.Cependant, son effet est bactériostatique sur *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pinus nigra* est de nature bactéricide sur *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones. Son activité sur *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline est bactéricide à la concentration 0.25% et bactériostatique à celle de 0.125%. Cette dernière correspond à la CMI (tableau IX).

Dans le but de la valorisation des ressources végétales et la promotion de la phytothérapie, nous avons étudié l'activité antibactérienne *in vitro* des huiles essentielles de deux plantes aromatiques locales : *Juniperus sabina* appartenant à la famille des Cupressaceae et *Pinus nigra* appartenant à la famille des Pinaceae.

L'extraction des deux huiles a été réalisée par méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Les rendements en huiles essentielles ont été déterminés. Les valeurs obtenues montrent que *Pinus nigra* donne un meilleur rendement de 0.47% comparé à celui obtenue avec *Juniperus sabina* qui est de l'ordre de 0.39%.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles testées par la méthode de diffusion sur agar a montré que l'huile essentielle de *Pinus nigra* est qualitativement la plus active en inhibant totalement la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthiciline et *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones à la dilution 1/2. Les deux souches se sont également révélées très sensibles même aux dilutions 1/5 et 1/10.Cependant, *Escherichia coli* NCCB1, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sont complétement résistantes.

Néanmoins, l'huile de *Juniperus sabina* est quantitativement la mieux active en exerçant une activité plus au moins importantes sur toutes les souches testées. Il est clair qu'à l'exception de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthiciline qui est résistant à toutes les dilutions, *Escherichia coli* NCCB1, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones présentent des sensibilités *vis-à-vis* de cette huile à la dilution 1/2 bien que leur sensibilité est négligeable aux restes des dilutions.

Les concentrations minimales inhibitrices obtenues varient et dépendent des huiles essentielles utilisées et des souches testées. La croissance de *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones s'est arrêtée à une concentration de 0.0625% dans le cas de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* par contre, elle est de 0.125% avec celle de *Pinus nigra*. *Escherichia coli* NCCB1 et *Escherichia coli* ATCC 25922 n'ont montré aucune croissance visuelle à la concentration 0.0625% avec l'huile essentielle de *Juniperus sabina*. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthiciline est inhibé à 0.125% en présence de l'huile essentielle de *Pinus* nigra.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* est bactéricide sur *Escherichia coli* NCCB 1 et *Escherichia coli* ATCC 25922 et bactériostatique sur *Klebsiella*

pneumoniae E47 résistante aux quinolones. Celle exercée par *Pinus nigra* et bactéricide sur toutes les souches utilisées.

La présente étude nous a permis de réaliser et de confirmer notamment que l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Juniperus sabina* et de *Pinus nigra* varie en fonction de la souche testée et de la concentration appliquée.

Ces résultats obtenus confirment l'intérêt des huiles essentielles de genévrier sabine et du pin noir. Ainsi, il est très important d'élargir les domaines de leur utilisation à savoir dans l'industrie agro-alimentaire comme alternatifs aux additifs chimiques et comme agents de conservation naturels, dans le secteur sanitaire comme désinfection de l'air des salles chirurgicales et de réanimation, etc.

Parmi les perspectives immédiates de cette étude on cite :

- Etudier l'activité antimicrobienne de ces huiles *in vivo*,
- Etudier l'activité antibactérienne de ces huiles avec d'autres méthodes notamment la méthode de micro atmosphère,
- Etudier la composition chimique de ces deux huiles essentielles,
- Déterminer leurs modes d'action sur les souches bactériennes,
- Etudier l'activité antimicrobienne sur d'autres souches pathogènes responsables d'infections graves,
- Evaluer leur cytotoxicité sur des modèles animales et d'élargir la gamme de bactéries à tester.
- D'autres tests sont préconisés en vue de connaître deséventuels effets indésirables ou des effets secondaires suivant leur utilisation.
- Etudier les autres activités biologiques de ces huiles essentielles surtout l'activité antifongique, antivirale, antiparasitaire et anticancérogène.

- Abdelouahab D et Amadou D. (2012).The therapeutic benefits of essential oils. Nutrition Well –Being and Health.pp 157-158.
- Achak N , Romane A, Alifriqui M et Adams R. (2009).Chemical studies of leaf essential oils of three species of juniperus from Tensift Al Haouz-marrakech Region (Morocco). Journal of Essential Oil Research.
- Ait Mimounen N, Ait Mimoune D, Yataghene A. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pinus pinaster*. Journal of Coastal Life Medicine. 1, 54-58.
- Amri I, Hanana M, Bejia A, Amri I, Jamoussi B, Gargouri S et Hamrouni L (2014). Activité biologique des huiles essentielle de pins.Natural Product Communications.407-410.
- Angioni A, Barra A, Russo M T, Coroneo V, Dessi S et Cabras P. (2003) Chemical Composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. Agricultural and food chemistry. **51**, 3073- 3078.
- Anton et Lobstein A. (2005).plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris.16-48p
- Attou A. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante Ruta chalepensis (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de magister en biologie .Universite Abou Bekr Belkaid Tlemcen.9-30 p
- Bagchi G.D, Srivastava D, Haider F, Dwivedi P, Naqvi A A. (2005). Comparative study of the leaf oil of *Juniperus macropoda* growing in Garhwal regions of Uttranchal (India). Flavour And Fragrance Journal **20**, 460–461.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils .Food and Chemical Toxicology. **46**, 446-475.
- Behravan J,Ramezani M, Nobandegani E F et Gharaee M E (2011). Antiviral and antimicrobial activity of *Thymus transcaspicus* essential oil.Pharmacologyonline. 1:1190-1199.
- Bekhechi C, Fernandez X, Bendimerad N et Mazari K.(2010).Chemecal composiotion and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoeniceae* L ; and *Cupressus sempervirensL*. Journal of Medicinal plants research.pp.959-964.

- Benayache F. (2013). Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret. Mémoire de magister en chimie organique.Université de constantine.3-58p
- Benjilali B, Tantaoui-Elaraki A, Ismaïli-ALAOui M et Ayadi A. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes médicinales et phytotherapie. Tome XX, n° 2, p.155-167.
- Billerbeck V. G, Roques C, Vanière P et Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles, Université de Toulouse. volume X - N°3.
- Bouguerra A. (2012). Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Mémoire de magister en science alimentaires. 5 -17p.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales .3éme ED.Tec et Doc, Paris. 464-498p.
- Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales.4éme ED. Tec et Doc, Paris. 488-578 p.
- Burt, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food. International Journal of Food Microbiology.94, 223– 253.
- Couderc VL. (2001).toxicité des huiles essentielles. Thèse de doctorat en vétérinaire. Université Paul-Sabatier, école nationale vétérinaire, Toulouse, France.2-12p.
- Derwich1. E, Benziane Z†et Boukir A.(2010). Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Juniperus phoenicea* and Evaluation of its Antibacterial Activity. International Journal of Agriculture & Biology. 12: 199–204.
- Diğrak M, İIçim A et Alma H. (1999).Antimicrobial Activities of Several Parts of *Pinusbrutia, Juniperus oxycedrus, Abies cilicia,Cedrus libani* and *Pinus nigra.* Phytotherapy Research **13**, 584–587.
- Dob T, Berramdane T, Chelgoum C. 2005. Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria.
- Dorman et Deans, (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology **88**, 308–316.
- El Haib A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de doctorat de chimie organique et catalyse. Université Paul Sabatier de Toulouse. 9p.

- Emami SA, Asgary S, Naberi GA, Shams Ardekani MR, Kasher T, Aslani S, Airin A, et Sahzbkar. (2011).Antioxidant activities of *Juniperus foetidissima* essential oils against several oxidative systems. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 21, 627-634.
- Faleiro M L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. Edition: A Méndez-Vilas Portugal.Science against microbial pathogens communicating current research and technological advances.
- Fauchére J L et Avril J L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Edition : Ellipses.pp 10-120.
- Guinoiseau E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat en biochimie- biologie moléculair. Universite de Corse-Pasquale Paoli .51-57 p
- Harzallah-Skhiri F, Elaissi A, Hadj Salah K, Mabrouk S, Khouja, M et Chemli R, L (2011).Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species essential oils.Food Chemistry. **129,** 1427–1434.
- Haziri A, Faiku F, Mehmeti A, Govori S, Abazi S, Daci M, Haziri I, Bytyqi-Damoni A et Mele A. (2013).Antimicrobial properties of the essential oil of *juniperus communis* growing wild in east part of Kosovo. American Journal of Pharmacology and Toxicology **8** (3): 128-133
- Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, ChaibN, et Guessous Idrissi N. (2000) Evaluation de l'activité antileishmanienne d'Artemisia herba-alba Asso. Therapeutique.
- Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus). Mémoire de magister en biochimie appliquée et biotechnologies, 3-4p.
- Herzi N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO_2-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat de génie des procédés et de l'environnement. Université de Toulouse. 13 p
- Hurabielle M. (1981). Abrégé de matière médicale pharmacognosie. Tom 1. Edition: Masson Paris.63-84p
- Iserin. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. Edition Larousse VUEF. Hong-Kong.5-14p.

- Ju-Sang P et Gyu-Hee L.2011. Volatile compounds and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of the needles of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii*. Society of Chemical Industry. **91**: 703–709
- Kaloustain J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L et Vergnes M F. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne.Phytotherapie **6**,160–164.
- Lahlou, 2004. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. Phytotherapy Research **18**, 435–448.
- Lamamra M. (2007).Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. et de *Filipendula hexapetala* Gibb. Mémoire de magister en sciences biologiques.8-17 p.
- Lardry J M & Haberkorn V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither. Rev. **(61)** ,14-17p.
- Lemaoui A. (2011). Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa.*L Algérienne. Mémoire de magister en biochimie. Universite Ferhat Abbas Setif. 28 -29 p.
- Mansouri N, Startrani B, Ghanmi M, El Ghadraoui L, Guedira A et Aafi A 2011. Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia*et *Juniperus phoenicea* ssp.*turbinata* du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **5**, 415-424.
- Mansouri N, Startrani B, Ghanmi M, El Ghadraoui L, Guedira A et Aafi A (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *juniperus communis* du Maroc. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège p. 791 – 805.
- Mansouri N, Startrani B, Ghanmi M, El Ghadraoui L, Guedira A et Aafi A (2011). Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle de *Plectranthus aromaticus* Royb de l'Inde de la grande Comore. *Biotechnol. Agron. Soc* 15(2), 251-258.
- Mapola G. (2003). Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles de E.citriodora acclimaté à Point-Noire(Congo-

Brazzaville). Mémoire de diplôme d'étude approfondie en chimie et technologie alimentaire. Université Marien Ngouabi. 5-9p.

- Marongiu B, Porcedda S, Piras A, Gluseppina S, Murreddu M, et Loddo R. (2005). Extraction of *Juniperus communis* L ssp. *nana* willd. essential oil by supercritical carbon dioxide. Flavour And Fragrance Journal **21**: 148–154.
- Medini H, Elaissi A, Farhat F, Khouja M L, Chemli R et Harzallah-Skhiri. (2009). Seasonal and Geographical Influences on the Chemical Composition of Juniperus phoenicea L. Essential Oil Leaves from the Northern Tunisia. Chemistry & Biodiversity.
- Miron A, Lungu Apetrei C, Spac A, Brebu M et Tuchlus C. (2013). Composition, and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of a full-grown *Pinus cembra* L. tree from the Calimani Mountains (Romania).Journal the Serbian Chemical Society. **78** (1) 27–37.
- Mirza M, Shahmir F, Ahmadi L Korori S A A. (2003). Secretory elements of needles and berries of *Juniperus communis* L ssp. *Communis* and its volatile constituents. Flavour AND Fragrance JournaL **18**: 425–428.
- Mohammedi Z. (2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat en biologie. Université de Tlemcen.23p
- Ngakegni-Limbili . (2012). Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale. Université de Toulouse. 26-27 p.
- Okusa P. (2012). Etude phytochimique et activité antimicrobienne directe et indirecte de *Cordia gilletii* De Wild (Boraginaceae).Université libre de Bruxelles, faculté de pharmacie.82-83 p.
- Pages N, Fournier G, Baduel C, Tur N, et Rusnac M. (1996). Sabinyl Acetate, the Main Component of *Juniperus sabin l* 'Herit. Essential oil, is responsible for antiimplantation effect. Phytotherapy ResearcH. **10**,438- 440.
- PepeljNjak S, Kosalec I, Kalodera Z et Blaževič N. (2005).Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharm* **55**, 417–422.

- Politeo O, Skocibusic M, Maravic A, Ruscic M et Milos M. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Endemic Dalmatian Black Pine (*Pinus nigra ssp. dalmatica*). Chemistry & Biodiversity.
- Rahouti M, Hmiri S, Habib Z, Satrani B, Ghanmi M, et El Ajjouri M. (2012). Evaluation du potential antifongique des huiles essentielles de *Mentha puleyium* et d*'Eucalyptus camadulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. Bulltin de la societé Royal des Science de Liege. 824-836p.

- Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Fès .12-13p.
- Selles C. (2012).Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen :*Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dansH_2SO_4 0.5M. Thèse de doctorat en sciences physiques. Universite Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 30-45p.
- Sezik E, Üstün O, Dermirci B , Hüsnü Can Başer K.2010. Composition of the essential oils of Pinusnigra Arnoldfrom Turkey.313 – 325.
- Svoboda. (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants. Areview and Atlas of micrographs.
- Tkachenko. (2007). Antiviral avtivity of essential oils of some *Heracleum L.*Species. Journal of Herbs, Spices Et Medicinal Plants.12: 3, 1-12.
- Tripathi A K et Upadhyay S. (2009). Repellent and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (Lamieceae) leaf essential oils against four stored grain *coleopteran pests.*International Journal of Tropical Insect Scines.pp219-228.
- Turbide M. (2010). Les huiles essentielles sont extraordinaires mais leur utilisation demande de la vigilance. In l'aromathérapie applications thérapeutiques, les huiles de Québec et du monde ; Montréal.

- Ucar G et Balaban M. (2004). Volatile needle extractives of Anatolian black pine varieties: *P. nigra subsp. pallasiana var. pallasiana* and *var. pyramidata*. Biochemical Systematics and Ecology. 32, 983–992.

- Verykokidou E, Loukis A, Harvala C, et Philianos S. (1996).The Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Four *Juniperus* species growing wild in Greece. Flavour and Fragrance Journal **11**. 71-74.
- Williams L R et Lusunzi I. (1994) Essential oil from *Melaleuca dissitiflora* :a potential source of high quality tea tree oil. Industrial Corps and Products.**2**, 211-217pp.
- Yakhlefet G, Laroul S, Hambaba L, Aberkane M C et Ayachi A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. 9:209-218pp.
- Yang X, Zhoa H T, Wang J, Meng Q, Zhang H, Yao L, Zhang Y C, Dong A J, Ma, Wang Z Y, Xu D C et Ding Y. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of pine cones of *Pinus armandii* from the Southwest region of China. Journal of Medicinal Plants Research. 4(16), 1668-1672pp.
- Zadeth –Kheyyat M, Ahmad Emami S, Abedindo B F. (2011). Antioxidant Activity of the Essential Oils of Different Parts of *Juniperus excelsa* M. Bieb. Subsp . *excelsa* and *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *polycarpos* (K. Koch) Takhtajan (Cupressaceae).
- Iranian Journal of Pharmaceutical Research**.** 10, 799-810pp.
- Zhiri A et Boudoux D. (2005). Aromathérapie scientifique. Huiles essentielles. chémotypes et leurs synergies. Edition : Inspir Development. Luxembourg.3-14p.
- <http://www.wolframalpha.com/entities/species/juniperus_sabina> consulté le 19/05/2015.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=juniperus+sabina> consulté le 19/05/2015.
- <http://www.wolframalpha.com/input/?i=pinus+nigrahttp://eol.org/pages/1061736/hierarchy_entries/57311291/overview> consulté le 19/05/2015.

Annexe I : Les milieux de culture

Bouillon Mueller Hinton

Composition	Quantité
Peptone de caséine	3,5 g
Extrait de viande	0,6 g
Amidon	0, 3 g
Eau distillée	200 ml

PH : 7,4

Préparation de bouillon nutritif

Composition	Quantité
Bouillon nutritif	2 g
Eau distillée	250 ml

PH : 7,2

Préparation du milieu Mueller Hinton (agar)

Compositions	Quantité
Mueller Hinton	36 g
Eau distillée	1 L

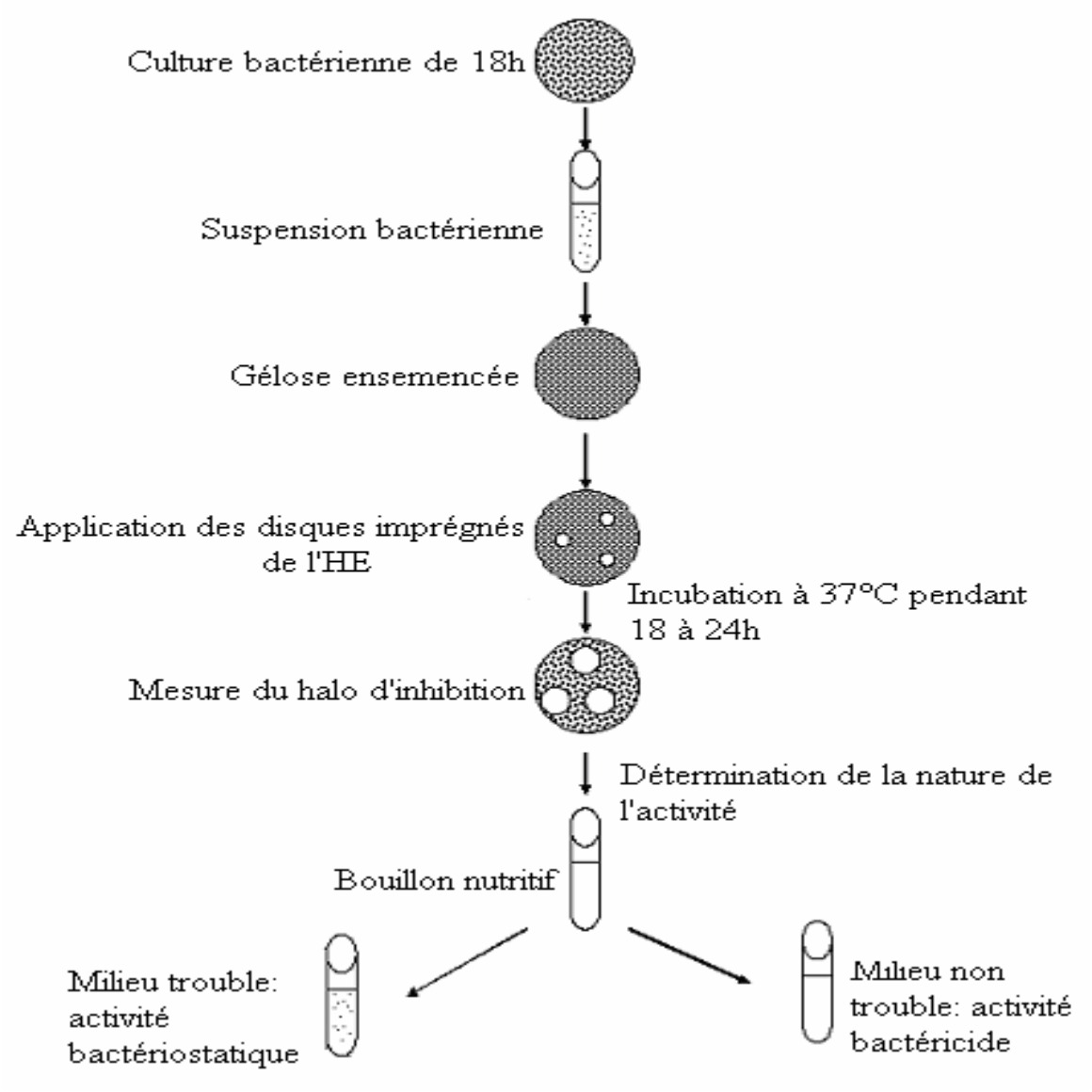
PH : 7,4

Préparation de l'eau physiologique

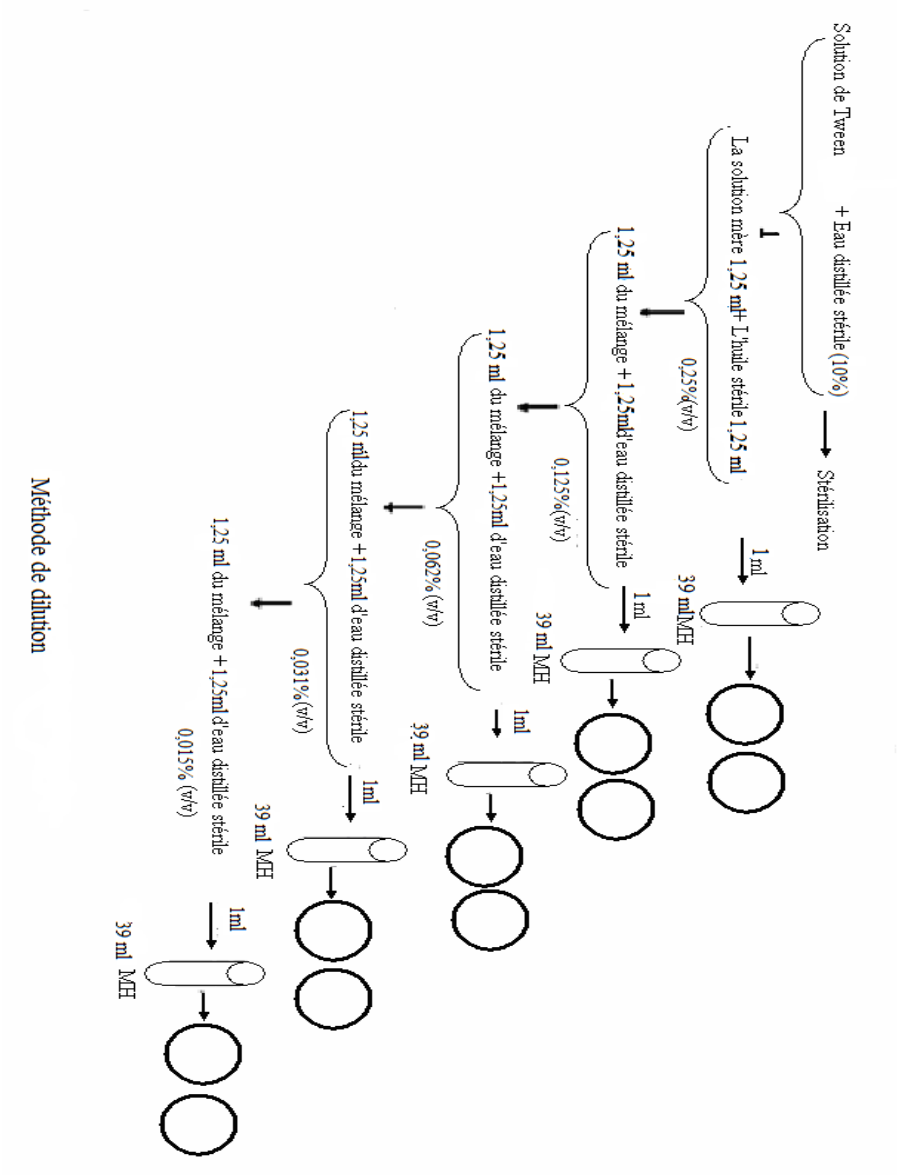
Compositions	Quantité
Nacl	4.5 g
Eau distillée	500 ml

PH : 7

Annexe II : Technique de diffusion sur agar

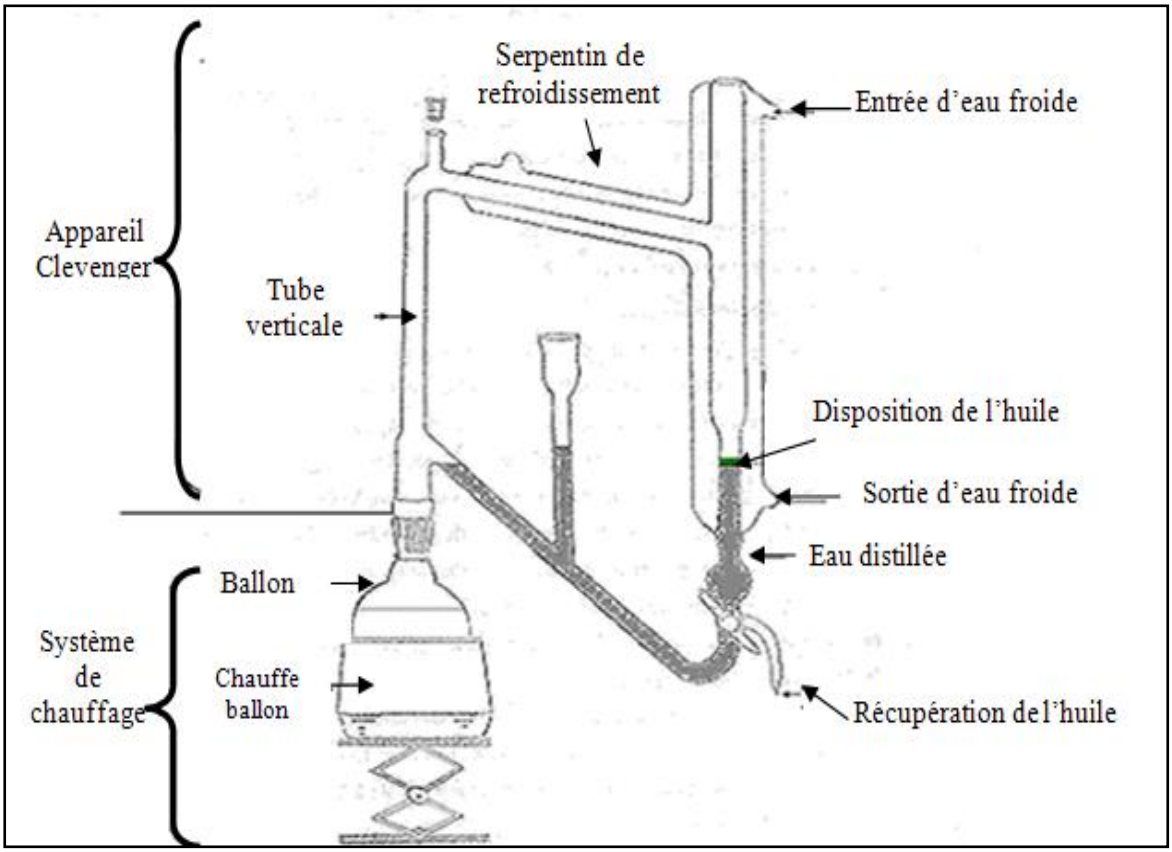


Annexe III : Méthode de dilution

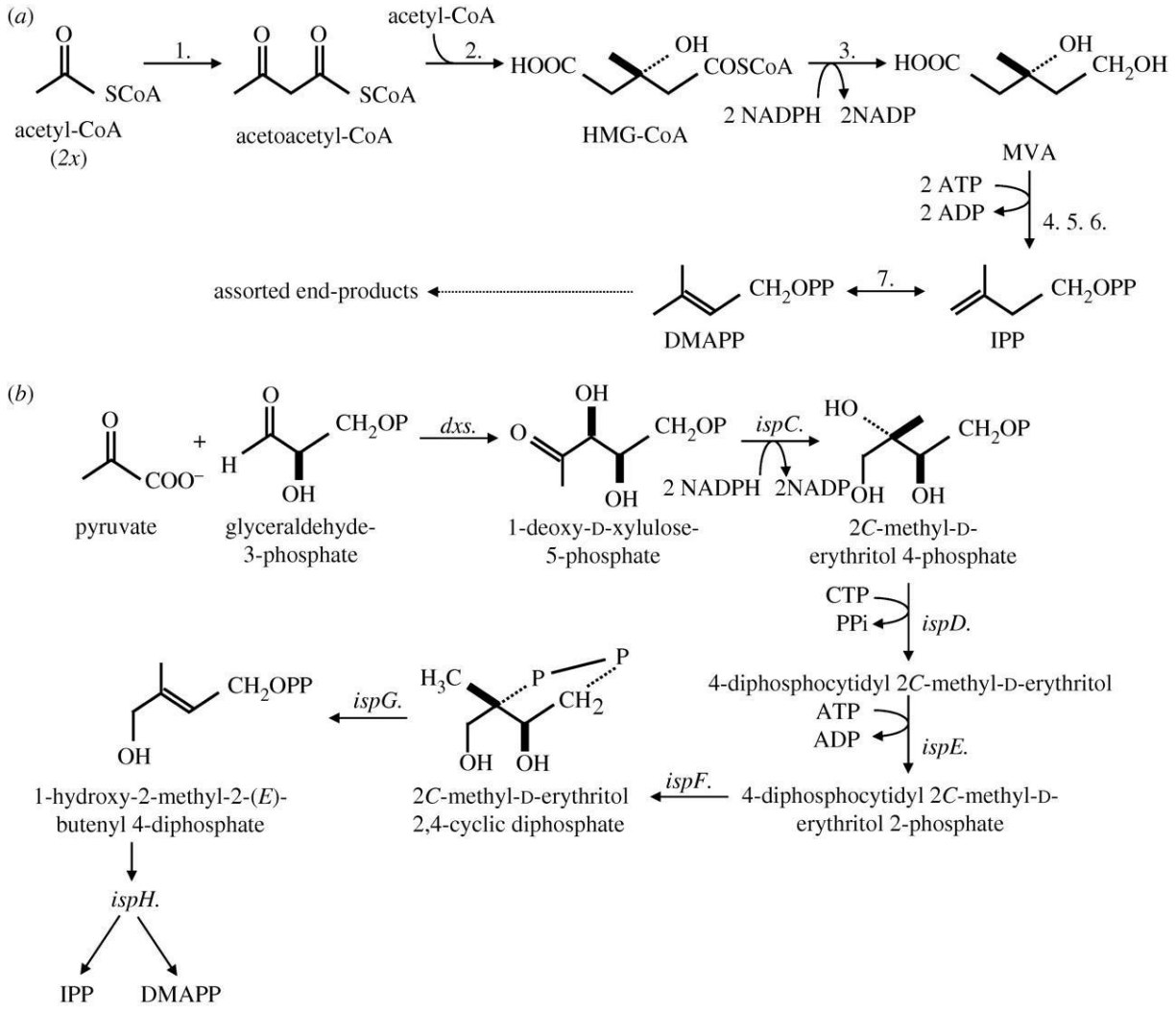


Méthode de dilution

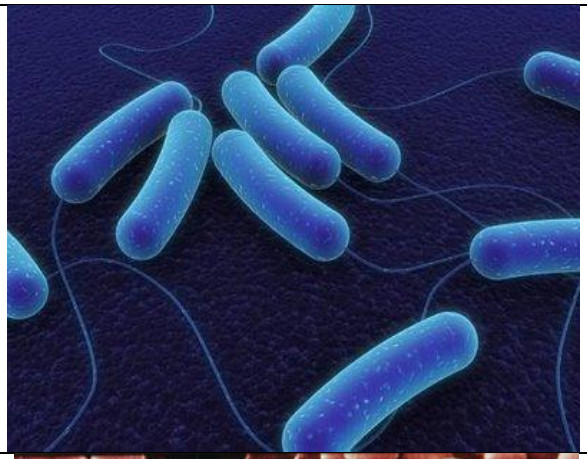
Annexe IV: Dispositif de l'hydrodistillation de type Clevenger



Annexe V : Les voies de synthèse de l'IPP et le DMAPP



Annexe VI : Tableau Caractéristiques des bactéries utilisées

Souches bactériennes		Caractéristiques
Bacillus subtilis		est une bactérie catalase-positive que l'on trouve habituellement dans le sol, mais c'est surtout une espèce ubiquitaire qui fait partie de la microflore humaine normale.
Staphylococcus Aureus		responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques.
Escherichia coli		est une bactérie Gram négatif intestinale, des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore.
Klebsiella pneumoniae		Gram négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales.

Introduction

Synthèse bibliographique

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion

Annexes

Références bibliographiques

Résumé : L'objectif de ce travail est de déterminer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques locales de la famille des Cupressaceae (*Juniperus sabina*) et des Pinaceae (*Pinus nigra*).L'extraction des huiles est réalisée par hydrodistillation. Le rendement est de l'ordre de 0.39% pour *Juniperus sabina* et de 0.47% pour *Pinus nigra*. L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur agar, sur cinq souches bactériennes. L'huile essentielle de *Juniperus sabina* est quantativement très active sur *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones, *Escherichia coli* NCCB 1 et *Escherichia coli* ATCC 25922. L'huile essentielle de *Pinus nigra* est qualitativement plus active sur *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistant à la méthicilline totalement inhibés à la dilution 1/2 (v/v). La concentration minimale inhibitrice obtenue par la méthode de dilution est ≥0.0625% pour l'huile essentielle de *Juniperus sabina* et est ≥0.125% pour celle de *Pinus nigra*, mais n'a pas pu être déterminée par la méthode de microdilution. L'activité de l'huile essentielle de *Juniperus sabina* est bactéricide sur *Escherichia coli* NCCB 1 et *Escherichia coli* ATCC 25922 mais bactériostatique sur *Klebsiella pneumoniae* E47 résistante aux quinolones. Par contre *Pinus nigra* exerce une activité bactéricide sur toutes les souches testées.

Mots clés : Activité antibactérienne, huiles essentielles, plantes aromatiques, Cupressaceae, Pinaceae, *Juniperus sabina*, *Pinus nigra*, concentration minimale inhibitrice.

Abstract: The aim of this work is to determine the antibacterial activity of essential oils obtained from two local aromatic plants owned the family of Cupressaceae (*Juniperus sabina*) and Pinaceae (*Pinus nigra*).The oil's extraction was achieved by hydrodistillation. The yield is 0.39% for *Juniperus sabina* and 0.47% for *Pinus nigra*. The study of the antimicrobial activity was performed by the agar diffusion method and carried out against five bacterial strains. *Juniperus sabina's* essential oil is quantitatively very active on *Klebsiella pneumonia* E47 quinolones resistant, *Escherichia coli* NCCB1 and *Escherichia coli* ATCC 25922. *Pinus nigra*'s essential oil is qualitatively more active against *Klebsiella pneumonia* E47 quinolones resistant and *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 methicillin resistant who were totally inhibited at the dilution of 1/2 (v/v).The minimum inhibitory concentration obtained by the dilution method is ≥0.0625% for the essential oil of *Juniperus sabina* and is ≥0.125% for that of *Pinus nigra*, but it couldn't be determined by the microdilution method. The activity of the essential oil of *Juniperus sabina* is bactericidal against *Escherichia coli* NCCB1 and *Escherichia coli* ATCC 25922, but it is bacteriostatic against *Klebsiella pneumonia* E47 quinolones resistant. However, *Pinus nigra* exerts a bactericidal activity against all the tested strains.

Keywords: Antibacterial activity, essential oils, aromatic plants, Cupressaceae, Pinaceae, *Juniperus sabina*, *Pinus nigra*, minimum inhibitory concentration.