



Année Universitaire : 2012-2013

**Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Titre :

Etude de l'effet synergique des huiles essentielles sur l'activité antibiotique d'un aminoside : la streptomycine.

Présenté par:

Fabrice ZOSSOUNGBO

Encadré par:

- Pr Misbahi Houria
- Pr Kandri Rhodi Youssef
- Pr Bouhdid Samira

Soutenu Le 18 Juin 2013 devant le jury composé de:

- Mr Fouad Ouazzani
- Mme. Houria Misbahi
- Mr Khalil F.
- Mr S. Chackroune
- Mr Youssef Kandri

Stage effectué à : L'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom: Fabrice ZOSSOUNGBO

Année Universitaire : 2012/2013

Titre: Etude de l'effet synergique des huiles essentielles sur l'activité antibiotique d'un aminoside : la streptomycine.

Résumé

Depuis leur découverte au XXe siècle, les antibiotiques ont connu un essor considérable dans le domaine de la santé. Cependant le mauvais traitement de ceux-ci a été le déclenchement des résistances soit de façon naturelle ou acquise.

Dans la recherche de nouvelles molécules bioactives, nous avons tourné le regard vers l'aromathérapie dans le but d'une action synergique avec les antibiotiques.

Nous avons choisi donc 6 huiles essentielles ayant une faible activité antibactérienne : la verveine (*Aloysia citrodora*), l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), l'origan (*Origanum vulgare*) le myrte (*Myrtus communis*) et l'oranger amer (*Citrus orantium*).

Nous avons pu démontrer l'effet potentialisateur des huiles essentielles sur l'activité de la streptomycine aussi bien sur une souche Gram+ que sur une souche Gram-.

L'effet de potentialisation de l'activité antibiotique a été plus marqué sur la souche Gram+.

La meilleure activité synergique a été obtenue avec l'huile essentielle de l'origan qui a réduit la CMI de la streptomycine de 64 µg/ml à 1 µg/ml.

Mots clés: antibiotique, résistance bactérienne, huile essentielle, streptomycine, activité antibactérienne, verveine, armoise, romarin, myrte, origan, fleur d'oranger, synergie.



Sommaire

Introduction.....	1
Première partie : Rappels bibliographiques.....	3
I. Les antibiotiques.....	4
1. Généralités.....	4
2. La streptomycine.....	5
3. La résistance aux antibiotiques.....	6
II. Les huiles essentielles.....	7
1. Généralités.....	7
2. Extraction des huiles essentielles.....	8
3. Composition chimique des huiles essentielles.....	11
4. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles.....	14
III. Les huiles essentielles étudiées.....	14
1. La verveine.....	15
2. Armoise.....	16
3. Romarin.....	17
4. Origan.....	18
5. Myrte C.....	19
6. Bigardier.....	20
Deuxième partie : Matériels et Méthodes.....	21
1. Matériel végétal.....	22
2. Extraction des huiles essentielles.....	22
3. Souches bactériennes.....	23
4. Préparation de l'inoculum.....	23
5. Méthode de diffusion par disques.....	23
6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	24
7. Synergie entre les huiles essentielles et la streptomycine.....	24
Troisième partie : Résultats et Discussion.....	26
I. Résultats.....	27
1. Rendements en huiles essentielles.....	27
2. Activité antibactérienne.....	27
a. Diffusion sur disques.....	27
b. CMI des huiles essentielles et de la streptomycine.....	28
c. Synergie entre les huiles essentielles et la streptomycine.....	29
II. Discussion.....	32



Conclusion.....	34
Annexes.....	36
Bibliographie.....	37
Webographie.....	41

Figure 1. Structures de quelques classes d'antibiotiques.....	4
Figure2. L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy et Marshall, 2004).....	6
Figure 3. Système d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	9
Figure 4. Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau...	9
Figure 5. Système d'extraction des huiles essentielles assistée par micro-ondes.....	10
Figure 5. Composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles (Kalemba et Kunicka, 2003).....	12
Figure 7 : Hydrodistillation par l'appareil Clevenger.....	22
Tableau 1 : Rendement en huiles essentielles.....	27
Tableau 2: Activité antibactérienne des huiles essentielles et des antibiotiques testés.....	28



Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles et de la streptomycine.....29

Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices de la streptomycine en combinaison avec les huiles essentielles contre *S. aureus*.....30

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices de la streptomycine en combinaison avec les huiles essentielles contre *P. aeruginosa*30



Introduction



Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme.

Pour se protéger de l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies conduisant à la diminution de la concentration intracellulaire des médicaments et donc à l'inefficacité de ces derniers.

Face à ce problème de résistance, les chercheurs ont adopté deux axes de recherche, soit développer de nouvelles molécules qui ne soient pas encore concernées par la résistance à l'antibiothérapie, soit trouver des produits capables, par effet synergique, de restaurer la sensibilité aux antibiotiques déjà existants et donc de restaurer leur utilité thérapeutique.

Dans la recherche de molécules bioactives, l'exploration des ressources naturelles apparaît comme une piste prometteuse car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, une grande réserve de substances actives. C'est dans ce cadre que nous avons étudié l'effet des huiles essentielles de six plantes aromatiques sur la potentialisation de l'activité antibactérienne de la streptomycine.

Cette étude préliminaire a pour but d'évaluer la synergie entre les huiles essentielles choisies et un antibiotique déjà disponible sur le marché.



Rappels bibliographiques



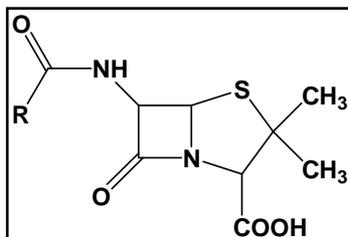
I. Les antibiotiques

1. Généralités

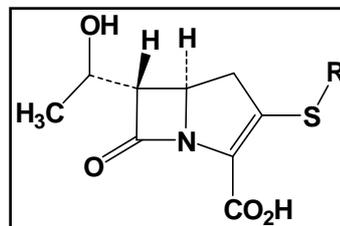
Les antibiotiques sont, par définition, des produits capables de tuer les micro-organismes (bactéricides) ou d'inhiber leur croissance (bactériostatiques) (Prescott *et al*, 1995). L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action : plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large.

Ils sont, majoritairement, d'origine naturelle ou des dérivés de molécules naturellement produites. Des substances antibactériennes d'origine synthétique ont été également développées (Newman *et al.*, 2003 ; Singh et Barrett, 2006).

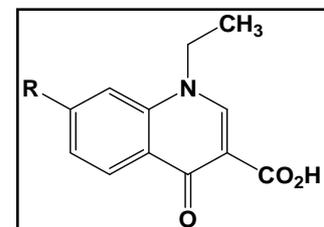
Selon leurs propriétés structurales, les antibiotiques sont groupés par familles ou classes (Figure 1).



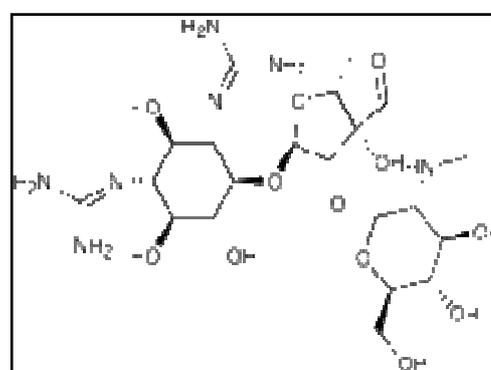
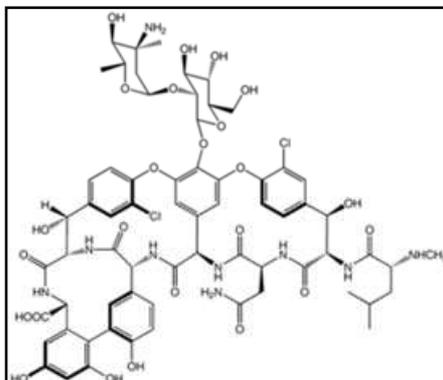
β -lactamines



pénems



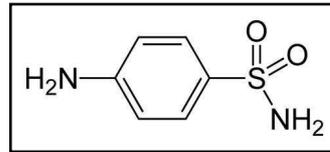
quinolones





glycopeptides

aminosides



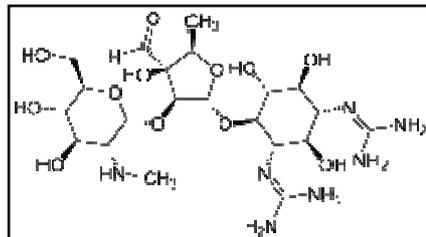
sulfamides

Figure 1 : Structures de quelques classes d'antibiotiques

2. La streptomycine

La streptomycine est un antibiotique antibactérien cytostatique et cytotoxique. Il appartient à la classe des aminosides (ou aminoglycosides). C'est d'ailleurs le premier membre de cette classe à avoir été découvert (en 1943). Il fut isolé à partir d'une souche d'actinobactérie « *Streptomyces griseus* ».

La découverte fut l'œuvre de l'étudiant Albert Schatz mais le mérite rejaillit sur son Professeur, Selman Waksman, qui obtint le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1952 (Wikipedia).



Structure chimique de la streptomycine

3. La résistance aux antibiotiques

Les bactéries sont capables de se protéger de l'action létale des antibiotiques en réduisant la concentration intracellulaire de ces derniers.

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. La résistance dite acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes.

Plusieurs mécanismes de résistance bactériennes ont été décrits, tels que la modification de la perméabilité membranaire ainsi que l'efflux actif des antibiotiques vers le milieu extracellulaire (Figure 2)

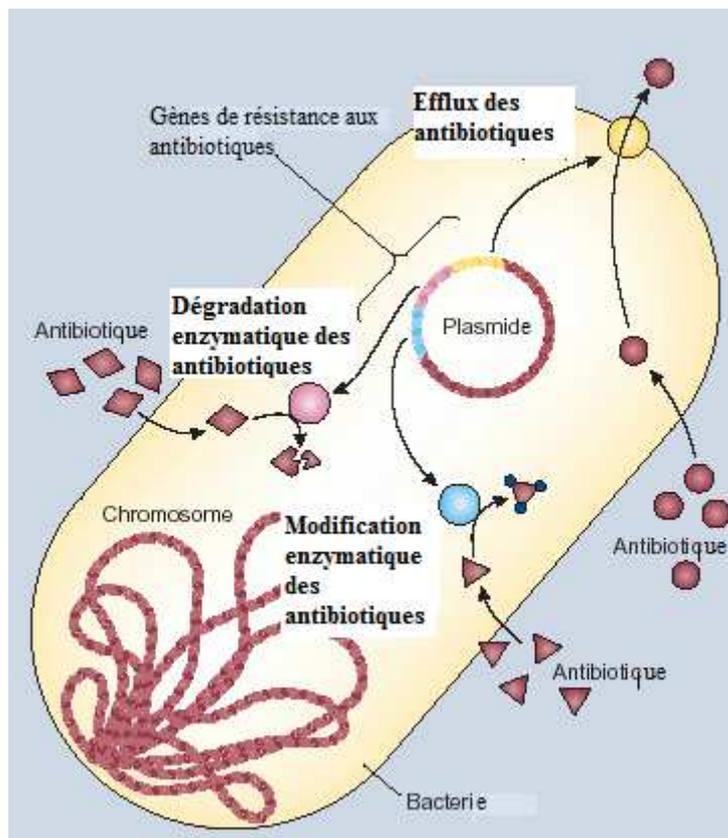


Figure 2. L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy et Marshall, 2004)



II. Les huiles essentielles

1. Généralités

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes. La vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle [Robert, 2000].

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes sont développés, notamment par les civilisations arabe et égyptienne, qui leurs attribuent avant tout un usage religieux [Sell, 2006]. Puis progressivement, ces huiles essentielles se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles.

De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques [Pauli, 2001]. Pour tenter de trouver de nouveaux remèdes aux fléaux actuels, la communauté scientifique s'est récemment tournée vers les constituants des huiles essentielles, car un nombre non négligeable de composés volatils, tels que les sesquiterpènes, ont montré des activités pharmacologiques remarquables contre les maladies comme le cancer [Modzelewska et al, 2005].



Les huiles essentielles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives.

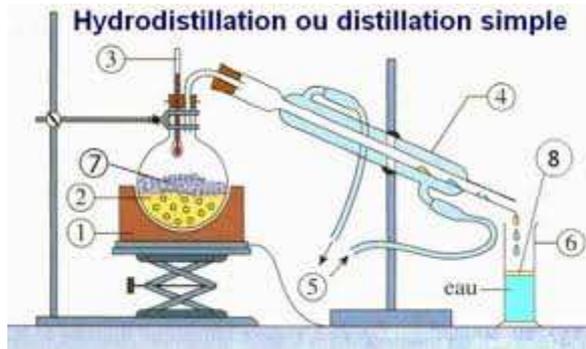
2. Extraction des huiles essentielles

C'est Avicenne, médecin et philosophe (980-1037), qui produit la première huile essentielle pure, une huile essentielle de roses. Pour cela, il met au point un alambic. La distillation par la vapeur d'eau autorisait l'extraction d'huiles essentielles pures de très nombreuses plantes. Avicenne écrit de nombreux ouvrages médicaux dans lesquels il fait une large place aux huiles essentielles.

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [Franchomme et al., 1990]. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc.

➤ Tout d'abord, **l'hydrodistillation**. Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont

condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat (Figure 3).



- 1 : chauffe ballon
- 2 : eau distillée
- 3 : thermomètre
- 4 : réfrigérant
- 5 : eau de réfrigération
- 6 : flacon de récupération
- 7 : plante
- 8 : huile essentielle extraite

Figure 3 : Système d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

➤ Ensuite, la **distillation par entraînement à la vapeur d'eau**. Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (Figure 4)

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [Franchomme et al, 1990].

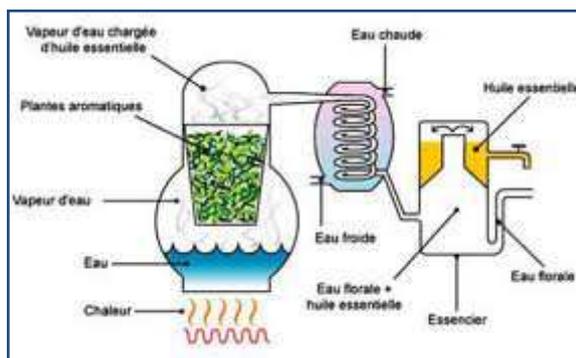


Figure 4 : Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau

➤ Enfin, la troisième technique est **l'hydrodiffusion**. Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (per descendum) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » [Franchomme et al, 1990 ; Richard, 1992].

➤ **Extraction par micro-ondes**

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Figure 5). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable [Mengal et al, 1993].

L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée [Chemat et al, 2006 ; Flamini et al, 2007; Lucchesi et al, 2007].

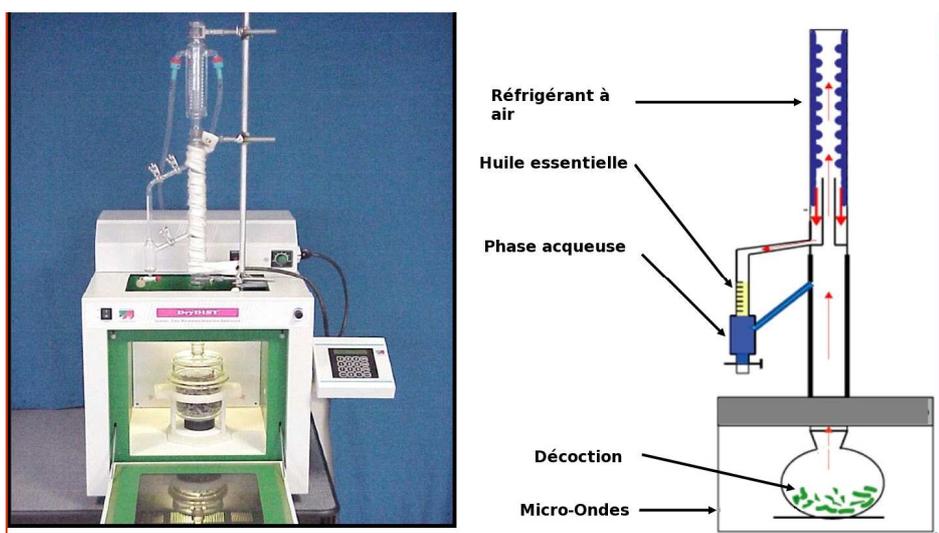




Figure 5. Système d'extraction des huiles essentielles assistée par micro-ondes

3. Composition chimique des huiles essentielles

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes [Buchanan et al., 2000].

La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C₅), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C₁₀) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesqui-terpénoïdes (C₁₅) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les mono- et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles.

Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle.

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées. Une liste, visant à classer les constituants des huiles essentielles en fonction de l'intensité de leur activité, a d'ailleurs été établie [Kalemba et Kunicka, 2003]

Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol (Figure 6), sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de



constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, d'origan et de clou de girofle, démontrent les plus hautes activités antibactériennes.

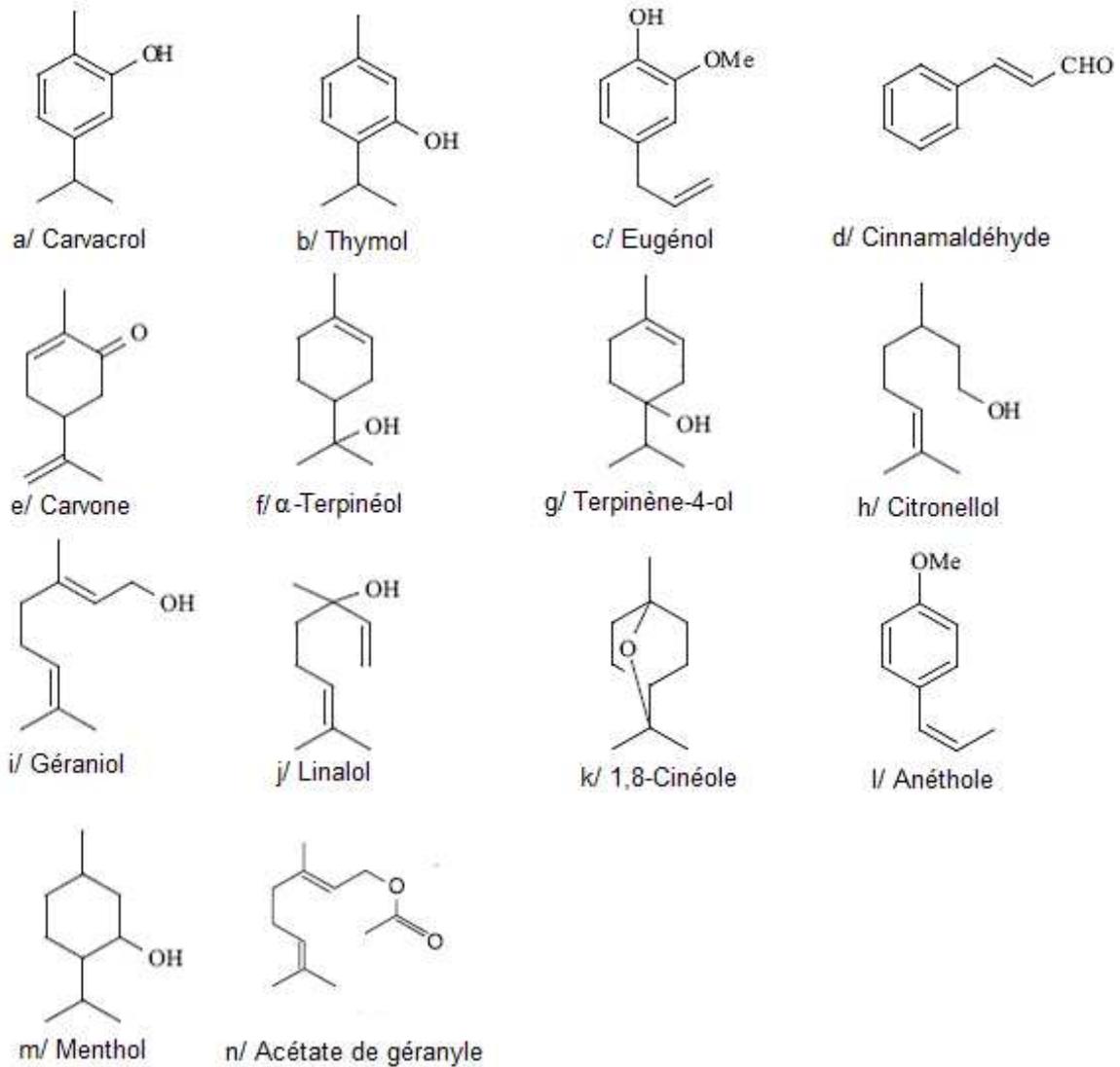


Figure 6 : Composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles (Kalemba et Kunicka, 2003)



4. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

Outre l'activité antibactérienne des huiles essentielles, leurs propriétés antioxydantes sont depuis peu massivement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'alzheimer [Butterfield, 2002], l'artériosclérose et le cancer [Gardner, 1997]. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine C, α -tocophérol, BHT, etc.) [Béliveau, 2005].

Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants [Edris, 2007]. Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs [Braga et al, 2006]. L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuables à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le tinalool, le 1,8-cinéole, le gèranial/néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène, γ -terpinène et l'aterpinolène [Edris, 2007].

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite [Maruyama et al, 2005]. Plusieurs études ont, par exemple, mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* [Koh et al, 2002; Caldefie-Chézet et al, 2004; Caldefie-Chézet et al., 2006] et de son composé principal, l' α -terpinéol [Hart et al., 2000].

Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles



essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux [Edris, 2007].

Les huiles essentielles agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer [Béliveau et al., 2006]. Certains de ces aliments contiennent des composés volatils dont l'activité chimiopreventive a été mise en évidence [Pyun et al., 2006 ; Milner, 2001; Milner, 2006].

Le géraniol, un alcool monoterpénique très fréquent dans les huiles essentielles, diminue la résistance des cellules cancéreuses du côlon (TC118) envers le 5-fluorouracil, un agent anticancéreux.

L'huile essentielle de sapin baumier et un de ses composés, l' α -humulène, ont montré une activité anticancéreuse significative sur plusieurs lignées cellulaires ainsi qu'une faible toxicité envers les cellules saines [Legault et al, 2003].

III. Les huiles essentielles étudiées

Pour ne pas induire une résistance multiple chez les bactéries, les produits potentialisateurs de l'activité des antibiotiques ne doivent pas présenter de pouvoir antibactérien intrinsèque.

Nous nous sommes, ainsi, basés sur les résultats d'une étude de l'activité antibactérienne de 23 huiles essentielles pour en choisir les moins actives :

la verveine (*Aloysia citrodora*), l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), l'origan (*Origanum vulgare*), le myrte (*Myrtus communis*) et l'oranger amer (*Citrus aurantium*) [Bouhdid, 2009].



1. Verveine (*Aloysia Citrodora*)



Du nom scientifique *Aloysia Citrodora*, la verveine odorante est une plante ligneuse d'Amérique du Sud qui a un goût très parfumé et utilisée dans divers domaines culinaire, commercial. Son huile essentielle est utilisée dans le monde entier en raison de ses propriétés sensorielles et médicinales.

Afin d'évaluer l'effet biologique sur la souche *Sitophilus granarius* deux chercheurs algériens ont étudié la composition de l'huile essentielle de *Lippia citrodora* et les ont comparé par rapport par à une autre étude faite en Argentine par Gillij et al, en 2008. La composition chimique de l'huile essentielle de *L. citriodora* feuilles est différente de celle observée en Argentine (Gillij et al, 2008). La comparaison de ces résultats avec la littérature montre des différences qualitatives et quantitatives dans la composition de l'huile. Elle a été dominée par les monoterpènes oxygénés (43,83% contre 65,70%, Gillij et al, 2008). Les principaux composants étaient limonène (17,72% contre 7,00%, Gillij et al., 2008), géraniol (14,79% contre 22,70%, Gillij et al., 2008), carvone



(14,22% contre 0,80%, Gillij et al., 2008) et l'oxyde de caryophyllène (12,38% contre 0,90%, Gillij et al., 2008). [Safia Zoubiri, Aoumeur Baaliouamer, 2011].

2. Armoise blanche (*Artemisia herba alba*)



C'est une plante de basse dans les régions sémi-désertiques.

Elle est ligneuse basse et toujours verte.

L'espèce *Artemisia herba alba*, ou armoise blanche, se rencontre à l'état spontané au Maroc. Presque spécifique du Sud du bassin méditerranéen, elle affectionne les climats secs et chauds et il n'est pas rare de trouver des zones de plusieurs dizaines de kilomètres de rayon où seule l'armoise règne dans un paysage quasi-désertique. Le Maroc attache beaucoup d'importance à cette plante qui constitue un excellent moyen naturel de lutte contre l'érosion et la désertification.

Désignée en arabe sous le nom de «Chih», l'armoise blanche possède une grande renommée dans la médecine traditionnelle [Bellkhdar. J, 1975]. Un vieux dicton du sud marocain en est l'illustration: «*Qui connaît le chih ne peut passer à coté sans en prendre* ».

L'étude qualitative de l'huile essentielle d'Armoise blanche, *Artemisia herba alba*, du Maroc faite par Benjilali B. et Richard H a permis d'identifier 16 composés terpéniques: α -pinène, camphène, β -pinène, sabinène, P-cymène, cinéole-1,8, α - et β -thujones, camphre, myrténal, cuminaldéhyde, terpinène-1-ol-4, trans-pinocarvéol, bornéol, myrténol et l'acétate de bornyle, ainsi que la présence probable de deux composés: le β -guaiène et le γ -élémane. Les trois cétones, α - et β -



thujones et camphre, représentent entre 60 et 80% de l'huile essentielle totale [Benjlali B et al, 1980].

3. Romarin (*Rosmarinus officinalis*)



Rosemary (*Rosmarinus offi*
forme d'aiguilles de conifè

est vivace avec des feuilles en
région méditerranéenne et est un

membre de la famille des Lamiacées.

La composition volatile de l'huile essentielle de romarin est l'objet de recherches considérables ces dernières années. L'huile essentielle de Romarin contient principalement des monoterpènes et dérivés monoterpéniques (95-98%), le reste (2-5%) étant sesquiterpènes. Les principaux composés volatiles sont le camphre et le 1,8-cinéole, suivies par le bornéol, le verbenone, l' α -pinène et le camphène [Mehdi Jalali-Heravi, 2011].

Le romarin est extrêmement élevé en fer, du calcium et de la vitamine B6. Il a une réputation très ancienne pour améliorer la mémoire, et a été utilisée comme un symbole pour le souvenir en Europe. L'acide carnosique, trouvé dans le romarin, protège le cerveau contre les radicaux libres. Il est utile pour remède d'anxiété, ballonnement, la migraine, hypertension, céphalées et il peut également être utilisé comme analgésique local dans le traitement des douleurs musculaires, des maladies rhumatismales [Naciye Erkan, 2008].



4. Origan (*Origanum vulgare*)



Origanum vulgare (Origan) appartient à la famille des Lamiacées. Issue d'Europe,

l'origan s'est très bien exporté au Moyen-Orient. Connue et reconnue par les peuples de l'Antiquité pour son goût prononcé et ses vertus médicinales

Jefferson Carneiro de Barros et ses collaborateurs ont fait une étude sur l'huile essentielle d'Origan en vue de savoir l'action antibactérienne sur Staphylocoques aëriens. L'analyse par GC-MS a montré que le carvacrol (57,71%) est le composé le plus répandu dans l'huile, puis p-cymène (10,91%), g-terpinène (7,18%), terpinène-4-ol (6,68%) et le thymol (3,83%) [Jefferson Carneiro et al, 2009].

Des chercheurs ont fait des études sur l'activité biologique de la dite plante et ont relevé une forte activité antibactérienne et une activité antifongiques sur des souches de Staphylococques [Braho Z. Ličina, 2013].



5. Myrte commun (*Myrtus communis*)



Communément un arbuste au port dressé. D'origine méditerranéenne ses feuilles sont longues ovales et opposées de couleur vert foncé. Ses fruits sont des baies oblongues ellipsoïdales.

Des études ont été faites sur l'huile essentielle de Myrte révélant ainsi leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-nociceptives. Elle est composée de produits majoritaires tels que 1,8-cinéole, α -pinène le linalol, l'acétate de bornyle, α -terpinéol, le limonène. L'activité antimicrobienne fut révélée assez importante sur la souche *Candida albicans*. [[Davod Yadegarinia](#) et al 2006].

En herboristerie, les feuilles de *Myrtus communis* sont classées astringentes, toniques et antiseptiques.

Une infusion de feuilles sert, en usage externe, à guérir les blessures et les ulcères ou, en usage interne, à soigner les troubles digestifs et urinaires.

6. Bigardier ou oranger amer (*Citrus aurantium*) :





Le [bigaradier](#) (*Citrus aurantium* L.) un arbuste aux feuilles en fuseau et luisantes. Le bigaradier, épineux, à fleurs blanches parfumées dont les pétales sont bien déliés et plus grands que celle de l'[oranger](#) doux

Aujourd'hui, le [Maroc](#) est l'un des premiers producteurs de cette fleur dont les produits obtenus sont divers et très recherchés : [Néroli](#) (pour laquelle 1 000 kg de fleurs sont nécessaires pour produire 1 litre), eau de [fleur](#) d'oranger, absolue d'[oranger](#) (obtenue par extraction aux solvants volatils des fleurs de l'oranger). Et c'est non loin de [Rabat](#) - [capitale](#) du royaume -, que nous la retrouvons, plus précisément dans la région de Khémisset, complantée de milliers d'arbustes et d'arbres aux feuilles en fuseau, persistantes et luisantes: les [Citrus aurantium](#) - plus communément appelés bigaradiers, issus de la grande famille des [rutacées](#) qui compte 900 espèces, réparties en 150 genres, à l'instar des [agrumes](#).

Plusieurs parties de l'oranger amer ont des propriétés traditionnellement connues. Les feuilles et les précieuses fleurs sont reconnues comme [sédatives](#), de même que les différentes huiles essentielles qu'on en extrait. L'[huile essentielle](#) des fleurs (ou essence de [néroli](#)) est reconnue pour être à la fois [tonique](#), sédatif et [antidépresseur](#). Toutefois, l'utilisation la plus répandue demeure dans la [parfumerie](#) et la [cosmétique](#).



Matériels et Méthodes



1. Matériel végétal

Les plantes que nous avons étudiées ont été achetées chez un herboriste à Fès. Six plantes ont été utilisées dans ce travail : la verveine (*Aloysia citrodora*), l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), l'origan (*Origanum vulgare*), le myrte (*Myrtus communis*) et l'oranger amer ou brigadier (*Citrus aurantium*).

L'huile essentielle est préparée par hydrodistillation sur l'appareil de Clevenger (Figure7).

Le principe de cette méthode est basé sur un entraînement des constituants volatils de l'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée de principes volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner de l'huile essentielle après décantation.



Figure 7. Hydrodistillation par l'appareil Clevenger

2. Extraction des huiles essentielles



L'huile essentielle a été extraite à partir des plantes étudiées par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Cette méthode est basée sur un entrainement des constituants volatils de l'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée de principes volatils est condensés dans un réfrigérant pour séparer l'eau de l'huile essentielle après décantation.

Le matériel végétal sec est placé dans un ballon rempli au 2/3 avec de l'eau distillée, puis porté à ébullition. On maintient le chauffage à température douce pendant 3 heures. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle et l'eau se séparent par différence de densité. Les huiles essentielles, étant moins dense que l'eau, ont été récupérées

3. Souches bactériennes

Deux souches bactériennes de l'American Type Culture Collection (ATCC) ont été utilisées lors de ce travail ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Gram positif).

4. Préparation de l'inoculum

Des tubes contenant le bouillon Tryptone-Soja sont inoculés à partir d'une culture stock de la souche bactérienne et incubés à 37°C pendant 24 h. A partir de la culture obtenue, une suspension bactérienne à 0,5 McFarland est préparée dans de l'eau physiologique. La densité bactérienne de la suspension obtenue est d'environ 1,5 10⁸ UFC/ml.

5. Méthode de diffusion par disques

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose. La surface de la gélose Mueller Hinton estensemencée par inondation à partir de l'inoculum



préparé. Des disques de papier filtre sont déposés sur la surface de la géloseensemencée. 20 μ l de l'huile essentielle à tester sont déposés sur le disque. Le chloramphénicol (30 μ g) et la streptomycine (10 μ g) sont utilisés comme antibactériens de référence. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques.

6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée, dans ce travail, par la technique de micro-dilution en milieu liquide. Des séries de dilutions doubles (50 μ l), allant de 4 à 0,0038% v/v dans le Bouillon Mueller Hinton (BMH) à 0,15% d'agar, sont préparées dans les puits d'une plaque de microtitration de 96 puits. A chaque puits sont ajoutés 50 μ l du BMH à 0,15% d'agar inoculés à partir de l'inoculum préparé en vue d'obtenir une concentration cellulaire finale d'environ 10⁶ UFC/ml. Les puits servant de contrôle ne contiennent pas d'huile essentielle. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h. La CMI correspond à la plus petite concentration d'huile essentielle qui ne produit aucune croissance visible.

La CMI des antibiotiques est déterminée par la même méthode dans le BMH sans agar. Les concentrations testées vont de 254 à 0,5 μ g/ml.

7. Synergie entre les huiles essentielles et la streptomycine

La synergie entre les huiles essentielles et la streptomycine a été évaluée par la détermination de la CMI de la streptomycine en présence de différentes concentrations de chacune des huiles essentielles.



La CMI des combinaisons est déterminée par la méthode de microdilution en utilisant le BMH à 0,15% d'agar. 50 μ l de la dilution de l'huile essentielle à tester sont ajoutés aux puits d'une plaque de microtitration contenant 50 μ l des dilutions de la streptomycine. 100 μ l de la suspension bactérienne sont ajoutés au mélange. La concentration bactérienne finale étant de 10^6 UFC/ml. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 24 h. La CMI correspond à la plus petite concentration de la streptomycine, en combinaison avec la dilution de l'huile essentielle, qui ne produit aucune croissance visible.



Résultats et Discussion



I. RESULTATS

1. Rendement en huiles essentielles

Les rendements en huiles essentielles sont calculés comme suit :

$$\left(\frac{\text{Masse de l'huile essentielle}}{\text{Masse de la matière végétale}} \right) \times 100$$

Tableau 1. Rendement en huiles essentielles

Plante	Partie utilisée	Rendement en huile essentielle
Verveine	Feuilles	0,44 %
Armoise blanche	Partie aérienne	0,82 %
Romarin	Partie aérienne	1,30 %
Origan	Partie aérienne	1,86 %
Myrte	Partie aérienne	0,70 %
Oranger amer	Fleurs	0,66 %

Comme le montre le tableau 1, le meilleur rendement en huile essentielle a été obtenu pour l'origan suivi du romarin avec 1,86 et 1,30 %, respectivement. La verveine a donné le plus faible rendement (0,44%).

2. Activité antibactérienne

a. Diffusion sur disque

Nous avons déterminé, qualitativement, le pouvoir antibactérien des six huiles essentielles choisies et de deux antibiotiques disponibles sur le marché, sur deux souches de bactéries Gram + et Gram -. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.



Tableau 2: Activité antibactérienne des huiles essentielles et des antibiotiques testés

	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
Verveine	-	9,33 ± 0,57
Myrte	-	9,00 ± 1,00
Armoise blanche	-	7,16 ± 0,28
Romarin	-	7,33 ± 0,57
Fleur d'oranger	-	10,66 ± 0,57
Origan	ND	ND
Chloramphénicol	-	28,00 ± 0,00
Streptomycine	12,33 ± 0,57	12,50 ± 0,50

- : aucune inhibition, ND : non déterminé

Les diamètres des zones d'inhibition enregistrés (allant de 7,17 à 10,66 mm) montrent une activité inhibitrice relativement faible des huiles essentielles de la verveine, le myrte, l'armoise blanche, le romarin et les fleurs d'oranger sur *S. aureus*. Néanmoins, aucune activité n'a été observée contre *P. aeruginosa*.

Pour les antibiotiques testés, la streptomycine a le même effet inhibiteur sur les deux souches alors que le chloramphénicol n'est actif que contre *S. aureus*.

b. CMI des huiles essentielles et de la streptomycine.

Nous avons quantifié l'activité antibactérienne des six huiles essentielles et de la streptomycine sur les deux souches microbiennes en déterminant leurs CMI. Les résultats sont représentés dans le tableau 3.



Tableau 3: Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles et de la streptomycine

	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
	CMI*	CMB*	CMI*	CMB*
Verveine	>2	>2	>2	>2
Myrte	>2	>2	>2	>2
Armoise blanche	>2	>2	>2	>2
Romarin	>2	>2	>2	>2
Fleur d'oranger	>2	>2	1	ND
Origan	>2	>2	0,25	ND
Streptomycine	64	ND	64	ND

*: % v/v pour les huiles essentielles et µg/mL pour la streptomycine

Aucun effet antibactérien sur *P. aeruginosa* n'a été observé, aux concentrations utilisées, pour toutes les huiles testées. L'huile d'origan et celle des fleurs d'oranger inhibe la croissance de *S. aureus* à des concentrations de 0,25 et 1%, respectivement. Cependant, les autres huiles se sont montrées inactives.

c. Synergie entre les huiles essentielles et la streptomycine.

Nous avons combiné chaque huile avec la streptomycine afin de déterminer d'une manière quantitative la capacité éventuelle des huiles essentielles d'augmenter l'effet antibactérien de la streptomycine (Tableaux 4 et 5). Pour toutes les huiles étudiées, les concentrations utilisées sont inférieures à leurs CMI, à l'exception de l'huile d'origan pour laquelle les concentrations utilisées sont la CMI/2, la CMI et la CMIx2.



Tableau 4. Concentrations minimales inhibitrices de la streptomycine en combinaison avec les huiles essentielles contre *S. aureus*

	CMI*					
	Verveine	Romarin	Myrte	Armoise blanche	Fleur d'oranger	Origan
0%	64	64	64	64	64	64
0,125%	16	32	32	64	64	2
0,25%	8	32	16	64	32	1
Gain 0,125/0,25	4/8	2/2	2/4	-/-	-/2	32/64

*: µg/mL

Bien que les huiles essentielles de la verveine, du romarin et du myrte soient inactives contre les deux souches bactériennes aux concentrations utilisées, elles sont capables de potentialiser l'effet antibactérien de la streptomycine contre *S. aureus*. Quant à l'huile d'origan, elle diminue de 32 fois la CMI de la streptomycine à une concentration de CMI/2. Aucun effet n'a été observé pour l'huile de l'armoise blanche.

Tableau 5. Concentrations minimales inhibitrices de la streptomycine en combinaison avec les huiles essentielles contre *P. aeruginosa*

	CMI*					
	Verveine	Romarin	Myrte	Armoise blanche	Fleur d'oranger	Origan
0%	64	64	64	64	64	64
0,25%	64	64	64	64	64	64
0,5%	64	32	64	64	64	32
Gain 0,25/0,5	-/-	-/2	-/-	-/-	-/-	-/2

*: µg/mL

Pour *P. aeruginosa*, les huiles essentielles du romarin et de l'origan ont montré un faible effet synergique avec la streptomycine à une concentration de 0,5%. Aucune activité n'est observée pour les autres huiles.



II. DISCUSSION

Le test de diffusion sur disques nous a permis d'évaluer d'une manière qualitative l'effet des huiles essentielles sur deux bactéries *S aureus* (Gram +) et *P. aeruginosa* (Gram -) en comparaison avec deux antibiotiques mis sur le marché, la streptomycine (aminoside) et le chloramphénicol (phénicolé).

Toutes les huiles essentielles ont montré une activité antibactérienne inférieure à celle des deux antibiotiques de référence, aussi bien sur la souche Gram + que sur la Gram-.

Elles n'avaient pas d'effet sur *P. aeruginosa*, pathogène opportuniste bien connu par sa résistance naturelle aux antimicrobiens conventionnels, alors qu'une faible activité antibactérienne a été observée sur *S. aureus*. Certains travaux ont attribué la faible susceptibilité de *P. aeruginosa* aux huiles essentielles et leurs composants à sa membrane externe et à des systèmes d'efflux actifs [Longbottom *et al.*, 2004; Papadopoulos *et al.*, 2008]

Nous avons trouvé des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très élevées pour les six huiles essentielles étudiées (>2%) sauf pour l'origan (0,25%) et les fleurs d'oranger (1%) qui avaient une CMI moyenne sur *S. aureus*. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence du carvacrol dans l'huile d'origan [Stojković *et al.*, 2013] et du limonène et du α -terpinéol dans celle des fleurs d'oranger [Haj Ammar *et al.*, 2012].

Donc, les huiles essentielles que nous avons choisies étaient inactives ou peu actives sur les deux souches bactériennes. De ce fait elles peuvent être utilisées comme potentialisateurs de l'effet des antibiotiques sans risquer d'induire de nouvelles résistances chez les bactéries.



L'utilisation des huiles essentielles, à différentes concentrations, en combinaison avec la streptomycine a permis de réduire dans la plupart des cas la CMI de cette dernière sur *S. aureus*. En effet, à la concentration de 0,25% :

- l'origan a réduit de 64 fois la CMI de la streptomycine,
 - la verveine l'a réduite huit fois,
 - le myrte l'a réduite de quatre fois,
- le romarin et les fleurs d'oranger l'on réduite de deux fois.

Ces résultats nous permettent de conclure que cinq huiles essentielles parmi les six étudiées ont agité d'une manière synergique avec la streptomycine sur une bactérie à Gram + (*S. aureus*).

Toutefois seules les huiles du romarin et de l'origan qui ont présenté un effet synergique avec la streptomycine sur la bactérie à Gram – (*P. aeruginosa*). Elles ont réduit la CMI de l'antibiotique deux fois à une concentration de 0,5%. Ceci est dû à la résistance de *P. aeruginosa* aux huiles essentielles utilisées.



Conclusion

Les antibiotiques sont les molécules extraites de microorganismes et ont permis une avancée incroyable dans le traitement des maladies infectieuses. Cependant de par la mauvaise utilisation des patients, il y a eu le développement des résistances. De façon naturelle et acquise, ces diverses



résistances sont la source véritable de la résistance des antibiotiques et ont constitué un frein majeur dans le domaine de la santé.

Nous avons donc tourné un regard vers l'aromathérapie en utilisant les huiles essentielles dans l'objectif d'une synergie c'est-à-dire de pouvoir augmenter l'effet antibactérien des antibiotiques afin de trouver une solution face à ce problème de résistance. Ce résultat s'est avéré positif car nous avons bel et bien obtenue cette synergie. Cette synergie est proportionnée à l'effet antibactérien de l'huile essentielle.

Il serait intéressant de faire un fractionnement des huiles essentielles les plus actives pour déterminer le ou les constituants responsables de cette activité. L'étude de toxicité de ces huiles permettrait, également, de déterminer l'indice thérapeutique de celles-ci, afin d'avoir une vision complète sur la possibilité de leur utilisation en thérapeutique.

Et enfin, l'utilisation des huiles essentielles en combinaison avec un antibiotique sur une souche résistance permettrait d'évaluer leur pouvoir de réversion de la résistance à l'antibiothérapie.

Ce stage m'a été très bénéfique car il m'a permis de mettre à profit mes connaissances et d'élargir mon champ de connaissance surtout en microbiologie et par-dessus tout d'avoir un aperçu du vaste monde de la recherche.



Annexes



Bibliographie

- Barel S, Segal R, Yashphe J. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *J. Ethnopharmacol.* **33**: 187-191, **1991**
- Béliveau, R.; Gingras, D. Les aliments contre le cancer. Édition du Trécarré. Outremont. P 213, **2005**
- BELLKHDAR. J. et KHAFADJY S.M. *Médecine traditionnelle et toxicologie Ouest-Saharienne*. Contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Techniques Nord-Africaines, Rabat, Maroc, **1975**
- Benjlali B. et Richard H. Etude de quelques peuplements d'Armoise blanche du Maroc *Artemisia herba alba*. *Rivista Italiana*, **2** : 62-74, **1980**.
- Bouhdid S. Activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles. Application biotechnologique pour l'amélioration de la qualité des boyaux naturels. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Abdelmalek essaadi. Faculté des Sciences; **2009**.
- Braho Z. Ličina. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L, *Food control*, **33** : 498-504, **2013**.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists: Rockville, MA, p 1367, **2000**
- Butterfield D.; Lauderback, C. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 32,1050-1060, **2002**.
- Caldefie-Chézet, F.; Fusillier, C; Jarde, T.; Laroye H.; Damez, M.; Vasson, M.P. Potential antiinflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytother. Res.* 20, 364-370, **2006**.
- Caldefie-Chézet, F.; Guerry, M.; Chalchat, J.C.; Fusillier, C; Vasson, M.P.; Guillot, J. Antiinflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radical Res.* 38, 805-811, **2004**.
- Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Favretto, L; Colnaghi, G.; Visinoni, F. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta* 555,157-160, **2006**.
- Edris, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 21, 308-323. **2007**.



- Edris, A.E.; Shalaby, A.; Fadel, H. Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L) growing in Siwa Oasis, Egypt. *Eur. Food Technol.* 218, 74-78, **2003**.
- Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P.L; Ceccarini, L; Ricci, A.S.; Longo, I. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *J. Chromatogr. A* 1143, 36-40, **2007**.
- Franchomme, P.; Pénéol, D. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. P 445, **1990**.
- Gardner, P. Superoxide-driven a conitase FE-S center cycling. *Bioscience Rep.* 17, 33 42, **1997**.
- Guler Ayranci, Erol Ayranci, and Naciye Erkan, Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol, *Food Chemistry*, **110** : 76-82, **2008**.
- Haj Ammar, A., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Romdhane, M., and Zagrouba, F. Chemical Composition and *in vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Citrus aurantium* L. Flowers Essential Oil (Neroli Oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15: 1034-1040, **2012**.
- Hart, P.H.; Brand, C; Carson, CF.; Riley, T.V.; Prager, R.H.; Finlay-Jones, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca altemifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *inflamm. Res.* 49, 619-626, **2000**.
- Hossein Hosseinzadeh, Mohammad Khoshdel, Maryam Ghorbani, Antinociceptive, Anti-inflammatory Effects and Acute Toxicity of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Myrtus communis* L. Aerial Parts in Mice Pharmaceutical Research Center, Pharmacodynamics and Toxicology Department, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I.R. Iran, **2011**.
- Jalali-Heravi M, Moazeni RS, Sereshti H. Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Chromatography A*, 2569-76, **2011**.
- Jefferson Carneiro et col, Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT. Food Science and Technology*, 1139-1143, **2009**.
- Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829, **2003**.



- Koh, K.J.; Pearce, A.L.; Marshman, G.; Finlay-Jones, J.J.; Hart, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation, *Br. J. Dermatol.* 147,1212-1217, **2002**.
- Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, A.; Madelmont, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* 69, 402-407, **2003**.
- Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**: 122-129, **2004**.
- Longbottom, C.J., Carson, C.F., Hammer, K.A., Mee, B.J. and Riley, T.V. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 386-392. **2004**.
- Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Bradshaw, S.; Louw, W.; Chemat, F. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Engineer.* 79, 1079-1086, **2007**.
- Maruyama, N.; Sekimoto, N.; Ishibashi, H. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J. inflamm.* 2,1-11, **2005**.
- Mengel, P.; Beh, D.; Bellido, G.M.; Monpon, B. VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes.* 114, 66-67, **1993**.
- Milner, J.Â. A historical perspective on garlic and cancer. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *J. Nutr.* 131, 1027-1031, **2001**.
- Milner, J.Â. Preclinical perspectives on garlic and cancer. Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 136, 827-831, **2006**.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **66**: 1022-1037, **2003**.
- Papadopoulos, C.J., Carson, C.F., Chang, B.J. and Riley, T.V. Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1,8-cineole, and alpha-terpineol. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1932-1935, **2008**.
- Prescott L M, Harley JP, Klein DA. *Microbiologie*. De Boeck ed. p 1014, **1995**.
- Pyun MS., Shin S. Trichophyton species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13, 394- 400, **2006**.
- Pyun, M.S.; Shin, S. Antifungal effects of the volatile oils from *Asium* plants against. **2006**.
- Richard, H. *Épices et Aromates*. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339, **1992**.



Safia Zoubiri ,Aoumeur Baaliouamer Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria, Food Chemistry, **2011**.

Singh SB, Barrett JF. Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* **71**: 1006-1015, **2006**.

Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Šiljegović, J., Soković, M. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *thymus vulgaris* essential oils. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 65 (2), 639-643, **2013**.

Yadegariniaa D., Gachkara L., Rezaeib MB., Taghizadehc M., Astanehc SA, Rasoolic I., Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils, *Phytochemistry*, **67** : 1249-1255, **2006**



Webographie

www.sciencedirect.com

www.wikipédia.com

www.google.fr

www.aroma-zone.fr