

Mémoire de Fin de Cycle

Filière: Sciences Biologiques

Option: Pharmacologie moléculaire

Thème

Evaluation de l'activité antibactérienne de combinaisons d'huiles essentielles et d'antibiotiques

- **Présenté par :**

M^{elle} SAIDI Meriama

M^{elle} TOBJI N'fissa

- **Composition du jury:**

M^{me} F. BEDJOU

Professeur, UAMB

Presidente

M^{me} N. OUKIL

MCB, UAMB

Encadreur

M^r R. LADJOUZI

MCB, UAMB

Examineur

Année universitaire: **2015 / 2016**

Dédicaces

*A la mémoire de ma grand-mère, tu m'as quittée pour un monde meilleur laissant
un vide immense. Que ton âme repose en paix.*

A toutes les personnes que je porte dans mon cœur.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit récolté après tant d'années d'efforts :

*A mon cher **papa**: pour ses précieux conseils et encouragements. Aucune dédicace ne saura exprimée l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi.*

*A ma très chère **Maman** et meilleure amie, qui a œuvré pour ma réussite, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.*

*A mes chères sœurs, **Mariam** et **Sara**, pour leurs encouragements et leur aide ma vie n'aurait pas eu de gout sans elles, mes oncles, tantes, cousins et cousines en particulier ma princesse Sara.*

*A mes adorables beaux-frères **Massi** et **Samir**.*

*A la prunelle de mes yeux **Mariah** et A mon ange **Adam**.*

A la mémoire de mes grands-mères (akila, amina, meriama) et mon grand-père m'hamed.

A mes grands-parents Ahmed et Latifa Je vous remercie pour tout le soutien exemplaire que vous me portez. J'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.

A mon deuxième papa (damane) et son adorable femme Saida, qui a toujours été là Depuis mon enfance aucune reconnaissance pourra décrire l'amour et l'estime que j'ai pour toi

A mes chères amis (es): Aida, Biba, Celia, Lilya, Lynda, Myma qui n'ont cessé de m'encourager, à Idir, Hichem et A Hocine pour son aide et encouragements

A Houda pour le travail que nous avons fourni

A mes camarades de sciences alimentaires avec lesquels j'ai passé un agréable stage.

Meriama

Dédicaces

*A la mémoire de ma grand-mère, tu m'as quittée pour un monde meilleur laissant
un vide immense. Que ton âme repose en paix.*

A toutes les personnes que je porte dans mon cœur.

Liste des abréviations

AINS : Anti Inflammatoire Non Stéroïdien

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine Triphosphate

BMH : Bouillon Mueller Hinton

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CG/SM : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

DO : Densité Optique

FIC : Concentration Inhibitrice Fractionnaire

FICI : FIC Index

HE: Huile Essentielle

Na₂SO₄ : Sulfate de sodium anhydre

PCA : Plate Count Agar

PLP : Protéine Liant la Pénicilline

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1	Aspect morphologique de <i>Laurus nobilis</i>	Page 4
Figure 2	Photographie de <i>Lavandula stoechas</i>	Page 7
Figure 3	<i>Hyoscyamus albus</i>	Page 10
Figure 4	Montage utilisé pour l'hydrodistillation.	Page 18
Figure 5	Série de dilutions.	Page 21
Figure 6	Une microplaque de 96 puits.	Page 22
Figure 7	Un isobogramme schématique.	Page 25
Figure 8	Les huiles essentielles extraites.	Page 26

Liste des tableaux

Tableau I	Classification botanique de <i>Laurus nobilis</i>	Page 4
Tableau II	Classification botanique <i>Lavandula stoechas</i>	Page 8
Tableau III	Classification botanique d' <i>Hyoscyamus albus</i>	Page 11
Tableau IV	Conditions de récolte	Page 14
Tableau V	Le matériel végétal	Page 15
Tableau VI	Les souches bactériennes utilisées	Page 16
Tableau VII	Les antibiotiques utilisés	Page 17
Tableau VIII	les autres composés chimiques utilisés	Page 17
Tableau IX	Rendements et couleurs des HEs	Page 26
Tableau X	CMI et CMB de <i>Laurus nobilis</i>	Page 27
Tableau XI	CMI et CMB de <i>Lavandula stoechas</i> .	Page 28
Tableau XII	CMI et CMB d' <i>Hyocyanus albus</i> .	Page 29
Tableau XIII	Résultats des associations réalisées sur <i>Staphylococcus aureus</i>	Page 33
Tableau XIV	Résultats des associations réalisées sur <i>Escherichia coli</i>	Page 34
Tableau XV	Résultats des associations réalisées sur <i>Salmonella</i>	Page 36
Tableau XVI	Résultats des associations réalisées sur <i>Enterococcus faecalis</i>	Page 37
Tableau XVII	Résultats des associations réalisées sur <i>Pseudomonas putida</i>	Page 38

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
CHAPITRE I : Revue bibliographique	
I.1 MONOGRAPHIE DES PLANTES ETUDIEES.....	3
I.1 <i>Laurus nobilis</i>	3
I.1.1 Description botanique et classification de <i>Laurus nobilis</i>	3
I.1.2 Répartition géographique.....	5
I.1.3 Composition phytochimique.....	5
I.2 <i>Lavandula stoechas</i>	7
I.2.1 Description botanique et classification de <i>Lavandula stoechas</i> ...	7
I.2.2 Répartition géographique.....	8
I.2.3 Composition phytochimique.....	9
I.3 <i>Hyoscyamus albus</i>	10
I.3.1 Description botanique et classification d' <i>Hyoscyamus albus</i>	10
I.3.2 Répartition géographique.....	11
I.3.3 Composition phytochimique.....	11
I.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	13
CHAPITRE II : Matériel et méthodes	
II.1 Matériel.....	14
II.1.1 Matériel végétal.....	14
II.1.2 Souches bactériennes.....	15
II.1.3 Antibiotiques et autres composés chimiques.....	17
II.1.4 Les milieux de culture.....	17
II.2 Méthodes.....	18
II.2.1 Extraction des huiles essentielles.....	20
II.2.2 Activité antibactérienne des huiles essentielles seules et en association.....	24
II.2.3 Interprétation des résultats.....	26
CHAPITRE III : Résultats et discussion	
III.1 Rendement en huile essentielle.....	26
III.2 Les paramètres de croissance des huiles essentielles.....	27
III.3 Résultats des associations réalisées.....	33
III.4 Les isobogrammes.....	40
Conclusion et perspectives	45
Références bibliographiques.....	46

Introduction

Depuis l'antiquité, Les plantes médicinales ont été utilisées en phytothérapie comme remède contre plusieurs maladies, vue leur richesse en centaines, voire en milliers de composants ayant des vertus thérapeutiques (**Franchomme et al., 2001**). Parmi les 800 000 espèces de plantes prospérant sur la planète, un nombre relativement important est capable de synthétiser des composants aromatiques que l'on appelle les huiles essentielles (HE) (**Roux, 2008**).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés volatiles issus du métabolisme secondaire des plantes. Elles sont dotées de plusieurs activités biologiques à savoir antivirale, anti-inflammatoire, antioxydante et anti bactérienne (**Oussou et al., 2010**). A l'heure actuelle, plusieurs travaux ont envisagé l'utilisation de ces composés bioactifs comme alternatives aux multiples substances synthétiques. En effet, la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques considérés comme la solution quasi universelle aux infections, est à l'origine de l'engouement suscité pour les plantes aromatiques qui sont capables d'offrir des soins plus efficaces et moins agressifs pour l'organisme (**Dorman et al., 2000**).

Les plantes aromatiques sources de ces substances bioactives sont largement répandues dans la nature. L'Algérie abrite un ensemble d'espèces importantes et variées et témoigne de ce fait d'une richesse floristique incontestable.

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques, nous nous sommes intéressées à trois plantes d'usage assez répandu en médecine traditionnelle algérienne et poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Bejaia, à savoir: *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas* et *Hyoscyamus albus*. Nous nous sommes focalisées sur l'un de leurs métabolites secondaires : les huiles essentielles.

Ce travail a pour objet l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles prises isolément sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et de réaliser différentes combinaisons entre ces huiles et d'autres composés : antibiotiques et composants d'huiles essentielles à la recherche d'un effet potentiel; synergique ou additif en utilisant la technique de l'échiquier.

En vue de rendre compte de la démarche adoptée, ce manuscrit comporte trois parties :

- La première partie contiendra, une revue bibliographique sur les plantes étudiées, la description et répartition géographique ainsi que l'activité antibactérienne des huiles essentielles.
- La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes utilisés dans la réalisation de ce travail, notamment, l'évaluation de l'effet d'association des huiles essentielles.
- Les résultats obtenus suivi de la discussion puis la conclusion et les perspectives feront l'objet de la troisième partie.

Chapitre I

Revue bibliographique

I. MONOGRAHIE DES PLANTES ETUDIEES**I.1 *Laurus nobilis*****I.1.1 Description botanique et classification de *Laurus nobilis***

Laurus nobilis parfois appelé laurier d'Apollon ou laurier noble, est une plante aromatique appartenant à la famille des *Lauraceae* qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces (Barla et al., 2007).

Etymologiquement, le nom latin *Laurus* qui signifie « toujours vert » fait allusion au feuillage persistant de la plante et *nobilis* veut dire « fameux » (Pariente, 2001).

Le laurier noble est un arbuste mesurant de 2 à 6 m et peut atteindre 15 m de haut.

- **Tige** droite et grise dans sa partie basse, verte en haut.
- **Le feuillage** est persistant avec des feuilles alternées, coriaces et dont le pétiole mesure de 2 à 5cm, longues de 5 à 12cm et large de 2 à 6cm.
- **Les fleurs** sont dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés), de 0,4 à 0,8 cm avec une couleur jaune verdâtre, à périanthe simple soudé à la base. Groupées en 4 à 6 ombelles. Les fleurs mâles possèdent 8 à 12 étamines rudimentaires, tandis que les fleurs femelles sont dotées d'un ovaire hypogyne à un compartiment avec un stigmate. Elles apparaissent en mois de mars-avril de l'année (Reynaud, 2002).
- **Le fruit** est une baie ovoïde, soutenue par le tube périanthaire peu dilaté de 2cm de longueur à 1cm de largeur, il est noir vernissé et renferme une seule graine libre (Beloued, 2005) (Figure 1).

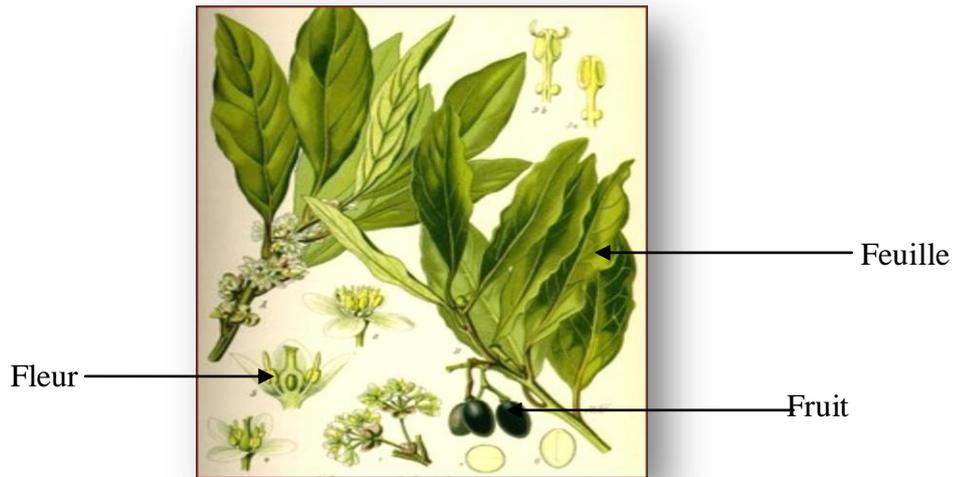


Figure 1 : Aspect morphologique de *Laurus nobilis* (Beloued, 2005).

➤ **Classification botanique de *Laurus nobilis* (Tableau I).**

Tableau I : Classification botanique de *Laurus nobilis* d’après (Quezel et santa, 1962).

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Laurales
Famille	<i>Lauraceae</i>
Genre	<i>Laurus</i>
Espèce	<i>Laurus nobilis</i>

I.1.2 Répartition géographique

Le laurier noble est présent dans la région méditerranéenne d'où il est originaire. Cette plante est retrouvée en particulier dans la Turquie, la Grèce, l'Espagne, l'Italie et la France. Actuellement, elle est largement cultivée pour la production commerciale dans beaucoup de pays arabes tels que la Lybie et le Maroc. En Algérie, elle pousse dans les forêts, ravins, les lieux humides et ombragés.

Elle pousse spontanément dans le sud et l'ouest de l'Europe, et aux Etats-Unis comme plante ornementale (Demir et al., 2004, Barla et al., 2007).

I.1.3 Composition phytochimique

Laurus nobilis comporte plusieurs métabolites secondaires, on distingue :

➤ L'huile essentielle

Laurus nobilis renferme une HE qui possède une action analgésique aussi puissante que la morphine, et une action anti-inflammatoire comparable au Piroxicam qui est un anti inflammatoire non stéroïdien (AINS) d'après une étude réalisée *In vivo* sur des souris en 2003. L'HE de *Laurus nobilis* s'est également révélée active contre la plupart des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cette activité pourrait être due à la présence de certains composés qui sont le 1,8-cinéole, le linalol, l'eugénol, l'alpha et le beta pinène (Erkmen et al., 2008).

➤ Les alcaloïdes aporphiniques

Laurus nobilis renferme quelques alcaloïdes aporphiniques, tels que la cryptodrine, et l'actinodaphnine qui sont responsables d'une activité cytotoxique (Kivçak et Mert, 2002).

➤ Les lactones sesquiterpéniques

Des études ont été réalisées sur l'isolement et l'identification des composés des feuilles et des fruits de *Laurus nobilis*, les chercheurs ont pu isoler six sesquiterpènes lactone connue et un nouveau sesquiterpène ; le lauroxepine. Ces substances actives se sont avérées fortement cytotoxiques contre la lignée cellulaire ovarienne cancéreuse A2780 (Barla et al., 2007).

➤ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes isolés à partir de *Laurus nobilis* sont polaires (dérivées glycosylées de quercétine, kaempferol et de catéchine), et peuvent également être apolaires (quatre dérivés acylés de kaempferol) (**Kivçak et Mert, 2002**).

➤ **Les tocophérols**

Demo et ses collaborateurs ont démontré la présence des tocophérols (vitamine E), principalement le γ - tocophérol, dans les feuilles de *Laurus nobilis* obtenue dans la fraction apolaire par extraction hexane. Dans cette étude il a été rapporté que le contenu tocophérol est étroitement corrélé avec l'activité antioxydante des feuilles de *Laurus nobilis*. (**Demo et al., 1998**)

➤ **Acides phénylacrylique et phénolcarbonique**

Ces acides peuvent être libres ou estérifiés, on trouve également d'autres acides comme le p-coumarique, férulique, sinapique, gentisique et vanillique (**Kivçak et Mert, 2002**).

I.2 *Lavandula stoechas***I.2.1 Description botanique et classification de *Lavandula stoechas***

Lavandula stoechas parfois appelée lavande à toupet ou encore lavande papillon, est une plante aromatique originaire du bassin méditerranéen appartenant à la famille des labiées ou des *lamiaceae* qui renferme environ 32 espèces (Upson et al., 2000).

Etymologiquement, le nom lavande dérive du latin «lavare» signifie laver, purifier (Chu et Kemper., 2001),

Lavandula stoechas est un sous arbrisseau tendre qui préfère les endroits ensoleillés.

- **Tige** : étroite quadrangulaire jusqu'à un mètre de long.
- **Feuilles** : persistantes très aromatiques, étroites, gris-vert de 2 à 4cm de long. étroites lancéolées et recourbées sur les bords.
- **Fleurs** : très parfumées en épis trapus surmontés d'un toupet de bractées violettes.
- **Fruits** : Sans intérêt économique ils permettent la production des graines. (Figure 2).

Elle préfère les sols siliceux et les terrains acides. Elle supporte la mi-ombre et tolère le froid jusqu'à -5°C (Chu et Kemper, 2001).

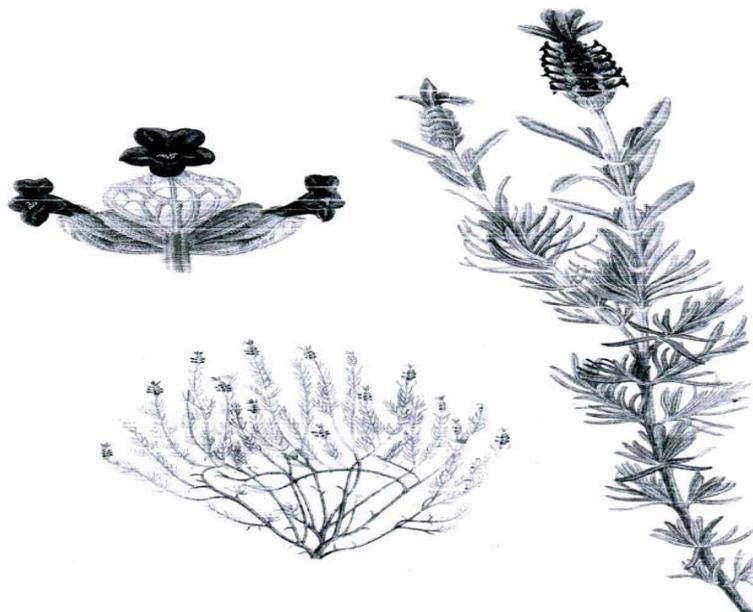


Figure 2: Photographie de *Lavandula stoechas* (Upson et Andrews, 2004).

➤ Classification botanique (tableau II)

Tableau II : classification de *Lavandula stoechas* (Quezel et Santa, 1963).

Règne	Plantes
Sous Règne	plantes vasculaires
Embranchement	spermaphytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Lamiales
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	Lavandula
Espèce	<i>Lavandula stoechas</i>

I.2.2 Répartition géographique :

Lavandula stoechas se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, c'est l'espèce la plus vaste des lavandes. Elle est répandue dans tout le bassin méditerranéen (Europe méridionale, l'Afrique du Nord et le Moyen Orient) avec une petite disjonction sur la frontière Lybie-Egypte. Actuellement, elle est introduite et est cultivée en Bretagne, Nouvelle Zélande et en Australie (Upson et Andrew, 2004).

En Algérie, *Lavandula stoechas* est largement distribuée à travers toute la périphérie nord du pays (Mahmoudi, 1982).

I.2.3 Composition Phytochimique**➤ Les huiles essentielles**

Les HEs de *Lavandula stoechas* sont les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (**Benayache, 2013**). La composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* en Algérie analysée au stade de pleine floraison contient : Le cinéole, l' α pinène, le p cymene, le fenchone, le camphre, et le lavandulyl acétate (**Dob et al., 2006**).

Les huiles essentielles de *Lavandula stoechas* sont des antifongiques naturels très efficaces et peuvent être une source très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer les infections d'origine fongique. Ce mérite revient à la composition chimique de l'HE et peut être aux composés majoritaires, essentiellement le cinéole et le camphre (**Dob et al., 2006**).

Lavandula stoechas renferme également d'autres métabolites secondaires:

➤ Les Flavonoïdes

Les principaux flavonoïdes retrouvés dans *Lavandula stoechas* sont :

Apigénine 7-glucoside, lutéoline, vitéxine, lutéoline 7-glucoside, lutéoline 7-glucuronique (**Upson et al., 2000**).

I.3 *Hyoscyamus albus*

I.3.1 Description botanique et classification d'*Hyoscyamus albus*

Hyoscyamus albus, appelée également la jusquiame blanche, est une plante hermaphrodite, appartenant à la famille des *Solanaceae* qui compte environ 90 genres et de 3000 à 4000 espèces réparties par tout dans le monde (Mahfouze et Ottai, 2011).

La jusquiame blanche doit son nom à la blancheur de ses fleurs. C'est une variété annuelle ou bisannuelle, mesurant de 30 à 90 cm de hauteur, à port dressé, à odeur vireuse faible et à poils collants.

- **Ses feuilles** sont longues de 5 à 10 cm, ont un pétiole mince de 2 à 6 cm de long avec un bord denté, elles sont larges, ovales, collantes et de couleur vert clair.
- Au printemps, la floraison, donne **des fleurs** de 1 à 3 cm de long, bilabiées, irrégulièrement lobées, de couleur vert pâle.
- **Les poils** sont simples et glandulaires et ont chacun une tête unicellulaire (Reynaud, 2002).
- **Fruits** : capsule peu renflée à la base. (Figure 3).

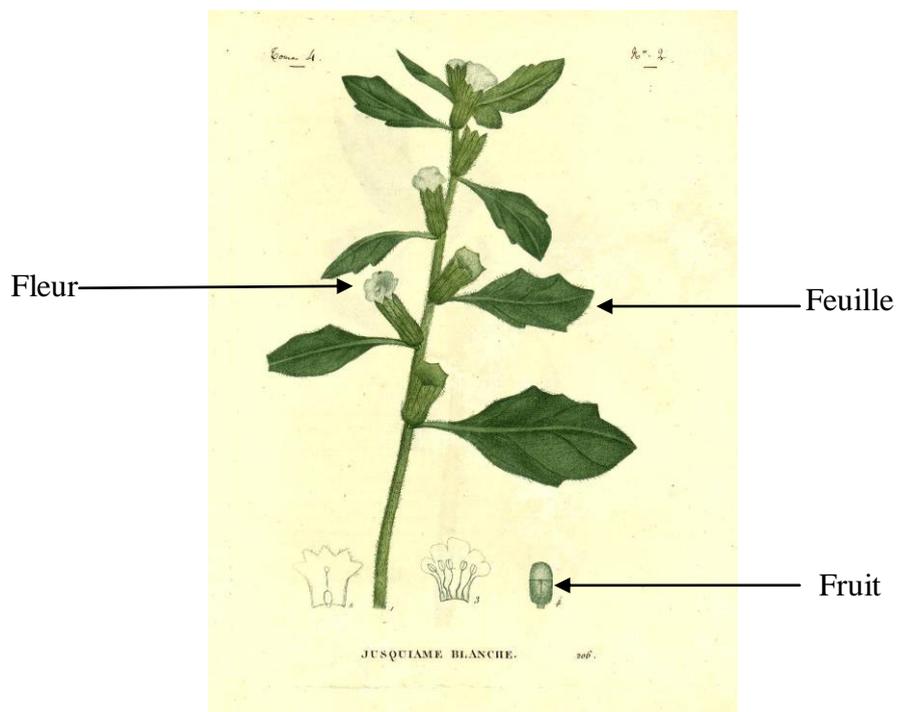


Figure 3 : *Hyoscyamus albus* (Reynaud, 2002).

➤ **Classification botanique d'*Hyoscyamus albus*** (Tableau III)

Tableau III : Classification botanique d'*Hyoscyamus albus* d'après (Quezel et santa, 1962).

Règne	plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Magnolidae
Ordre	Solanales
Famille	<i>Solanaceae</i>
Genre	<i>Hyocyanus</i>
Espèce	<i>Hyocyanus albus</i>

I.3.2 Répartition géographique

La jusquiame blanche vit sur les talus, les falaises, les friches et les plages de galets en Europe, en Afrique du nord et en Asie (Goullé et al., 2004).

En Algérie on retrouve cette plante dans quelques régions ; Batna, Jijel et Béjaia.

I.3.3 Composition phytochimique

Hyoscyamus albus est connue pour être une bonne source d'alcaloïdes elle en contient de 0,2 à 0,5 % (Goullé et al., 2004), on distingue :

➤ **Les alcaloïdes tropaniques**

La jusquiame blanche renferme l'hyoscyamine et la scopolamine qui sont largement utilisées pour leur effet ; anti cholinergique, caractérisé par une inhibition de la production d'acétylcholine, et pour leurs propriétés hypnotiques et sédatives.

L'atropine qui est l'alcaloïde principal de la jusquiame blanche est responsable d'une stimulation vagale modérée à doses thérapeutiques (0,5 à 1,0 mg). Elle exerce un effet significatif sur la neutralisation de la vasodilatation périphérique et sur la chute de la pression artérielle (**Pudersell, 2006**).

➤ **Alcaloïdes nortropaniques**

Les alcaloïdes nortropaniques constituent les calystegines qui ont été extraits pour la première fois dans *Calystegia sepium* puis dans les *Solanaceae*s.

Ces alcaloïdes sont dotés de plusieurs activités thérapeutiques, et sont utilisés pour le traitement de plusieurs maladies tels que le diabète, le cancer et les infections virales (**Bekkouche et al., 2001**).

➤ **Les saponines, les tanins condensés et les flavonoïdes**

Ces composés ont été extraits à partir des racines de la jusquiame blanche, Une étude *In vitro* a été faite et a montré que l'activité analgésique d'*Hyoscyamus albus* est liée à la présence de ces trois composés (**Benhouda et al., 2014**).

➤ **L'huile essentielle**

La partie aérienne d'*Hyoscyamus albus* renferme une HE, l'analyse chimique de cette huile par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM) a été réalisée par Monsieur **BOUADAM** (Enseignant à l'université de Béjaïa). Les résultats ont montré la présence de trois composés majoritaires qui sont le dillapiole, l' α cardinol, le ρ -cymène, l'HE renferme également l' α phellandrène, le β pinène, et le bisabolol acétate avec des teneurs allant de 5 jusqu'à 10%, et des traces du phytol, le linalyl butanoate, le limonène et finalement le menthène.

I.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles

Face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des bactéries aux antibiotiques, la seule alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des HEs. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité antibactérienne a été démontrée par de nombreux travaux *In vitro* et *In vivo* et vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, elles ont un champ d'action très large qui est lié à leurs compositions chimiques, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (**Carson et al., 1995**).

L'activité antimicrobienne des HEs a été signalée comme étant liée spécifiquement à la présence de plusieurs composants. Récemment, des tentatives ont été faites pour identifier les composés responsables d'une telle bioactivité. Les molécules oxygénées qui entrent dans la composition des HEs sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées qui sont, par contre, connues pour leurs faibles pouvoirs antimicrobiennes.

Sur cette base l'ordre d'activité de ces composés s'est établi comme suit : phénols>cétones>oxydes>hydrocarbonées>esters (**Kalembe et Kunicka, 2003**).

Les effets antibactériens sont liés, entre autre, à la présence de groupements hydroxyles libres qui permettent une bonne solubilisation de ces composés dans les milieux physiologiques aqueux (**Ben Arafa et al., 2006**). Certains de ces composés sont connus pour leur grande solubilité dans l'eau et donc de leur forte capacité à accéder aux cellules microbiennes et à pénétrer leurs parois (**Knobloch et al., 1989**). D'autres composés végétaux sont hydrophobes. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires des bactéries, assurant ainsi leur solubilisation dans la bicouche lipidique (**Carson et al., 2006**).

Chapitre II

Materiel et Méthodes

Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à la détermination de l'effet *In vitro* de l'association d'huiles essentielles des trois plantes à savoir ; *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas* et *Hyocyamus albus*, d'antibiotiques et de quelques composés d'huiles essentielles sur une collection de souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif.

II.1 Matériel

II.1.1 Le matériel végétal

Les parties aériennes de *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas* et *Hyocyamus albus* ont été utilisées pour l'extraction des HEs.

- Les conditions de récolte sont présentées dans le (tableau IV).

Tableau IV: conditions de récolte.

Nom scientifique de la plante	Localisation géographique de l'endroit de la récolte	Date de récolte
<i>Laurus nobilis</i>	Djoua Aith Bimoune commune de Boukhelifa à 7 Km de la willaya de Béjaia 1005 mètres d'altitude.	Janvier 2016
<i>Lavandula stoechas</i>	Village Carrier commune d'Oued Amizour à 36 m d'altitude.	Février 2016
<i>Hyoscyamus albus</i>	Ville de Béjaia à 11 mètre d'altitude.	

Le matériel végétal recueilli a été séché dans un endroit aéré, à une température ambiante et à l'ombre, afin de préserver au maximum l'intégrité de ses molécules (Tableau V).

Tableau V : Le matériel végétal.

Partie aérienne fraîche	Partie aérienne sèche
 <p data-bbox="560 976 783 1010">a-Laurus nobilis</p>	
 <p data-bbox="488 1458 783 1491">b-Lavandula stoechas</p>	
 <p data-bbox="499 1973 775 2007">c-Hyoscyamus albus</p>	

II.1.2 Les souches bactériennes

Le choix des bactéries (Tableau VI) a été porté sur cinq souches fréquentes en pathologie humaine, ces souches ont été sélectionnées en fonction de leur pouvoir pathogène et leur résistance naturelle aux antibiotiques constituant ainsi un problème majeur de santé publique.

- Les souches bactériennes ont été fournies par le laboratoire de microbiologie.

Tableau VI : Les souches bactériennes utilisées.

La souche bactérienne	Référence	Gram	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM)	ATCC 6538	Positif	Staphylococcaceae
<i>Enterococcus faecalis</i>	Isolée d'eau souillée	Positif	Enterococcaceae
<i>Salmonella sp</i>	Souche hospitalière	Négatif	Enterobacteriaceae
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 4157	Négatif	Enterobacteriaceae
<i>Pseudomonas putida</i>	Isolée d'eau souillée	Négatif	Pseudomonadaceae

II.1.3 Antibiotiques et autres composés chimiques

Les antibiotiques et les autres composés utilisés pour réaliser des associations avec les huiles essentielles extraites sont présentés dans les tableaux suivants (Tableau VII et tableau VIII).

Tableau VII : Les antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	référence	Famille
Tétracycline	SIGMA®, Chine.	Tétracyclines
Chloramphénicol		Phénicolés
Amoxicilline		β-lactamines
Céfotaxime	Shanghai Pharmaceutical Group (SPG), Chine.	
Imipenème	RANBAXY Laboratories, Inde.	

Tableau VIII : les autres composés chimiques utilisés.

Composé chimique	référence
Thymol	<i>Riedel-de Haën®, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Allemagne.</i>
Eugénol	Alfa Aesar GnbH & Co KG, Canada
Eucalyptol	Alfa Aesar A Jonshon Matthey Company, USA
Huile essentielle d'arbre à thé	Omni San Schoning GmbH & Co .kg, Australie
Alpha pinène	Alfa Aesar GnbH & Co KG, Allemagne

II.1.4 Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antibactériens sont les suivants :

- Le bouillon nutritif pour l'isolement des souches bactériennes.
- Le bouillon Mueller Hinton (BMH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux huiles essentielles.
- La gélose Plate Count Agar (PCA) pour la culture des souches bactériennes afin de déterminer les paramètres de croissance : La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

II.2 METHODES**II.2.1 Extraction des huiles essentielles**

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par la technique d'hydrodistillation car elle permet de fournir une huile essentielle de bonne qualité, un rendement élevé avec un cout faible. Elle a été réalisée dans un appareil inspiré de celui de Clevenger (**Clevenger, 1928**) (Figure 4), ce dernier est constitué :

- D'un support élévateur.
- Un chauffe -ballon.
- Un ballon en verre.
- Une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant).
- Une ampoule à décanter.



Figure 4: Montage utilisé pour l'hydrodistillation.

- La méthode consiste à immerger la matière végétale coupée dans un ballon rempli d'eau; l'ensemble est porté à ébullition, à pression atmosphérique et sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des plantes sont libérées (**Lucchesi, 2005**).

Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par leurs différences de densité dans l'essencier en une phase aqueuse (hydrolat) et une phase organique surnageante qui comporte l'huile essentielle (**Willem, 2004**).

- Une quantité de 100 grammes de chacune des trois plantes séchées a été macérés dans un litre d'eau de source pendant une nuit (16 à 20 heures), le tout est ensuite porté à ébullition pendant 2 heures.
- Après séparation des deux phases, les HEs obtenues sont déshydratées en utilisant le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) et sont ensuite conservées au réfrigérateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement à 4 °C.
- Le rendement en l'HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal traité (**AFNOR, 1986**).

Le rendement est exprimé en pourcentage :

$$\text{Rendement (\%)} = \text{poids de l'HE} / \text{poids de la plante} \times 100$$

II.2.2 Activité antibactérienne des huiles essentielles seules et en association

La méthode utilisée est celle de microdilution en milieu liquide aussi appelée méthode de l'échiquier, car elle permet de tester le pouvoir antibactérien des HES seules ou en associations avec d'autres composants antibactériens.

➤ **Méthode de l'échiquier**

Cette méthode permet de quantifier l'interaction de deux composés antibactériens A et B en réalisant l'association d'une gamme de concentrations des deux composés (**Vaubourdolle, 2007**). Toutes les démarches effectuées pour la réalisation de cette technique sont conformes aux directives du protocole **M7A7 de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006)**.

➤ **Principe de la méthode de l'échiquier**

C'est une méthode de référence consistant à distribuer dans une série de microcupules contenant un volume déterminé de BMH, des concentrations décroissantes de substances antibactériennes et à ensemercer chaque cupule avec une suspension standardisée de la bactérie à étudier; après incubation (de 18 à 24 h), la plus faible dilution du composé antibactérien dans laquelle la croissance bactérienne est visiblement inhibée représente la CMI.

- La CMI est définie comme étant la concentration la plus basse qui inhibe toute croissance visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C.

Pour la détermination de la CMB, des repiquages sur gélose PCA ont été effectués.

- La CMB est définie comme étant la concentration la plus faible capable d'entraîner la mort d'au moins 99.99% des bactéries. Elle correspondrait à celle dont les puits n'ont donné aucune croissance après repiquage et incubation de 24h à 37°C (**Li, 2000**).

➤ **Mode opératoire**

Les étapes du test antibactérien sont présentées ci-dessous :

➤ **Préparation des dilutions**

Du fait de la non-miscibilité des HEs et l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été effectuée avec une solution d'agar à 0,2 %. Cela permet d'obtenir une répartition homogène des HEs et d'augmenter au maximum la surface de contact entre le germe et le composé antibactérien (**Remmal et al., 1993**).

- Une quantité de 100 μ l de l'HE est additionnée à 900 μ l d'une solution d'agar à 0.2 %, ce qui correspond à une dilution d'un dixième.
- Une série de dilution d'ordre deux est préparée à partir de cette solution mère (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) en utilisant le même émulsifiant (Figure 5).
- Les dilutions des autres substances testées (antibiotiques et composés d'HE) ont été préparées de la même manière.



Figure 5 : Série de dilutions.

➤ **Préparation des inocula bactériens**

Le test antibactérien doit être réalisé sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle.

Avant chaque ensemencement, les inocula bactériens sont préparés de la manière suivante :

- Repiquage des souches bactériennes sur un milieu neuf (bouillon nutritif).
- Incubation environ 6 heures à 37°C afin d'obtenir des colonies bien isolées.
- Standardisation des inocula bactériens :

CLSI exige une charge bactérienne standard pour les tests en milieu liquide qui est 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 stérile.

Les inocula bactériens doivent avoir une densité optique (DO) comprise entre 0,08 et 0,13 à une longueur d'onde de 625 nm.

➤ **Ensemencement de la microplaque :**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée sur des microplaques de 96 puits contenant 12 colonnes (1 à 12) et 8 lignes (A à H) (Figure 6).

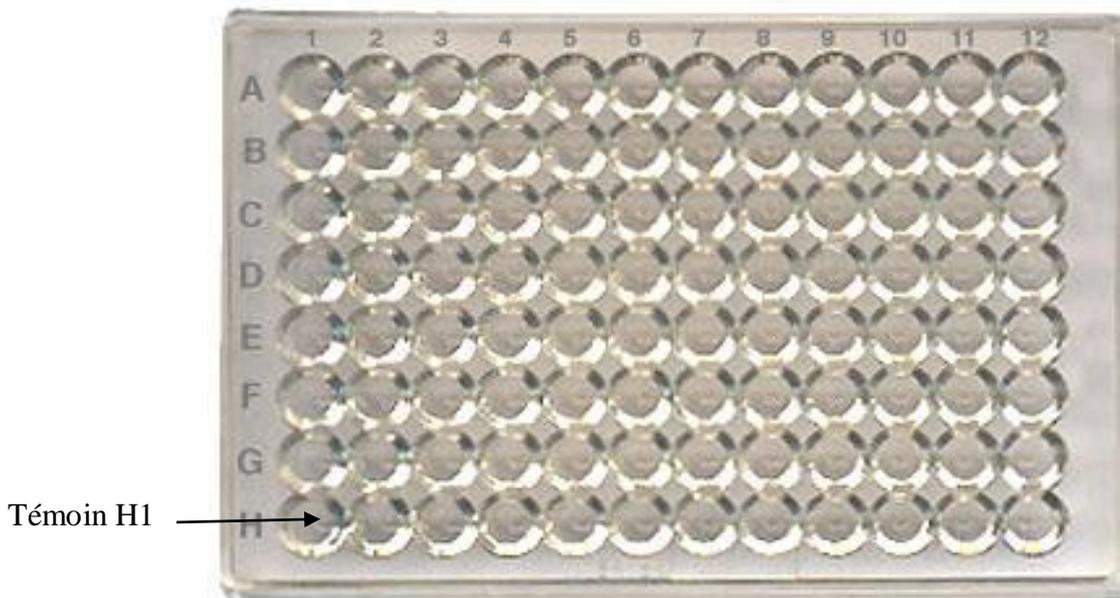


Figure 6: Une microplaque de 96 puits.

On procède comme suit :

- Le puits H1 (la figure 6) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum bactérien, et 50 µl d'agar à 0,2%, qui sert de 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 bactérien, et 50 µl d'une dilution de l'agent antimicrobien A (de la plus concentrée à la plus diluée).
- 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 bactérien, et 50 µl d'une dilution de l'agent antimicrobien B (de la plus concentrée à la plus diluée).
- Chaque puits du reste de la microplaque contient les mêmes quantités du BMH, de l'inoculum, et 25 µl de chaque agent antimicrobien ce qui permet de réaliser des combinaisons des différentes dilutions correspondant à celles des deux axes ; de telle sorte que chaque puits sera unique en ses combinaisons de doses.
- Après 16 à 20 h d'incubation à 37°C, les microplaques sont lues en observant le fond des cupules dans un miroir.

II.2.3 Interprétation des résultats

- L'activité antibactérienne des composés pris isolément est estimée par le rapport **CMB/CMI**.

Selon (**Traoré et al., 2012**), lorsque le rapport **CMB/CMI** d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4) cette dernière est qualifiée de substance bactéricide cependant si ce rapport est supérieur à quatre (> 4), alors elle est dite bactériostatique.

- Les CMI des différentes substances sont d'abord transformées en des concentrations inhibitrices fractionnaires (FICs).
- Une FIC d'un échantillon A (FIC_A) est définie comme étant le rapport de la concentration inhibitrice de (A) en présence d'un autre échantillon B sur la CMI de l'échantillon A seul, et de la même manière on calcule la FIC de la substance antibactérienne B (FIC_B).
- L'activité antibactérienne des associations est déterminée par les concentrations inhibitrices fractionnaires index (FICI) les plus basses.

La FICI est: $FIC_{(A)} + FIC_{(B)}$ (Rosato et al., 2010).

Pour chaque association de deux agents antimicrobiens, la FICI de la combinaison la plus efficace (FICI la plus basse) a été prise pour interpréter les résultats.

L'effet d'une association est considéré :

- **Synergique** si la FICI qui en découle est inférieure ou égale à 0,5.
- **Additif** si elle est supérieure à 0,5 et inférieure à 1.
- **Indifférent** si elle est égale à 1.
- **Antagoniste** si elle est supérieure à 1 (**Rosato et al., 2010**).

➤ Les isobogrammes

De nombreuses études portent sur l'utilisation de ces graphiques appelés les isobogrammes

La méthode des isobogrammes est une approche expérimentale couramment utilisée afin de déterminer les différentes combinaisons de traitement qui produisent un effet déterminé (synergie, antagonisme, addition) (Figure 7).

Un isobogramme est un graphique en deux dimensions avec, sur chaque axe la concentration d'un composé utilisé dans l'association, il est caractérisé par une ligne droite qui relie les CMI des deux composés antibactériens associés, une déviation de cette ligne peut indiquer un antagonisme ou une synergie (Cedergreen et al., 2005 ; Syberg et al., 2008).

Chaque point d'un isobogramme a été tiré à partir des deux concentrations contenues dans les cupules de la microplaque (les puits clairs).

- Les points au dessus de la droite déterminent un antagonisme.
- Les points en dessous de la droite déterminent une synergie, néanmoins l'apparition des points de part et d'autres de la droite détermine une addition.

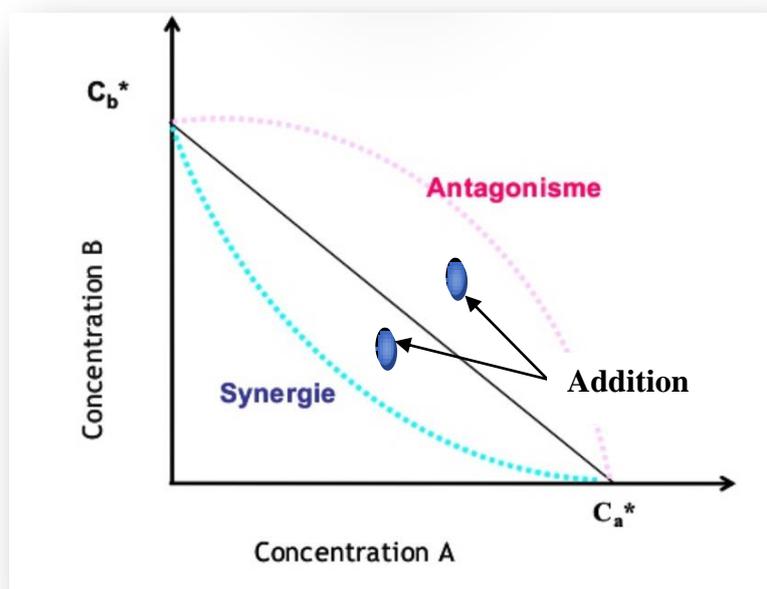


Figure 7: Un isobogramme schématique (Syberg et al., 2008).

Chapitre III
Résultats
et
Discussion

III.1. Rendement en huile essentielle

Les HEs extraites sont présentées dans la (Figure 8). Leurs rendements ont été calculés et sont illustrés dans (le tableau IX) :

Tableau IX: rendements et couleurs des HEs.

L'huile essentielle	Rendement en%	Couleur
<i>Laurus nobilis</i>	0.53	Jaune pale
<i>Lavandula stoechas</i>	0.60	Jaune
<i>Hyoscyamus albus</i>	0.17	Transparente

a- L'HE de *Laurus nobilis*.b- L'HE de *Lavandula stoechas*.c- L'HE d'*Hyoscyamus albus*.

Figure 8 : Les huiles essentielles extraites.

La méthode d'extraction est une opération importante qu'il faut mener avec soin. La récolte, le séchage, et le stockage influencent largement sur le rendement ainsi que la qualité organoleptique des HEs (Benjlali., 2005).

Le rendement en HEs des deux plantes *Laurus nobilis* (0.53%), et *Lavandula stoechas* (0.60%) sont faibles par rapport à ceux signalés par d'autres chercheurs qui sont de (1,3 à 1,4%) pour *Laurus nobilis* et de (2 à 3%) pour *Lavandula stoechas* (Franchomme et al., 2001). Cette différence pourrait être expliquée par le génotype des espèces récoltées, la saison de la récolte ainsi que les conditions géographiques et climatiques.

Le rendement le plus faible a été marqué avec l'HE de *Hyoscyamus albus*.

III.2 Les paramètres de croissance des huiles essentielles (CMI et CMBs)

Les valeurs des CMI et CMBs calculées ont montré que les HEs des trois plantes étudiées sont bactéricides sur au moins trois des souches bactériennes testées (Le rapport $CMB/CMI \leq 4$).

Les valeurs sont illustrées dans les tableaux suivants :

➤ Tableau X : CMI et CMBs de l'HE de *Laurus nobilis*

Bactérie	<i>Laurus nobilis</i> mg/ml		
	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.656	2.656	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.664	1.328	2
<i>Escherichia coli</i>	2.656	2.656	1
<i>Pseudomonas putida</i>	0.664	10.62	16
<i>Salmonella sp</i>	0.332	1.328	4

L'HE de *Laurus nobilis* s'est montrée très active à l'égard de toutes les souches et a exercé un effet bactéricide sur les quatre souches ; *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus concordent avec les travaux de (Elharas *et al.*, 2013) rapportant que l'HE de *Laurus nobilis* exerce un effet bactéricide sur les trois souches (*Escherichia coli* ATCC25921, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC29733 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923).

Une HE peut contenir 50 à 100 éléments biochimiques parfois 300 comme chez quelques espèces, les plus fréquemment rencontrés sont les alcools, les aldéhydes terpéniques, et les terpènes (Willem, 2004). L'activité antibactérienne d'une HE est donc attribuée à sa composition chimique.

Plusieurs substances ont été dénombrées dans l'HE de *Laurus nobilis*, d'après (Demir *et al.*, 2004). Cette composition est dominée par la présence de 1,8-cinéole (35.31%), β -linalol (22.52%), eugénol méthylether (9.17%), camphène (7.37%).

➤ Tableau XI : CMI et CMB de l'HE de *Lavandula stoechas*

HE	<i>Lavandula stoechas</i> mg/ml		
	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$
Bactérie			
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.703	N.D	N.D
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.351	0.703	2
<i>Escherichia coli</i>	0.351	0.351	1
<i>Pseudomonas putida</i>	1.406	11.25	8
<i>Salmonella sp</i>	0.351	0.703	2

(Mohhhamedi et al., 2012) ont analysé l’HE de *Lavandula stoechas* par CG/SM. Et ont pu séparer 21 composés dont 11 ont été identifiés. Les composés majoritaires de l’HE de *Lavandula stoechas* d’après cette étude présentent une variation quantitative importante grâce à la biodiversité génétique de la plante, on cite :

Fenchone (27.6%), 1,8 cinéole (18.9%), et Camphre (18.1%).

Les résultats obtenus dans notre étude sont en accord avec d’autres rapports indiquant que les HEs de populations non-algériennes de *Lavandula stoechas* possèdent également des activités antimicrobiennes. Il a été rapporté que l’huile volatile de *Lavandula stoechas* en provenance de Tunisie exerce une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (Bouzouita et al., 2005). De même, de fortes activités antibactériennes ont été exercées par l’HE de *Lavandula stoechas* sauvage de Turquie (Gören et al., 2002), et d’Italie (Angioni et al., 2006) ou à partir des espèces cultivées en Australie (Moon et al., 2007).

D’après (Mohammedi., 2006) l’essence des feuilles de *Lavandula stoechas* est un agent antibactérien efficace contre *Klebsiella pneumoneae*, *Proteus mirabilis* et *E. coli* ATCC25922.

➤ **Tableau XII : CMI et CMBs d’*Hyocyamus albus*.**

HE Bactérie	<i>Hyocyamus albus</i> mg/ml		
	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.093	N.D	N.D
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.546	1.093	2
<i>Escherichia coli</i>	0.546	1.093	2
<i>Salmonella sp</i>	0.546	1.093	2

N.D : non déterminé

L'HE d'*Hyoscyamus albus* s'est montrée très active contre les souches bactériennes testées avec une CMI de 0.546 mg/ml pour les trois souches : *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, et de 1.093 mg/ml pour *staphylococcus aureus*.

L'effet bactéricide de cette HE a été observé avec les trois souches *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*.

L'analyse par CGSM de l'HE d'*Hyoscyamus albus* a été faite par monsieur **BOUADAM**, et a révélé la présence d'une dizaine de composé dont trois sont majoritaires, il s'agit de dillapiole (24.22%) qui est un arylpropènes, le α Cainol (18.47%) et finalement le p -cymène (11.01%) qui appartient aux monoterpènes monocycliques.

Les extraits aqueux et méthanolique d'*Hyoscyamus albus* se sont montrés très actifs contre des souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif (**Alghazeer et al., 2012**).

La variabilité des constituants des HEs suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**Burt, 2004**).

L'ensemble des résultats précédents montre que les HEs étudiées sont dotées d'une forte activité antibactérienne. Cette importante bioactivité des HEs étudiées est en relation avec leur composition chimique. En effet, (**Oussalah et ses collaborateurs., 2006**) ont rapporté que l'effet antibactérien des HEs est attribué aux monoterpènes particulièrement aux phénols.

Les composés phénoliques causent des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassium, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires (**Lambert, 2001 ? Bakkali, 2008**).

Il est également probable que cette activité antibactérienne est le résultat de l'interaction entre divers structures aromatiques (**Delaquis, 2002**). D'après (**Oussou et al., 2004**), ces molécules agiraient le plus souvent par une action synergique. En plus de ces composés majoritaires, les composés mineurs peuvent contribuer significativement à l'activité des HEs (**Lahlou, 2004**).

Les plus grandes valeurs des CMBs ont été observées avec la souche *Pseudomonas putida* (10.62 mg/ml pour L'HE de *Laurus nobilis* et 11.25 mg/ml pour celle de *Lavandula stoechas*) ce qui montre que cette bactérie est la plus résistante parmi les souches testées. Ceci pourrait être expliqué par la structure de sa paroi (Gram négatif) qui bloque partiellement la pénétration des HEs à l'intérieur de la cellule bactérienne. En effet la paroi des bactéries à Gram négatif est constituée d'une double couche phospholipidique dans laquelle se trouvent des lipopoly-saccharides qui rendent la paroi imperméable à la pénétration des substances liposolubles.

La paroi des bactéries à Gram positif est constituée de peptidoglycanes et ne représente pas une barrière sélective comme la paroi des bactéries à Gram négatif (**Shin et al., 2005**).

D'après (**Mayaud et al., 2008**), Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont en général les moins sensibles aux HEs par rapport aux autres bactéries à Gram négatif ce qui concorde avec nos résultats.

L'activité antibactérienne de l'HE de *Laurus nobilis* s'est montrée très comparable à celle de *Lavandula stoechas*, ce qui pourrait être expliqué par le fait que les deux HEs semblent avoir quelques composés majoritaires en commun (l' α pinène et le 1.8 cinéol). Ces composés seraient des agents dotés d'une activité antibactérienne élevée.

Le pouvoir antibactérien du 1,8 cinéol contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif a été démontré par plusieurs travaux. Il conduit à une perte des métabolites cytoplasmiques et des acides nucléiques en provoquant des dommages au niveau de la membrane cellulaire (**Derwich et al., 2009**).

L'eugénol appartient au groupe des phénols et est classé parmi les premières molécules possédant le coefficient antibactérien le plus élevé après le carvacrol et le thymol (**Franchomme et al., 2001**).

Wendakoon et Sakaguchi ont suggéré que le groupe hydroxyle de l'eugénol pourrait interagir avec des protéines bactériennes et inhiber leur action enzymatique (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995**).

Le 4-terpinol, l' α -terpinol, et le linalol existant dans l'HE de *Laurus nobilis* sont des alcools terpéniques, ils possèdent une activité antibactérienne importante après les phénols terpéniques, ils sont connus par leur activité bactéricide plutôt que bactériostatique, car ils agissent comme dénaturants des protéines (**Pelczar et al., 1988**). Ils sont actifs sur la plupart des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Le bornéol identifié dans l'HE de *Lavandula stoechas* comme composé minoritaire est un alcool qui agit comme dénaturant des protéines bactériennes (**Pelczar et al., 1988**).

Il existe plusieurs travaux affirmant que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux HEs que les bactéries à Gram positif, cependant nos résultats ont montré que les HEs n'ont aucune sélectivité envers le type de Gram des bactéries, d'autres recherches ont démontré que les bactéries à Gram positif et à Gram négatif agissent de la même manière vis-à-vis des HEs (**Imelouane et al., 2009**).

(**Domrman et Deans, 2000**) ont montré que l'activité antibactérienne dépend uniquement de la composition chimique des HEs et ne dépend pas du type de Gram de la bactérie.

L'effet antibactérien d'une huile essentielle pourrait être due à une synergie entre les différents composés majoritaires et minoritaires (**Vardar et al., 2003**).

III.3 Résultats des associations réalisées

La réalisation de combinaisons entre les HEs avec différents composés isolés (composés d’HEs ou antibiotiques) à pour but de potentialiser l’effet des composés actifs. On cite : le thymol, l’eugénol, l’HE d’arbre à thé, l’eucalyptol, et l’ α pinène. Ces derniers ont été choisis pour leur forte activité antibactérienne.

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux suivants :

➤ **Tableau XIII : Résultats des associations réalisées sur *Staphylococcus aureus***

Association	CMI1	CMI2	FIC	FICI	Interprétation
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.166	0.0625	0.31	Synergie
thymol	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.703	0.351	0.5	0.75	Addition
Thymol	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.703	0.175	0.25	0.5	synergie
α -pinène	2.25	0.562	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.703	0.351	0.5	1	Indifférence
Eugénol	1.593	0.796	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.703	0.351	0.5	1	Indifférence
Imipenème	3.125	1.5625	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.703	0.175	0.25	0.5	Synergie
Tétracycline	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.703	0.175	0.25	0.5	Synergie
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.664	0.25		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	1.328	0.5	1	Indifférence
HE de <i>Hyocyamus albus</i>	1.093	0.546	0.5		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.332	0.125	0.625	Addition
HE de <i>Hyocyamus albus</i>	1.093	0.546	0.5		

➤ **Tableau XIV : Résultats des associations réalisées sur *Escherichia coli***

Association	CMI1	CMI2	FIC	FICI	Interprétation
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.664	0.25	0.5	Synergie
α-pinène	2.25	0.562	0.25		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	5.3125	2	2.25	Antagonisme
Thymol	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.166	0.0625	0.31	Synergie
Tétracycline	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.166	0.0625	0.31	Synergie
Céfotaxime	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.332	0.125	0.37	Synergie
chloramphénicol	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.703	2	3	Antagonisme
HE d'arbre à thé	2.718	2.718	1		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.25	Antagonisme
Thymol	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	0.75	Addition
α-pinène	2.25	0.562	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	1	Indifférence
Eugénol	1.593	0.796	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	1	Indifférence
Imipénème	3.125	1.5625	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	0.75	Addition
Tétracycline	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.25	Antagonisme
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.664	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.25	Antagonisme
Céfotaxime	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.5	Antagonisme
Eucalyptol	1.39	0.695	0.5		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.166	0.0625	0.56	Synergie
Eugénol	1.593	0.796	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	2	Antagonisme
HE de <i>Hyocymus albus</i>	0.546	0.546	1		

Des effets synergiques ont été obtenus en combinant les HEs avec des antibiotiques on cite : L'HE de *Lavandula stoechas* et la tétracycline à l'égard de *Staphylococcus aureus*, l'HE de *Laurus nobilis* et la tétracycline, *Laurus nobilis* et le céfotaxime et l'HE de *Laurus nobilis* et le chloramphénicol à l'égard d'*E.coli* (FICI \leq 0.5).

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques qui agissent par inhibition de la synthèse protéique en interférant avec la sous-unité 30 S ribosomale (**Poyart, 2006**).

Le chloramphénicol inhibe la synthèse des protéines en inhibant l'activité peptidyl transférase du ribosome bactérien (**Cattoir, 2006**).

La famille des β -lactamines est la plus utilisée en antibiothérapie, ces antibiotiques sont des inhibiteurs de la synthèse de paroi bactérienne (synthèse du peptidoglycane) par une inactivation des principaux enzymes impliqués dans cette construction : les PLP (protéine liant la pénicilline) (**Nour et al., 2005**).

Les mécanismes par lesquels les HEs inhibent la croissance bactérienne impliquent plusieurs modes d'action. Leur caractère hydrophobe et leur richesse en plusieurs composés phénoliques leur permet de diviser la bicouche lipidique de la paroi bactérienne la rendant plus perméable et facilitant ainsi la pénétration des antibiotiques (**Rodrigues et al., 2009**).

➤ Tableau XV : Résultats des associations réalisées sur *Salmonella sp*

Association	CMI1	CMI2	FIC	FICI	Interprétation
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.332	0.083	0.25	0.75	Addition
Eugénol	1.593	0.796	0.5		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.332	0.166	0.5	0.75	Addition
α-pinène	2.25	0.562	0.25		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.332	0.332	1	1.25	Antagonisme
HE d'arbre à thé	2.718	0.679	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.25	Antagonisme
HE d'arbre à thé	2.718	0.679	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	2.812	8	8.25	Antagonisme
Thymol	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.25	Antagonisme
α-pinène	2.25	0.562	0.25		
<i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	1	Indifférence
Eugénol	1.593	0.796	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	0.75	Addition
Imipenème	3.125	1.5625	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	1	Indifférence
Eugénol	1.593	0.796	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	0.75	Addition
Tétracycline	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	2.5	Antagonisme
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.332	0.664	2		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.5	Antagonisme
Eucalyptol	1.39	0.695	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	2	Antagonisme
HE de <i>Hyocyamus albus</i>	0.546	0.546	1		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.332	0.332	1	2	Antagonisme
HE de <i>Hyocyamus albus</i>	0.546	0.546	1		

➤ **Tableau XVI : Résultats des associations réalisées sur *Enterococcus faecalis***

Association	CMI1	CMI2	FIC	FICI	Interprétation
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.664	0.166	0.25	1.25	Antagonisme
α-pinène	1.125	1.125	1		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.664	0.166	0.25	0.75	Addition
HE d'arbre à thé	1.359	0.679	0.5		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.664	0.664	1	1.25	Antagonisme
Thymol	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.664	0.332	0.5	0.75	Addition
Amoxicilline	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.5	Antagonisme
HE d'arbre à thé	1.359	0.679	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.25	Antagonisme
Thymol	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	1	Indifférence
α-pinène	1.125	0.562	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	1	Indifférence
Eugénol	1.593	0.796	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.351	1	1.5	Antagonisme
Imipenème	3.125	1.5625	0.5		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	0.75	Addition
Tétracycline	3.125	0.781	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	1.5	Antagonisme
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.664	0.664	1		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.664	0.332	0.5	1.5	Antagonisme
HE de <i>Hyocyamus albus</i>	0.546	0.546	1		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	0.351	0.175	0.5	1.5	Antagonisme
HE de <i>Hyocyamus albus</i>	0.546	0.546	1		

➤ Tableau XVII : Résultats des associations réalisées sur *Pseudomonas putida*

Association	CMI1	CMI2	FIC	FICI	Interprétation
HE de <i>Laurus nobilis</i>	2.656	0.664	0.25	0.5	Synergie
α -pinène	2.2	0.562	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	1.406	1.406	1	1.25	Antagonisme
HE d'arbre à thé	2.718	0.679	0.25		
HE de <i>Lavandula stoechas</i>	1.406	0.351	0.25	0.75	Addition
Thymol	3.125	1.5625	0.5		
HE de <i>Laurus nobilis</i>	0.664	0.166	0.25	0.75	Addition
Eugénol	1.593	0.796	0.5		

CMI₁ : concentration minimale inhibitrice de l'échantillon seul.

CMI₂: concentration minimale inhibitrice de l'échantillon en présence du deuxième composé.

*Les CMI des antibiotiques et du thymol sont exprimées en $\mu\text{g/ml}$ tandis que celles des HEs et des autres composés le sont en mg/ml .

(Dorman et Deans, 2000) ont testé un grand nombre de composés purs sur 25 genres de bactéries et ils ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne, suivi du carvacrol et de l' α -terpinéol. Il a la capacité de perturber la structure de la membrane externe des bactéries à Gram négatif libérant ainsi les lipolysaccharides et augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP.

D'après (Yap et al., 2014), l'HE d'arbre à thé aussi appelée *Melaleuca alternifolia* est dotée d'un fort pouvoir antibactérien en causant des lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie.

(Delaquis et al., 2002) ont estimé que l'activité antimicrobienne de certaines HEs pourrait être attribuée à la présence des composés présents à l'état de trace.

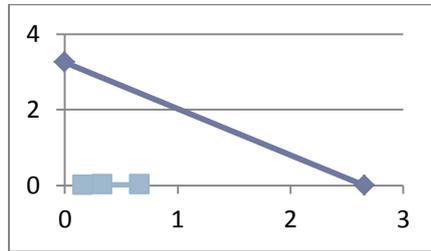
(Viljoen et al., 2006) ont démontré que l'effet synergique peut être actif dans une association entre le 1,8-cinéol et le camphre ce qui pourrait être traduit dans notre étude par une synergie entre l'HE de *Laurus nobilis* et celle de *Lavandula stoechas*.

En ce qui concerne les effets antagonismes observés, aucune explication du mécanisme n'a été retrouvée, néanmoins quelques auteurs ont suggéré que cet effet est probablement associé à la composition de la paroi bactérienne (Scholar et Prat, 2000).

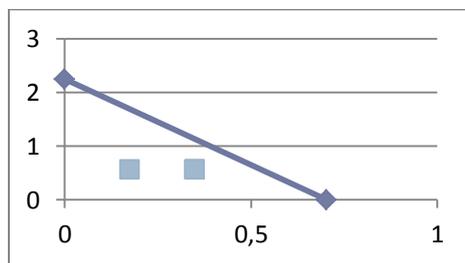
Plusieurs travaux ont montré que les HEs possèdent un pouvoir antibactérien plus fort que celui de leurs composés pris isolément suggérant ainsi que les composés minoritaires sont indispensable pour avoir une synergie (Zengin et Baysal, 2014).

III.4 Les isobogrammes :

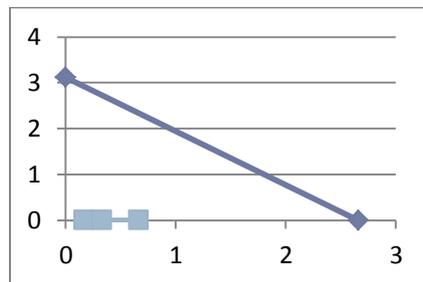
➤ Les résultats des combinaisons sont confirmés par les isobogrammes:



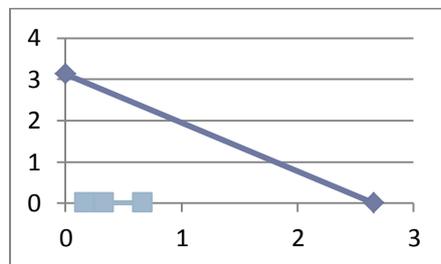
Synergie entre l'HE de *Laurus nobilis* et le thymol réalisée sur *Staphylococcus aureus*



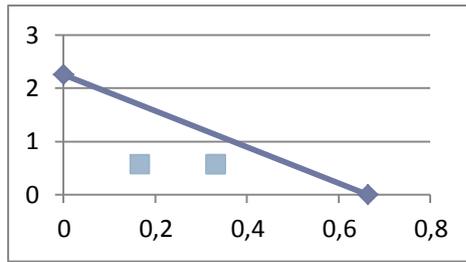
Synergie entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l'alpha pinène réalisée sur *Staphylococcus aureus*.



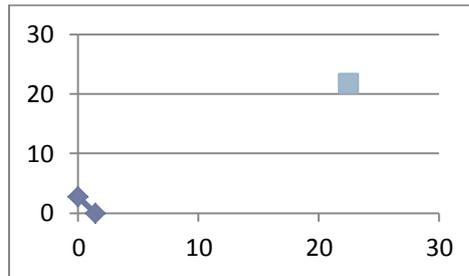
Synergie entre l'HE de *Laurus nobilis* et le céfotaxime réalisée sur *E.coli*.



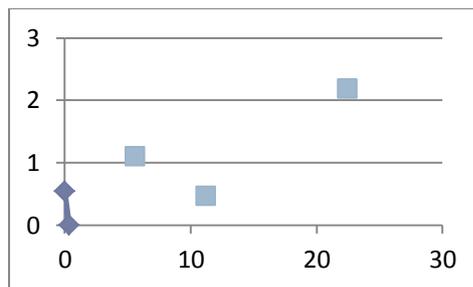
Synergie entre l'HE de *Laurus nobilis* et la tétracycline testée sur *E.coli*.



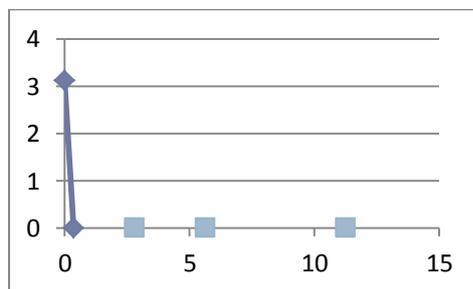
Synergie entre l'HE de *Laurus nobilis* et l' α pinène testée sur *Pseudomonas putida*.



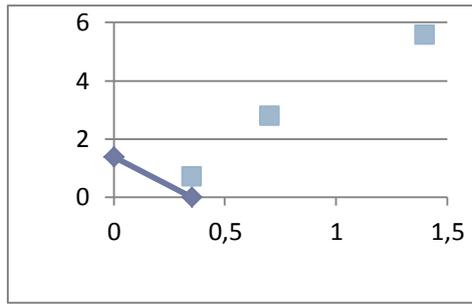
Antagonisme entre l'HE de *Lavandula stoechas* et HE d'arbre à thé testée sur *Enterococcus faecalis*.



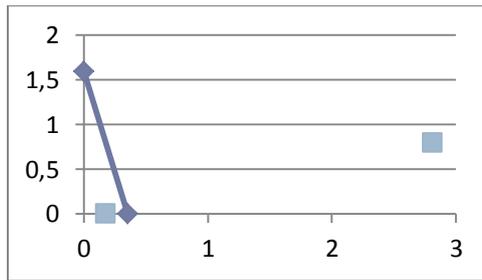
Antagonisme entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l'HE d'*Hyscyamus albus* testée sur *Pseudomonas putida*.



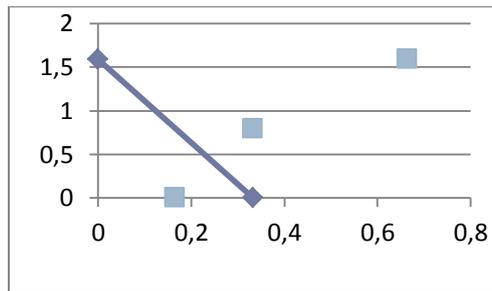
Antagonisme entre l'HE de *Lavandula stoechas* et le thymol testée sur *salmonella sp.*



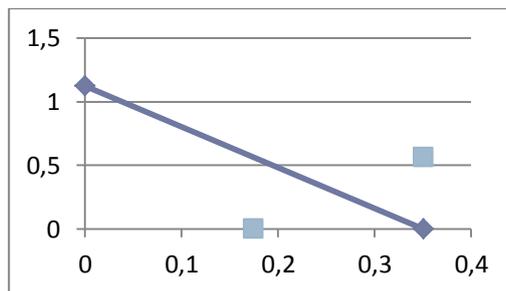
Antagonisme entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l'eucalyptol testée sur *E. coli*.



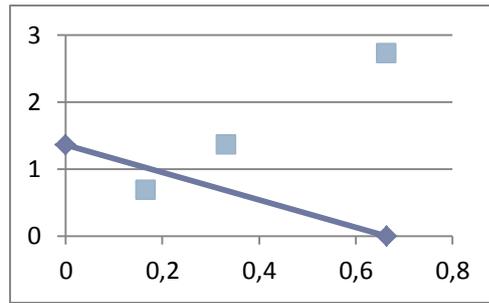
Addition entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l'eugénoI testée sur *E. coli*.



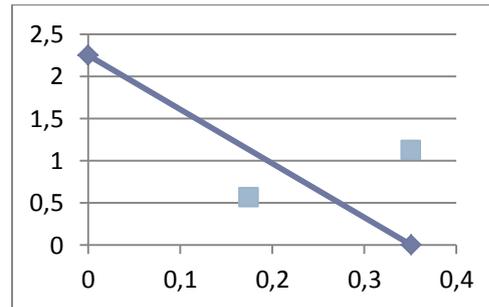
Addition entre l'HE de *Laurus nobilis* et l'eugénoI testée sur *salmonella sp.*



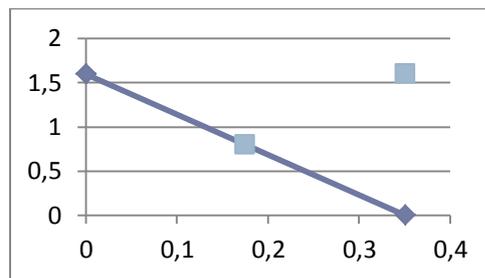
Addition entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l' α pinène testée sur *Enterococcus faecalis*.



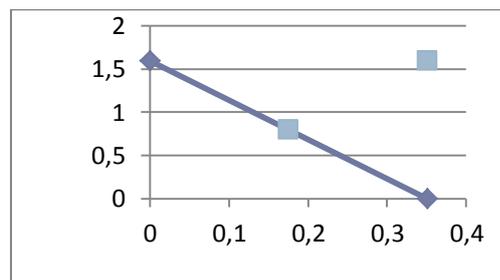
Addition entre l'HE de *Laurus nobilis* et l'HE d'arbre à thé testée sur *Enterococcus faecalis*.



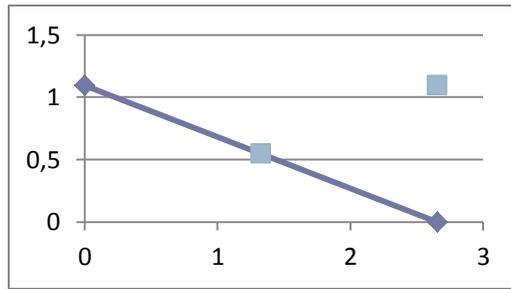
Addition entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l' α pinène testée sur *E.coli*.



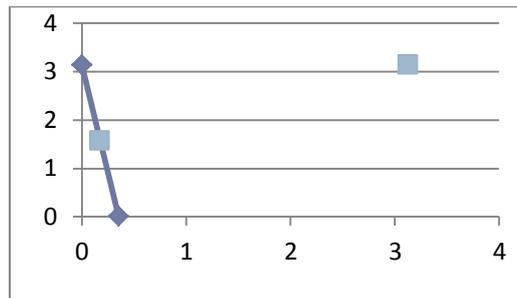
Indifférence entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l'eugénol testée sur *Enterococcus faecalis*.



Indifférence entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l'eugénol testée sur *Staphylococcus aureus*.



Indifférence entre l'HE de *Laurus nobilis* et l'HE d'*Hyoscyamus albus* testée sur *Staphylococcus aureus*.



Indifférence entre l'HE de *Lavandula stoechas* et l'imipenème testée sur *E coli*.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude analytique qui consistait à évaluer l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles, nous avons pu conclure que :

- Les parties aériennes des plantes aromatiques étudiées ont fourni des rendements en huiles essentielles avec un pourcentage de 0.17% pour *Hyoscyamus albus*, 0.53% pour *Laurus nobilis* et de 0.60% pour *Lavandula stoechas*.
- Nous avons également constaté que les cinq souches bactériennes testées sont sensibles aux huiles essentielles extraites avec des concentrations minimales inhibitrices variant entre 0.332 mg/ml et 2.656 mg/ml, et des concentrations minimales bactéricides (CMB) allant de 0.351 mg/ml à 10.62 mg/ml.
- L'association des différentes huiles essentielles avec d'autres substances antibactériennes a pu aboutir à des effets synergiques parmi lesquels on cite :

L'HE de *Laurus nobilis* et le thymol, l'HE de *Laurus nobilis* et la tétracycline, l'HE de *Laurus nobilis* et le céfotaxime et l'HE de *Laurus nobilis* et le chloramphénicol.

- Les combinaisons réalisées ont également donné plusieurs effets additifs, on cite :

L'HE de *Lavandula stoechas* et l' α -pinène, l'HE de *Lavandula stoechas* et la tétracycline, l'HE de *Laurus nobilis* et l'eugénol, HE de *Laurus nobilis* et l'HE d'arbre à thé.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons déduire que la flore algérienne peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes dont les principes actifs peuvent être employés dans plusieurs domaines tels que les industries agroalimentaire et pharmaceutique.

Pour valoriser ce travail d'autres études complémentaires seraient intéressantes telles que :

- L'identification des principes actifs responsables de l'activité antibactérienne par des techniques analytiques performantes telle que la CG-SM.
- Tester séparément les différents composants de ces huiles essentielles.
- Suivre cette étude par des applications *In-vivo* et étudier la toxicité de ces substances.
- Elargir les tests sur des bactéries phytopathogènes, des virus et des parasites.
- Etudier d'autres activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire et anticancéreuse.
- Tester ces substances bioactives sur d'autres souches bactériennes.

Références

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AFNOR (1996)**. Huiles essentielles, recueil de normes françaises, Paris La Défense, France.
- **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 (5) : 324-335.
- **Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S. et Cabras, P. (2006)**. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas L. ssp. stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(12) : 4364-4370.
- **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. et Idaomar, M. (2008)**. Biological effects of essential oils a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2) : 446-475.
- **Barla, A., Topçu, G., Öksüz, S., Tümen, G. et Kingston, D. G. (2007)**. Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis L.* *Food chemistry*, 104(4) : 1478-1484.
- **Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, S., Veuthey, J.L. et Christen, P. (2001)**. Calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry*, 58(3) : 455-462.
- **Beloued, A. (2005)**. Plantes médicinales d'Algérie. *Office des publications universitaires*, Alger. 124p.
- **Ben Arafa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. et Chalier, P. (2006)**. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology*, 43(2) : 149-154.
- **Benhouda, A. et Yahia, M. (2014)**. Toxicity, analgesic and anti-pyretic activities of methanolic extract from *Hyoscyamus albus* leaves in albino rats.
- **Benjilali, B. (2005)**. Le matériel végétal et l'extraction. In : *Huiles essentielles, de la plante à l'extraction. Manuel pratique*. Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi : 61-78.
- **Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., Chaabouni, M., Aissa, R. B., Zgoulli, S. et Lognay, G.C. (2005)**. Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas L.* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5) : 584-586.
- **Burt, S. (2004)**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3) : 223-253.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Carson, C.F. et Riley, T.V. (1995).** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl Bacteriol*, 78(3): 264-269.
- **Carson, C.F., Hammer, K.A. et Riley, T.V. (2006).** *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews*, 19(1) : 50-62.
- **Cattoir, V., Courvalain, P., Leclercq, R., Bingen, B. (2006).** Chloramphénicol, fosfomycine, acide fusidique et polymyxines. In : *Antibiogramme*. 2ème édition, Pp 349-364.
- **Cedergreen, N., Ritz, C. et Streibig, J.C. (2005).** Improved empirical models describing hormesis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(12) : 3166-3172.
- **Chu, C.J. et Kemper, K.J. (2001).** Lavender (*Lavandula spp*). *The Longwood Herbal Task Force*. Pp 2-3.
- **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, 26(2). Pennsylvania, U.S.A.
- **Couplan, F. (2012).** Lettre d'information n°12, Rencontre avec la lavande. Edition Quae.
- **Decoussera, J.W., Lamy, B., Pina, P., Allouch, P.Y. et Collège de Bactériologie Virologie Hygiène Study Group. (2010).** Trends in antibiotic susceptibility of bloodstream pathogens in hospitalized patients in France, 1996 to 2007. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 66(3) : 292-300.
- **Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. et Mazza, G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, 74(1) : 101-109.
- **Demir, V., Gunhan, T., Yagcioglu, A. K. et Degirmencioglu, A. (2004).** Mathematical modelling and the determination of some quality parameters of air-dried bay leaves. *Biosystems Engineering*, 88(3) : 325-335.
- **Demo, A., Petrakis, C., Kefalas, P. et Boskou, D. (1998).** Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food research international*, 31(5) : 351-354.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Derwich, E., Benziane, Z. et Boukir, A. (2009).** Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4) : 3818-3824.
- **Dob, T., Dahmane, D., Agli, M. et Chelghoum, C. (2006).** Essential Oil Composition of *Lavandula stoechas*. from Algeria. *Pharmaceutical biology*, 44(1) : 60-64.
- **Dorman, H.J.D. et Deans, S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2) : 308-316.
- **Elharas, K., Daagare, A., Mesfioui, A. et Ouhssin, M. (2013).** Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus nobilis* et *Lavandula angustifolia*. *Afrique Science*, 09(2):134 – 141.
- **Erkmen, O. et Özcan, M. (2008).** Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *Journal of Medicinal Food*, 11(3) : 587-592.
- **Franchomme, P., Jollois, R. et Péroël, D. (2001).** L'aromathérapie exactement .in : *Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques*. Limoges: Roger Jollois.
- **Gamisans, J. et Jeanmonod, D. (1993).** *Catalogue des plantes vasculaires de la Corse. biosciences*. Edit, Jeanmonod D., Burdet H.M. Genève.
- **Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L. et Portugal, H. (2004).** Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research*, 18(12) : 990-995.
- **Gören, A.C., Topçu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Aydoğmuş, Z. et Pezzuto, J. M. (2002).** The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Z. Naturforsch*, 57 :(9-10) : 797-800.
- **Goullé, J.P.G. Pé pin, V. Dumestre-Toulet, C. Lacroix. (2004).** Botanic, chemistry and toxicological review of the hallucinogen solanacies: deadly nightshade, jimsonweed, henbane, mandrake. *Ann. Toxicologie. Analytique*, 16(1) :22-35.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Imelouane, B., Elbachiri, A., Ankit, M., Benzeid, H. et Khedid, K. (2009).** Physico-chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of eastern Moroccan *Lavandula dentata*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(2) : 113-118.
- **Kalemba, D. et Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10) : 813-829.
- **Kivçak, B. et Mert, T. (2002).** Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*, 73(3) : 242-243.
- **Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H. et Weis, N. (1989).** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3) : 119-128.
- **Lahlou, M. (2004).** Methods to study the phyto chemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy research*, 18(6) : 435-448.
- **Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. et Nychas, G.J. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3) : 453-462.
- **Li, R.C. (2000).** New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. *International journal of antimicrobial agents*, 13(4) : 229-235.
- **Lucchesi, M.E. (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Doctoral dissertation, chimie, Université de la Réunion.
- **Mahfouz, A.S. et Ottai, M.E. (2011).** Assessment of Genetic Variability for Some *Hyoscyamus* Species Using Biochemical and Molecular Markers. *J Apply Sic Res*, 7 : 1752-1759.
- **Mahmoudi, Y. (1982).** La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Doctorat dissertation, Blida. Pp 55-58.
- **Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Bagchi, D. et Preuss, H.G. (2001).** Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and cellular biochemistry*, 228: 111-117.
- **Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A. et Aubert, G. (2008).** Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in applied microbiology*, 47(3) : 167-173.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Moon, T., Cavanagh, H.M. et Wilkinson, J.M. (2007).** Antifungal activity of Australian grown *Lavandula* ssp. essential oils against *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Leptosphaeria maculans* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Essent. Oil Res*, 19(2) : 171-175.
- **Mohammedi, Z. et Atik, F. (2012).** Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*. *L.Nature & Technologie*. Pp 34-39.
- **Nour, M., Mastouri, M. et Nejma, M.B. (2005).** Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et bases moléculaires de la résistance. *pathologie biologie*, 53 (6) :334-340.
- **Oussalah, M., Caillet, S. et Lacroix, M. (2006).** Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(5) : 1046-1055.
- **Oussou, K. R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Dosso, M., N'Guessan, Y.T. et Koukoua, G. (2004).** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10) : 1081-1086.
- **Oussou, K.R., Yolou, S. F., Tue, Bi B., Kanko, C., Boti, J.B., Ahibo, C. (2010).** Etude Chimique Bio-Guidée de l'huile Essentielle de *Ocimum Gratissimum*. *journal casanova*, 40(1) :50-59.
- **Pariente L. (2001).** Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologiques. 2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris. 1643 p.
- **Poyart, C., Courvalain, P., Leclercq, R., Bingen, E. (2006).** Tétracyclines. In : *Antibiogramme*. 2ème Edition, Pp 325-334.
- **Pudersell, K. (2006).** *Tropane alkaloid production and riboflavine excretion in the field and tissue cultures of henbane*, Tartu University Press. 89p.
- **Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. et Hadioetomo, R.S. (1988).** *Dasar-dasar mikrobiologi*. Universitas Indonesia. Pp 469-509.
- **Quezel, P. et Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Ed C.N.R.S.* Tome I. 565 p.
- **Quézel, P., Santa, J. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : *Editions du Centre National de la recherche scientifique*. Pp 142-143.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M. et Tantaoui-Elaraki, A. (1993).** Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2) : 179-184.
- **Reynaud, J. (2002).** La flore du pharmacien. In : *solanacées*. Edition tec et doc. 200p.
- **Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M. et Coutinho, H.D.M. (2009).** Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*, 16(11) : 1052-1055.
- **Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M. E. et Vitali, C. (2010).** In vitro synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current medicinal chemistry*, 17(28) : 3289-3295.
- **Roux, D. (2008).** Conseil en aromathérapie. France : 2^e Edition. pro-Officina : Wolters Kluwer.
- **Scholar, E.M. et Pratt, W.B. (2000).** *The antimicrobial drugs*. Oxford University Press, USA.
- **Shin, S. et Kim, J.H. (2005).** In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean *Thymus* species against antibiotic-resistant pathogens. *Archives of pharmacal research*, 28(8) : 897-901.
- **Syberg, K., Elleby, A., Pedersen, H., Cedergreen, N. et Forbes, V.E. (2008).** Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3) : 428-436.
- **Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I. et Coulibaly, A. (2012).** Recherche des activités antifongiques et antibactériennes des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied biosciences*, 58 : 4234-4242.
- **Upson, T.M, Grayer, R.J., Greenham, J.R., Williams, C.A., Al-Ghamdi F. et Chen, F.H. (2000).** Leaf flavonoids assystematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem Syst Ecol*, 28: 991–1007.
- **Upson, T. et Andrews, S. (2004).** *The genus Lavandula*. Portland and Oregon, USA: Timber Press. 442p.
- **Valnet, J., Duraffourd, C.H., Duraffourd, P. et Cilapraz, J. (1978).** L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant Med Phytother*, 12 : 43-52.
- **Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M. et Tepe, B. (2003).** Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1) : 63-67.

- **Vaubourdolle, M. (2007).** Infectiologie. 3^e édition. *Wolters Kluwer SA*. France. 1037 p.
- **Viljoen, A.M., Denirci, B., Baser, K.H.C., Potgieter, C.J. et Edwards, T.J. (2006).** Micro distillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 72(1):99-104.
- **Wendakoon, C.N. et Sakaguchi, M. (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58(3) : 280-283.
- **Willem, J.P. (2004).** *Les huiles essentielles, médecine d'avenir*. 318p.
- **Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C. et Lim, S.H.E. (2014).** Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8 : 6-14.
- **Zengin, H. et Baysal, A.H. (2014).** Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*, 25(19) :17773-17798.

Résumé

Les plantes aromatiques synthétisent différents métabolites secondaires parmi lesquels on trouve les huiles essentielles, ces dernières peuvent être utilisées comme alternatives pour le traitement des maladies infectieuses étant donné que les antibiotiques montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants. Dans notre étude nous avons évalué le pouvoir antibactérien des huiles essentielles obtenues par la technique d'hydrodistillation de trois plantes à savoir *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas* et *Hyocyamus albus*. Les huiles essentielles extraites ont été testées sur cinq souches bactériennes à Gram positif à savoir *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* et à Gram négatif à savoir *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* et *Salmonella spp*. Les huiles essentielles ont été testées isolément puis combinées avec des antibiotiques et avec d'autres composants d'huile essentielle. La technique utilisée pour les tests antibactériens est celle de microdilution en milieu liquide aussi appelée technique de l'échiquier car elle permet de combiner différentes substances antibactériennes à la recherche d'un effet synergique ou même additif. Toutes les souches testées se sont révélées sensibles à toutes les huiles essentielles. Les concentrations minimales inhibitrices enregistrées (CMI) varient entre 0.332 mg/ml et 2.656 mg/ml, tandis que les concentrations minimales bactéricides (CMB) se trouvent entre 0.351 mg/ml et 10.62 mg/ml. Dix effets synergiques et treize effets additifs ont été obtenus entre les différents agents antibactériens. Des isobologrammes ont été tracés afin de confirmer les résultats obtenus.

Les mots clefs : *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas*, *Hyocyamus albus*, huiles essentielles, activité antibactérienne, méthode de l'échiquier, isobologramme.

Abstract

Different aromatic plants synthesize secondary metabolites as essential oils, they can be used as alternative for treatment of some infectious diseases specially when antibiotics became less effective against resistant microorganisms. In our study we have evaluated the antibacterial activity of some essential oils obtained by hydro distillation method, we used three plants *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas* and *Hyocyamus albus*. Essential oils were tested against five bacterial strains including Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* and Gram negative bacteria *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* and *Salmonella*. These essential oils were tested alone then combined with antibiotics and with other plant's compound. Antibacterial activity was determined by micro-dilution method, this technique allows to associate different antibacterial agents looking for synergistic effects or additive ones. All the bacterial strains tested turned sensitive to the three essential oils, Minimum inhibitory concentrations (MIC) vary between 0.332 mg/ml and 2.656 mg/ml, while minimum bactericidal concentrations (MBC) vary between 0.351 mg/ml and 10.62 mg/ml. Ten synergistic effects and thirteen additive effects were also obtained with different associations made between antibacterial agents. Isobologrammes were finally traced in order to confirm our results

Keywords : *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas*, *Hyocyamus albus*, essential oils, antibacterial activity, micro-dilution method, isobologram.

ملخص

تنتج النباتات العطرية مركبات ثانوية مثل الزيوت الأساسية، يمكن استخدام هذه الأخيرة كبديل لعلاج الأمراض المعدية خصوصا أن المضادات الحيوية قد أظهرت عدم فعاليتها ضد الكائنات الحية الدقيقة المقاومة.

قمنا خلال هذه الدراسة بتقييم النشاط المضاد للبكتيريا الأساسية التي تم الحصول عليها عن طريق التقطير بالبخار للزيوت حيث تم استعمال ثلاث نباتات عطرية وهي: *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas* و *Hyocyamus albus*, تم اختبار الزيوت الأساسية المستخلصة على خمسة سلالات بكتيرية ذات غرام موجب نذكر منها: *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis*, وذات غرام سالب نذكر: *Salmonella*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*. وتم اختبارها بصفة منعزلة ثم بعد دمجها بمركبات أخرى مثل المضادات الحيوية و عناصر مستخلصة من زيوت أساسية لنباتات أخرى.

الطريقة المستعملة في هذه الدراسة تتمثل في تقنية L'échiquier لأنها تسمح بإجراء مختلف التركيبات بهدف الحصول على تفاعل تكاملي أو أقصى، إتضح أن جميع السلالات البكتيرية المختبرة حساسة تجاه الزيوت الأساسية الثلاثة التراكيز المثبطة ذات الحد الأدنى قدرت في حدود 0.332 مغ/ملو 2.656 مغ/مل، وبينما تقع التراكيز ذات الحد الأدنى الهالكة للبكتيريا في حدود 0.351 مغ/ملو 10.62 مغ/مل.

من خلال النتائج تم الحصول على عشرة تفاعلات قصو بإضافة إلى ثلاثة عشر تفاعل تكاملي.

تم رسم الأشكال المدعوة les isobologrammes لتأكيد النتائج المتحصل عليها.

الكلمات الأساسية :

النشاط المضاد للبكتيريا، الزيوت الأساسية، *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas*, *Hyocyamus albus*, isobologramme، L'échiquier،