

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Filière : Sciences Biologique
Spécialité : Sciences Alimentaires
Option : Bioprocédé et Technologie des Aliments

Réf :.....

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

MASTER

Thème

***Effet de l'association des huiles
essentielles de quelques plantes
médicinales***

Présenté par :

M^{lle} OUHADDAD Lynda & M^{lle} SIDI SALAH Farida

Soutenu le : **12 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M^{me}. MERZOUK H
M^{me}. OUKIL N
M^{elle}. TOUATI N
M^{me}. BEDJOU F

MAA Président
MCB Encadreur
MAA Examineur
Professeur Invité

Année universitaire : 2015 / 2016



Remerciements

On remercie, Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, la volonté et le courage qui nous ont permis de mener à bien ce travail ;

Nous tenons à remercier :

M^{me} OUKIL NAÏMA, d'avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, sa patience, ses conseils précieux qu'elle nous a prodigué tout le long de notre travail et pour le temps qu'elle nous a consacré toute les fois que cela était nécessaire ;

M^{me} MERZOUK, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury ;

M^{lle} TOUATI, d'avoir accepté d'examiner notre mémoire ;

Nos sincères remerciements s'adressent aux responsables et à tout le personnel du laboratoire de microbiologie ;

Enfin, on remercie profondément nos chers parents pour leur soutien moral et matériel durant nos études ;

Ainsi qu'à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail particulièrement : Djemai, Athman, Souhila et ath-Bouhou en général.

Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude ;

Farida et Lynda





Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

*Aux deux êtres les plus chers au monde qui ont donné
sens à mon existence, en m'Offrant une éducation digne
de confiance et qui m'ont soutenu
Jours et nuit et durant tout mon parcours.*

A mes chers frères Azzedin et Sofiane

A ma très chère sœur Feriel

A toute la famille OUHADDAD

*A ma chère binôme et soeur Farida, ainsi qu'à toute sa
famille*

A mon meilleur ami Djimi

*Ainsi qu'à toute la promotion de Master II Sciences
Alimentaires 2015/2016*

A tous mes amis.

LYNDA(Dyda)





Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

*A la mémoire de mon père Abd el-madjid, que son âme
repose en paix*

*A ma très chère mère qui sans elle je ne serais ce que je suis
maintenant*

A mes chers frères Farid et Khaled

A mes chères sœurs Souad et Oïassila

A mon mari Farid et sa famille Merzouk

A toutes la famille Sidi Salah et Djellidi

*A ma chère binôme et sœur Lynda, ainsi qu'à toute sa
famille*

*Ainsi qu'à toute la promotion de Master II Sciences
Alimentaires 2015/2016*

A tous mes amis.

FARIDA (Sàaya)



Liste des abréviations

- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- **ARN** : Acide Ribonucléique.
- **ATB** : Antibiotiques.
- **BMH** : Bouillon Mueller Hinton.
- **CLSI** : *Clinical and Laboratory Standards Institute* .
- **CMB** : Concentratio Minimale Bactéricide.
- **CMI** : Concentratio Minimale Inhibitrice.
- **DO** : Densité Optique.
- ***E. fécalis*** : *Enterococcus fécalis*.
- ***E. coli*** : *Escherichia coli*.
- **FBC_{index}** : Concentration Bactéricide Fractionnaire.
- **FIC_{index}** : Concentration Inhibitrice Fractionnaire.
- **HEs** : Huiles Essentielles.
- **IC₅₀** : concentration donnant 50%.
- **NCCLS** : *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.
- **Na₂SO₄** : sulfate de sodium anhydre.
- ***P. putida*** : *Pseudomonas putida*.
- **Rd** : Rendement.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.
- ***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus* .

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique et photo de la <i>Mentha aquatica</i>	3
Figure 02 : Représentation et photo d' <i>Origanum vulgare</i>	6
Figure03 : Photo d' <i>Hyoscyamus albus L</i>	8
Figure 04 :Photographie des trois plantes utilisées	15
Figure 05 : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger	18
Figure 06 : Schéma d'une microplaque de 96 puits	20
Figure 07 : Rendement en huiles essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> ; <i>Mentha aquatica</i> et <i>Hyoscyamus albus</i>	24
Figure 08 : Isobogrammes indiquant les effets de l'association des huiles essentielles sur les bactéries testées	26
Figure 09 : Isobogrammes montrant les effets des associations HE _s des deux plantes (<i>Mentha aquatica</i> et <i>Origanum vulgare</i>) avec les composés majoritaires	29
Figure 10 : Isobogrammes montrant l'effet de l'association de l'HE de <i>Mentha aquatica</i> avec les antibiotiques	31
Figure 11 : Isobogrammes indiquant les effets de l'association des HE / Composés majoritaires sur les bactéries testées.....	35
Figure 12 : Isobogrammes indiquant les effets de l'association des HE / Antibiotiques sur les bactéries testées	38

Liste des tableaux

Tableau I : Classification botanique de <i>Mentha aquatica</i>	4
Tableau II : Composition de l'huile essentielle de <i>M. aquatica</i> suivant les phases végétatives et floraison.....	4
Tableau III : Classification classique de l'espèce <i>Origanum vulgare</i> L.....	6
Tableau IV : Classification de <i>Hyoscyamus albus</i> L.	9
Tableau V : Souches bactériennes utilisées	16
Tableau VI : Antibiotiques utilisés	16
Tableau VII : Composés majoritaires utilisés.....	16
Tableau VIII : CMBs de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> , <i>Mentha aquatica</i> et de <i>Hyoscyamus albus</i> sur les différentes souches bactériennes	24
Tableau IX : Effets de l'association des trois huiles essentielles sur les souches bactériennes testées	26
Tableau X : CMBs des composés majoritaires, (Thymol, Eugénol, α -Pinène et <i>Melaleuca alternifolia</i>) testées sur différentes souches bactériennes	27
Tableau XI : Effets des différentes associations, HE/composés majoritaires vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	28
Tableau XII : CMBs des deux antibiotiques sur <i>Escherichia coli</i> et <i>Entérocooccus fécalis</i> ...	30
Tableau XIII : Effets des différentes associations, HE /Antibiotiques sur les deux souches bactériennes (<i>Escherichia coli</i> et <i>Entérocooccus fécalis</i>)	31
Tableau XIV : CMI de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> , <i>Mentha aquatica</i> et d' <i>Hyoscyamus albus</i> sur les différentes souches bactériennes.	32
Tableau XV : CMI des composés majoritaires, (Thymol, Eugénol, α -Pinène et <i>Melaleuca alternifolia</i>) testées sur différentes souches bactériennes.	33
Tableau XVI : Effets des différentes associations, HE / composés majoritaires vis-à-vis des souches bactériennes testées.	34
Tableau XVII : CMI des antibiotiques sur les souches bactériennes testées.	36
Tableau XVIII : Effets des différentes associations, HE /Antibiotiques sur les souches bactériennes testées	37

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures	1
Liste des tableaux	1
Introduction	1
Partie I : synthèse bibliographique	
Chapitre I : Généralité sur les plantes étudiées	3
I.1 <i>Mentha aquatica L.</i>.....	3
I.1.1 Description botanique et classification	3
I.1.2 Répartition géographique	4
I.1.3 Composition chimique.....	4
I.2 <i>Origanum vulgare L.</i>	5
I.2.1 Description botanique et classification.....	5
I.2.2 Répartition géographique	7
I.2.3 Composition chimique.....	7
I.3 <i>Hyoscyamus albus L.</i>	8
I.3.1 Description botanique et classification.....	8
I.3.2 Répartition géographique	9
I.3.3 Composition chimique	9
Chapitre II : Potentiel d'activité des plantes étudiées	11
II.1 <i>Mentha aquatica L.</i>	11
II.2 <i>Origanum vulgare L.</i>	11
II.3 <i>Hyoscyamus albus L.</i>	14
Partie II : Partie pratique	
I. Matériels et méthodes	15
I.1 Matériel	15
I.1.1. Le matériel végétal	15
I.1.2. Le matériel biologique	16
I.1.2.1. Les souches bactériennes	16
I.1.2.2. Les antibiotiques	16
I.1.2.3. Les composés majoritaires	16
I.1.2.4. Les milieux de culture	17

I.2 Méthodes	17
I.2.1 Extraction des huiles essentielles	17
I.2.1.1 Récolte et séchage.....	17
I.2.1.2 Extraction (Principe de l'hydro-distillation)	17
I.2.2 Effets in vitro des huiles essentielles seules ou en association	19
I.2.2.1 Préparation des inocula bactériens	19
I.2.2.1.1 Standardisation des inocula bactériens	19
I.2.2.1.2 Préparation des dilutions	19
I.2.2.2 Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de l'échiquier	20
II. Résultats et interprétations	23
II.1 Rendement en huiles essentielles	23
II.2 L'activité antibactérienne	24
II.2.1 Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)	24
II.2.1.1 Activité antibactérienne des trois huiles essentielles seules.....	24
II.2.1.2 Activité antibactérienne des différentes associations	25
• Activité antibactérienne de l'association huile essentielle / huile essentielle	25
• L'Activité antibactérienne de l'association huile essentielle / composés majoritaires	27
• Activité antibactérienne de l'association huile essentielle / antibiotiques	30
II.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	32
II.2.2.1 Activité antibactérienne des trois huiles essentielles seules	32
II.2.2.2 Activité antibactérienne des différentes associations.....	33
• L'Activité antibactérienne de l'association huile essentielle / composés	33
majoritaires	33
• Activité antibactérienne de l'association huiles essentielles / Antibiotiques	36
Conclusion et perspectives	39
Références bibliographiques	
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

Depuis toujours, les Hommes ont utilisé les plantes pour se soigner. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle (Newmann et Cragg, 2007). Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans les industries : alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, chimique. Parmi ces composés on retrouve les métabolites secondaires utilisés en thérapeutique (Bahorun, 1996). Et parmi lesquels on retrouve les composés phénoliques et les huiles essentielles.

Les HES et leurs composants ont montré d'excellents résultats contre les bactéries multi-résistantes. Elles présentent simultanément plusieurs cibles dans les structures bactériennes en raison de la complexité de leur composition (Kon et Rai, 2012). Beaucoup d'HES ont montré une capacité d'agir *in vitro* en synergie avec différents antibiotiques (Kon et Rai, 2012).

Les HES sont des mélanges complexes de composés volatiles issus du métabolisme secondaire des plantes dites aromatiques. Elles peuvent contenir environ 20 à 60 composants à différentes concentrations. Elles sont caractérisées par deux ou trois composés majoritaires à des concentrations assez élevées (20 à 70%) comparativement à d'autres composés présents à l'état de traces (Bakkali et al., 2007).

Les applications thérapeutiques des HES sont connues depuis l'Antiquité (Buchbauer et al., 1993). Actuellement, environ 3000 HES sont connues dont un dixième sont d'un intérêt commercial surtout pour l'industrie pharmaceutique, sanitaire, agro-alimentaire, cosmétique (Bakkali et al., 2007). Ceci explique l'intérêt porté par les chercheurs aux substances naturelles.

Les HES les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées (thym, origan, lavande, menthe) (Benayache, 2013).

L'objectif du présent travail est d'une part, l'évaluation de l'activité antibactérienne des HES obtenues à partir des parties aériennes de *Mentha aquatica* L. et *Origanum vulgare* L. de la famille des Lamiacées, et de *Hyoscyamus albus* L. de la famille des Solanacées, plante très peu étudiée, et d'une autre part, la détermination de la nature de l'interaction entre ces HES et certains antibiotiques ainsi que certains composés majoritaires.

Ce manuscrit comporte deux parties, la première est un recueil concernant les trois plantes étudiées à partir de la bibliographie. La deuxième partie présente le travail expérimental qui rassemble en premier lieu le matériel et les méthodes utilisés pour

Introduction

l'extraction des HEs, la technique de l'échiquier pour l'appréciation des différents effets générés par ces HEs en association avec les composés des huiles essentielles et les antibiotiques. Il s'agit soit d'un effet synergique, additif ou antagoniste en fonction du calcul du FIC_{index}. Les résultats obtenus seront confrontés aux données bibliographiques.

Cette étude constitue une ébauche pour les chercheurs, qui complétée par d'autres travaux sur la toxicité par des tests *in vivo*, pourrait dans un proche avenir confirmer l'efficacité des substances bioactives (HE ou autres) utilisées pour vaincre les maladies infectieuses.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LES PLANTES ÉTUDIÉES

I.1 *Mentha aquatica* L.(Menthe aquatique)

I.1.1 Description botanique et classification

❖ Description botanique

Il s'agit d'une plante vivace à rhizome long, rampant, traçant, chevelue. La tige, de 50 à 80 centimètres, dressée ou ascendante, se divise en rameaux opposés. Ses feuilles mesurent de 4 à 10 cm de long, elles sont ovales, opposées, courtement pétiolées, lancéolées, aiguës, dentées, sont d'un très beau vert et se teignent de nuances rougeâtres au soleil et de rouge cuivré à l'ombre, elles sont recouvertes de gros poils sécréteurs arrondis dans lesquels s'accumulent les substances volatiles odorantes (Benayad, 2008).

Les fleurs, violacées, forment des épis très courts, ovoïdes, à l'extrémité des rameaux. Le fruit, divisé en quatre parties, est entouré d'un calice persistant. Son odeur est puissante, sa saveur piquante et rafraichissante (Jahandiez *et al.*, 1934).



Figure 01: Représentation schématique et photo de *Mentha aquatica* (Dhifi *et al.*, 2011).

❖ Classification :

La classification classique de la plante *Mentha aquatica*, est présentée dans le tableau N°I.

Tableau I : Classification botanique de *Mentha aquatica*. (Benayad, 2008).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Mentha
Espèce	<i>Mentha aquatica</i>

I.1.2 Répartition géographique

Elle est cultivée en Chine, Inde, Europe, États-Unis, Mexique, Cuba, Guatemala.

La Menthe aquatique est une plante des zones humides et lieux frais, près des eaux douces, fossés, mares, ruisseaux rivières de l'ensemble du territoire de l'Europe sauf l'extrême nord, le nord-ouest de l'Asie et le nord-ouest de l'Afrique. C'est une espèce de lumière ou de demi-ombre, croissant dans la vase, les argiles et les tourbes (Rameau *et al.*, 1989).

I.1.3 Composition chimique

L'analyse d'Andro *et al*(2013) de plantes récoltées dans le sud-ouest de la Roumanie a identifiée 41 substances en proportion variable suivant la phase du cycle : végétatif, floraison ou sénescence, cette composition est représentée dans le tableau N° II.

Tableau II : Composition de l'huile essentielle de *M. aquatica* suivant les phases végétatives et floraison(Andro *et al.*, 2013).

Huile essentielle de <i>M. aquatica</i> (Andro <i>et al</i> ⁸ , suivant les phases végétatives et floraison)					
Phase\Composé	menthofurane	limonène	trans-β-ocimène	β-caryophyllène	ledol
végétative %	58,59	9,91	5,59	3,55	3,29
floraison %	51,26	12,06	8,10	2,92	3,01

Le menthofurane, un composé hautement toxique, donne une odeur intense à la plante ; il représente tout au cours du cycle, le composé principal, suivi par le limonène et le trans-β-ocimène (qui croît dans la phase de floraison), le β-caryophyllène, le ledol et le β-pinène. Le menthol n'a pas été détecté, et des traces de menthone n'ont été détectées qu'en phase de

sénescence (Andro *et al.*, 2013). Plusieurs autres analyses de la menthe aquatique, effectuées en d'autres lieux, ont donné des profils semblables, avec en général le menthofurane majoritaire. Cependant d'autres chémotypes ont été observés comme celui analysé par Akbar *et al.* (2006).

Sur le plan phytochimique, les résultats obtenues par Benomari (2014), montrent une composition riche et variée en métabolites secondaires, et ont permis de mettre en évidence que :

- La plante a une teneur importante en stérols et stéroïdes, tanins et coumarines.
- Les anthocyanes ont aussi marqué leurs présences dans les deux extraits testés (éthanolique et aqueux).
- L'utilisation de l'extrait hexanique dans ces tests a mis en évidence la présence d'acides gras ainsi qu'un résidu arôme indiquant la présence de molécules volatiles.
- Les alcaloïdes et flavonoïdes particularisent à un taux modeste l'extrait aqueux.

Les résultats de l'analyse de la détermination du pourcentage en eau ont révélé un taux de 79,39%, ce qui offre à la plante un caractère humide très puissant (Benomari, 2014).

I.2 *Origanum vulgare* L. (Origan)

I.2.1 Description botanique et classification

❖ Description botanique

Sous-arbrisseau vivace, très ramifié, a racines rampantes émettant des tiges pouvant atteindre 50 cm (voir 1.2 m de hauteur), nombreuses, dressées et quadrangulaires, elles sont souvent parcourues de rouge et duveteuses, recouvertes de poils veloutés ou soyeux.

Les feuilles sont opposées-décussées, courtement pétiolées, et de petite taille, leur limbe est entier ou faiblement denticulé, ovale ou elliptique, glabre ou poilu, ponctué de poils sécréteurs à leur face inférieure ; par simple frottement, elles dégagent une odeur aromatique caractéristique.

Les fleurs sont regroupées en inflorescence de type panicule, fixées au sommet des rameaux, les bractées elliptiques ont 4 à 5 mm de long et leur couleur souvent rouge foncé varie selon les espèces ; la corolle gamopétale et rouge violet ou rose pâle, exceptionnellement blanche, de 4 à 7 mm de long ; le calice persistant et gamosépales et pourvu de 5 dents égales ; les étamines sont en nombre de 4 ; l'ovaire est supère, bicarpellaire et divisé en deux loges comportant chacune 2 ovules.

Le fruit est un tétrakène lisse, brun, de 1 mm de long, chaque akène qui le compose reste longtemps soudé au fond du calice. La floraison a lieu de juillet à septembre (Teuscher et al., 2005).



Figure 02: Représentation schématique et photo d'*Origanum vulgare* (www.biolib.de)

❖ Classification

La taxonomie du genre *Origanum* est complexe et fait souvent l'objet de débats, de part sa grande diversité morphologique et chimique. En outre, cette complexité est renforcée par les dénominations croisées entre nos différentes langues latines, ajoutant encore une certaine confusion (Goust, 1999 ; Kintzios, 2002). La classification d'*Origanum vulgare* est représentée dans le tableau N°III.

Tableau III : Classification classique de l'espèce *Origanum vulgare* L. (Morales, 2002).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Astériidae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Origanum
Espèce	<i>Origanum vulgare</i> L.

I.2.2 Répartition géographique

L'*Origanum vulgare* L. se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages. (Kaloustian *et al.*, 2003).

➤ *Dans le monde*

Le genre *Origanum* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (Naghbi *et al.*, 2005). Selon Dob *et al.*, (2006), il existe près de 350 espèces d'origan réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est un genre très répandu dans le nord ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (Mebarki, 2010).

➤ *En Algérie*

L'origan comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (Mebarki, 2010). Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leurs variabilités et leur tendance à s'hybrider facilement.

I.2.3 Composition chimique

La sous-espèce *Vulgare* est celle que l'on utilise majoritairement en tant que condiment et comme espèce médicinale. Cependant, sa teneur en huile essentielle est assez faible. Diverses variétés ont également été sélectionnées pour être utilisées en tant que plantes ornementales (Kintzios, 2002).

Plus d'une centaine de composés ont été identifiés dans cette sous-espèce, ce qui représente 92,4% de la composition de son huile essentielle. C'est une huile riche en hydrocarbures monoterpéniques ou sesquiterpéniques. La totalité de ces hydrocarbures représentent environ 59,0%. On retrouve également quelques monoterpènes tels que le linalol ou le terpinène-4-ol. Contrairement aux autres sous-espèces, les sesquiterpènes sont présents en quantités plus importantes (Kintzios, 2002).

Les huiles essentielles de cette sous-espèce sont le plus souvent composées d'hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques, et contiennent en quantités importantes des sesquiterpènes oxygénés (oxyde de caryophyllène, spathulénol), et de faibles quantités de composés phénoliques (Kintzios, 2002).

L'huile essentielle d'Origan contient du carvacrol, qui est considéré comme le composé à valeur sensorielle, ainsi que d'importance antimicrobienne (Kintzios, 2002).

De nouveaux composés sont régulièrement mis en évidence à partir de l'origan et de ses extraits. C'est le cas pour trois nouveaux composés polyphénoliques découverts il y a peu : l'origanine-A, l'origanine-B et l'origanine-C (Liu *et al.*, 2012).

-Les flavonoïdes sont également des composés phénoliques, divisés en deux classes chez les *Lamiaceae* : flavonoïdes sous forme libre et glycosides de flavonoïdes (Kintzios, 2002).

-Les terpénoïdes, plus d'une cinquantaine ont déjà été isolés de l'espèce *Origanum vulgare*. On peut citer parmi les plus importants : sabinène, β -ocimène, germacrène D, et spathulénol (Venkateswara Rao *et al.*, 2011).

-Les lipides et acides gras représentent quant à eux généralement environ 7% du poids sec des feuilles des plantes (Kintzios, 2002). L'étude des graines de l'espèce *Origanum vulgare* a révélé leur composition en acides gras. Les principaux sont de nature linoléique, linoléique, palmitique et stéarique (Azcan *et al.*, 2004).

I.3. *Hyoscyamus albus* (Jusquiame blanche)

La jusquiame blanche (*Hyoscyamus albus* L.), appartient à la famille des solanacées, et au genre *Hyoscyamus*. Elle est localement connue sous le nom de « Sikrane ». Elle est très employée contre diverses maladies, dans la région Méditerranéenne et en Algérie (Jouzier, 2005).

I.3.1 Description botanique et classification

❖ Description botanique

La jusquiame blanche est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, qui mesure de 30 à 90 cm de hauteur, rameuse, visqueuse et velue, qui dégage une odeur forte. Les feuilles entières irrégulièrement dentées sont ovales et longues, 5 à 10 cm sur la partie supérieure, pétiolées et allongées. Les fleurs sont de longueur de 1 à 3 cm, bilabiées et disposées en cymes scorpoïdes. Le calice est très velu, campanulé, et divisé en 5 dents. La corolle est blanchâtre ou d'un jaune très pale. Le fruit est une capsule contenant plusieurs graines blanches, enfermées dans le calice (Alphonse, 1864 ; Schultes et Hofmann, 1993 ; Goullé *et al.*, 2004).

Figure03 :

Photographied'*Hyoscyamus albus* L.

(Jouzier, 2005).



❖ Classification

Hyoscyamus albus L. appartient à l'embranchement des Spermatophytes, la classe des Dicotylédones et à la famille des *Solanacées*. Sa classification est présentée dans le tableau N° IV.

Tableau IV : Classification de *Hyoscyamus albus L.* (Jouzier, 2005).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Classe	Dicotylédones
Sous Classe	Asteridae
Ordre	Solanales
Super Ordre	Solanales
Famille	Solanaceae
Sous Famille	Solanoideae
Genre	Hyoscyamus
Espèce	<i>Hyoscyamus albus L.</i>

I.3.2 Répartition géographique

La Jusquiame pousse dans le midi de la France, on la trouve fréquemment dans la Lorraine, le Languedoc et la Provence mais aussi subcontinent indien (Alphonse, 1864 ; Benhouda et Yahia, 2014). Elle pousse sur les talus, les falaises, les friches et les plages de galets en Europe, en Afrique du nord et en Asie (Guignard, 1998), comme on peut la rencontrer en Libye (Alghazeer *et al.*, 2012).

➤ En Algérie

Le genre *Hyoscyamus* comporte une vingtaine d'espèces, dont trois sont représentées dans la flore algérienne *Hyoscyamus muticus*, *Hyoscyamus niger* et *Hyoscyamus albus* (Quezel et santa, 1963). La jusquiame blanche ou *Hyoscyamus albus* dont le nom vernaculaire est « Tesker », est une espèce très commune dans la zone tellienne et rare ailleurs (Ghrib, 1965).

I.3.3 Composition physico-chimique d'*Hyoscyamus albus L.*

Hyoscyamus albus L. est très riche en matières minérales. On peut noter la présence d'une base volatile : le tétraméthylamineobutane ou tétraméthylputrescine servant à l'identification. Elle renferme la coumarine, et le scopolétole. L'odeur désagréable de la plante est due au tétraméthylputrescine (Moreau, 1964 ; Roques, 1965).

Dans les graines, une dizaine de composés non alcaloïdes ont été isolés parmi lesquels l'acide vanillique, le sistostérol, la rutine, le glycérol et 4 lignanamides. Ces dernières

présentent une certaine toxicité sur les cultures cellulaires . La plante contient aussi 15 à 20% d'huile essentielle(**Hammiche et al., 2013**).

La feuille de la jusquiame est particulièrement riche en matières minérales qui atteignent 20%. Les flavonoides (rutoside) sont importants, le scopolétol n'est présent qu'à l'état de traces (**Paris et Moyse, 1981**).

L'analyse phytochimique révèle la présence d'alcaloïdes tropaniques, stéroïdes, terpenoïdes, le 2,3-dimethylnonacosane et une grande quantité de composés phénoliques (dans les extraits méthanoliques) tels que les flavonoides, tanins condensés et saponines (**Mahmood et al., 2001 ; Benhouda et Yahia, 2014**).

❖ Toxicité de la plante

La jusquiame blanche ou *Hyoscyamus albus L.* est une plante hautement toxique, elle entre dans la composition d'un poison puissant. Elle est connue, au Maroc, ou elle est ajoutée à la composition d'un poison, elle en augmente sa toxicité grace à ses propriétés antiémétiques (**Gregoire, 2009**).

CHAPITRE II

POTENTIEL D'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES PLANTES ÉTUDIÉES

II.1. *Mentha aquatica*

De part les avantages que suscite la *Menthe Aquatique* dans le domaine de la médecine traditionnelle, on note la présence de deux travaux (Tunisie, Turquie) qui ont fait l'objet d'études des activités biologiques sur l'huile essentielle de la Menthe aquatique. Ces études ont décelé une activité antioxydante importante avec une IC₅₀ similaire à celui du Trolox(Dhifiet *al.*,2011).Ces mêmes échantillons ont révélés que l'huile essentielle de cette plante possède une activité antimicrobienne intéressante contre les bactéries du genre *Staphylococcus*, *Escherichia coli* et *Bascilus* (Senatoreet *al.*, 2005).

Elle donne une huile essentielle qui possède une forte activité antibactérienne, en particulier contre *Escherichia coli* (Mimica-Dukićet *al.*,2003).

Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc.

Et parmi les propriétés les plus connues, on citera également :

- **Le pouvoir antiseptique:**Les aldéhydes et les terpènes sont connus pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes. Leur efficacité se révèle en effet stable dans le temps et la preuve est faite tous les jours de leur grande efficacité, là où certains antibiotiques échouent désormais.
- **Le pouvoir antifongique:** Aux mêmes groupes que ceux cités plus haut, on ajoutera les sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques, participent a ce pouvoir.
- **Le pouvoir antiviral :** les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques de la menthe aquatique.
- **Le pouvoir antiparasitaire:** Le groupe des phénols possède une action puissantecontre les parasites (Maache et Jemali, 1986 ; Asma, 2010).

II.2. *Origanum vulgare*

❖ **Activité antibactérienne**

L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* est un mélange complexe contenant des monoterpènes hydrophobes, dont le carvacrol et le thymol, qui sont soupçonnésêtre responsables de ses propriétés antibactériennes. Cette activité antibactérienne est donc principalement due à la présence dans l'huile essentielle de ces composés phénoliques (carvacrol et/ou thymol). De même, la position relative du groupe hydroxyle au sein de la structure phénolique peut contribuer au pouvoir antibactérien des composants de l'huile

essentielle. Les espèces à thymol sont en effet un peu plus sensibles que celles à carvacrol. (Kintzios, 2002 ; Carneiro de Barroset *al.*, 2008 ; Leite de Souza *et al.*, 2009).

❖ Activité antifongique

Les phénols sont considérés comme étant les antimicrobiens les plus puissants, suivis par les alcools, cétones et éthers. L'augmentation du contenu en carvacrol de l'huile essentielle permet ainsi d'augmenter le potentiel antifongique, d'où l'intérêt de choisir un chémotype riche en carvacrol. Cet effet est cependant dépendant du pH, l'effet fongicide est ainsi plus important à pH 4 qu'à 6. Utilisé en quantité suffisante, le carvacrol peut donc inhiber la croissance et la production de toxine de certaines bactéries.

Les dérivés phénoliques pourraient également être impliqués dans la réduction de la respiration cellulaire, produisant alors une perte d'énergie cellulaire des levures.

Les terpènes, qui sont quant à eux présents dans différentes proportions, semblent posséder un effet additif sur l'inhibition fongique.

En exposant les cellules, en contact avec l'huile essentielle d'origan, à la chaleur, celles-ci se révèlent encore plus sensibles à l'effet de l'huile essentielle (Kintzios, 2002 ; Vale-Silva *et al.*, 2011).

❖ Activité antioxydant

Un très grand nombre d'études rapporte les effets antioxydants des différentes espèces d'*Origanum* (Kintzios, 2002).

L'origan possède des effets puissants de piégeage de radicaux hydroxy, comme c'est également le cas pour le thym et le clou de girofle. On attribue souvent cet effet antioxydant aux composés phénoliques présents, même si très peu d'informations sont disponibles concernant les mécanismes de cette action antioxydante. Ainsi, des composés phénolique non-polaires comme le thymol et le carvacrol, l'acide rosmarinique, retrouvés dans les espèces riches en huiles essentielles possèdent des propriétés antioxydantes remarquables. Le pouvoir antioxydant du thymol est cependant significativement plus important que celui du carvacrol, mais moins que celui de l'acide rosmarinique (Liang, 2011 ; Liang *et al.*, 2012).

L'effet antioxydant des plantes appartenant au genre *Origanum* est également la conséquence de la présence de dérivés polaires hydroxycinnamiques et de glycosides de flavonoïdes. L'Origan possède en effet des flavonoïdes (apigénine, eriodictyole,...), antioxydants lipidiques efficaces durant le stockage et la cuisson des huiles végétales (Liang, 2011 ; Liang *et al.*, 2012).

❖ Activité anti-mutagène

Même si encore aucune application clinique ou pratique de l'origan n'est pratiquée dans la prévention du cancer, de nombreuses études ont été réalisées concernant cette activité anticancéreuse du genre *Origanum* (**Bakkaliet al., 2007**).

L'espèce *Origanum vulgare*, et notamment son extrait aqueux, ont ainsi montré des effets anti-mutagènes significatifs. Deux substances faisant partie de la famille des flavonoïdes et présents dans l'origan, la galangine et la quercétine, agissent comme des agents spécifiques pour diminuer la mutagénéité. Cependant, à plus fortes concentrations, la quercétine agit elle-même comme un agent mutagène, mais diminue la mutagénéité quand elle est utilisée à de faibles concentrations (entre 0,1 et 10 µg) (**Kintzios, 2002**).

Des composés phénoliques provenant de diverses plantes, dont *Origanum vulgare*, ont inhibés fortement la formation de radicaux libres (cation de pyrazine) lors de la réaction de Maillard, ainsi que la formation de composés mutagènes et cancérigènes amino-imidazoazaarènes formés à partir de créatinine (**Kintzios, 2002**).

❖ Activité dépigmentante

Il en a été déduit que les antioxydants seraient des bons promoteurs de la santé de la peau. De plus, de nombreuses études sont effectuées concernant les effets dépigmentants qui découlent de l'origan, principalement sur le continent asiatique où il existe une obsession de la peau blanche.

Le contenu de l'espèce *Origanum vulgare* en acide rosmarinique est d'environ 5%, sous forme d'un dérivé dénommé Ov-8. Ce composé montrerait l'avantage d'être beaucoup plus sûr et moins toxique que l'arbutine ou l'acide L-ascorbique pour les cellules humaines fibroblastiques.

Un nouveau composant identifié, l'origanoside, a également montré ce même effet blanchissant de la peau. Ce nouveau glucoside phénolique est un solide orange isolé de la fraction éthyl acétate, extraite à partir des parties aériennes d'*Origanum vulgare* (**Lianget al., 2009**).

L'activité antioxydante de la vanilline et de l'acide vanillique, isolés de l'origan, a également été étudiée, notamment pour son intérêt en tant qu'agent anti-mélanogénique. L'acide vanillique est, plus particulièrement, un puissant antioxydant, avec une activité supérieure à l'acide ascorbique sur les espèces réactives à l'oxygène (**Chou et al., 2010**).

L'acide procatéchique, présent dans l'origan, a également été étudié concernant ces mêmes propriétés. Cette molécule montre également une importance en tant qu'agent antioxydant aux propriétés anti-mélanogénique (**Chou et al., 2010**).

Ceci indique que toutes ces molécules, voire l'origan dans sa globalité, pourraient être exploités à l'avenir dans l'industrie cosmétique ou dans des compléments alimentaires pour son action dépigmentante et anti-mélanogénique.

❖ Activité antiparasitaire

Le thymol serait le principal composant responsable de cette activité, expliquant la supériorité de l'action du thym par rapport à l'origan (**Santoroet al., 2007**).

❖ Activités diverses :

- Activité nématocide,
- Activité antispasmodique et urolithique ;
- Activité anti-glycémique ;
- Activité anti-thrombotique ;
- Action anti-inflammatoire (**Oka et al., 2000 ; Barbosaet al., 2010 ; Ntalliet al., 2010**).

II.3. Hyoscyamus albus

Peu d'études ont été réalisées concernant cette plante, et d'après nos recherches on constate qu'elle possède certaines activités biologiques telles que :

❖ Activité antibactérienne

Les polyphénols, contenus dans les extraits de cette plante, tels que les tanins et les flavonoïdes comme l'épigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine, (**Shan et al., 2007**) et lutéoline (**Askunet al., 2009**), sont des substances à fort pouvoir antibactérien.

❖ Activité antioxydant

Le pouvoir réducteur des extraits de l'espèce *Hyoscyamus albus* L. est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants. De même quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Hibiet al., 1992**).

**PARTIE
PRATIQUE**

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

I. Matériel et méthodes

Notre étude rentre dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques à travers la détermination de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles extraites à partir de trois plantes aromatiques *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare*, de la famille des *Lamiacées* et *Hyoscyamus albus* de la famille des *Solanacées*, seules ou associées à des composés majoritaires tels que l' α -pinène, l'Eugénol, le Thymol, et l'huile essentielle de l'Arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) ou des antibiotiques tels que le Chloramphénicol, Céfotaxime, Tétracycline et l'Amoxicycline, sur quelques souches bactériennes à GRAM positif et à GRAM négatif.

I.1. Matériel

I.1.1 Matériel végétal

Les trois plantes aromatiques utilisées dans la présente étude sont : *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus*, elles sont présentées dans la **figure n°4**



(a) *Mentha aquatica*



(b) *Origanum vulgare*



(c) *Hyoscyamus albus*

Figure 04 : Photographies des trois plantes utilisées.

Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de *Hyoscyamus albus* ont été récolté au moi de Février 2016 sur les montagnes du village de Béni-wihdan, commune de Boudjellil, willaya de Bejaia et à une altitude de 780m, séchées pendant quelques jours dans un endroit aéré, alors que *Mentha aquatica* et *Origanum vulgare* ont été achetées chez un arboriste à Bejaia, cité Tobal. L'étude effectuée sur les plantes à été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie à l'université A/Mira, Bejaia.

I.1.2 Matériel biologique

Afin d'étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites, cinq souches ont été choisies pour leur pouvoir pathogène pour l'Homme, ainsi que leur résistance aux antibiotiques. Des antibiotiques et des composés majoritaires sont également utilisés et ils sont représentés dans les tableaux V, VI et VII.

I.1.2.1. Souches bactériennes

Tableau V : Souches bactériennes utilisés

Bactéries	Référence	Classification
<i>Escherichia Coli</i>	ATCC 4157	Enterobacteriaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Micococcaceae
<i>Salmonella</i>	Souche Hospitalière	Enterobacteriaceae
<i>Entérocooccus fécalis</i>	Isolée d'eau souillée	Micococcaceae
<i>Pseudomonas putida</i>		Pseudomonadaceae

I.1.2.2. Antibiotiques

Tableau VI : Antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Formule chimique	Référence
Amoxiciline	$C_{18}H_{19}N_3O_5S$	A 8523-25G C.A.S :26787-78-0
Tétracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_2$	101317160 C.A.S :60-54-8
Chloramphénicol	$C_{11}H_{12}Cl_2O_3$	Produit par SPG Chine pour SOPHAL Algérie
Céfotaxime	$C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$	

I.1.2.3. Composés majoritaires

Tableau VII : Composés majoritaires utilisés.

Composés majoritaires	Référence
Thymol	Riedel – de Haén, FrademarK registered by Honeywell.
Eugénol	500350100, C.A.S.97-530. EINECS :202-589-1.New office :315 place youville suite 343. Montréal, Québec.
α -pinène	1012248651 zeppelinstra 7,76185 Karistruche, Germany
Huile essentielle de l'Arbre à thé (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	SCHONING GmbH et CO.KG, Porschestr.22/24. D-12107 Berlin.

Nb : L'huile essentielle de l'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) est classé dans les huiles essentielles et non pas dans les composés majoritaires tel qu'il est cité dans notre document.

I.1.2.4. Milieux de culture

- Le Bouillon nutritif est utilisé pour les cultures mères et pour la conservation des souches.
- Le milieu Bouillon Mueller Hinton (BMH) a été utilisé pour la détermination des paramètres de croissance (CMI et des CMB des HE, de leurs composés à l'état pur et des ATB).
- Solution d'agar à 0,2% a été utilisée pour préparer la solution mère et les dilutions de chaque huile essentielle et composé majoritaire ainsi que celle des antibiotiques.
- La gélose nutritive, pour la culture des souches bactériennes.

I.2. Méthodes

I-2-1 Extraction des huiles essentielles

I-2-1-1 Récolte et séchage

Hyoscyamus albus a été récoltée et séchée dans un endroit aéré, tandis que *Mentha aquatica* et *Origanum vulgare* ont été achetées à l'état sec. Pour l'extraction des huiles essentielles seules les parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) des différentes plantes sont utilisées.

I-2-1-2 Extraction

Nous avons utilisé la méthode d'hydrodistillation pour l'extraction des huiles essentielles des différentes plantes. La distillation a été effectuée par un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). Le temps d'extraction est de deux heures. (Figure 05). Il comporte :

- 1) Un support élévateur, un chauffe-ballon, un ballon de 2 litres.
- 2) Un système de refroidissement (un réfrigérant, de type Liebig, relié à une pompe qui fait circuler une eau froide, en continu, à travers ce dernier).
- 3) Une ampoule à décanter.
- 4) Deux coudes dont l'un mâle-mâle reliant le ballon au réfrigérant et l'autre femelle-mâle (avec une sortie sous vide pour éviter l'explosion du système par augmentation de la pression ; dans le Clevenger ce problème est réglé par le système de cohobage).



Figure 05 : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger.

La chaleur provoque d'une part l'évaporation de l'eau et d'autre part la libération de l'HE, cette dernière est entraînée par la vapeur d'eau et condensée avec elle au niveau du condenseur (réfrigérant) puis séparée de la phase aqueuse par différence de solubilité au niveau de l'ampoule à décanter (Clevenger, 1928).

Pour les trois plantes, 50 grammes sont macérés (Hilan *et al.*, 2006), dans 1 litre d'eau de source pendant toute une nuit (16 à 20 heures). Puis l'eau dans le ballon est portée à ébullition (mais surveillé de tel sorte à ne pas trop dépasser les 100°C) pendant 2 heures. Une série de treize extractions a été effectuée pour *Mentha aquatica*, douze pour l'*Origanum vulgare* et enfin une série de 19 extractions a été effectuée pour *Hyoscyamus albus*.

Après décantation des distillats, les HEs ont été récupérées et complètement déshydratées à l'aide du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), puis conservées au réfrigérateur (0-4°C) dans des tubes fumés et bien fermés et à l'abri de la lumière, pour éviter toute dégradation de l'huile essentielle due à l'action de l'air et de la lumière (Şahin *et al.*, 2004).

Après chaque extraction, nous avons déterminé le rendement en huile essentielle qui est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse végétale sèche à traiter (Carré, 1953).

❖ Rendement (Rd) en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal traitée (Mrabet *et al.*, 1999).

$$\text{Rd}\% = \text{Mi} / \text{M}_0 * 100$$

Mi : masse de l'huile essentielle obtenue.

M₀ : masse du matériel végétal traité.

I-2-2 Effets in vitro des huiles essentielles seules ou en association

La technique utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles et l'effet de leurs associations était celle de la microdilution en milieu Bouillon Mueller Hinton (BMH), appelée communément la méthode de l'échiquier. (Vaubourdolle, 2007). Toutes les étapes effectuées pour réaliser cette technique étaient conformes aux CLSI (2006), anciennement appelé NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Les associations ont été testées sur cinq souches. Il s'agit de : *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *P. putida* et *E. fécalis*.

I-2-2-1 Préparation des inocula bactériens

Avant chaque test, les bactéries sont repiquées sur un milieu neuf (bouillon nutritif) et incubées environ 6 heures à 37°C puis ensemencées sur gélose nutritive par la méthode des stries et incubées pendant 18 heures à 37°C (afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées). À partir de ces colonies, l'inocula à tester est préparé et standardisé.

I.2.2.1.1. Standardisation des inocula bactériens

L'inoculum à tester doit avoir une charge bactérienne standard, exigée par CLSI, (2006) (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour les tests en milieu liquide (macro et micro dilution), qui équivaut à une turbidité de 0,5 Mc Farland ($\sim 10^8$ UFC/ml). Une solution dite de Mc Farland a été préparée (annexe I). Une fois préparée, cette solution doit avoir une densité optique (DO) comprise entre 0,08 et 0,13 à 625 nm. Les inocula sont comparés à cette solution, ils doivent aussi avoir cet intervalle de DO, ce qui correspond à une charge de 10^8 UFC/ml. Cette solution est ensuite ramenée à 10^7 UFC/ml après dilution d'un dixième dans de l'eau physiologique.

I.2.2.1.2. Préparation des dilutions

Etant donné la non miscibilité des huiles essentielles ou des composés majoritaires dans l'eau, une solution d'agar à 0,2% a été utilisée pour préparer la solution mère et les dilutions de chaque huile essentielle et composé majoritaire ainsi que celle des antibiotiques.

La préparation de l'émulsion d'huile essentielle ou de composés majoritaires est réalisée selon la méthode rapportée par Remmal *et al.*, (1993).

L'huile essentielle ou le composé majoritaire sont émulsionnés en ajoutant 100 µl de la solution à 900 µl d'une solution aqueuse stérile à 0,2 % d'agar, pour faciliter la dispersion de ces composés et faciliter leur contact avec le germe testé.

Pour les antibiotiques ,10 mg de chaque antibiotique sont ajouté à 10 ml d'eau distillée, a partir de cette solution 100 µl sont émulsionnée dans 900 µl d'agar pour préparer la solution mère.

Les différentes dilutions des (1/2 ,1/4,1/8,...1/256) trois huiles essentielles, des composés majoritaires et des antibiotiques sont préparées dans la solution d'agar pour obtenir les différentes concentrations.

I-2-2-2 Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de l'échiquier

L'évaluation in Vitro de l'activité antibactérienne des composés testés, consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes en contact de différents produits, et ceci par la méthode de dilution sur microplaque (technique de l'échiquier), (**Vaubourdolle, 2007**).

La méthode de l'échiquier est décrite par **Eliopoulos et al (2005)**, les volumes utilisés ainsi que le temps d'incubation sont ceux exigés par le **CLSI (2006)** pour la technique de dilution en milieu liquide (microdilution).

Notre travail est divisé en trois parties essentielles :

- L'activité antibactérienne de l'association des trois huiles essentielles (*Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus*), testé sur cinq souches bactériennes.
- L'activité antibactérienne de l'association des trois huiles avec les composés majoritaires (Thymol, Eugénol, α-pinène et l'HS de l'Arbre à thé), testé sur 5 souches.
- Et enfin l'activité antibactérienne de l'association des trois huiles essentielles avec les antibiotiques (Amoxiciline, Tétracycline, Chloramphénicol et Céfotaxime), testé sur 5 souches.

La figure 06 représente un schéma d'une microplaque de 96 puits qui a été utilisée dans ce protocole.

A	1/64											
B	1/32											
C	1/16											
D	1/8											
E	1/4											
F	1/2											
G	SM											
H	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Figure 06 : Schéma d'une microplaque de 96 puits

Les différentes dilutions (concentrations doubles) de chaque agent antimicrobien sont préalablement préparées en quantités suffisantes dans des tubes stérilisés (en verre) de 75×12 mm. Conservées à 4°C et à l'abri de la lumière après chaque test, celles-ci ont été renouvelées tous les deux jours dans d'autres tubes.

On procède comme suit :

- Le puit H1 (en rouge, sur la figure 6) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum bactérien, et 50 µl de l'agar à 0,2% (témoin de croissance).
- À l'exception du puits H1, chaque puits de la ligne H (en abscisses) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum, et **50 µl** d'une dilution de l'agent antimicrobien A (de la plus concentrée à la plus diluée), ces puits sont utilisés pour déterminer les CMB_S de l'agent antimicrobien A .
- À l'exception du puits H1, chaque puits de la colonne n° 1 (en ordonnées) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum, et **50 µl** d'une dilution de l'agent antimicrobien B (de la plus concentrée à la plus diluée), ces puits sont utilisés pour déterminer les CMB_S de l'agent antimicrobien B.
- Chaque puits du reste de la microplaque (en violet) contient les mêmes quantités du BMH, de l'inoculum, et **25 µl** de chaque agent antimicrobien (combinaison des différentes dilutions qui correspondent à celles des deux axes ; de telle sorte que chaque puits sera unique en ses combinaisons de doses), pour déterminer l'effet de l'association.
- Après 16 à 20 h d'incubation à 37°C, les microplaques sont examinées. Les puits là où il n'y a pas de croissance (puits clairs) contiendraient des concentrations inhibitrices. des repiquages ont été effectués à partir de ces puits sur une gélose nutritive, cette dernière est incubée à 37°C pendant 24 h. Les concentrations minimales bactéricides correspondraient à celles dont les puits n'ont donné aucune croissance après repiquage.

L'effet de l'association est déterminé par la formule suivante (**vaubourdolle, 2007**).

$$\text{FIC}_{\text{Index}} = \frac{\text{C M}(\frac{\text{A}}{\text{B}})}{\text{C M}(\text{A})} + \frac{\text{C M}(\frac{\text{A}}{\text{B}})}{\text{C M}(\text{B})}$$

L'effet antibactérien est apprécié comme suit soit pour les FIC_{index} ou bien pour les FBC_{index} :

- ✓ La synergie est définie par un **FIC_{Index} ≤ 0,75**.

- ✓ L'addition correspond à un $\text{FIC}_{\text{Index}} = 1$.
- ✓ L'indifférence est définie par un $\text{FIC}_{\text{Index}}$ compris entre 1 et 2.
- ✓ L'antagonisme est défini par $\text{FIC}_{\text{Index}} \geq 2$.

**RÉSULTATS
ET
INTÉRPRÉTATIONS**

II.1. Rendement en huiles essentielles

II.1.1. *Mentha aquatica* L.

Nous avons obtenu une huile de couleur jaunepaleavec une odeur aromatique forte et fraîche. Les mêmes caractéristiques trouvées par **Bardeau, (2009)** et d'autres études **Sylvain, (2010)**. Le rendement en huile essentielle de *Mentha aquatica* est de **1,01 %**. Ce rendement est important par rapport à celui qui est exploité industriellement qui est de **(0,5-1%)**. (**Edward, 1987**).

Montes et al. (1986) rapportent que *Mentha pulegium* de provenance de Chili a un rendement en huile essentielle de **2,3%**. Par ailleurs, **Sivropoulou et al. (1995)** ont obtenu une teneur en huile essentielle de *Mentha pulegium* récoltée dans trois stations en Grèce, de l'ordre de **1,6 à 2%**, par contre **Teixeira Duarte et al. (2005)**, avancent que le rendement en huile essentielle de cette même espèce végétale d'origine Brésilienne est très faible, de l'ordre de **0,42%**. Ces valeurs sont nettement inférieures aux nôtres.

II.1.2 *Origanum vulgare* L.

Pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, elle est d'une couleur marron claire, le rendement est de **(1,35%)** est inférieur, comparativement aux résultats rapportés pour *Origanum vulgare* ssp. *Hirtem* (**4,3%**) d'Hongrie. (**Veres et al., 2003**), et celui d'*Origanum vulgare* ssp. *vulgare* (**2,31%**) de la Turquie. (**Sahin et al., 2004**). Cette différence de résultats pourrait être expliquée par la différence géographique et climatique des régions de récolte, ainsi la période de récolte (avant ou après la floraison). (**Veres et al., 2003 ; Prieto et al., 2005**).

II.1.3 *Hyoscyamus albus* L.

Hyoscyamus albus a un rendement en huile essentielle qui est de l'ordre de **0,10 %**, d'une couleur transparente, il est faible comparant à celui obtenu par un travail réalisé à l'université de Bejaia (Anonyme) et qui est de l'ordre de **0,32%**, ce résultat montre que la plante n'est pas riche en huiles essentielles.

Enfin, **Desjobert et al. (1997)**, avancent que l'étude complète d'une huile essentielle doit passer par la prise en compte des facteurs édaphiques. Ainsi, les résultats obtenus nous permettent de supposer que les différences des teneurs en huiles essentielles des différentes plantes sont étroitement liées aux conditions culturales, tant climatiques; répartition géographique, altitude, qu'édaphiques et nature du sol.

La figure 07 représente les rendements en huiles essentielles d'*Origanum vulgare*; *Mentha aquatica* et *Hyoscyamus albus*.

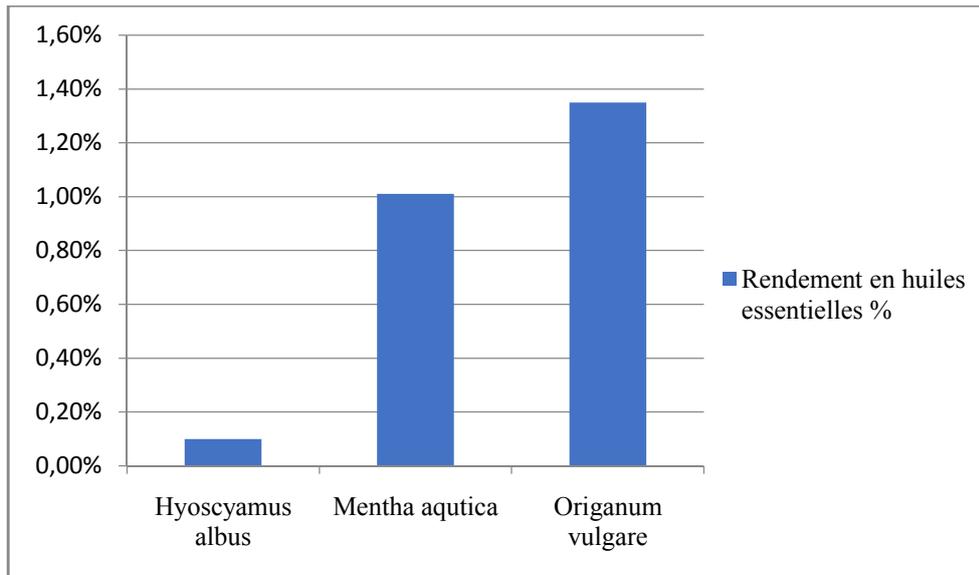


Figure 07:rendement en huiles essentielle d'*Origanum vulgare* ; *Mentha aquatica* et *Hyoscyamus albus*.

II.2.Activité antibactérienne

II.2.1. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB):

La CMB (Concentration Minimale Bactéricide) s'est avérée être un bon prédicateur de l'efficacité thérapeutique d'un antibiotique et est donc largement utilisée dans la recherche de nouvelles substances actives.(Joffin etLeyral, 1996).

Le tableau N° VIII représente les CMB_s de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, *Mentha aquatica* et d'*Hyoscyamus albus* sur les différentes souches bactériennes.

II.2.1.1Activité antibactérienne des trois huiles essentielles seules

Tableau VIII : CMB_s de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, *Mentha aquatica* et d'*Hyoscyamus albus* sur les différentes souches bactériennes.

Bactéries	CMB (mg /ml)		
	HE d' <i>Origanum vulgare</i>	HE de <i>Mentha aquatica</i>	HE de <i>Hyoscyamus albus</i>
<i>Escherichia coli</i>	2.18	46.65	0.046
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.37	11.66	0.046
<i>Entérocooccus fécalis</i>	2.18	46.65	0.046
<i>Pseudomonas putida</i>	0.27	/	/
<i>Salmonella</i>	0.27	46.50	0.046

Ces résultats montrent que les huiles essentielles des trois plantes aromatiques : *Origanum vulgare*, *Mentha aquatica* et *Hyoscyamus albus* ont une activité antibactérienne.

Ces huiles agissent différemment sur les bactéries testées, leurs CMB_S varient entre 0.27 et 4.37 mg/ml pour l'HE de *Origanum vulgare*, 11.66 et 46.65 mg/ml pour l'HE de *Mentha aquatica*, et une valeur constante de 0.046 mg/ml pour l'HE d'*Hyoscyamus albus*.

Staphylococcus aureus est la moins sensible vis-à-vis de l'HE d'*Origanum vulgare* avec une CMB de 4.37 mg/ml, par contre avec l'HE de *Mentha aquatica* cette souche apparaît plus sensible, les autres souches ont le même degré de sensibilité vis-à-vis de cette HE avec une CMB de 46.65 mg/ml.

Une meilleure activité de l'HE d'*Origanum vulgare* est observée vis-à-vis de *Pseudomonas putida* et *Salmonella* avec une CMB de 0.27 mg/ml.

De nombreuses études ont montré que les activités biologiques des HEs des plantes aromatiques sont liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires. Cependant, des composés minoritaires peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité biologique. (Burt, 2004 ; Wang et al.,2012 ;Kheyaret al.,2014).

L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* est un mélange complexe contenant des monoterpènes hydrophobes, dont le carvacrol et le thymol, qui sont soupçonnés être responsable de ses propriétés antibactériennes. Cette activité antibactérienne est donc principalement due à la présence dans l'huile essentielle de ces composés phénoliques (carvacrol et /ou thymol). De même, la position relative du groupe hydroxyle au sein de la structure phénolique peut contribuer au pouvoir antibactérien des composants de l'huile essentielle. Les espèces à thymol sont en effet un peu plus sensibles que celles à carvacrol. (Kintzios,2002 ;Carneiro de Barroset al.,2008 ;Leite de souzaet al.,2009).

L'huile essentielle de *Mentha aquatica* possède une activité antimicrobienne intéressante contre les bactéries du genre (*Staphylococcus*, *Escherichia coli* et *Bacillus*) (Senatoreet al., 2005).

II.2.1.2 Activité antibactérienne des différentes associations

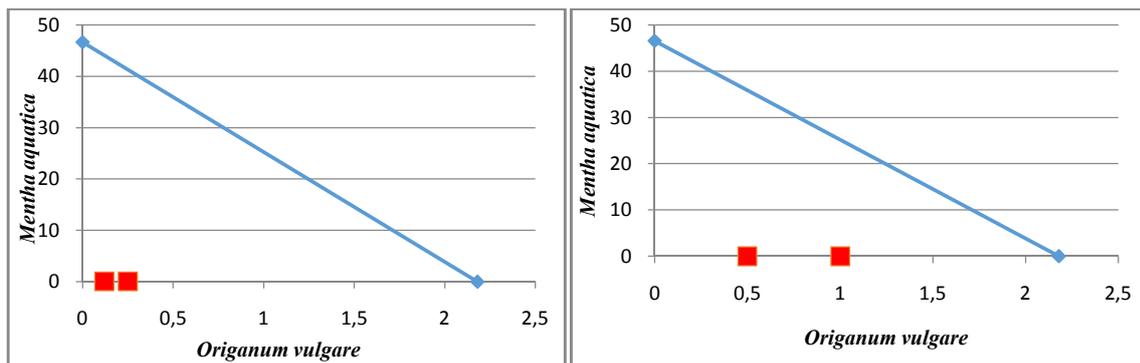
- **Activité antibactérienne de l'association huile essentielle /huile essentielle**

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'association de l'HE de *l'Origanum vulgare*, *Mentha aquatica* et l'HE d'*Hyoscyamus albus* vis-à-vis des souches bactériennes testées, sont présentées dans le Tableau N°IX.

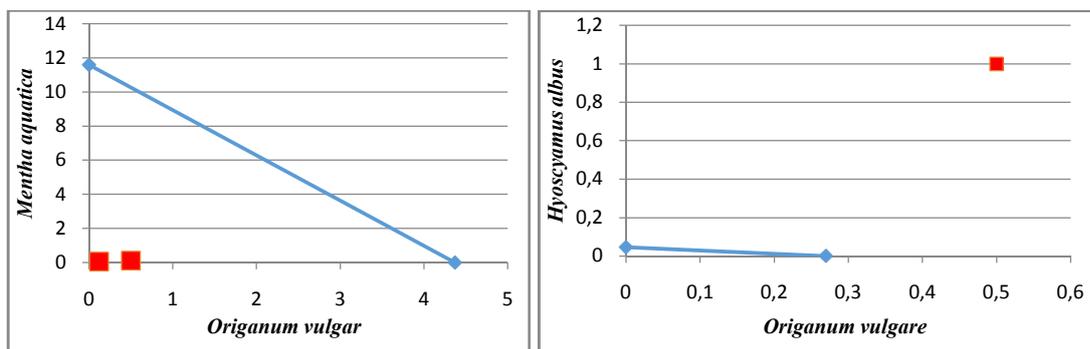
Tableau IX : Effets de l'association des trois huiles essentielles sur les souches bactériennes testées.

Association	Bactéries	FBC _{index}	Effet de l'association
HE d' <i>Origanum vulgare</i> et HE de <i>Mentha aquatica</i>	<i>Escherichia coli</i>	0.18	Synergie
	<i>Entérocooccus fécalis</i>	0.51	Synergie
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.18	Synergie
HE d' <i>Origanum vulgare</i> et <i>Hyoscyamus albus</i>	<i>Salmonella</i>	1.5	Indifférence

Les isobogrammes montrant l'effet de l'association de l'HE d'*Origanum vulgare* avec l'HE de *Mentha aquatica* et son association avec l'HE d'*Hyoscyamus albus* sur les souches bactériennes testées, sont présentées dans la figure n° 08.



Effet synergique sur *Escherichia coli* Effet synergique sur *Entérocooccus fécalis*



Effet synergique sur *Staphylococcus aureus*

Effet L'indifférence sur *Salmonella*

Figure 08 : Les isobogrammes indiquant les effets de l'association des huiles essentielles sur les bactéries testées.

Ces résultats montrent que l'association des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* et de *Mentha aquatica* présente des effets synergiques sur trois bactéries : *Escherichia coli*,

Entérocooccus fécalis et *Staphylococcus aureus*. Les FBC_{Sindex} calculées sont entre 0.18 et 0.51. Elles sont inférieures à 0.75 ce qui indique l'effet synergique. (Vaubourdolle, 2007), Alors que son association avec l'HE d'*Hyoscyamus albus* a donné un effet d'indifférence sur *Salmonella*, avec une valeur de 1,5.

Des études ont montré que les effets antimicrobiens des huiles essentielles sont liés à la présence de groupements hydroxyles libres qui permettent une bonne solubilisation de ces composés dans les milieux physiologiques aqueux (Knobloch *et al.*, 1989 ; Giordani *et al.*, 2004 ; Ben Arafaet *et al.*, 2006). Certains de ces composés sont connus pour leur fort pouvoir antimicrobien du fait de leur grande solubilité dans l'eau et donc de leur forte capacité à accéder aux cellules microbiennes et à pénétrer les parois des cellules bactériennes et fongiques (Knobloch *et al.*, 1989).

Les plantes aromatique les plus connues pour leurs propriétés antibactériennes sont celles à huiles essentielles riches en composés phénoliques comme l'Eugénol, Thymol et Carvacrol, ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori*. (Pauli, 2001).

Activité antibactérienne de l'association huile essentielle / composés majoritaires

Le tableau N°X représente les CMB_s des composés majoritaires, (Thymol, Eugénol, α -Pinène et *Melaleuca alternifolia*) testées sur différentes souches bactériennes.

Tableau X : CMB_s des composés majoritaires, (Thymol, Eugénol, α -Pinène et *Melaleuca alternifolia*) testées sur différentes souches bactériennes.

Bactéries	CMBmg/ml			
	Eugénol	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Thymol	l' α -Pinène
<i>Entérocooccus fécalis</i>	12.75	1.35	0.0062	/
<i>Escherichia coli</i>	12.5	8.7	0.025	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.75	/	0.0062	7.2
<i>Pseudomonas putida</i>	/	/	0.025	/
<i>Salmonella</i>	/	8.7	/	/

Ces résultats montrent que le composé majoritaire Thymol a une bonne activité antibactérienne par rapport aux trois autres composés. Il est plus actifs que l'HEsd '*Origanum vulgare* et *Mentha aquatica*, avec des CMB_s variant de 0,0062 et 0,025 mg/ml. Par contre l'Eugénol est le moins actif avec une valeur qui varie entre 12,5 et 12,75 mg/ml.

Escherichia coli est plus résistante à l' α -Pinène avec une CMB de l'ordre de 18 mg/ml, suivie par *Staphylococcus aureus* avec une valeur de 7.2 mg/ml.

Résultats et Interprétations

Les deux bactéries (*Escherichia coli* et *Salmonella*) ont la même résistance vis-à-vis de l'huile de *Melaleuca alternifolia* (8.7mg/ml), par contre *Entérocooccus fécalis* est plus sensible à ce dernier avec une valeur de 1.35 mg/ml.

Zhiri et ses collaborateurs (2005) ont montré que le Thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches bactériennes tellesqu'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles il provoque des fuites d'ions potassium.

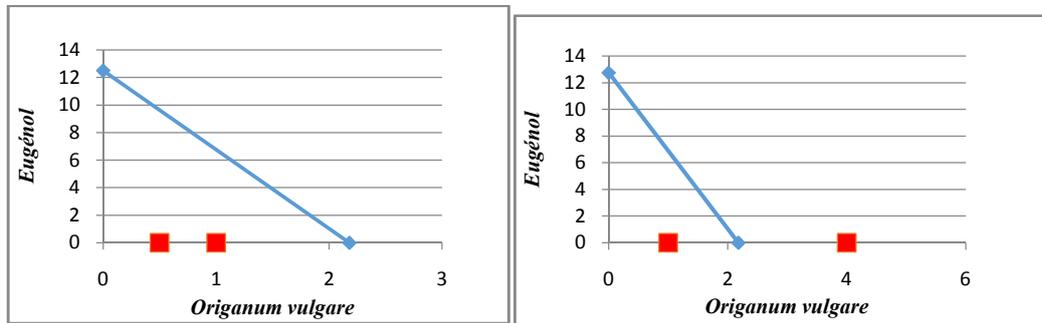
Les travaux de **Ghalem et Mohamed (2008)**, ont indiqué que les composés majoritaires peuvent ne pas être nécessairement responsables de l'activité antibactérienne des HEs.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'association de l'HE de *Origanum vulgare* et *Mentha aquatica* avec descomposés majoritairesvis-à-vis des souches bactériennes testées, sont présentées dans le Tableau N°XI.

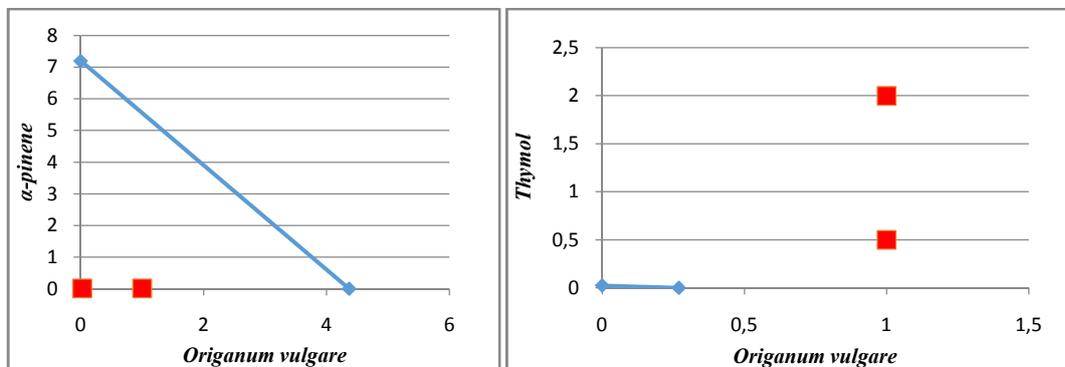
Tableau XI : Effets des différentes associations, HE/composés majoritaires vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Associations		Bactéries	FBC _{index}	Effet de l'association
HE d' <i>Origanum vulgare</i>	Thymol	<i>Entérocooccus fécalis</i>	0.56	Synergie
		<i>Escherichia coli</i>	0.31	Synergie
		<i>Staphylococcus aureus</i>	0.15	Synergie
		<i>Pseudomonas putida</i>	1.5	Indifférence
	Eugénol	<i>Entérocooccus fécalis</i>	1	Addition
		<i>Escherichia coli</i>	0.50	Synergie
		<i>Staphylococcus aureus</i>	0.04	Synergie
	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Entérocooccus fécalis</i>	0.55	Synergie
		<i>Escherichia coli</i>	1.25	Indifférence
	α-Pinène	<i>Escherichia coli</i>	0.12	Synergie
<i>Staphylococcus aureus</i>		0.037	Synergie	
HE de <i>Mentha aquatica</i>	α-Pinène	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.13	Synergie
		<i>Escherichia coli</i>	0.009	Synergie
	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Entérocooccus fécalis</i>	0.06	Synergie
		<i>Salmonella</i>	0.51	Synergie
	Eugénol	<i>Entérocooccus fécalis</i>	0.16	Synergie

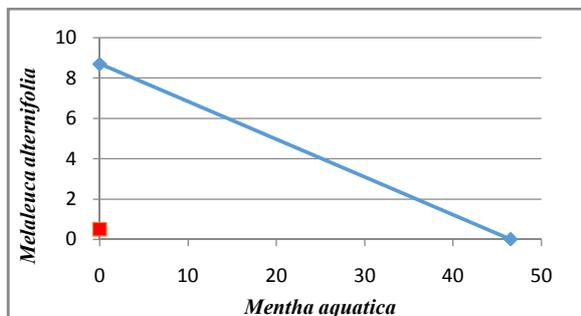
La figure n° 09 présente les isobogrammes, qui montrent les effets des associations HE_S des deux plantes (*Mentha aquatica* et *Origanum vulgare*) avec les composés majoritaires.



Effet synergique sur *Escherichia coli* Effet d'addition sur *Entérocooccus fécalis*



Effet synergique sur *Staphylococcus aureus* Effet d'indifférence sur *Pseudomonas putida*



Effet synergique sur *Salmonella*

Figure 09 : Isobogrammes montrant les effets des associations HE_S des deux plantes (*Mentha aquatica* et *Origanum vulgare*) avec les composés majoritaires.

D'après les résultats présentés dans le tableau XI, l'association de l'huile essentielle de *Mentha aquatica* avec l' α -Pinène, *Melaleuca alternifolia* et l'Eugénol a donné des effets synergiques sur les quatre souches (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Entérocooccus fécalis*), avec des FBC_{index} comprises entre 0.009 et 0.51 qui sont inférieures à 0.75 selon *Vaubourdolle (2007)*, et aussi l'association de l'huile essentielle d'*Origanum*

vulgare avec l' α -Pinène a donné des effets synergiques sur deux souches avec des FBC_{index} de l'ordre de 0.037 pour *Staphylococcus aureus* et 0.12 pour *Escherichia coli*.

Par contre les associations entre l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* avec les trois composés majoritaires (Thymol, *Melaleuca alternifolia* et Eugénol) ont montré plusieurs effets ; son association avec le Thymol, *Melaleuca alternifolia* a un effet synergique avec des FBC_{index} de 0.15 et 0.56 sur *Staphylococcus aureus* et *Entérocooccus fécalis*, alors que cet effet est observé sur *E. coli* seulement en association avec le Thymol ; et son association avec l'Eugénol a donné un effet synergique uniquement sur les deux souches *Staphylococcus aureus* et *E. Coli*.

L'association de l'HE d'*Origanum vulgare* avec l'Eugénol a révélé un effet d'addition sur *Entérocooccus fécalis*, un effet d'indifférence en association avec le Thymol, sur *Pseudomonas putida*, et avec *Melaleuca alternifolia* sur *Escherichia coli*.

Il est bien connu que les bactéries GRAM négatives sont plus sensibles aux HEs que les bactéries GRAM positives. Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HEs confirment ce phénomène (Burt, 2004 ; Poole, 2004).

Delaquis et ses collaborateurs (2002), ont estimé que l'activité antimicrobienne de certaines HES pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à l'état de traces, tels que le nérol, le bornéol, le linalol, l'aldéhyde de cinnamyl, le carvacrol, le géraniol, le myrténal et l'Eugénol connus pour son activité antibactérienne.

L'effet antimicrobien observé serait alors attribué à une ou plusieurs molécules actives, présentes en forte ou faible proportion dans les HEs. De cette façon, différentes combinaisons de plusieurs composés actifs peuvent générer des activités biologiques équivalentes (Delaquis et al., 2002).

- **Activité antibactérienne de l'association huile essentielle / antibiotiques**

Parmi les antibiotiques testés, seulement deux (chloramphénicol et Céfotaxime) associés avec l'HE de *Mentha aquatica* ont donné un effet bactéricide sur deux souches bactériennes, une à Gram positif (*Escherichia coli*) et une autre à Gram négatif (*Entérocooccus fécalis*).

Le tableau N°XII représente les CMB_s des antibiotiques testés sur différentes souches bactériennes.

Tableau XII: CMB_s des deux antibiotiques sur *Escherichia coli* et *Entérocooccus fécalis*.

Bactéries	CMB mg/ml	
	chloramphénicol	Céfotaxime
<i>Entérocooccus fécalis</i>	0.5	/
<i>Escherichia coli</i>	/	0.1

A partir de ces résultats on note que les deux antibiotiques ont agit chacun sur une souche bactérienne, chloramphénicol sur *Entérocooccus fécalis* avec une CMB de 0.5 mg/ml et Céfotaxime sur *Escherichia coli* avec une CMB de 0.1 mg/ml.

Le chloramphénicol est un antibiotique de la Famille des Phénicoles, il agit sur les bactéries GRAM positives et GRAM négatives. Il se fixe sur unités 50_s des ribosomes et induit l'inhibition de la polymérase.

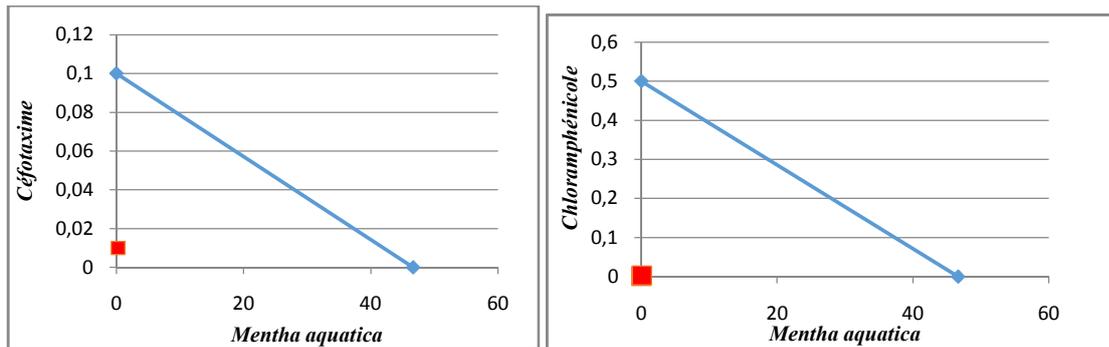
Le Céfotaxime fait partie des céphalosporines de 3^{ème} génération. Il a un large spectre d'activité, Il agit aussi bien sur les bactéries GRAM négatives que sur les bactéries GRAM positives. Le mode d'action des céphalosporines est identique au mode d'action des autres β lactamines, ils ont une action sur la paroi bactérienne, par toxicité sélective ; ils agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant la pénicilline (PLP). (Mouhammedi, 2006).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'association de l'HE de *Mentha aquatica* avec des Antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées, sont présentés dans le Tableau N°XIII.

Tableau XIII : Effets des différentes associations, HE /Antibiotiques sur les deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Entérocooccus fécalis*).

Association		Bactéries	FBC _{index}	Effet de L'association
Huile essentielle	Antibiotique			
Mentha aquatica	chloramphénicol	<i>Entérocooccus fécalis</i>	0.008	synergique
	Céfotaxime	<i>Escherichia coli</i>	0.26	synergique

Les isobogrammes montrant l'effet de l'association des HE_s avec les antibiotiques sont présentées dans la figure n° 10.



Effetsynergique sur *Escherichia coli* Effetsynergique sur *Entérocooccus fécalis*

Figure 10 :Isobologrammes montrant l'effet de l'association de l'HEde *Mentha aquatica* avec les antibiotiques

Cesrésultats montrent que l'association entre l'huile essentielle de *Mentha aquatica* et les deux antibiotiques (chloramphénicol, Céfotaxime) ont donné des effets synergiques avec des FBC_{index} de 0.008 sur *Escherichia coli* et 0.26 pour *Entérocooccus fécalis*.

En dépit de la présence d'une grande quantité de travail consacrée soit à l'activité antibactérienne des huiles essentielles, des antibiotiques ou aux combinaisons antibiotiques-antibiotiques, il y a un manque d'études sur l'effet antibactérien de combinaisons entre les huiles essentielles et les antibiotiques (Kon et Rai, 2012).

II.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier (Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999).

II.2.2.1 Activité antibactérienne des trois huiles essentielles seules

Le tableau N°XIV représente les CMI_s de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et *Mentha aquatica* sur les différentes souches bactériennes.

Tableau XIV : CMI_s de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, *Mentha aquatica* et sur les différentes souches bactériennes.

Bactéries	CMI (mg /ml)	
	HE d' <i>Origanum vulgare</i>	HE de <i>Mentha aquatica</i>
<i>Escherichia coli</i>	8.75	1.45
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.27	2.91
<i>Salmonella</i>	8.75	1.45

D'après les résultats obtenus, on a constaté que *Escherichia coli* et *Salmonella* sont plus résistantes vis-à-vis de HE d'*Origanum vulgare* avec une valeur de CMI de 8.75 mg/ml, par contre sont plus sensibles vis-à-vis de l'HE de *Mentha aquatica*. Alors que *Staphylococcus aureus* est plus sensible à l'HE d'*Origanum vulgare* avec une CMI de l'ordre de 4.27 mg/ml, et plus résistante vis-à-vis de l'HE de *Mentha aquatica* avec une valeur de 2.91 mg/ml.

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement liée à leur composition chimique, et en particulier à leurs composés majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. (Gachkaret al., 2007; Rasooliet al., 2008).

L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* posséderait donc un effet inhibiteur intéressant sur la viabilité cellulaire de *Staphylococcus aureus*, avec un taux de destruction rapide et stable des bactéries (Carneiro de Barroset al., 2008; Leite de Souza et al., 2009). Les HE peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides (Cox et al., 2001).

II.2.2.2 Activité antibactérienne des différentes associations

- L'Activité antibactérienne de l'association huile essentielle / composés majoritaires

Le tableau N°XV représente les CMI_s des composés majoritaires, (Thymol, Eugénol, α -Pinène et *Melaleuca alternifolia*) testées sur différentes souches bactériennes.

Tableau XV : CMI_s des composés majoritaires, (Thymol, Eugénol, α -Pinène et *Melaleuca alternifolia*) testées sur différentes souches bactériennes.

Bactéries	CMI mg/ml			
	Eugénol	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Thymol	l' α -Pinène
<i>Escherichia coli</i>	12.5	2.175	0.0015	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	4.35	0.0025	18
<i>Salmonella</i>	12.5	/	0.05	1.12

Ces résultats montrent que le composé majoritaire Thymol a une bonne activité antibactérienne par rapport aux trois autres composés. Il est plus actif que les

Résultats et Interprétations

l'HE_s d'*Origanum vulgare* et *Mentha aquatica*, avec des CMIS variant de 0,0015 et 0,05 mg/ml. Par contre l'Eugénol est le moins actif avec une valeur constante de 12,5 mg/ml.

Staphylococcus aureus est plus résistante à l'HE de *Melaleuca alternifolia* et l' α -Pinène avec des CMI de l'ordre de 4.35 et 18mg/ml respectivement, par contre *Escherichia coli* est plus sensible au composé majoritaire *Melaleuca alternifolia* (CMI : 2.17mg/ml). *Salmonella* est plus sensible au composé majoritaire α -Pinène avec une valeur de CMI qui est de l'ordre de 1.12mg/ml.

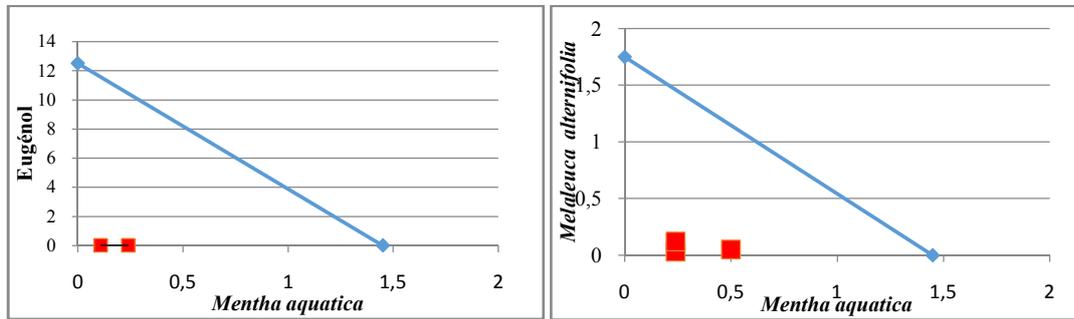
Une association des huiles essentielle et de leurs composés majoritaires est réalisée dans le but d'élargir leur spectre d'action, d'obtenir une synergie, diminuer la durée du traitement et de diminuer les concentrations en huiles utilisées (Essawi et Srour, 2000).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'association de l'HE de *l'Origanum vulgare* et *Mentha aquatica* avec des composés majoritaires vis-à-vis des souches bactériennes testées, sont présentées dans le Tableau N° XVI.

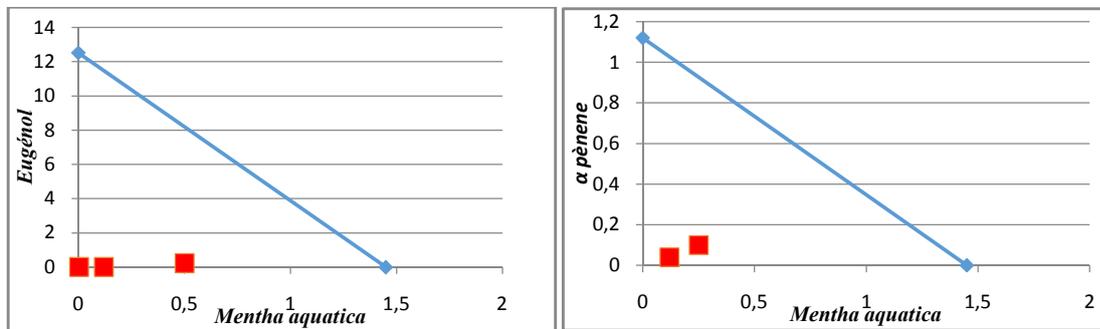
Tableau XVI : Effets des différentes associations, HE / composés majoritaires vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Associations		Bactéries	FIC _{index}	Effet de l'association
HE d' <i>Origanum vulgare</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.061	Synergie
HE de <i>Mentha aquatica</i>	α -Pinène	<i>Salmonella</i>	0.16	Synergie
	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.091	Synergie
		<i>Escherichia coli</i>	0.27	Synergie
	Eugénol	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.12	Synergie
		<i>Escherichia coli</i>	0.24	Synergie
		<i>Salmonella</i>	0.12	Synergie

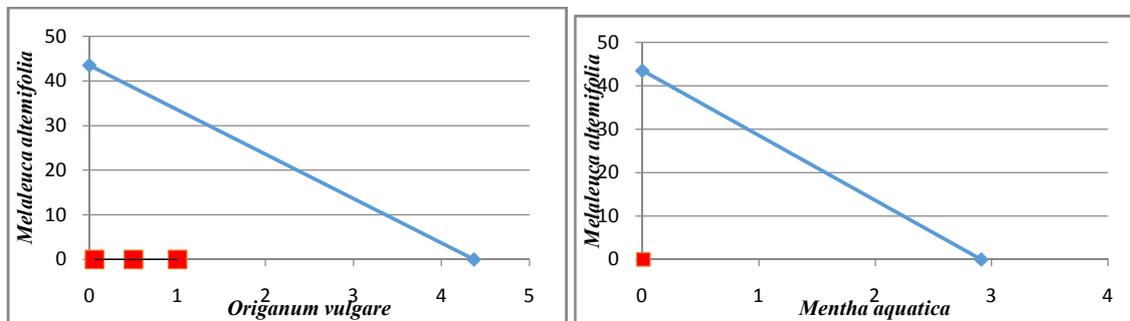
Les isobogrammes montrant l'effet de l'association des deux HE (*Origanum vulgare* et *Mentha aquatica*) avec des Composés majoritaires sur les souches bactériennes testées, sont présentés dans la figure n°11.



Effet synergique sur *Escherichia coli* Effet synergique sur *Escherichia coli*

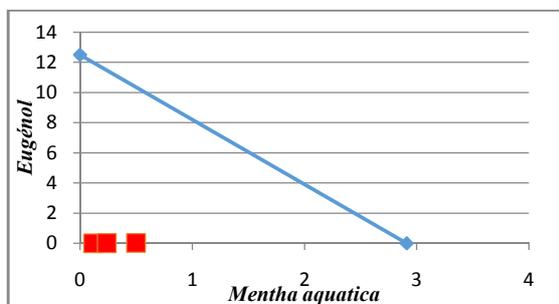


Effet synergique sur *Salmonella* Effet synergique sur *Salmonella*



Effet synergique sur *Staphylococcus aureus*

Effet synergique sur *Staphylococcus aureus*



Effet synergique sur *Staphylococcus aureus*

Figure 11 : Les isobogrammes indiquant les effets de l'association des HE / Composés majoritaires sur les bactéries testées.

D'après les résultats présentés dans le tableau N°XVI et ces Isobogrammes, l'association de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* avec l'HE de *Melaleuca alternifolia* a donné des effets synergiques sur *Staphylococcus aureus* avec un FIC_{index} de 0.061 qui est inférieure à 0.75 selon *Vaubourdolle, (2007)*.

L'association de l'huile essentielle de *Mentha aquatica* avec l' α -Pinène, *Melaleuca alternifolia* et l'Eugénol a donné des effets synergiques sur les trois souches (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella*), avec des FBC_{index} compris entre 0.091 et 0.27 qui sont inférieures à 0.75 selon *Vaubourdolle, (2007)*.

L'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, caractérisée par une haute teneur en thymol et en carvacrol, a montré une forte activité inhibitrice sur des bactéries GRAM positives et GRAM négatives (*Saeed et al., 2009*).

Selon certains travaux, l'effet du carvacrol et du thymol purifiés de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* L. sur la souche *Staphylococcus aureus* de référence ATCC 43300 a montré une forte inhibition de ces composés contre cette souche. D'après les résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles et de leur activité antibactérienne, on peut dire que les huiles essentielles les plus efficaces contre ce pathogène sont généralement les huiles riches en monoterpènes oxygénés de nature phénoliques comme le thymol, le carvacrol et des sesquiterpènes monocycliques tels que le β -bisabolène qui sont connus par leur pouvoir inhibiteur des microorganismes. Cette activité antibactérienne peut être aussi plus importante lorsqu'il y a une synergie entre les constituants d'une même HE (*Pattnaik et al., 1997 ; Nostro et al., 2004*).

- **Activité antibactérienne de l'association huiles essentielles / Antibiotiques**

Parmi les antibiotiques testés, on a ces trois antibiotiques : chloramphénicol, Céfotaxime et Amoxiciline, associés avec les deux HES : *Mentha aquatica* et *Origanum vulgare* qui ont donné un effet inhibiteur sur les souches bactériennes, deux à GRAM négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella*) et une autre GRAM positive (*Staphylococcus aureus*).

Le tableau N°XII représente les CMI_s des antibiotiques testés sur différentes souches bactériennes.

Tableau XVII : CMI_s des antibiotiques sur les souches bactériennes testées.

Bactéries	CMI mg/ml		
	Chloramphénicol	Céfotaxime	Amoxiciline
<i>Escherichia coli</i>	/	0.1	0.1
<i>Salmonella</i>	/	0.1	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.1	/	/

A partir de ces résultats on note que deux antibiotiques ont agit chacun sur une souche bactérienne, Chloramphénicol sur *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 0.1mg/ml et Amoxiciline sur *Escherichia coli* avec une CMI de 0.1 mg/ml, par contre Céfotaxime agit sur les deux bactéries : *Escherichia coli*, *Salmonella*, avec une valeur constante 0.1 mg/ml.

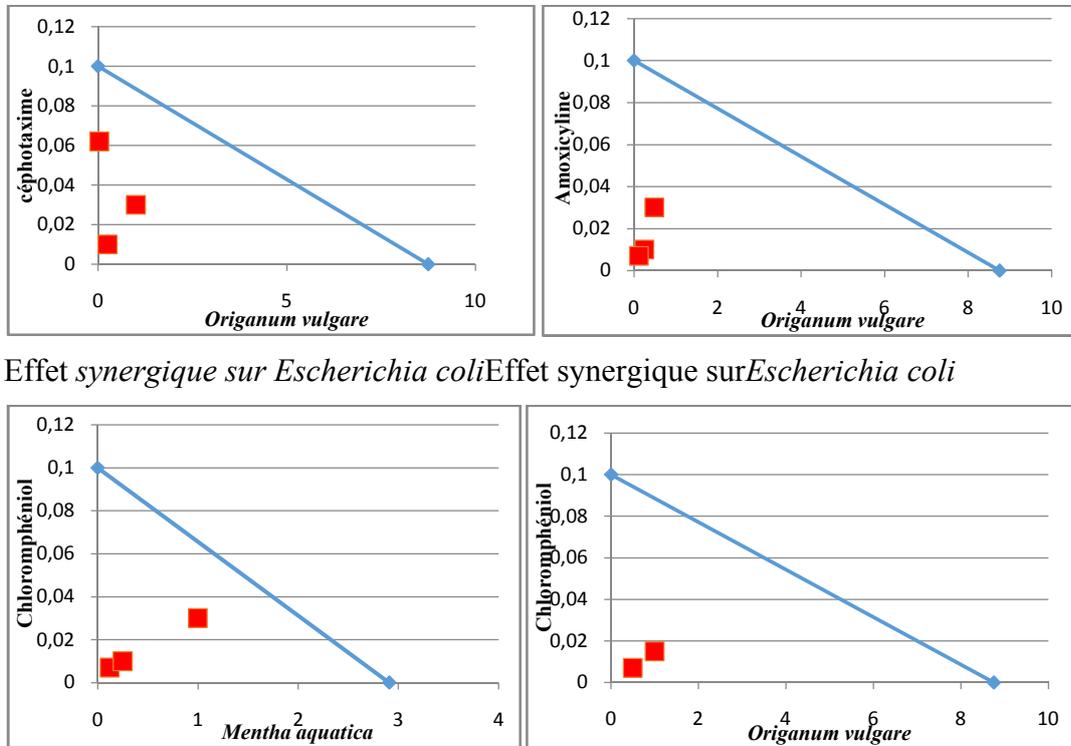
L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* a ainsi été testée sur des souches de *Staphylococcus aureus*, souche souvent retrouvées dans les cas de toxi-infections alimentaires et dont le problème majeur est la résistance à un très grand nombre d'antibiotiques voire à la quasi-totalité du panel, d'antibiotiques existant (Alexopoulos et al., 2011).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'association de l'HE de *Mentha aquatica* et l'*Origanum vulgare* avec des Antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées, sont présentés dans le Tableau N° XVIII.

Tableau XVIII: Effets des différentes associations, HE /Antibiotiques sur les souches bactériennes testées.

Association		Bactéries	FIC _{index}	Effet de L'association
Huile essentielle	Antibiotique			
<i>Mentha aquatica</i>	Chloramphénicol	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.12	Synergique
<i>Origanum vulgare</i>	Céfotaxime	<i>Escherichia coli</i>	0.068	Synergique
		<i>Salmonella</i>	0.5	Synergique
	Amoxiciline	<i>Escherichia coli</i>	0.12	Synergique

Les isobogrammes indiquant les effets de l'association des HE_s (*Origanum vulgare* et *Mentha aquatica*) avec des Antibiotiques sur les bactéries testées, sont présentées dans la figure n°12.



Effet synergique sur *Escherichia coli* Effet synergique sur *Escherichia coli*

Effet synergique sur *Staphylococcus aureus* Effet synergique sur *Salmonella*

Figure 12 : Les isobogrammes indiquant les effets de l'association des HE / Antibiotiques sur les bactéries testées.

Ces résultats montrent que l'association entre l'huile essentielle de *Mentha aquatica* et le Chloramphénicol a donné des effets synergiques selon **Vaubourdolle(2007)**, sur *Staphylococcus aureus* avec des FIC_{index} de 0.12, et l'association entre l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et les deux antibiotiques (Amoxiciline et Céfotaxime) ont donné des effets synergiques sur *Escherichia coli* avec des FIC_{index} de 0.12 et 0.068 respectivement, et sur *Salmonella* par son association avec Céfotaxime (FIC_{index} :0.5).

Concernant les associations manquantes, cela est dû à une contamination par *Pseudomonas putida*.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles extraites à partir de trois plantes aromatiques *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus*, seules ou associées à des composés majoritaires ou des antibiotiques, sur cinq souches à GRAM positif et à GRAM négatif.

Au terme de ce travail nous pouvons conclure que les trois plantes médicinales (*Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus*) ont un rendement acceptable en huile essentielle et peut être rentable à l'échelle industrielle, *Hyoscyamus albus* a un faible rendement ce qui indique que c'est une plante qui n'est pas riche en huiles essentielles. Les trois huiles ont montré une activité antibactérienne, on observe une meilleure activité de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de *Pseudomonas putida* et *Salmonella* avec une CMB de 0.27 mg/ml.

L'association des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* et de *Mentha aquatica* présente des effets synergiques sur trois bactéries : *Escherichia coli*, *Entérocooccus fécalis* et *Staphylococcus aureus*. Les FBCs_{index} calculées sont entre 0.18 et 0.51. Elles sont inférieures à 0.75 ce qui indique l'effet synergique. Alors que son association avec l'HE d'*Hyoscyamus albus* a donné un effet d'indifférence sur *salmonella*, avec une valeur de 1,5.

D'après les résultats obtenues, on note que le composé majoritaire Thymol a une bonne activité antibactérienne par rapport aux trois autres composés. Il est plus actif que les l'HEs d'*Origanum vulgare* et *Mentha aquatica*, avec des CMBs variant de 0,0062 et 0,025 mg/ml. Par contre l'Eugénol est le moins actif avec une valeur qui varie de 12,5 et 12,75 mg/ml.

L'association de l'huile essentielle de *Mentha aquatica* avec l' α -Pinène, l'HE de *Melaleuca alternifolia* et l'Eugénol a donné des effets synergiques sur les quatre souches, par contre les associations entre l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* avec les trois composés majoritaires (Thymol, l'HE de *Melaleuca alternifolia* et Eugénol) ont montré plusieurs effets différents.

Parmi les antibiotiques testés, on a deux, chacun agit sur une souche bactérienne, chloramphénicol sur *Escherichia coli* avec une CMB de 0.1mg/ml et Céfotaxime sur *Entérocooccus fécalis* avec une CMB de 0.5 mg/ml, ces résultats montrent que l'association entre l'huile essentielle *Mentha aquatica* et les deux antibiotiques ont donné des effets synergiques avec des FBC_{index} de 0.008 sur *Escherichia coli* et 0.26 pour *Entérocooccus fécalis*.

Concernant les CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), on a constaté que *Escherichia coli* et *Salmonella* sont plus résistantes vis-à-vis de HE d'*Origanum vulgare* avec une valeur de 8.75 mg/ml, par contre sont plus sensibles vis-à-vis de l'HE de *Mentha aquatica*. Alors que *Staphylococcus aureus* est plus sensible à l'HE d'*Origanum vulgare* avec une CMI de l'ordre de 4.27 mg/ml, et plus résistante vis-à-vis de l'HE de *Mentha aquatica* avec une valeur de 2.91 mg/ml, et on ce qui concerne les composés majoritaires, *Staphylococcus aureus* est plus résistante à l'HE de *Melaleuca alternifolia* et l' α -Pinène avec des CMI de l'ordre de 4.35 et 18mg/ml respectivement, par contre *Escherichia coli* est plus sensible à l'HE de *Melaleuca alternifolia* (CMI : 2.17mg/ml). *Salmonella* est plus sensible au composé majoritaire α -Pinène avec une valeur de CMI qui est de l'ordre de 1.12mg/ml.

Les deux antibiotiques ont agit chacun sur une souche bactérienne, Chloramphénicol sur *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 0.1mg/ml et Amoxiciline sur *Escherichia coli* avec une CMI de 0.1 mg/ml, par contre Céfotaxime il agit sur les deux bactéries : *Escherichia coli*, *Salmonella*, avec une valeur constante 0.1 mg/ml.

L'association des huiles essentielles (*Mentha aquatica* et *Origanum vulgare*) avec les composés majoritaires et avec les antibiotiques a révélé des effets synergiques vis-a-vis les souches bactériennes : *E. coli*, *S. aureus* et *Salmonella*.

En général, à l'essor de la présente étude, on conclut que les huiles essentielles des plantes médicinales étudiées sont doués d'activités biologiques dues a leur richesse en composés bioactifs, et leur association soit avec des antibiotiques ou des composés majoritaires a illustré l'activité antibactérienne, l'intitulé de notre étude, avec des effets synergiques. Il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur ces plantes pour mieux les valoriser, pour cela il serai intéressant :

- D'étudier d'autres combinaisons avec d'autres composés majoritaires ou minoritaires, et avec d'autres antibiotiques vis-a-vis d'autres souches bactériennes ;
- D'étudier d'autres activités biologiques(antifongiques, antiparasitaire,...) pour les associations à effets synergique ;
- Réaliser des études *in vivo* afin de démontrer et d'évaluer d'autres activités biologiques, des huiles essentielles ;
- Approfondir les recherches sur les propriétés pharmacologiques de *Hyoscyamus albus* L. ;
- Faire des tests *in vitro* et *in vivo* pour évaluer d'autres propriétés telles que les effets anti-tumoraux et anti-inflammatoires, vu son utilisation traditionnelle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Akbar E., Rustaiyan A., Masoudi S., Nadji K. 2006. « Composition of the Essential Oils of *Mentha aquatica L.* and *Nepetameyeri Benth.* From Iran », J. Essent. Oil Res., vol. 18.

Alexopoulos A., Kimbaris AC., Plessas S., Mantzourani I., Theodoridou I., Stavropoulou E., Polissiou MG., Bezirtzoglou E. 2011. Antibacterial activity of essential oils from eight Greek aromatic isolates of *Staphylococcus aureus* –Anaerobe 17 (2011) 399-402.

Alghazeer R., El-Saltani H., Nabeel S., Al-Najjar A et Hebail F. 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. Natural Science, 4 : 324-335 325.

Alphonse M.E. 1864. De la famille des solanacées. Paris : impr. De E. Martinet. Cote: P5292.

Andro A-R., Boz1 I., Zamfirache M-M., Burzo I. 2013. « Chemical composition of essential oils from *Mentha aquatica L.* at different moments of the ontogenetic cycle », Journal of Medicinal Plants Research, vol. 7, n°9.

Askun T., Tumen G., Satil F., Ates M. 2009. *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. Food Chem. 116: 289- 294.

Asma Farhat.2010. Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Thèse en Sciences des Procédés, Sciences des Aliments. L'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et L'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès Marseille. Pp. 18-32.

Azcan N., Kara M., Demirci B., Baser KH. 2004. Fatty acids of the seeds of *Origanum onites L.* and *O. vulgare L.* Lipids 39 (2004). Pp. 487 – 489.

B

Bahorun T. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-Forschung, 46(11): 1086-1089.

Références bibliographiques

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2007. Biological effects of essential oils- A review – Food and Chemical Toxicology 46. Pp. 446-475.

Barbosa P., Lima AS., Vieira P., Dias LS., Tinocco MT., Barroso JG., Pedro LG., Figueiredo AC., Mota M. 2010. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Journal of Nematology 42 (2010). Pp, 8-16.

Bardeau F. 2009. Les huiles essentielles: découvrir les bienfaits et les vertus. Ed. Lanore, Paris, 32-198-201 P.

Ben Arafa A., Combes S. & al. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, Lett. Appl. Microbiol. 43. pp. 149-154.

Benayache F. 2013. Étude phytochimique et biologique de l'espèce *thymus numidicus*. Université de Constantine. Pp 23-34.

Benayad N. 2008. Thèse sur : les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaine : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, Université Mohammed V-Agdal de Rabat. Pp. 13-30.

Benhouda A., Yahia M. 2014. Toxicity, analgesic and anti-pyretic activities of methanolic extract from *Hyoscyamus albus* leaves in albinos rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6(3) : 121-127.

Benomari F.Z. 2014. Caractérisation chimique et activités biologiques des volatiles de *Mentha aquatica* L. (DOMRANE) de l'ouest Algérien. Master en chimie. Université ABOU BEKR BELKAID-TLEMCCEN.

Bergogne-Bérézin E. et Brogard J. M. 1999. Bases biologiques de l'antibiothérapie. Ed. Masson, pp 27.

Buchbauer G., Jirovetz L., Jager W., Plank C., Dietrich H. 1993. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. J. Pharm. Sci., Vol.82, pp. 660-664.

Burt S. A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food-a review International. J. Food Microbiol. 94: pp 223-253.

Références bibliographiques

Carneiro de Barros J., da Conceicao M., Gomes Neto N., Veirai da Costaa., Siqueira J., Diniz I., Leite de Souza E. 2008. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Food Science and Technology* 42 (2009). Pp. 1139-1143.

Carrée P. 1953. Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome II. Ed. Ballière J. B. et fils.

Chou TH., Ding HY., Hung WJ., Liang CH. 2010. Antioxydative characteristics and inhibition of alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*. *Experimental Dermatology* 19 (2010). Pp. 742-750.

Clevenger J. F. 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 17: (4) 345-349.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Seventh edition: M7-A7, vol. 26 - n°2. Pennsylvania, U.S.A.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L. 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology* 91. pp. 492-497.

D

Delaquis P. J., Stanich K., Girard B., Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*

Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J., Bernardini A. F. 1997. Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse/ Spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis*, 25(6):13-16.

Dhifi W., Litaïem M., Jelali N., Hamdi N., Mnif W. 2011. "Identification Of A New Chemotype Of The Plant *Mentha Aquatica* Grown In Tunisia: Chemical Composition, Antioxidant And Biological Activities Of Its Essential Oil" *J. Essent. Oil Bear. Plants*, Vol. 14, No. 3. Pp. 320–328.

Références bibliographiques

Dob T., Berramdane T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C. 2007. Chemical composition of the essential oil of *Salvia officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*. 43 (4): 491-494.



Edward P.C., Varro E.T., Lynn R.B. 1987. Pharmacognosy, sixth edition. LEA etFebiger (ed), 184-187.

Eliopoulos G. M., Pillai S. K., & R. C., Moellering J. R. 2005.Antimicrobial combinations. *In:V. Lorian V.* (5th ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. The Williams & Wilkins Co. Philadelphia, USA. Pp.365-424.

Essawi T. et Srour M. 2000.« Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity ». *Journal of ethnopharmacology*. 70.pp 343-349.



Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminumcuminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*. 102: pp.898-904.

Ghalem B. et Mohamed B. 2008. Antibacterial activity of leaf of *Eucalyptus globules* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African journal of pharmacology*, 2. Pp. 211-215.

Ghrib A.1965. Etude de la Jusquiame Blanche d'Algérie. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat d'Etat en Pharmacie. Université' Alger.

Giordani, R., Regli P. & al. 2004. Antimicrobial effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother. Res*. 18.pp. 990-995.

Goullé J-P., Pépin G., Dumestre Toulet V, et Lacroix C. 2004. Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore, *Annales de Toxicologie Analytique*. XVI : (1).

Goust Jérôme. 1999. *Basilic, marjolaine et origan*. Actes Sud.

Gregoire P.2009. Entre alimentation, hygiène et médecine : le vocabulaire de l'administration des simples dans le livre IX des Recherches sur les plantes de Théophraste. 121p.

Références bibliographiques

Guignard J.L. 1998. Abrégé de botanique. Masson Ed. Paris.

H

Hammiche V., Merad R & Azzouz M. 2013. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. ISBN : 978-2-8178-0374-6 Springer- Verlag Paris.

Hibi N., Fujita T., HATANO M., Hashimoto T., Yamada Y. 1992. Putrescine N-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus* : n-Butylamine as a potent inhibitor of the transferase both *in vitro* and *in vivo* . Plant physiol., 100 :826-835.

Hilan C., Sfeir R., Jawish D., Aitour S. 2006. Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des *Lamiaceae*. Lebanese Science Journal. 7(2): 13-22.

J

Jahandiez E & Marie R. 1934. Catalogues des plantes du Maroc, spermatophytes et ptérydophytes. Tom III ; P., Lechevalier, librairie 12, rue de Tournon Vie, Alger-Paris.

Joffin J. N., Leyral G. 1996. Microbiologie technique: dictionnaire des techniques. Centre régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, pp 131.

Jouzier E. 2005. Solanacées médicinales et philatélie. Plantes science. 144 : 311-332.

K

Kaloustian J., El-Moselhy T. F., Portugal H. 2003. Chemical and thermal analysis of the biopolymers in Thyme (*Thymus vulgaris*). Therm. Ochimica. Acta. 401 : 7786.

Kheyar N., Meridja D., Belhamel K. 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inulaviscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurusnobilis* de la région de Bejaia. Algerian Journal of natural products. 2 : (1) pp 18-26.

Kintzios Spiridon E. 2002. *Origano*: The genera *Origanum* and *Lippia* (Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles) – Taylor & Francis.

Knobloch K. A., Pauli B., Iberl H., Weigand N., weis. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J. of Ess. Oil Res. 1 : pp 119-123.

Kon KV. et Rai MK. 2012. Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. Expert Rev Anti Infect Ther. 10(7): 775-90. doi: 10.1586/eri.12.57.

Références bibliographiques

L

Lahlou M. 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18 : 435-448.

Leite de Souza E., de Barros J.C., de Oliveira C.E., da Conceicao M. 2009. Influence of *Origanum vulgare L.* essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 137 (2010). Pp. 308-311.

Liang C-H. 2011. Ov-16 [4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl-O- β -D-glucopyranosidal inhibits melanin synthesis by regulating expressions of melanogenesis-regulated gene and protein. *Experimental dermatology* 20 (2011). Pp. 743-748.

Liang CH., Chan LP., Ding HY., So EC., Lin RJ., Wang HM., Chen YG., Chou TH. 2012. Free radical scavening activity of 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl-O- β -d-glucopyrano-side from *Origanum vulgare* and its protection against oxidative damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012). Pp. 7690-7696.

Liang C-H., Chou T-H., Ding H-Y. 2009. Inhibition of melanogenesis by a novel origanoside from *Origanum vulgare*. *Journal of Dermatological Science* 57 (2010). Pp. 170-177.

Liu H., Zheng A., Liu H., Yu H., Wu X., Xiao C., Dai H., Hao F., Zhang L., Wang Y., Tang H. 2012. Identification of three novel polyphenolic compounds, origanine A-C, with unique skeleton from *Origanum vulgare L.* using the hyphenated LC-DAD-SPE-NMR /MS methods- *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012). Pp. 129-135.

M

Maache A. et, Jemali A. 1986. Thèse sur : les caractéristiques physico-chimiques des HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc: Menthe NaaNaa Abdi, Coriandre. IAV Hassan II, Rabat, Maroc. Pp. 55-65.

Mahmood U., Yogendra S., Raghunath S., Thakur R. 2001. 2, 3-dimethyl nonacosane and tropane alkaloids from *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry*, 24 (7):1618- 1619.

Mebarki. N. 2010. Extraction des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et application à la forme médicamenteuse antimicrobienne. Thèse de Magistère en chimie. Université M-Hamed Bougara, Boumerdes.

Références bibliographiques

Mimica-Dukić N., Bozin B., Soković M., Mihajlović B., Matavulj M. 2003. « Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils », *Planta Medica*, vol. 69, n° 5. Pp. 413–419.

Montes M., Valenzuela L., Wilkomirsky T., Niedmann C. 1986. Détermination de la pulégone dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. originaire de Chili. *Ann. Pharmaceutiques françaises*, 44: 133 - 136.

Morales R. 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme: the genus Thymus*. Ed Taylor & Francis, London. pp.1-43.

Moreau F. 1964. Alcaloïdes of plantes alcaloïfères. Editions Masson. Paris. 250 p.

Mouhammedi Z. 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Magistère Univrité Abou Bakar Bel Kaid Tlemcen, 150 p.

Mrabet N., Lahlou H., Benjilali B. 1999. Effect of maroccan *Cistus ladaniferus* L. (rockrose) extracts on the growth of four fungi- *J. Cryptogamie mycology*. Maroc. VOL.20. (1). PP 23-33.

N

Naghibi F., Mosaddegh M., Motamed S.M., Ghorbani A. 2005. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 4(2):63-79.

Newman DJ & Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70: 461-477.

Nostro A., Blanco A.R., Cannatelli M.A., Enea V., Flamini G., Morelli I., Sudano Roccaro A., Alonzo V. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters* 230. pp. 191-195.

Ntalli NG., Ferrari F., Giannakou I., Menkissoglu-Spiroudi U. 2010. Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek *Lamiaceae* plants and 13 terpene components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010). Pp. 7856-7863.

Références bibliographiques

O

Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid U., Yaniz Z., Spiegel Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 90 (2000). Pp. 710-715.

P

Paris RR & Moyse H. 1981. Précis de matière médicale. Masson, Paris.

Pattnaik S., Subramanyam V.R., Bapaji M., Kole C.R. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.* 89. pp: 39-46.

Pauli A. 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International journal of Aromatherapy*, 11. pp.126-133.

Poole K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *clin. Microbiol. Infect.* 10 :12-26.

Prieto M., Iacopini P., Cioni., Chericoni S. 2007. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite –induced oxidative processes. *Food chemistry* 104 (2007) 889-895.

Q

Quezel P & Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales. Tom II. Editions Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 600p.

R

Rameau J.C., Mansion D., Dumé G. 1989. Flore forestière française, guide écologique illustré, 1 plaines et collines, Institut pour le développement forestier. 1786 p.

Rasooli I. et Owlia P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66: pp.2851-2856.

Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M. 1993. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research.* 5: 179-184.

Références bibliographiques

Roques A.1965. Etude de la jusquiame blanche d'Algérie : *Hyoscyamus albus L.* Thèse de Doctorat en pharmacie. Université d'Alger. 120 p.

Rosato A., Vitali C., de Laurentis N., Armenise D. Nulillo M.A. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine*, 14. Pp. 727-732.

S

Saeed S., Tariq P. Antibacterial activity of Oregano (*Origanum vulgare Linn.*) against Gram positive bacteria. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 22(2009) 241-424.

Sahin F., Gulluce M., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., Agar G., Ozer H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 15 : 549-557.

Santoro GF., das Gracas Cardoso M., Guimaraes LG., Salgado AP., Menna-Barreto RF., Soares MJ. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare L.*) and thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oils on Trypanosomacruzi (Protozoa :Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research* 100 (2007). Pp, 783-790.

Schultes R.E. & Hofmann A. 1993. Les plantes des dieux. Les plantes hallucinogènes, botanique et ethnologie. Ed. du Lézard. Paris.

Senatore F., D'Alessio A., Formisano C., Özcan M. 2005. "Chemical Composition And Antibacterial Activity Of The Essential Oil Of A 1,8-Cineole Chemotype Of *Mentha Aquatica L.* Growing Wild In Turkey" *J. Essent. Oil Bear. Plants*, Vol. 8, No. 2. Pp. 148–153.

Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H. 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J. Food Microbiology*. 117 : 112-119.

Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. *J Agric. Food Chem.*, 43: 2384 - 2388.

Sylvain S. 2010. Étude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Thèse de doctorat, université de Corse Pascal Paoli.

T

Références bibliographiques

Teixeira Duarte M. C., MaraFigueira G., Sartoratto A., Rehder V. L. G., Delarmelina C. 2005. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *J of Ethnopharmacology*, 97: 305-311.

Teuscher E., Anton R., Lobstein A. 2005. Origan. In « Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ». Ed Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp. 361-364.

V

Vale-Silva L., Silva MJ, Oliveira D., Goncalves MJ., Cavaleiro C., Salgueiro L., Pinto E. 2011. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare subsp. Virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology* 61 (2012). Pp. 252-260.

Vaubourdolle M. 2007. Infectiologie. 3^{ème} édition. Wolters Kluwer SA. France. 1037 pages.

Venkateswara Rao G., Mukhopadhyay T., Annamalai T., Radhakrishnan N., Sahoo MR. 2011. Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare Linn.* *Pharmacognosy Research* 3 (2011). Pp. 143 - 145.

Veres K., Varga K., Dabos A., Hajdu L., Mathé E., Szabo K. 2003. Investigation of the composition and stability of the essential oils of *Origanum vulgare ssp, vulgare L.* and *O.vulgare ssp. hirtim.* 57 :95-98.

W

Wang W., Li N., Luo M., Zu Y., Efferth T. 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil Compared to that of its main component. *Molecules*. 17 :pp 2704-271.

Z

Zhiri A., Baudoux D., Breda ML. 2005. Huile essentielles chémotypées et leurs synergies. Ed. Inspir développement. 46p.

Références numériques

www.biolib.de.

ANNEXES

Annexes

Annexe I : Préparation du standard de McFarland

Ajouter 0,5 ml d'une solution de BaCl₂ (chlorure de baryum) d'une molarité de 0,048 mol/l (BaCl₂ à 1,175% masse/volume : BaCl₂/H₂O) à 99,5 ml d'une solution de H₂SO₄ (acide sulfurique) d'une molarité de 0,18 mol/l en agitant continuellement, puis vérifier si l'absorbance de ce standard à 625 nm est comprise entre 0,08 et 0,13 (CLSI, 2006).

Annexe II : Constitution des milieux de cultures utilisés (1 L d'eau)

II-1 Eau physiologique

- Na Cl :9g/l

II-2 Bouillon Mueller-Hinton (BMH)

- Infusion de viande bovine :2g/l
- Peptone de caseine :17,5 g/l
- Amidon :1,5 g/l

pH 7,0

II-3 Bouillon nutritif (BN)

- Peptone tryptique:15 g/l
- Extrait de viande :3 g/l
- Chlorure de sodium :6 g/l

pH 7,2

II-4 Gélose nutritive (GN)

- Extrait de viande :3 g/l
- Peptone de viande :10 g/l
- Extrait de levure :3 g/l
- Agar :18 g/l

pH 7,3

II-5 Agar à 0,2%

- Agar :2g/l

(Stérilisation à 120°C / 15-20 minutes)

RÉSUMÉ

Résumé :

L'activité antibactérienne de trois huiles essentielles extraites à partir de trois plantes aromatiques, *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus*, seules ou associées à des composés majoritaires ou des antibiotiques, a été évaluée *in vitro* par la méthode de l'échiquier en milieu BMH sur cinq souches bactériennes à GRAM positif et à GRAM négatif. L'extraction des huiles essentielles est réalisée par l'hydrodistillation et a donné des rendements de 1,01% pour *Mentha aquatica*, 1,35% pour *Origanum vulgare* et de 0,10% pour *Hyoscyamus albus*. Les trois huiles ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes testées, avec des CMBs variant entre 11,66 et 46,65mg/ml pour l'HE de *Mentha aquatica*, entre 0,27 et 4,37mg/ml pour l'HE d'Origan et une valeur constante pour l'HE d'*Hyoscyamus albus* qui est de 0,046mg/ml. L'association des huiles entre elles ou avec des composés majoritaires a donné divers effets dont la majorité sont des synergies, par contre leur association avec les deux antibiotiques Chloramphénicol et Céfotaxime n'a donné que des effets synergiques, et avec des CMI's variant entre 1,45 et 2,91mg/ml pour l'HE de *Mentha aquatica* et entre 4,27 et 8,75mg/ml pour l'HE d'Origan, toutes les associations réalisées ont donné des effets synergiques sur trois bactéries, *E. coli*, *S. aureus* et *Salmonella*. La combinaison des agents antimicrobiens et la recherche des effets synergiques, semble être une bonne approche pour traiter les maladies infectieuses et résoudre le problème de la résistance aux antibiotiques.

Mots clés : *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare*, *Hyoscyamus albus*, huiles essentielles, association, composés majoritaires, antibiotiques, méthode de l'échiquier, activité antibactérienne.

Abstract:

The antibacterial activity of three essential oils extracted from three aromatic plants, *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* and *Hyoscyamus albus*, solely or associated with major compounds or antibiotics was evaluated *in vitro* by the checker-board method in the BMH medium against five bacterial strains GRAM positive and GRAM negative. The extraction of essential oils is carried out by hydrodistillation and gave yields of 1,01% for *Mentha aquatica*, 1,35% for *Origanum vulgare* and of 0,10% for *Hyoscyamus albus*. Three oils showed antibacterial activity against the bacterial strains tested, with CMBs ranging between 11,66 and 46,65mg/ml for the EO of *Mentha aquatica*, between 0,27 and 4,37mg/ml for the EO of *Origanum vulgare* and a constant value for the EO of *Hyoscyamus albus* which is of 0,046mg/ml. The association between the oils or oils and major compounds gave various effects mainly synergic, on the other hand their association with the two antibiotics Chloramphenicol and Cefotaxime gave only synergistic effects, with CMI's ranging between 1,45 and 2,91mg/ml for the EO of *Mentha aquatica* and between 4,27 and 8,75mg/ml for the EO of *Origanum vulgare*. All associations carried out gave synergistic effects against three bacteria, *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella*. The combination of the antimicrobial agents and the research of synergistic effects, seem to be a good approach to treat the infectious illness and to solve the problem of antibiotic resistance.

Key words: *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare*, *Hyoscyamus albus*, essential oils, association, major compounds, antibiotic, method of the checker-board, antibacterial activity.