

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et la Vie
Département des Sciences Alimentaires

Memoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en contrôle de qualité et analyse

Thème

**Effet *in vitro* de l'association des huiles essentielles de *Salvia officinalis*,
Melaleuca alternifolia et deux composés majoritaires
sur les bactéries**

Préparé par :

**AMIROUCHE Radhia
BELKOLAI Fahima**

Membre de jury :

**Président : M^{me} BOULKBACHE
Promotrice : M^{me} OUKIL N.
Examinatrice : M^{elle} TOUATI N.
Examinatrice : M^{me} GUEMGHAR H.**

Année universitaire 2012/2013

Remerciements

Avant toute chose, on tient à remercier le Dieu le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience.

On tient à exprimer nos remerciements en premier lieu et tout particulièrement à notre promotrice docteur N. Ouqil pour l'accueil qu'elle nous a réservé au sein de son laboratoire de microbiologie, et qui a bien voulu diriger ce travail avec beaucoup de compétence et d'efficacité. On a eu le privilège de bénéficier de son enseignement, de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour nous un modèle.

On remercie vivement les membres de jury:

❖ *Madame Boukhabache (MCB)*

On est très honorée que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements et soyez assuré de notre profonde gratitude.

❖ *M^{elle} N. Touati (MAA)*

D'avoir bien voulu accepté de juger ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde sympathie.

❖ *Madame H. Guemghar (MAA)*

Pour participer au jury et d'évaluer ce travail.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de nos très vifs remerciements

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents que dieu les protège pour leurs soutien depuis toujours

Mon âme sœur : Fares

Mes frères : EL hacene et son épouse Soraya, Yacine, Lakhdar et Fahem

Mes sœurs : Naïma, Farida et son époux mokrane, Karima et son époux Meziane,

Souad et son époux sliman

Mes tantes et mes oncles : cousins et cousines

Mes très chers nièces et neveux surtout : Tinhinane, Yifithen, et mes petits princes

Saou et Gogo

Mon binôme et meilleur amie Rado

Madame N. Oukil et sa famille

Tous mes amis(es) : Lynda, Ouarda, Malha et à toutes mes copines de chambre

Mes collègues de la promotion de CQA pour les sympathiques moments qu'on a passé

ensemble

Fahima

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents que dieu les protège pour leurs soutien depuis toujours

Mes frères : Meziane et Karim

Mes sœurs : Nadjet et son époux Amirouche, Samra et son époux Nabil et Sabrina

Ma petite princesse Lina et mon petit prince Ghilas

Mes tantes et mes oncles : cousins et cousines

Mon binôme sœur et meilleur amie Mima

Smail que j'apprécie énormément

Madame N. Oukil et sa famille

Tous mes amis(es) : Lynda, Ouarda, Malha et à toutes mes copines de chambre

Mes collègues de la promotion de CQA pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble

Radia

Table des matières

Liste des figures	I
Liste des tableaux	II
Introduction.....	1

Partie théorique

Chapitre I

Monographie des plantes utilisées et propriétés d' α - pinène et d'eucalyptol (1,8 cinéole)

I-1) Généralités sur *Salvia officinalis*

1) Description botanique et répartition géographique.....	2
2) Classification botanique.....	2
3) Principaux constituants de <i>Salvia officinalis</i>	3
4) Propriétés thérapeutiques de <i>Salvia officinalis</i>	4

I-2) Généralités sur *Melaleuca alternifolia*

1) Description botanique et répartition géographique.....	5
2) Classification botanique.....	5
3) Composition chimique de l'huile essentielle de l'arbre à thé.....	5
4) Propriétés thérapeutiques de l'arbre à thé.....	6

I-3) Généralités sur l'eucalyptol	
1) Définition.....	7
2) Propriétés de l'eucalyptol.....	8
I-4) Généralités sur l'alpha-pinène	
1) Définition.....	8
2) Propriétés de l'α-pinène.....	8

Chapitre II

Association des antibiotiques

II-1) Définition des antibiotiques.....	9
II-2) Association des antibiotiques.....	9
II-3) Effets d'association des antibiotiques.....	10
II-4) Méthodes utilisées dans l'association des antibiotiques.....	10
II-4-1) Méthodes en point fixé.....	10
II-4-2) Méthode cinétique.....	13
II-5) Détermination de CMI et de CMB.....	14
5-1) Méthode par dilution en milieu gélosé.....	14
5-2) Méthode par dilution en milieu liquide.....	15
5-3) Méthode E-test.....	15

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I) Matériel	
I -1) Matériel végétal.....	17
I-2) Les souches bactériennes.....	18
II) Méthodes	
II-1) Extraction des huiles essentielles.....	18
II-2) Tests antibactériens.....	20
II-2-1) Préparation de concentrations d'huile essentielle et des composés majoritaires.....	20
II-3) Détermination de l'effet d'association des deux huiles essentielles, d'eucalyptol et de l' α -pinène.....	23

Résultats et discussion

I) Rendement en huile essentielle.....	25
II) Activité antibactérienne des huiles essentielles et les composés majoritaires étudiés et leurs associations.....	26
Conclusion.....	35
Références bibliographiques	

Annexes

Figure 1 : <i>Melaleuca alternifolia</i>	5
Figure 2 : Structure de 1, 8 cinéole.....	7
Figure 3 : Structure de l' α -pinène.....	8
Figure 4 : Mise en évidence de l'interaction entre deux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé.....	11
Figure 5 : Mise en évidence de l'interaction entre deux antibiotiques par la méthode de dilution en milieu liquide.....	13
Figure 6 : Mise en évidence de l'interaction entre deux antibiotiques par la méthode cinétique.....	14
Figure 7 : Illustration de la méthode E-Test	16
Figure 8 : <i>Salvia officinalis</i>	17
Figure 9 : Dispositif d'extraction.....	19
Figure 10 : Huile essentielle de la sauge.....	20
Figure 11 : Le rendement en huiles essentielle de <i>Salvia officinalis</i> originaire de Bejaia et dans quelques pays.....	25
Figure 12 : Comparaison de l'activité antibactérienne d'association des deux huiles essentielles (arbre à thé A, sauge S), d'eucalyptol (E) et d' α – pinènes (α) sur <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Figure 13 : Comparaison de l'activité antibactérienne d'association des deux huiles essentielles (arbre à thé A, sauge S), d'eucalyptol (E) et d' α – pinènes (α) sur <i>Acinetobacter</i>	33

Tableau I : Composition de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	4
Tableau II : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Melaleuca alternifolia</i>	6
Tableau III : Référence et classification des souches bactériennes utilisées	18
Tableau IV : Les concentrations de l'huile essentielle de la sauge obtenues à partir des différentes dilutions.....	21
Tableau V : Les concentrations de l'huile essentielle de l'arbre à thé obtenues à partir des différentes dilutions.....	21
Tableau VI : Les concentrations d'eucalyptol obtenues à partir des différentes dilutions.....	22
Tableau VII : Les concentrations de l' α - pinène obtenues à partir des différentes dilutions..	22
Tableau VIII : Représentation des effets d'association des huiles essentielles (FIC, FBC)....	26
Tableau IX : Représentation des résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sauge et de l'arbre à thé.....	27
Tableau X : Représentation des résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'arbre à thé et d'eucalyptol.....	29
Tableau XI : Représentation des résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sauge et d'eucalyptol.....	30
Tableau XII : Représentation des résultats de l'activité antibactérienne d'eucalyptol et de l' α - pinène.....	31
Tableau XIII : Représentation des résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'arbre à thé et de l' α - pinène.....	31

Introduction

Les vertus thérapeutiques des essences aromatiques sont connues depuis l'antiquité ; cependant l'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir des plantes aromatiques et médicinales n'a augmenté que durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement (Zhang et al, 2010).

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antibactériens (Bourkhiss et al, 2007. Magina et al, 2009), antifongiques (Moleyar et al, 1986. Soliman et al, 2002), antioxydants (Bouzouita et al, 2008) et insecticides (Erlor et al, 2006).

Dans la littérature, les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiaceae : Thym, Origan, Sarriette, Lavande, Menthe, Romarin, Sauge, Hysope. Cette activité est due principalement à ces composés majoritaires tels que le thymol, le carvacrol, 1,8-cinéole, p-cymène, α et β -pinène (Pellecuer et al, 1980).

Ce travail a pour objet l'extraction et l'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux espèces appartenant à deux familles botaniques différentes; la famille des Lamiaceae représentée par l'espèce *Salvia officinalis* et la famille des Myrtaceae représentée par l'espèce *Melaleuca alternifolia*, ainsi que deux composés majoritaires eucalyptol (1,8-cinéole) et α - pinène.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties. La première partie propose une synthèse bibliographique. Elle est divisée en deux chapitres. Le premier est consacré à la monographie des plantes étudiées et propriétés des composés majoritaires. Le second traite les méthodes d'association des antibiotiques. Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal, puis l'extraction des huiles essentielles et enfin, l'étude de leurs activité antibactérienne au moyen du test de l'échiquier, à fin de déterminer la nature de l'effet d'association des deux huiles essentielles, de 1,8 cinéole et d' α - pinène *in vitro*.

Partie théorique

Chapitre I

*Monographie des plantes utilisées et
propriétés d' α - pinène et d'eucalyptol (1, 8
cinéole)*

I-1) Généralités sur *Salvia officinalis*

1) Description botanique et répartition géographique

Il y a plusieurs centaines d'espèces de sauge dans le monde (environ 900 espèces); en Europe c'est la sauge officinale (ou grande sauge) qui est la plus utilisée comme plante médicinale (Walker et *al*, 2004).

La sauge officinale est une plante commune dans les pays du pourtour méditerranéen, elle affectionne les lieux ensoleillés, on la cultive par semis au printemps. Les plantes sont remplacées tous les 3 ou 4 ans et les feuilles sont récoltées en été.

La sauge est une plante très ramifiée, aux tiges de section carrée, à la base lignifiée mesure de 20 à 30 centimètres. La racine de la sauge est brunâtre et fibreuse. Les feuilles opposées, elliptiques, inférieures pétiolées, veloutées, oblongues, rugueuses, à bord dentelé réticulées, molles, à dessus blanchâtre, persistent l'hiver grâce au revêtement de poils laineux qui les protège. Les fleurs, bleu-rose lilas, visibles de mai à août, sont grandes, groupées à la base des feuilles supérieures, l'ensemble forme de grands épis. Commune en Europe, plus spécialement dans les régions méridionales, elle est cependant rare à l'état sauvage. Sa hauteur est de 50 à 60 cm (Maatoug, 1990).

2) Classification botanique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia officinalis*

Nom commun : la sauge, sauge des prairies, herbe sacrée (Brieskorn et *al*, 1971).

3) Principaux constituants de *Salvia officinalis*

- Huile essentielle ;
- Composés phénoliques dont l'acide rosmarinique ;
- Tanins et flavonoïdes ;
- Riche en œstrogènes (hormones féminines) ;
- Salvène (Teuscher *et al*, 2005).

❖ composition chimique de l'huile essentielle de la sauge

Plusieurs travaux récents ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* dans différentes régions de part et d'autre du bassin méditerranéen tel que, la Yougoslavie (Perry *et al* 1996, Putievsky *et al*, 1992), la Bulgarie (Tsankova *et al*, 1994), l'Italie (Place *et al*, 1995. Piccaglia *et al*, 1993), l'Égypte (Karawya *et al*, 1981) et le Maroc (Belkamel *et al*, 1990),... etc.

La composition chimique de l'huile essentielle de la sauge a été déterminée par la méthode chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG / SM), cette composition est représentée dans le tableau I.

Tableau I : Composition de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* (Wolter, 2007).

hydrocarbures terpéniques		Cétones	
Myrcène	0,3 à 3%	Camphre	4,1 à 27,5%
Limonène	trace à 7,6%	α -thujone	1,5 à 44,2%
Humulène	trace à 18,9%	β -thujone	1 à 36,7%
α -pinène	1,7 à 13,1%	Ester	
β -pinène	0,5 à 17,9%	Acetate de bornyl	0,1 à 3,5%
Camphène	1,1 à 10,3%	Alcools	
β -caryophyllène	trace à 9,4%	Linalol	trace à 1,8%
p-cymène	trace à 1,1%	Bornéol	0,7 à 6,2%
		Viridiflorol	0 à 9,9%
		Autres	
		1,8- cinéole	0,7 à 20,8%

4) Propriétés thérapeutiques de *Salvia officinalis*

Le nom scientifique de la sauge indique clairement l'importance de son rôle en phytothérapie: *Salvia* vient de *salvare* qui, en latin, signifie «guérir». Sa saveur est chaude, amère et astringente, elle agit contre les maux de gorge, les troubles de la digestion, elle est stimulante, tonique et stomachique. La sauge possède aussi à divers degrés des propriétés antispasmodiques, fébrifuges, antisudorales et emménagogues (action bénéfique sur les menstruations) (Duke et al, 2002).

L'huile essentielle de la sauge officinale est neurotoxique, pouvant provoquer des crises nerveuses rappelant l'épilepsie, ainsi que des vomissements. Le thujone et le camphre en sont responsables. Elle est par ailleurs bactéricide et elle est à éviter lors de la grossesse (risque de fausse couche) ou de l'allaitement (Jean-Michel, 2012).

I-2) Généralités sur *Melaleuca alternifolia*

1) Description botanique et répartition géographique

L'arbre à thé ou *Melaleuca alternifolia* se retrouve en Australie, Nouvelle-Zélande et d'autres espèces existent en Nouvelle-Guinée, Nouvelle-Calédonie et Malaisie. Les arbres poussent dans les forêts, les régions boisées, les zones peuplées d'arbustes et le long des marais. Leur nom scientifique vient du grec melas (noir) et leukos (blanc): en effet, l'écorce est foncée sur le tronc et les branches anciennes, alors qu'elle est blanche sur les jeunes rameaux.

L'arbre à thé est un arbuste ou arbrisseau d'aspect délicat, à petites feuilles linéaires persistantes et épineuses, à inflorescences en épis en forme de panaches blancs ou à fleurs jaunes ou pourpres (Tocaven, 2011).



Figure 1 : *Melaleuca alternifolia* (encyclopédie, Encarta 2009)

2) Classification botanique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Myrtales*

Famille : *Myrtaceae*

Genre : *Melaleuca*

Espèce : *Melaleuca alternifolia*

Nom commun : tea tree, arbre à thé, melaleuque (Maiden et *al*, 1924).

3) Composition chimique de l'huile essentielle de l'arbre à thé

La composition chimique de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* a été rapportée dans plusieurs études. La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse permet d'identifier et de quantifier chacune des molécules composant l'huile essentielle (tableau II).

Tableau II : Composition chimique de l'huile essentielle de l'arbre à thé (Doris, 1999).

Familles	Principaux constituants
Famille des Monoterpènes (45 à 50 %)	-39 à 41 % de terpinène-4-ol ; -6 à 8% d'α-terpinéol.
Famille des Monoterpènes (30 à 40 %)	-20 à 22 % de gammaterpinène ; -9 à 10 % d'α-terpinène ; -3 à 6 % d'α-pinène ; -2 à 4% de terpinolène, -2 % de para-cymène ; -1 % de limonène ; -< 1 % pour chacun des autres constituants suivants: α et β-phellandrène, myrcène, β-pinène, camphène et α-thuyène.
Famille des Sesquiterpènes (5 à 10 %)	-avec environ 1 % d'aromandrène ; -1 % de viridiflorène ; -1% de bicyclogermacrène ; -< 1 % de deltacadinène.
Famille des Sesquiterpènes (< 2 %)	-globulol ; - viriflorol.
Famille des oxydes monoterpéniques: (< 5 %)	-1,8-cinéole < 2,5 %

4) Propriétés thérapeutiques de l'arbre à thé

L'huile essentielle de l'arbre à thé est antibactérienne majeure à large spectre, antifongique, antivirale, immunomodulante, antiparasitaire cutanée et intestinale, décongestionnante veineuse et lymphatique, neurotonique radioprotectrice cutanée. Elle est utilisée dans le cas d'infections buccales (aphtoses, stomatites, abcès, gingivites, pyorrhées), infections O.R.L (Sinusites, otites, rhinopharyngites, angines, bronchites) ...etc (Morand, 1989).

Comme la plupart des huiles essentielles, l'huile de l'arbre à thé peut provoquer des irritations cutanées suite à ces trois composants (d-limonène, α -terpinène et aromandrène), elle est déconseillée durant la grossesse et l'allaitement. A part ces cas de réactions rapportées dues à un surdosage ou une allergie, d'autres contre-indications ou effets secondaires ne sont pas connus (Doris, 1999).

I-3) Généralités sur l'eucalyptol

1) Définition

En 1870, Boland et *al* ont identifié et attribué l'eucalyptol (Figure 2) nommé à la partie dominante d'essence d'*Eucalyptus globulus*. C'est un composé naturel organique incolore. C'est un éther cyclique et un monoterpène, il porte également toute une série d'autres noms équivalents : 1,8 cinéole, cinéol, cajeputol, 1,8- époxy-p-menthane.

L'eucalyptol est trouvé dans l'huile essentielle de certains eucalyptus (à des taux allant jusqu'à 90 %, par exemple chez l'*Eucalyptus polybractea*). Le romarin, l'armoise, l'absinthe, le laurier, la sauge et le basilic (Boland, 1991).

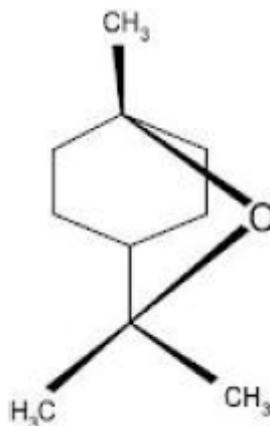


Figure 2: Structure de 1, 8 cinéole (Hajer et *al*, 2011).

2) Propriétés de l'eucalyptol

L'eucalyptol est très recherché pour son action antiseptique et cicatrisante. Antibiotique naturel, il est surtout utilisé pour soigner certaines maladies broncho – pulmonaires comme la grippe, la toux, la sinusite, la bronchite et la rhinopharyngite tandis qu'en dermatologie, on s'en sert pour traiter l'acné. Son action est remarquable au niveau du poumon par sécrétion d'un mucus antiseptique (Candy et *al*, 1977).

I-4) Généralités sur l' α -pinène

1) Définition

L' α -pinène (α -pinène) est un monoterpène bicyclique (Figure 3). Il a pour isomère le bêta-pinène, il est parmi les terpènes les plus abondants dans la nature, représenté à plus de 90 % dans la turpentine, l'huile essentielle issue de l'écorce de pin, et à plus de 12 % dans les huiles essentielles d'agrumes (Ohloff, 1994). Il est obtenu industriellement par distillation fractionnée de la turpentine (Krasnobajew, 1984). Il est présent dans de nombreuses plantes, comme la menthe, la lavande, la sauge et le gingembre. On la trouve également dans l'essence de térébenthine.

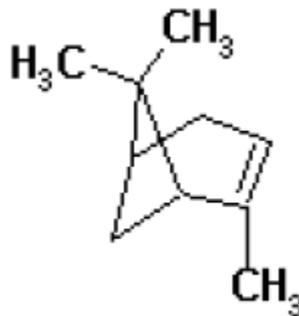


Figure 3 : Structure de l' α -pinène (Best et *al*, 1987).

IV-2) Propriétés de l' α -pinène

L' α -pinène est connu pour ses propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires, immunostimulantes (Perry et *al*, 2001), antioxydantes, bactéricides et fongicides (combattent les champignons pathogènes et les levures) (Andrews et *al*, 1980). Il peut aussi être prescrit en cas d'hypersécrétion bronchique.

Chapitre II

Association des antibiotiques

II-1) Définition des antibiotiques

L'antibiotique, du grec, anti signifie contre et bios, la vie. Tout composé chimique, élaboré par un micro-organisme ou produit par synthèse, dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des micro-organismes sensibles (Fleming, 1928).

II-2) Association des antibiotiques

La décision entre le recours à un seul antibiotique ou à une association de deux antibiotiques n'est pas anodine. Théoriquement, une association d'antibiotiques est instaurée pour plusieurs raisons :

- ❖ Obtenir une action synergique bactéricide ou au minimum une action additive :
La gravité de l'infection, qu'elle soit liée à un terrain particulièrement compromis, à un germe particulièrement résistant, à un site particulièrement difficile d'accès, peut nécessiter un renforcement et/ou une accélération de la vitesse bactéricidie ;
- ❖ Prévenir l'émergence de mutants résistants ;
Les facteurs favorisant l'émergence des bactéries résistantes sont :
 - **L'espèce bactérienne** (exemple : *Staphylococcus aureus*, *Entérobacter sp*, *Serratia sp*, *Citrobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Brucella sp* et *Mycobactéries sp*.)
 - **L'antibiotique utilisé** : certains antibiotiques, dont les mécanismes de résistances sont les plus souvent déterminés chromosomiques, sont l'objet d'une fréquence de mutation élevée vers la résistance.
- ❖ Elargir le spectre d'activité lorsqu'une molécule ne peut prétendre à elle seule agir sur les germes isolés ou seulement suspectés ;
 - En cas d'infections à germes multiples
 - En cas de traitement empirique chez certains patients, en attendant les résultats de cultures.
- ❖ Diminuer la durée d'un traitement anti-infectieux.
- ❖ Diminuer éventuellement les posologies; ce but est sans doute accessoire. Il est surtout recherché lorsque des effets toxiques existent (Auboyer et al, 1999).

II-3) Effets d'association des antibiotiques

L'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre effets principaux :

- Indifférence : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre ;
- Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- Synergie : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- Antagonisme : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément (Bricaire, 1997).

II-4) Méthodes utilisées dans l'association des antibiotiques

De nombreuses méthodes sont utilisées, certaines simples et d'autres compliquées. Les résultats sont parfois difficiles à interpréter voire discordants (Cattoir, 2006).

II-4-1) Méthodes en point fixé

a) Diffusion en gélose (disques ou bandelettes)

La méthode de diffusion en gélose consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après 18 heures d'incubation à 37°C, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque qui permet de mesurer un diamètre. Ce diamètre reflète la valeur de la CMI.

La comparaison de ce diamètre aux diamètres critiques publiés par le CASFIVI (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) permet de répondre qualitativement si la souche étudiée est sensible, intermédiaire ou résistante.

La figure 4 ci-dessous permet d'identifier les effets de l'association (Archambaud, 2009).

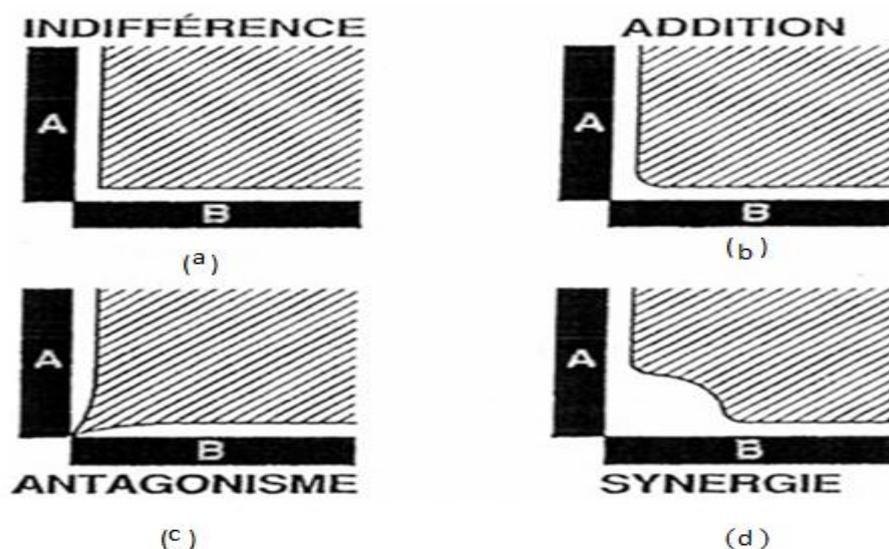


Figure 4: Mise en évidence de l'interaction entre deux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Denis et *al*, 2007).

b) Dilution en milieu liquide

Parmi les méthodes de dilutions, trois techniques sont les plus utilisées : L'échiquier, Le pouvoir bactériostatique et bactéricide de l'association et l'étude du pouvoir bactériostatique et bactéricide du sérum (Mainardi, 1997).

▪ Méthode de l'échiquier

La méthode de l'échiquier, où chaque concentration d'une gamme d'antibiotique est associée à chaque concentration d'une gamme d'un autre antibiotique, permet de calculer des coefficients de synergie : concentration fractionnelle inhibitrice (FIC) index et concentration fractionnelle bactéricide (FBC) index.

Le principe est le même à la détermination des CMI (concentration minimale inhibitrice) en milieu liquide mais les concentrations d'antibiotiques sont associées entre elles deux à deux selon un schéma carré en microplaques. Après 18 heures d'incubation à 37 °C, la valeur de l'association est mesurée grâce au FIC dans les tubes où il n'y a pas de culture visible (Denis et *al*, 2007).

$$\text{FIC index} = \frac{\text{CMI}_{A/B}}{\text{CMI}_A} + \frac{\text{CMI}_{B/A}}{\text{CMI}_B}$$

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice : plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique (Helander et *al*, 1998).

CMI_{A/B} : CMI de l'antibiotique A en présence de l'antibiotique B.

CMI_{B/A} : CMI de l'antibiotique B en présence de l'antibiotique A.

L'effet antibactérien est apprécié comme suit :

- L'effet synergique est défini par un FIC index $\leq 0,5$;
- L'effet d'addition est défini par un $0,5 < \text{FIC index} \leq 1$;
- L'effet d'indifférence est défini par un $1 < \text{FIC index} \leq 2$;
- L'effet d'antagonisme est défini par un FIC index > 2 .

Dans tous les tubes où il n'y a pas de culture visible, il est possible de pratiquer un repiquage sur gélose à l'aide d'une anse calibrée et d'énumérer les colonies. Comparer ensuite cette numération à celle de l'inoculum de départ faite le premier jour (comme pour la détermination de la CMB). Il est possible de calculer alors un FBC index (Denis et *al*, 2007).

$$\text{FBC index} = \frac{\text{CMB}_{A/B}}{\text{CMB}_A} + \frac{\text{CMB}_{B/A}}{\text{CMB}_B}$$

Cependant le caractère parfois non continu de l'effet bactéricide (phénomène de palier ou de rebond) rend difficile l'interprétation du FBC index. Il est plus adapté de comparer le nombre de survivants de l'association par rapport à celui obtenu pour l'antibiotique le plus actif pris isolément (Denis et *al*, 2007).

CMB : Concentration Minimale Bactéricide : la plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique (Juliano et al, 2000. Helander et al, 1998. Ultee et al, 2002).

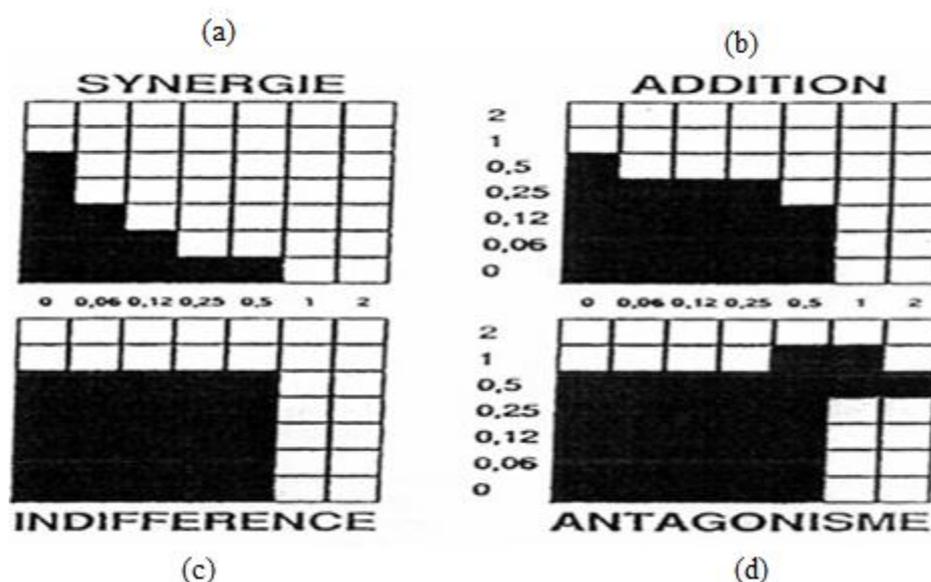


Figure 5: Mise en évidence de l'interaction entre deux antibiotiques par la méthode de dilution en milieu liquide (Cattoir, 2006).

II-4-2) Méthode cinétique

Elle permet d'explorer dans le temps le devenir d'une population bactérienne (vitesse de bactéricidie) en présence de plusieurs concentrations d'antibiotiques utilisées seules ou en association. La synergie se définit par un pourcentage de survivants 100 fois plus faible ($-2 \log 10$) en présence de l'association par rapport à l'antibiotique le plus actif, et l'antagonisme par un pourcentage de survivants 100 fois plus grand (Figure 6). Cette méthode permet d'étudier la phase précoce de bactéricidie appréciant ainsi la vitesse de bactéricidie et la phase tardive qui explore l'effet de l'association sur le phénomène de croissance bactérienne en particulier l'émergence de mutants résistants (Euzéby, 2001).

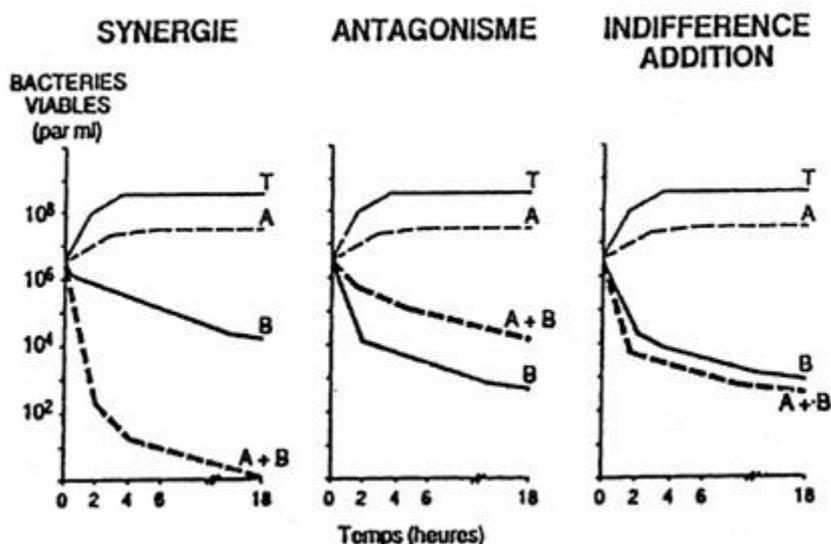


Figure 6 : Mise en évidence de l'interaction entre deux antibiotiques par la méthode cinétique (Archambaud, 2009).

II-5) Détermination de CMI et de CMB

La détermination des CMI avec la méthode par dilution est celle de référence. Elle peut être réalisée en milieu liquide ou solide. Il est prudent d'introduire des souches de références comme contrôles à chaque série de tests (Eloff, 1998).

5-1) Méthode par dilution en milieu gélosé

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). elle nécessite l'incorporation de chaque concentration d'antibiotique dans le milieu liquéfié (à 45°C) et l'utilisation d'un ensemeur à tiges multiples (dérivé de l'appareil de Steers) délivrant 1 à 5 µl de l'inoculum de chaque bactérie étudiée (10^4 bactéries par spot). La CMI est définie comme la concentration d'antibiotique ne laissant subsister aucune, ou au plus, 1 à 3 colonies après 18 heures d'incubation à 37°C.

Cette technique, considérée comme la méthode de référence pour la détermination des CMI, présente l'avantage de pouvoir tester un grand nombre de souches bactériennes vis-à-

vis d'une concentration d'antibiotique. Elle est cependant difficilement utilisable en routine et elle ne permet pas la détermination des CMB.

5-2) Méthode par dilution en milieu liquide

La méthode par dilution en bouillon Mueller Hinton peut être réalisée en tubes (macro-méthode) ou en plaques (micro-méthode).

En pratique, on distribue en premier temps dans une série de tubes à hémolyse (ou dans les cupules d'une microplaque), sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotiques (en progression géométrique de 2). Puis on ajoute, dans un second temps, dans chacun des tubes (cupules), sous un même volume, des bactéries en phase exponentielle de croissance de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^8 bactéries par ml.

La CMB peut être déterminée en repiquant (par la méthode des stries ou par étalement en râteau sur un milieu approprié) les tubes sans croissance bactérienne visible, et en calculant le pourcentage de germes survivants par rapport à une gamme étalon préalablement établie en parallèle. La gamme étalon (ou témoin de dénombrement) est réalisée en diluant de 10 en 10 l'inoculum de départ ; 0,1 ml de chaque dilution est prélevée à l'anse calibrée et déposée sous forme d'une strie de 5 cm sur une boîte de gélose. Un autre procédé de dénombrement consiste à étaler en râteau 0,1 ml de chaque dilution sur une gélose. Les boîtes sont incubées 18 heures à 37°C.

Plusieurs facteurs peuvent entraîner des variations de la CMB : composition du milieu de culture, taille de l'inoculum bactérien, phase de croissance des bactéries (stationnaire ou exponentielle), agitation et transport des antibiotiques (Garnière, 2004).

5-3) Méthode E-test

La méthode E-test n'est pas, à la différence des deux précédentes, une technique par dilution, mais une méthode par diffusion en milieu gélosé. Des bandelettes imprégnées dans un gradient d'antibiotique, sont déposées sur une gélose préalablementensemencée par une culture bactérienne calibrée et en croissance exponentielle. Après 18 heures d'incubation à 37°C, on observe une plage d'inhibition en forme de poire dont l'intersection avec la bandelette graduée permet une lecture directe de la CMI.

Cette méthode simple, rapide et bien corrélée avec la méthode de référence, est actuellement réalisable pour de nombreux antibiotiques.

Néanmoins, le cout élevé de l'E-test en limite son usage. Il peut être utilisé à chaque fois qu'il est recommandé pour mesurer rapidement la CMI d'un antibiotique de manière précise (par exemple, pour les souches des pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline G, ou encore pour les souches de *Staphylococcus* présentant un diamètre inférieur à 17 mm aux glycopeptides) (Burnichon, 2003).



Figure 7 : Illustration de la méthode E-Test (Johan et *al*, 2005).

Partie pratique

*Matériel et
méthodes*

D) Matériel et méthodes

Notre étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales à travers la détermination de l'effet *in vitro* de l'association de deux huiles essentielles, de l'alpha pinène et l'eucalyptol sur les bactéries.

I-1) Matériel végétal

Notre étude a porté sur deux espèces, de deux plantes de la famille des lamiaceae et des myrtaceae qui sont respectivement : « *Salvia officinalis* » et « *Melaleuca alternifolia* ». Ainsi que deux autres composés majoritaires issus d'huile essentielle qui sont « α -pinène » et « eucalyptol ».



Figure 8: *Salvia officinalis*

Les échantillons de la sauge ont été récoltés pendant la période de floraison, dans la région d'Amizour située à 30 Km de Bejaia au mois de Mars. L'identification est effectuée par un botaniste au laboratoire d'écologie de l'université de Bejaia.

L'huile essentielle de l'arbre à thé, α -pinène et eucalyptol ont été utilisées sous forme liquide.

L'huile essentielle de l'arbre à thé (OmniSan, Teebaum Öl, 30ml e. lot-Nr: 42281.D12107 Berlin).

α -pinène (N° du lot : 101248651. Zepperlinstra. 7.76185. Karlstruhe, Germany. M = 136g/mol). Sa formule chimique : C₁₀H₁₆.

Eucalyptol (cas : 70-82-6-UN 3271.N° UF : 207-431-5. Lot: 10153825. Avocado Germany). Sa formule chimique: C₁₀H₁₈O.

I-2) Les souches bactériennes

L'étude a été réalisée sur deux souches bactériennes appartenant à la collection ATCC (American Type Culture Collection) : *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Acinetobacter* (Gram négatif) qui ont été fournies par le laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Bejaia (Tableau III).

Tableau III : Référence et classification des souches bactériennes utilisées

Souches bactériennes	Référence	Famille	Resistance aux antibiotiques
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	Micrococcaceae	Méthicilline
<i>Acinetobacter</i>	ATCC949(S)	Moraxellaceae	Pénicilline

II) Méthodes

II-1) Extraction des huiles essentielles

La partie utilisée dans l'extraction des huiles essentielles de la sauge sont les feuilles et les boutons floraux (partie aérienne) l'extraction a été effectuée par l'hydrodistillation (figure 9) à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928).

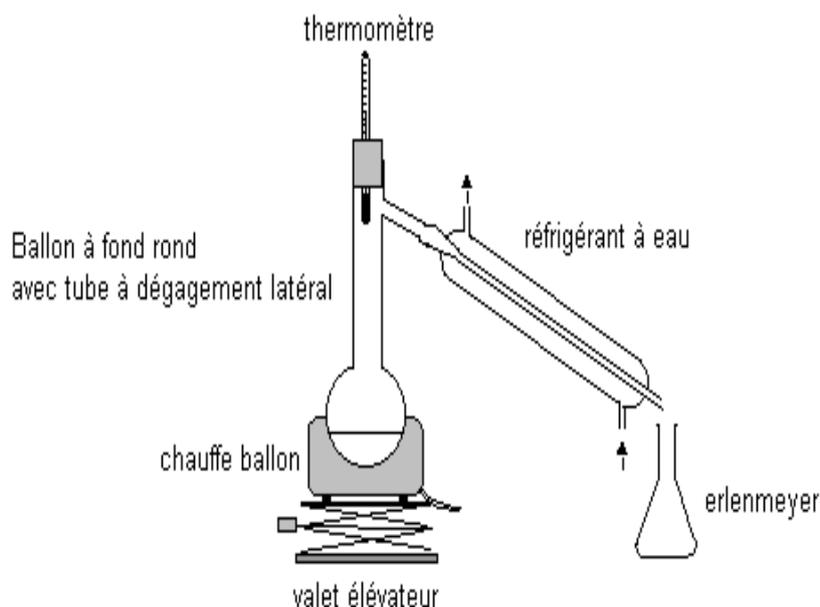


Figure 9: Dispositif d'extraction (Clevenger, 1928).

Le dispositif d'extraction est constitué de :

- Un ballon de capacité de deux litres ;
- Un réfrigérant ;
- Une ampoule à décanter cinq cent millilitre.

La technique d'hydrodistillation consiste à mettre dans un ballon, un mélange d'eau distillé (250 ml) et de la sauge (50 g) dont on souhaite extraire l'huile essentielle, on laisse macérer pendant 24 heures. Le mélange est porté à ébullition pendant deux heures. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, celles qui sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient (Ganou, 2001).

Le récipient contient à ce moment deux phases: une phase aqueuse et une phase organique odorante appelée huile essentielle. On sépare ces deux phases par décantation et on récupère l'huile essentielle.



Figure 10 : Huile essentielle de la sauge

Le rendement d'extraction des huiles essentielles est exprimé par le rapport de poids d'huile essentielle extraite sur le poids sec de la matière végétale (Williams et Lusunzi, 1994).

$$Rd = \frac{\text{Le poids d'huile essentielle}}{\text{Le poids sec de la matière végétale}}$$

$$Rd \% = \frac{P}{P_0} * 100$$

P : poids d'huile essentielle.

P₀ : poids sec de la matière végétale.

II-2) Tests antibactériens

II-2-1) Préparation de concentrations d'huile essentielle et des composés majoritaires

❖ Préparation de l'émulsion

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB) des huiles essentielles et les composés majoritaires ont été déterminées selon la méthode rapportée par Remmal et al, Satrani et al. Du fait de la non miscibilité de l'huile essentielle à l'eau et donc

aux milieux de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/huile essentielle.

L'huile essentielle est émulsionnée en ajoutant 100 µl d'huile essentielle à 900 µl d'une solution à 0,2 % d'agar (Remmal et al.1993, Satrani et al.2001).

❖ Préparation des dilutions des deux huiles essentielles, d'eucalyptol et d' α - pinène

Les différentes dilutions des deux huiles essentielles, d' α -pinène et d'eucalyptol ont été préparées dans la solution d'agar à 0,2 % pour obtenir les différentes concentrations (tableaux IV..... VII).

Tableau IV : Concentrations de l'huile essentielle de la sauge obtenues à partir des différentes dilutions

Dilution	Concentration (mg /ml)	Dilution	Concentration (mg /ml)
SM	60	1/64	0,937
1/2	30	1/128	0,468
1/4	15	1/256	0,234
1/8	7,5	1/512	0,117
1/16	3,75	1/1024	0,058
1/32	1,875	/	/

Tableau V : Concentrations de l'huile essentielle de l'arbre à thé obtenues à partir des différentes dilutions

Dilution	Concentration (mg /ml)	Dilution	Concentration (mg /ml)
SM	106	1/64	1,656
1/2	53	1/128	0,828
1/4	26,5	1/256	0,414
1/8	13,25	1/512	0,207
1/16	6,625	1/1024	0,103
1/32	3,312	/	/

Tableau VI : Concentrations d'eucalyptol obtenues à partir des différentes dilutions

Dilution	Concentration (mg /ml)	Dilution	Concentration (mg /ml)
SM	125	1/64	1,95
1/2	62,5	1/128	0,97
1/4	31,25	1/256	0,48
1/8	15,62	1/512	0,24
1/16	7,81	1/1024	0,12
1/32	3,9	/	/

Tableau VII : Concentrations de l' α - pinène obtenues à partir des différentes dilutions

Dilution	Concentration (mg /ml)	Dilution	Concentration (mg /ml)
SM	111	1/64	1,73
1/2	55,5	1/128	0,86
1/4	27,75	1/256	0,43
1/8	13,87	1/512	0,21
1/16	6,93	1/1024	0,1
1/32	3,46	/	/

❖ Préparation de la suspension bactérienne

1- Repiquage sur milieu liquide

En vue d'obtention d'un nombre de bactéries précis pour les analyses, il est primordial de les repiquer, sur les milieux BCP et Chapman, ces milieux sélectifs, respectivement, favorisent la culture bactérienne d'*Acinetobacter* et de *Staphylococcus aureus* (Guillaume 2004).

2- Standardisation des inocula bactériens

La standardisation est effectuée dans le but d'obtenir une concentration d'environ 10^7 à 10^8 UFC/ml et d'avoir une charge homogène des souches utilisées pour pouvoir étudier l'effet antibactérien des deux huiles essentielles et les deux composés majoritaires.

Après 18 heures d'incubation de la culture bactérienne sur milieu sélectif, on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. On décharge l'anse dans 5 à 9 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mac Farland ou à une DO de 0,08 à 0,1. Donc à une concentration qui égale à 10^7 - 10^8 UFC/ml lue à 625 nm à l'aide d'un spectromètre. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort (Cabbert *et al*, 1986 ; Courvalin *et al*, 1991).

Après la standardisation on a pris à partir d'une culture bactérienne de *Staphylococcus aureus* 11 colonies et 09 colonies à partir d'une culture bactérienne d'*Acinetobacter*.

II-3) Détermination de l'effet d'association des deux huiles essentielles, d'eucalyptol et de l' α - pinène

La méthode utilisée pour la détermination de la CMI et CMB dans l'association des huiles essentielles et les composés majoritaires est celle de l'échiquier. Elle est réalisée sur des microplaques (microméthode), qui contiennent 96 puis de 300 μ l (Denis *et al*, 2007).

➤ Détermination de CMI et CMB de la sauge officinalis, de l'arbre à thé, d'eucalyptol et de l' α - pinène :

Dans chaque cupule (sur l'axe des abscisses ou des ordonnées) on introduit :

- 60 μ l de bouillon Mueller Hinton (scharleau 02- 136. barcelona (spain). made in European Union) ;
- 60 μ l de la suspension bactérienne ;
- 60 μ l de dilution d'huile essentielle (ou de composé majoritaire).

➤ Détermination de l'effet d'association des huiles essentielles et les composés majoritaires:

Les associations effectuées sont : « sauge, arbre a thé », « sauge, eucalyptol », «arbre à thé, eucalyptol », « eucalyptol, α - pinène », « arbre a thé, α - pinène ».

Dans le reste des cupules on met :

- 60 µl de bouillon Mueller Hinton ;
- 60 µl de la suspension bactérienne ;
- 60 µl de dilution de 1^{ère} huile essentielle (ou composé majoritaire);
- 60 µl de dilution de 2^{ème} huile essentielle (ou composé majoritaire).

Après l'incubation des microplaques à 37°C pendant 18 heures, on effectue un repiquage sur les cupules où il n'y a pas de trouble et on l'ensemence dans des tubes de bouillon nutritif ou dans des boîtes de Pétri après avoir coulé la gélose nutritive, pour vérifier si l'effet des huiles essentielles et les composés majoritaires utilisées est bactéricide ou bactériostatique ainsi que l'effet de leurs association.

Résultats et discussion

D) Rendement en huile essentielle

Le rendement obtenu en huile essentielle de la sauge récoltée dans la région d'Amizour est de 0,98 %, qui est supérieur au rendement en huile essentielle de *Salvia officinalis* récoltée dans la région de Ghardaïa (0,52 %).

En effet, Chalchat et *al* en 1998, ont montré que le rendement d'extraction des huiles essentielles de *Salvia officinalis* obtenu par hydrodistillation pendant quatre heures dans un appareil Clevenger est en fonction de l'origine de la plante : France (2,05%), Hongrie (2,50 %), Portugal (2,90 %), Roumanie (2,30 %).

Par contre, le rendement obtenu par Matelic en 2001, est de 1,42 % par hydrodistillation, de 1,39 % par extraction à la vapeur de pentane et de 1,40% par extraction à la vapeur d'éther.

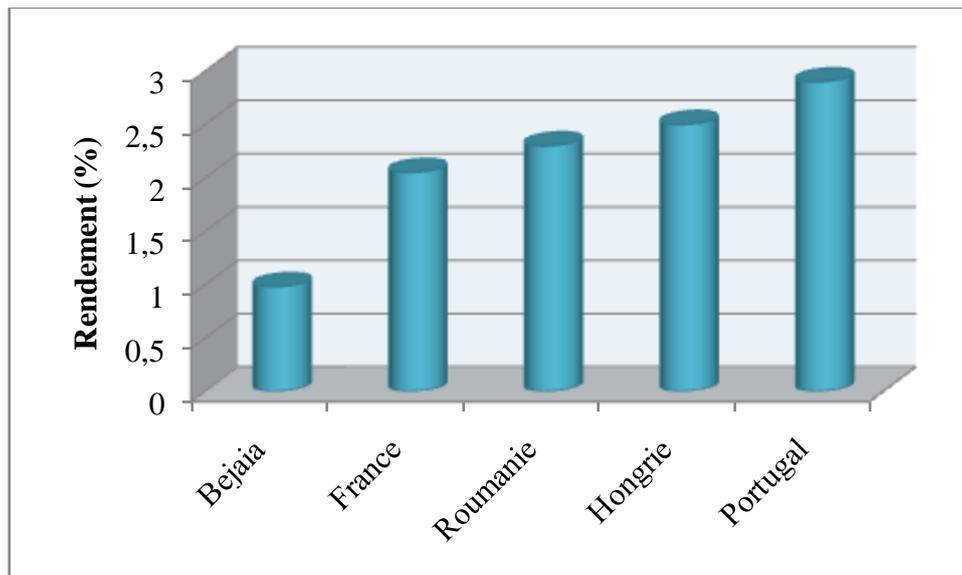


Figure 11: Le rendement en huile essentielle de *Salvia officinalis* originaire de Bejaia et dans quelques pays

Cette variation dans le rendement peut être attribuée non seulement à l'origine de la plante et à la technique d'extraction mais également à la période de la récolte de la matière végétale, de cycle végétatif et de la nature de l'organe végétal (Fellah, 2001).

Par exemple, une huile essentielle de Menthe ne présente pas la même composition selon quelle soit extraite à partir des plantes récoltées le matin, au milieu ou en fin de journée.

Ainsi le taux de thujone de *Salvia officinalis* variété *dalmate* est de 26 % pour une récolte de printemps et de 51 % pour une récolte d'automne (Laouer, 2004).

II) Activité antibactérienne des huiles essentielles et des composés majoritaires étudiés et leurs associations

Les huiles essentielles sont reconnues par leurs composants naturels, comme les monoterpènes, diterpènes et les hydrocarbures avec des groupes fonctionnels divers. Dans les années 1990, Muanza et ses collaborateurs ont recherché des extraits de plantes potentiellement bioactifs contre les bactéries et les moisissures (Muanza, 1994 et Muanza, 1995). Depuis, beaucoup d'autres chercheurs ont rapporté l'effet antimicrobien (Sivropoulou et al. 1995, Sivropoulou et al. 1997, Cowan, 1999, Mau, 2001, Hoffman, 2004) et antifongique (Muller et al. 1995; Adam et al. 1998; Moretti et al. 1998; Deferera et al. 2000, Sridhar et al. 2003; Rakotonirainy and Lavedrine, 2005) des huiles essentielles dans l'application agroalimentaire, la recherche pharmaceutique et dans d'autres domaines. Plusieurs composés sont souvent cités comme responsables des propriétés antiseptiques des huiles essentielles: le thymol, le carvacrol, le cinnamaldéhyde, l'eugénol, le 1,8-cinéole, le camphre et les thujones (Hubert, 2008).

Les effets d'association des huiles essentielles, le FIC et le FBC sont illustrés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Représentation des effets d'association des huiles essentielles (FIC, FBC) d'après Denis et al, 2007

Effet d'association des huiles essentielles	FIC ou FBC	Les équations
Synergie	$\leq 0,5$	$\text{FIC index} = \frac{\text{CMIA/B}}{\text{CMIA}} + \frac{\text{CMIB/A}}{\text{CMIB}}$ $\text{FBC index} = \frac{\text{CMBA/B}}{\text{CMBA}} + \frac{\text{CMBB/A}}{\text{CMBB}}$
Addition	$0,5 < \text{FIC index} \leq 1$	
Indifférence	$1 < \text{FIC index} \leq 2$	
Antagonisme	> 2	

Pour les huiles essentielles de *Salvia officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, α - pinène et eucalyptol, les résultats de l'activité antibactérienne sont résumés dans les tableaux (IX...XIV)

Tableau IX : Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sauge et de l'arbre à thé

Souches bactériennes	CMB d'HE de la sauge officinale (mg/ml)	CMB d'HE de l'arbre à thé (mg/ml)	FBC index (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	30	13,25	0,5
<i>Acinetobacter</i>	30	13,25	0,53

Ce test a montré que la concentration de 30 mg /ml de l'huile essentielle de la sauge a été suffisante pour arrêter la croissance de *Staphylococcus aureus* (Gram positif) du même qu'*Acinetobacter* (Gram négatif).

L'association de ces deux huiles essentielles montre un effet synergique (FBC index = 0,5 \leq 0,5) contre *Staphylococcus aureus* et un effet d'addition (0,5 \leq FIC index = 0,53 \leq 1) contre *Acinetobacter*.

La présence d'une teneur importante d'hydrocarbures terpéniques (camphène 1,1-10,3 %, α - pinène 1,7- 13,1 %, β - pinène 0,5-17,9 % et 1,8-cinéole 0,7-20,8 %) dans l'huile essentielle de *Salvia officinalis* peut être responsable de son activité prononcée contre *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter*. Des études ont été réalisées par Angioni et al sur les huiles essentielles des feuilles de *Juniperus oxycedrus* ont montré qu'elle présente une bonne activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*. Cette huile essentielle est caractérisée par l'abondance de l' α -pinène (environ 86 %).

En 2001, Miladinovic et al ont mis en évidence le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Salvia officinalis*. Les résultats ont montré que les dilutions d'huile essentielle aux 1/50 et 1/100 sont très actives sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis* et *Aspergillus niger*. Cette activité a été attribuée à l' α -thujone et au camphre.

En 2000, Martin et *al* ont rapporté que l'activité observée contre les bactéries étudiées au cours de leurs travaux sur l'huile essentielle de *Croton stellulifer* est attribuée particulièrement à la présence de l' α -pinène parmi les composés majoritaires de cette essence. Le biotest réalisé par Aligiani et *al*, (2001) sur l'huile essentielle de *Sideritis sipylea* (contenant comme constituant principal l' α -pinène 35,20 %) a montré qu'elle possède une grande activité contre les microorganismes testés.

Ainsi les résultats obtenus par Dorman, (2000), Oussalah, (2007) ont démontré que *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus affectée par les monoterpènes et les cétones comme les thujones.

L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* présente, *in vitro*, une bonne activité bactéricide *vis-à-vis* les bactéries testées, cela est due à sa composition riche en monoterpinoles (39-41 % de terpinène -4-ol) et monoterpènes (20-22 % de gamma terpinène) (Cox et *al*, 2000).

L'étude faite par Swords et Hunter, (1978) sur *Melaleuca alternifolia* a montrée que les principaux composants : terpinen-4-ol, terpinène, 1,8-cinéole et le p-cymène sont certainement responsables de l'activité bactériostatique notable *vis-à-vis* de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *E.coli* et une activité fongistatique notable *vis-à-vis* de *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.

Par contre l'étude rapportée par Doris en 1999, a montré que l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* a une activité bactéricide contre les bactéries : *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* qui est due principalement à son profil chimique.

Cette activité antibactérienne de ces deux huiles essentielles pourrait être expliquée par l'interaction moléculaire des groupements fonctionnels de leurs composants avec la paroi des bactéries ce qui provoque de profondes lésions. On peut conclure donc que cette activité peut être le résultat d'un effet synergique entre plusieurs composés de ces huiles essentielles (Felice et *al*, 2004)

Tableau X : Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'arbre à thé et d'eucalyptol

Souche bactérienne	CMB d'eucalyptol (mg/ml)	CMB d'HE de l'arbre à thé (mg/ml)	FBC index (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	31,25	13,25	0,56
Souche bactérienne	CMI d'eucalyptol (mg/ml)	CMI d'HE de l'arbre à thé (mg/ml)	FIC index (mg/ml)
<i>Acinetobacter</i>	31,25	6,625	1,06

L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* en association avec l'eucalyptol (1,8 cinéole) présente, *in vitro*, une bonne activité inhibitrice *vis-à-vis* les bactéries testées. Cependant, ces bactéries n'ont pas manifesté la même sensibilité *vis-à-vis* de l'huile essentielle et l'eucalyptol. La concentration de 31,25 mg/ml d'eucalyptol a été suffisante pour arrêter la croissance de *Staphylococcus aureus* et inhiber la croissance d'*Acinetobacter*.

En contre partie, pour *Staphylococcus aureus*, la concentration de 13,25 mg/ml a été suffisante pour arrêter sa croissance qui s'est montrée la plus vulnérable à l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*, alors qu'*Acinetobacter* a été inhibé à partir de la concentration minimale de 6.625 mg/ml.

L'effet d'association de l'huile essentielle de l'arbre à thé avec l'eucalyptol montre un effet d'addition ($0,5 \leq \text{FBC index} = 0,56 \leq 1$) contre *Staphylococcus aureus* et un effet d'indifférence ($1 \leq \text{FIC index} = 1,06 \leq 2$) contre *Acinetobacter*.

Des études rapportées par Juergens et *al*, 1998 et Pattnaick et *al*, 1997 ont montré l'effet inhibiteur et l'activité antimicrobienne de l'eucalyptol, ce qui explique les résultats obtenus, *Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité plus élevée qu'*Acinetobacter*.

En 1997, Pattnaick et *al* ont testé l'activité antimicrobienne de cinq constituants des huiles essentielles; le cinéole, le citral, le géraniol, le linalol et le menthol sur 18 bactéries (Gram positif et Gram négatif) et 12 champignons (3 levures et 9 mycètes). Le linalol était le plus efficace il a inhibé 17 bactéries, suivi du cinéole et du géraniol (chacun a inhibé 16 bactéries), le menthol et le citral ont inhibé 15 et 14 bactéries respectivement.

Tableau XI : Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sauge et d'eucalyptol

Souches bactériennes	CMI d'eucalyptol (mg/ml)	CMI d'HE de la sauge (mg/ml)	FIC index (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	62,5	60	0,224
<i>Acinetobacter</i>	31,25	60	0,55

En ce qui concerne l'huile essentielle de *Salvia officinalis* dans ce test, elle présente une faible activité *vis-à-vis* les souches utilisées (les CMI sont déterminées à partir de la solution mère), cela peut être attribué à sa composition cétonique (Camphre 4,1 à 27,5%, α -thujone 1,5 à 44,2%, β -thujone 1 à 36,7%).

Alors que l'eucalyptol, présente une activité moyenne contre ces deux bactéries dont il a inhibé la croissance de ces dernières à une concentration de 62,5 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* et de 31,25 mg/ml pour *Acinetobacter*.

L'effet d'association de l'huile essentielle de la sauge avec l'eucalyptol montre un effet synergique (FIC index = $0,22 \leq 0,5$) contre *Staphylococcus aureus* et un effet d'addition ($0,5 \leq \text{FIC index} = 0,55 \leq 1$) contre *Acinetobacter*.

En 1999, Hammer et *al* ont effectué une étude qui portait sur l'activité antimicrobienne de 47 huiles essentielles contre 10 microorganismes dont une levure (*Candida albicans*), tous les microorganismes sont inhibés par les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* et de *Pimenta racemosa* à des concentrations inférieures ou égales à 2 % par contre, ces microorganismes ne sont pas inhibés par l'huile essentielle de *Salvia officinalis* à la concentration de 2 %.

L'action relative des thujones et d'eucalyptol (1,8-cinéole) a été associée à leur basse hydrosolubilité et la capacité de former des liaisons hydrogènes, ce qui limite leur entrée dans les bactéries à Gram négatif qui possèdent des voies hydrophobes inopérants dans la membrane externe (Faleiro, 2003).

Tableau XII : Résultats de l'activité antibactérienne d'eucalyptol et de l' α - pinène

Souches bactériennes	CMI d'eucalyptol (mg/ml)	CMI de l' α - pinène (mg/ml)	FIC index (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	62,5	111	1,03
<i>Acinetobacter</i>	62,5	111	2

Tableau XIII : Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'arbre à thé et de l' α - pinène

Souches bactériennes	CMI d'HE de l'arbre à thé (mg/ml)	CMI de l' α - pinène (mg/ml)	FIC index (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	6,625	111	1,24
<i>Acinetobacter</i>	13,25	111	1,12

A partir des résultats représentés dans les tableaux (XII, XIII) ci-dessus, α - pinène a une activité faible contre les bactéries, donc, il est inefficace alors que Magwa et al, (2006), Cha et al, (2007) démontrent le contraire.

L'effet d'association de l' α -pinène avec l'eucalyptol montre un effet d'indifférence ($1 \leq \text{FIC index} = 1,03 \leq 2$) contre *Staphylococcus aureus* et contre *Acinetobacter* ($1 \leq \text{FIC index} = 2 \leq 2$).

L'effet d'association de l' α -pinène avec l'huile essentielle de l'arbre à thé montre un effet d'indifférence ($1 \leq \text{FIC index} = 1,24 \leq 2$) contre *Staphylococcus aureus* et contre *Acinetobacter* ($1 \leq \text{FIC index} = 1,12 \leq 2$).

Les effets des α - pinènes rapportés dans la littérature scientifique varient avec la composition globale des substances accompagnatrices, notamment les monoterpènes et les sesquiterpènes. Les recherches scientifiques portent généralement sur une huile essentielle complète plutôt que sur ses composants, parce que, bien évidemment, c'est un produit entier qui est libéré dans le biotope et les plantes créent une famille de terpènes plutôt qu'une seule

espèce chimique. De plus, l'effet biologique est souvent du à une synergie d'action entre les différents composants de la substance active (Sonboli et *al*, 2006). Ceci explique les nombreuses contradictions observées dans les différentes publications. Par exemple, les α -pinènes sont les composants majoritaires de la plante amazonienne *Cordiaverbenacea spp* (environ 27%). Cette plante présente une efficacité remarquable contre les bactéries Gram positives et les levures, mais pas contre les bactéries Gram négatives (Carvalho et *al*, 2004). Cependant, d'autres études démontrent l'effet antibactérien de ces terpènes à la fois sur des bactéries Gram négatives et Gram positives (Martins et *al*, 2003).

En outre, la stéréochimie influence l'activité antibactérienne. Il a été observé que les α -isomères sont moins actifs relativement aux β -isomères (Dorman, 2000). Du moment que la β -thujone, est le composé majoritaire (56,33%) d'huile essentielle d'*Artemisia mesatlantica*, elle lui confère une forte propriété antiseptique en plus d'autres caractéristiques physiologiques; elle est abortive, antibactérienne, emménagogue, insecticide et larvicide (Duke, 1998).

Des études antérieures ont démontré que la majorité des huiles essentielles testées pour leurs propriétés antibactériennes ont un effet plus prononcé contre les bactéries à Gram positif. La résistance des bactéries à Gram négatif est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration de composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible (Wan, 1998).

Chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique.

Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) (Wan, 1998).

➤ **Comparaison de l'activité antibactérienne d'association des deux huiles essentielles, d'eucalyptol et de l' α - pinènes**

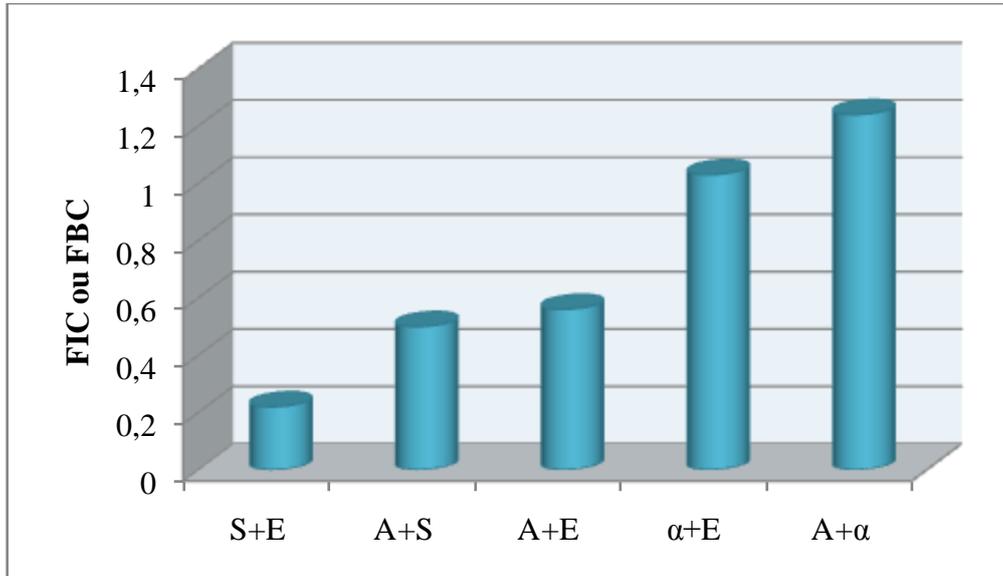


Figure 12 : Comparaison de l'activité antibactérienne d'association des deux huiles essentielles (arbre à thé A, sauge S), d'eucalyptol (E) et d' α - pinènes (α) sur *Staphylococcus aureus*.

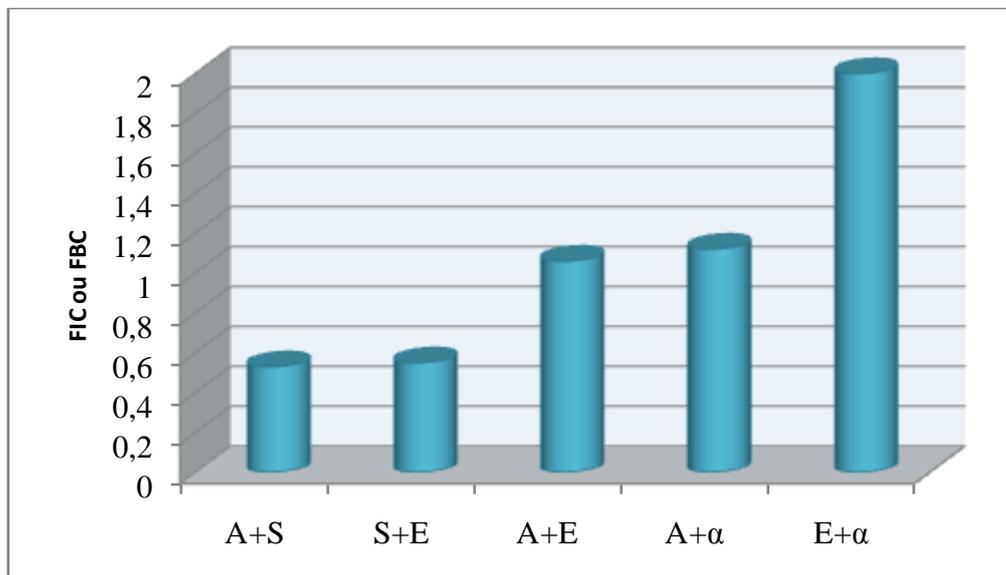


Figure 13 : Comparaison de l'activité antibactérienne d'association des deux huiles essentielles (arbre à thé A, sauge S), d'eucalyptol (E) et d' α - pinènes (α) sur *Acinetobacter*.

L'huile essentielle de l'arbre à thé a montré une activité meilleure en association avec l'huile essentielle de la sauge sur les bactéries testées (effet bactéricide), suivi de son association avec l'eucalyptol (effet bactériostatique) et enfin son association avec l'alpha pinène.

L'huile essentielle de la sauge a une bonne activité *in vitro* en association avec l'eucalyptol et avec l'huile essentielle de l'arbre à thé sur les bactéries testées.

Par contre, l' α -pinène a présenté une activité modérée contre les souches bactériennes en association soit avec l'huile essentielle de l'arbre à thé ou avec l'eucalyptol.

Tandis que, l'eucalyptol a montré une bonne activité sur les bactéries en association avec les huiles essentielles étudiées, alors que, son association avec l' α -pinène est faible.

En 2000, Dorman et Deans ont étudié l'activité de l'huile essentielle du poivre (*Piper nigrum*), du géranium (*Pelargonium graveolens*), d'origan (*Origanum vulgare*) et du thym (*Thymus vulgaris*) sur 25 genres différents de bactéries. Les huiles essentielles ont montré des effets inhibiteurs considérables contre tous les micro-organismes testés, alors que leurs constituants majeurs ont montré des degrés différents au niveau de la culture bactérienne. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est comparée à celle des antibiotiques sur des bactéries en culture. Les constituants à structure phénolique tels que le carvacrol, l'eugénol et le thymol, sont hautement actifs contre les microorganismes. Les phénols sont connus pour être des agents bactéricides ou bactériostatiques selon la concentration utilisée.

En effet, l'étude de l'activité antibactérienne de certains constituants des huiles essentielles a permis de distinguer:

- les composés phénoliques à forte activité antimicrobienne tels que le thymol et le carvacrol (Cosentino et al, 1999 ; Gergis et al, 1990).
- les constituants à faible activité antibactérienne qui sont : pulegone, menthone, 1,8-cinéole, p-cymène, isomenthone, myrcène, α et β -pinène, pipéritone, limonène, linalol, -terpinène et les composés non terpéniques (Lattaoui et al, 1994 ; Carson et al, 1995 ; Chalchat et al, 1995).

Conclusion

Le présent travail a été consacré à la détermination du rendement et des propriétés antibactériennes de l'huile essentielle extraite de *Salvia officinalis* récoltée dans la région d'Amizour (Algérie) en Mars 2013, et l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* et les deux composés majoritaires α -pinène et eucalyptol (1,8 cinéole), ainsi que l'activité de leurs association.

L'effet antibactérien de l'association des huiles essentielles et les deux composés majoritaires, est mis en évidence par la méthode de l'échiquier, en présence de deux bactéries pathogènes: *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter*.

Dans cette étude, la valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Salvia officinalis* était de 0,98%. Cette valeur est inférieure aux rendements obtenus chez la même espèce dans les différentes régions.

En matière d'activité antibactérienne, l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* et *Salvia officinalis* a montré une bonne activité *in vitro vis-à-vis* les souches bactériennes testées, ceci est dû à la nature de la composition chimique de ces huiles. Cependant l'activité antibactérienne de l'eucalyptol, évaluée par la méthode de l'échiquier, a permis de révéler une activité moyenne sur la croissance de *S. aureus* et *Acinetobacter*. Cette étude met également en évidence une faible activité de l' α - pinène *vis-à-vis* de ces souches bactériennes.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour l'application des huiles essentielles dans le domaine de l'agroalimentaire comme additif naturel pour réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques. Aussi, leur utilisation en très faibles quantités est envisageable en raison de leur grande efficacité, contrairement à certains additifs comme les sels ou les épices entières. Leurs combinaisons à d'autres procédés de conservation en feront certainement dans les prochaines années l'agent antimicrobien naturel incontournable pour améliorer la durée de vie des aliments (oussalah, 2006). Mais il faudrait, comme pour beaucoup de plantes médicinales, réaliser une étude pharmacologique complète et approfondie afin de prouver par des méthodes expérimentales modernes ses propriétés thérapeutiques.

D'autres propriétés des huiles, notamment antiparasitaire, insecticide, antifongique et antivirale sont actuellement à l'étude par plusieurs chercheurs. À plus ou moins long terme, ces travaux pourraient être une réponse aux problèmes des antibiotiques et de leurs résistances, et avoir une application en santé humaine et animale.

Références bibliographiques

A

- **Adam, A., Sivropoulou, S., Kokkini, T., Lanaras and M. Arsenakis., (1998).** « Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oil against human pathogenic fungi, » *Journal of Agricultural and Food Chemistry*» 46, 1739–1745.
- **Aligiannis, E., Kalpoutzakis, I. B., Chinou, S., Mitakou, E., Gikas, A., Tsaarbopoulos., (2001).** « Composition and antimicrobial activity of essential oils of five taxa of Sderitis from Greece ». *J. Agric. Food Chem.* 49, 811-815.
- **Andrews R E., Parks L W., Spence K D., (1980).** Some Effects of Douglas fir Terpenes on Certain Microorganisms. *Appl Environ Microbiol*; 40(2): 301–4.
- **Angioni, A., Barra, M T., Russo, V., Coroneo, S., Dessip, P., Cabras (2003),** « Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity ». *J. Agric. Food Chem.* 51, 3073-3078.
- **Archambaud, M., (2009).** Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro. *Laboratoire Bactériologie-Hygiène, CHU Rangueil Toulouse.*
- **Arnaud Delahaye., 2007.** La structure bactérienne. [http:// www.arnobio2.com](http://www.arnobio2.com).
- **Auboyer, C., H. drugeon., f. gouin., (1999).** association d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgicale et en chirurgie. *conférence d'experts.*

B

- **Belkamel. S., Drouet, M., Rouzet, (1990),** *Rev. Mar. Pharmacol.* 4, 7.

- **Best D J., Floyd N C., Magalhaes A., Burfield A., Rhodes P M., 1987** Initial enzymatic step in the degradation of -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Biocatalysis*;1:147–59.
- **Boland, D J., Brophy, J., and A.P.N. (1991)**, House, *Eucalyptus Leaf Oils*, p. 23 ISBN 0-909605-69-6
- **Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., et Chaouch A., (2007)**, Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc, *Afrique Science*, 3 (2), 232-242.
- **Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben halima, M., et Chaabouni M., (2008)**, Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, *J. Soc. Chim. Tunis.* 10, 119-125.
- **Bricaire, F., (1997)**. Pourquoi une association antibiotique ? *Réanimation Urgences*, 6 (4, Part 3), 3s-8s.
- **Brieskom, C H., et Biechele W., (1971)**. The flavones from *Salvia officinalis* L. *Archiv der Pharmazie.* 304:557–561.
- **Burnichon Nelly, T A., (2003)**. l'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques *des bactériologie*.
- **Burt S., (2004)**. essential oils: A review. *International Journal of Food Microbiology.* 94, 223-253.

C

- **Cabberty., Derlote A., et Courvalin P., (1986)**. Etude de centre nationale de références des antibiotiques sur l'inoculum de l'antibiogramme. *Edition path-Biol Vol n°15 P 703-705.*

- **Candy, G, (1977)**, Investigation into Chemical Composition and potential of a selected number of Rhodesian eucalyptus Unpublished Thesis, Univ of Rhodesia, Dept of Pharmacy. s
- **Carson, C F., Hammer, K A., Riley, T V., (1995)**. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios* 82 : 181-185.
- **Carvalho P M J r., Rodrigues R F., Sawaya A C., Marques M O., Shimizu M T., 2004**. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *J Ethnopharmacol*;95(2–3):297–301.
- **Cattoir, D V, (2006)**. < Bacterio 15. pdf > etude in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. *Cours de DCEMI - Faculté de Médecine de Créteil*.
- **Cha J D., Jeong M R., Jeong S I., Moon S E., Kil B S., Yun S I., 2007**. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytother Res*;21(3):295–9.
- **Chalchat J-C., Garry R-P H., Harama, M., et Sidibe, L., (1995)**. Plantes aromatiques du Mali. Etude de deux *Ocimum* : *O. basilicum* L. et *O. canum* Sims. *Rivista Italiana EPpaS* numéro spécial janvier.
- **Chalchat, A., Michet, B., Pasquier, (1998)**. *Flavour Fragr J.* 13, 68.
- **Cheng S., Huang, C., Chen, Y., YU J., Chen, W., and Chang S., (2009)**. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species, *Bioresour. Technol.* 100, 452-456.
- **Clevenger (J.F) – (1928)**, Apparatus for the determination of volatile oil. – *J. Am. Pharm. Assoc.* 17(4), 346-351.
- **CLSI (2007)** Clinical and Laboratory Standards Institute-Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests methods for antimicrobial susceptibility

- testing for bacteria isolated from animals-Approved standard- Third edition CLSI document M11-A7 - Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- **Cosentino S., Tuberoso, C 1 G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., and Palmas F., (1999).** *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinia Thymus* essential oils. Letter in Applied. Microbiology 29: 130-135.
 - **Courvalin, P., Drugeon, H., Flandrois. J P., and Goldtein F., (1991).** Aspects théoriques et thérapeutiques in bactéricidie : Caillon J and Drugeon H ; démembrément des bactéries vivantes in Maloine – Edu Paris P : 127-136.
 - **Cowan, (1999).** Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564–582.
 - **Cox, S D., Mann, C M., Markham, J L., Bell, H C., Gustafson, J E., Warmington, T R., Wyllie, S G., (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88, 170–175.

D

- **Deférera, B N., Ziogas and M G., Polissiou, (2000).** “GC-MS Analysis of essential oil from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Pennicillium digitatum*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2576–2581.
- **Denis François., maris cécile poly., christian martin., edouard bingen., roland quentin (2007).** page 544- 554.
- **Doris zehren (1999).** *Melaleuca alternifolia*, l'or vert du cinquième continent. *petit manuel à l'usage de l'huile essentielle de l'arbre à thé.*

- **Dorman, H J D., Deans, S G., (2000).** “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308-316.
- **Duke, J A., (1998).** USDA – ARS – NGRL (ed), Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland. ‘Phytochemical Database’.
- **Duke J A., Bogenschutz-godwin du cellier M J., et Duke P A K., (2002).** Medicinal Herbs. Edition CRC Press LLC.P:201.

E

- **Eloff, J N., (1998)** a sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 64:711–713
- **Erler, F., Ulug I., and Yalcinkaya B., (2006).** Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*, *Fitoterapia*, **77**, 491-494.
- **Euzéby (2001).** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire : Évaluation in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

F

- **Faleiro, M L., Miguel, M G., Ladeiro, F., Vanancio, F., Tavares, R., Brito, J C., Figueirido, A C., Barroso, J G., Pedro, L G., (2003).** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. App. Microbiol.* 36, 35-40.
- **Felice S, N., Francesco, A., Nelly, B., Maurezio & H., Werner, (2004)** – Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L. *Flav. Fragr. J.* 20 (3), 291 – 294.

- **Fellah, (2001).** Valorisation de l'huile essentielle de la salvia officinalis de Tunis, extraction et étude physico-chimique et théorique. DEA en chimie organique Fac des Sciences de Tunis.
- **Fleming , (1928).** Les antibiotiques, alerte chez les médecins.

G

- **Ganière, C M., M P., (2004).** Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Unité de pathologie infectieuse, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, France.*
- **Ganou, L., (2001).** Contribution à l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles.
- **Gergis V., Spilotis V., and Poulos C., (1990).** Antimicrobial activity of essential oils from Greek Sideritis species. *Pharmazie* 45: 70-75.
- **Guillaume P Y., (2004).** La microbiologie ; milieux de culture.

H

- **Hammer K A., Carson C F., and Riley T V., (1999)** - Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology.* 86: 985–990,
- **Hajer Naceur Ben Marzoug., Mehrez Romdhane., Ahmed Lebrihi., Florenc Mathieu., François Couderc., Manef Abderraba., Mohamed Larbi Khouja and Jalloul Bouajila., 2011.** Eucalyptus oleosa Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits). *16*, 1695-1709; doi:10.3390/molecules16021695

- **Helander, I M H - L., Alakomi, K., Latva-Kala, T., Mattila-Sandholm, I., Pol, E J., Smid, L G M., Gorris, and A., Von Wright, (1998).** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:3590-3595.
- **Hoffman, H., DelasAlas, R E., Wiederhold and L., William, (2004).** “Screening of antibacterial and antifungal activities of ten medicinal plants from Ghana” *Pharmaceutical Biology* 42 (1), 13–17.
- **Hubert Richard, Avril (2008).** « Épices et herbes aromatiques »©"Vie", *site ressource en Sciences de la Vie*.
- **Hulin V., Mathot A G., Mafart P., et Dufossé L., (1998):** les propriétés antibactériennes des huiles essentielles et composés d’arome. *Science des aliments*, 18 :563-582.

J

- **Jean-Michel, (2012)** plantes médicinales et huiles essentielles : phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles.
- **Johan, W., Mouton, Michael N., Dudley, Otto Cars., Hartmut Derendorf and George L., Drusano, 16 Mars 2005;** standardization of pharmacokinetic/ pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal of antimicrobial chemotherapy* (2005) 55,601-607.
- **Juergens, U R., Stober, M., Vetter, H., (1998).** Inhibition of cytokine production and arachidonic metabolism by eucalyptol (1, 8-cineole) in human blood monocytes in vitro. *Eur. J. Med. Res.* 17, 508–510.

- **Juliano, C A., Mattana, and M., Usai, (2000).** Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12:516-522.

K

- **Karawya, S., El Hawary, (1981).** *J. Pharm. Sci.* 19, 301.
- **Krasnobajew, (1984).** Terpenoids. In: *Biotechnology – Biotransformations*, Vol. 6a, K. Kieslich (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany pp. 98–125.

L

- **Laouer H, (2004)** -Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles *d'Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Larousse- plantes médicinales
- **Lattaoui N., Tantaoui-Elaraki A., (1994).** Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils. *Revista Italiana Eppos* 13: 13-19.

M

- **Maatoug, Février (1990).** « *Nos plantes médicinales* ». Lexiques cliniques des plantes médicinales non toxiques employées en Tunisie.

- **Magina M D A., Dalmarco E M., Wisniewski A., Simionatto E L., Dalmarco J B., Pizzolatti M G., and Brighente I M C., (2009).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species, *J. Nat. Med.* 63, 345-350.
- **Magwa M L., Gundidza M., Gweru N., Humphrey G., (2006).** Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. *J Ethnopharmacol*; 103(1):85–9.
- **Maiden et Betche Cheel., GRIN (1924):** espèce *Melaleuca alternifolia*.
- **Mainardi J L, (1997).** Associations d'antibiotiques pour le traitement des infections/*Staphylococcus aureus*. *Méd Mal Infect.* 224.
- **Martin, L R., Salgueiro, M J., Goncalves, R., Vila, F., Tomi, T., Adzet, J., Casanova, (2003).** « Activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer* ». *Planta Medica*, 66(7), 647-650.
- **Matelic, (2001).** *Flavour Fragr. J.* 16, 370
- **Mau, C P., Chen and P C., Hsieh, (2001),** “Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon and *Corni fructus*,’ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 183–188.
- **Miladinovic D., and Miladinovic I J., (2001) –** Antimicrobial activity of essential oil of Sage from Serbia. *Physics, Chemistry and Technology*, 2(2): 97-100
- **Moleyar V., and Narasimham P., (1986).** Antifungal activity of some essential oil components, *Food Microbiology*, 3, 331-336.
- **Morand, D., (1989).** L'intérêt phytothérapeutique de l'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*). *Laboratoire d'écologie végétale - Université de Paris-Sud - 91 Orsay et Jery Nizinski, Institut Français de Recherche Scientifique pour le développement en coopération avec l'Orstom à paris.*

- **Moretti, A T., Peana, A., Franceschini and C., Carta, (1998).** *In vivo* activity of *Salvia officinalis* oil against *Botrytis cinerea*, *Journal of Essential Oil Research*, 10, 157–160.
- **Muanza, D N., Muanza, K L., Euler and L., William, (1995).** ‘Screening for antitumor and anti-HIV activities of nine medicinal plants from Zaire’, *International Journal of Pharmacology* 33 (1995), pp. 98–106.
- **Muanza K., Muanza, B W., Kim, K L., Euler and L., William, (1994) .** Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire, *International Journal of Pharmacology* 32 (1994) 337–345.
- **Muller-Riebau, B., Berger and O., Yegen, (1995).** “Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oil of selected aromatic plants growing wild in Turkey”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2262–2266.

O

- **Ohloff G, (1994).** Scent and fragrances, Springer, Berlin, Heidelberg.
- **Oussalah M S., Caillet, S., Salmié ri, L., Saucier and M., Lacroix, (2006).** Antimicrobial effects of alginate based film containing essential oils for preservation of whole beef muscle. *Journal of food Protection*. 69 (10), 2364-2369.
- **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M., (2007).** “Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*”. *Food Control*, 18, 414-420.
- **Oussalah M S., Caillet, L., SAUCIER and M., Lacroix. (2007).** *Food Control*. 18 (5) 414-420.

P

- **Pattnaick, S., Subramanyam, V R., Bapaji, M., Kole, C R., (1997).** Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89, 39–46.
- **Pellecuer J., Jacob M., Simeon Bouchberg M., (DE), (1980).** Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plant Médicin Phytothér*; 14: 83-98.
- **Perry N S., Houghton P J., Sampson J., Theobald A E., Hart S., Lis-Balchin M., (2001).** In-vitro activity of *S. lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol*; 53(10):1347–56.
- **Perry, A J., Baxter, N J., Brennan, J W., Van Klin J., (1996).** *Flavour Frag.* 11, 213.
- **Piccaglia, M., Marotti J., (1993).** *Flavour Frag* 8, 115.
- **Place, R., Piccaglia, J., essent. (1995).** *Oil. Res.* 7, 443.
- **Putievsky, U., Ravid, D., Sande rovich, J., Essent (1992).** *Oil Res.* 4, 291.

R

- **Rakotonirainy and B., Lavedrine, (2005).** “Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas”, *International Biodeterioration and Biodegradation* 55, 141–147.
- **Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M., Tantaoui- Elaraki A., (1993).** Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Ess. Oil Res*, 5(2), 179-184.

S

- **Satrani B., Farah A., Fechtal M., Talbi M., Blaghen M., Chaouch A., (2001).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 94(956), 241-250.
- **Sivropoulou, C., Nicolaou, E., Papanikolaou, S., Dokkini, T., Lanaras and M., Arsenakis, (1997).** “Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3197–3201.
- **Sivropoulou, S., Kokkini and T., Lanaras, (1995).** “Antimicrobial activity of mint essential oil”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2384–2388.
- **Soliman K M., and Badeaa R I., (2002).** Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi, *Food Chem. Toxicol.* 40, 1669-1675.
- **Sonboli A., Babakhani B., Mehrabian A R., (2006).** Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z Naturforsch [C]*. ; 61 (3–4):160–4.
- **Sridhar, R V., Rajagopal, R., Rajavel, S., Masiilamani and S., Narasimhan, (2003).** “Antifungal activity of some essential oils”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 512, 7596–7599.
- **Sword G., et Hunter G L K., (1978).** Composition of Australian Tea Tree Oil (*Melaleuca alternifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26 (3). 734-737.

T

- **Teuscher E., Anton R., et Lobstein A., (2005).** *Plantes Aromatiques (épices, aromates, condiments et huiles essentielles)*. Edition Tec et Doc. Paris. Edition. E.M. inter. Allemagne. P : 266.

- **Tocaven, I, (2011).** L'huile essentielle d'arbre a the: une source de bienfaits.
- **Tsankova, A N., Konkchiev, E M., Genova, J., (1994).** Essent. Oil. Res, 6, 375.

U

- **Ultee, A M H J., Bennink, and R., Moezelaar, (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1561-1568.

W

- **Walker, J B., Sytsma, K J., Treutlein, J., Wink, M., (2004).** *Salvia (Lamiaceae)* is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *Am. J. Bot.* 91, 1115–1125.
- **Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M J., (1998).** “The effect of essential oils of basil of the growth *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*”, *J. Appl. Microbiol.* 84: 152-158.
- **Williams L R., Lusunzi I., (1994).** Essential oil from *Melaleuca dissitiflora*: a potential source of highquality tea tree oil. *Industriel corps and products.* 2; 211-221.
- **Wolters kluwer, (2007).** botanique pharmacognosie phytothérapie.1, rus Eugène et Armand Peugeot.92500 Rueil-Malmaison Cedex.

Z

- **Zhang C Q., Liu Y H., and Zhu G N., (2010).** Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables, *Eur. J. plant Pathol.* 126 (4), 509-515.

Les sites internet

- <http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Melaleuca alternifolia &oldid=89177789> ». Avril 2013.
- <http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Sauge officinalis &oldid=89177789> » Avril, 2013.

Annexes

Annexe 1 : Composition et préparation des milieux de culture (Guillaume, 2004)

Milieu Muller Hinton liquide : pour un litre

- **Composition :**

Infusion de viande bovine 02,0 g ;

Peptone de caséine 17,5 g ;

Amidon de maïs 01,5 g.

- **Préparation**

Pour préparer ce milieu il faut peser 38 g de poudre et la mélanger dans 1L d'eau. Homogénéiser puis chauffer en agitant. Porter à ébullition pendant environ une minute. Ensuite le stériliser à l'autoclave durant 15 minutes à 120° C.

Bouillon nutritif : pour un litre

- **Composition :**

Peptone 5 g ;

Extrait de viande 1 g ;

Extrait de levure 2 g ;

Chlorure de Sodium 5 g.

- **Préparation :**

Pour préparer ce milieu il faut peser 25 g de poudre et la mélanger dans 1L d'eau. Homogénéiser et ensuite le stériliser à l'autoclave durant 15 minutes à 120°C.

Eau physiologique stérile

Chlorure de sodium (NaCL) 9 g ;

Eau distillée 1L ;

PH= 7 ;

Stérilisation à 120° C/ 15 min.

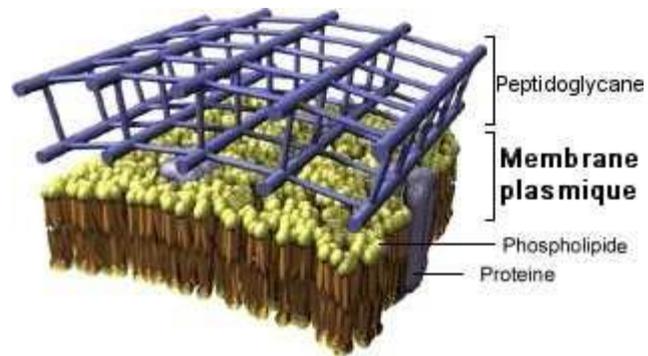
Agar à 0,2%

Agar 0,2g ;

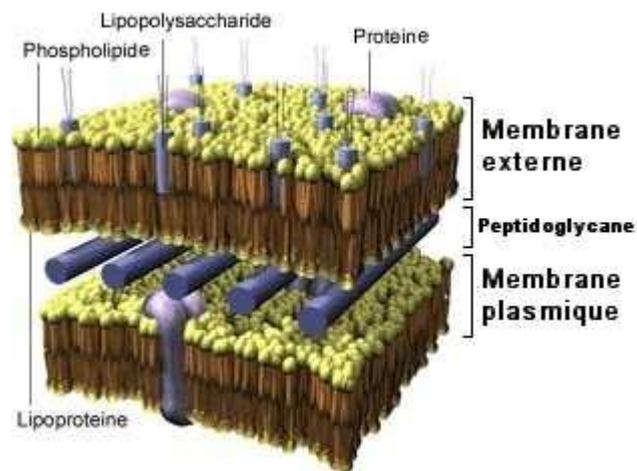
Eau distillée 1L ;

Stérilisation à 120° C/ 15 min.

Annexe 2 : Structure de la paroi bactérienne



Structure de la paroi bactérienne Gram positive (Arnaud, 2007).



Structure de la paroi bactérienne Gram négative (Arnaud, 2007).

Résumé

Les huiles essentielles ont un spectre d'action biocide très large, puisqu'elles inhibent la croissance de moisissures, levures et bactéries. Le but de ce travail est de déterminer l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles (*Salvia officinalis* et *Melaleuca alternifolia*) et de deux composés majoritaires eucalyptol et α - pinène, ainsi que leurs association sur deux souches bactériennes pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter*. Le rendement en huile essentielle extraite de *Salvia officinalis* de la région d'Amizour en Algérie montre une teneur moyenne qui est de 0,98 %. Cette activité antibactérienne est mise en évidence par la méthode de l'échiquier qui a montré que les deux huiles essentielles des deux plantes ont une bonne activité in vitro vis-à-vis les souches bactériennes testées (leurs association montre un effet synergique $FBC = 0,5$ pour *s.aureus* et $FBC=0,53$ pour *Acinetobacter*), cependant, l'eucalyptol a généré une activité moyenne (son association montre un effet synergique avec l'HE de *Salvia officinalis* $FIC=0,22$, effet d'addition avec l'HE de l'arbre à thé contre *S. aureus* $FBC= 0,56$ et un effet d'indifférence contre *Acinetobacter* $FIC=1,06$, par contre son association avec l' α - pinène montre un effet d'indifférence $FIC= 1,2$ pour *s.aureus* et $FIC=2$ pour *Acinetobacter*), contrairement à l' α - pinène qui a exercé la plus faible activité contre ces souches (son association avec l'HE de l'arbre à thé ($FIC= 1,24$ pour *s.aureus* et $FIC=1,12$ pour *Acinetobacter*) et l'eucalyptol montre un effet d' indifférence).

Mots clés

Huiles essentielles (HE), activité antibactérienne, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter*, *Salvia officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, eucalyptol, α - pinène, synergisme, addition, indifférence.

Abstract

Essential oils have a very large biocidal action spectrum as they inhibit the growth of mould, yeast and bacteria. The aim of this work was to determine the antibacterial activity of two essential oils (*Salvia officinalis* and *Melaleuca alternifolia*) as well as two majority compounds: eucalyptol and α -pinene, like their associations of two pathogenic bacterial strains; that is, *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter*. The essential oil yield extracted from *Salvia officinalis* in Amizour (an Algerian province) showed an average of 0.98%. This antibacterial activity was highlighted by the chess board method which showed that the two essential oils of both plants had a good activity in vitro vis-à-vis the tested bacterial strains (their associations show a synergistic effect). However, unlike α -pinene which showed a weak activity against these strains (its association with the essential oil of the tea tree and the eucalyptol shows an effect of indifference), eucalyptol manifested an average one (its association shows a synergistic effect with essential oil of *Salvia officinalis*, effect of addition with essential oil of the tea tree against *S. aureus* and an effect of indifference against *Acinetobacter*. on the other hand its association with the α -pinene shows an effect of indifference).

Key words

Essential oils, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter*, *Salvia officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, eucalyptol, α -pinene, synergism, addition, indifference.