

**UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA - BÉJAÏA**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie Physico-Chimique**

# **MÉMOIRE**

**Présenté par**

**Mr ADRAR Nabil**

**Pour l'obtention du diplôme de Magister**

**Filière : Biologie**

**Option : Ingénierie Biochimique et Biotechnologies**

## **Thème**

**Activité antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles du  
thym numide et de la sauge**

Soutenu le 12 Mars 2015

Devant le Jury composé de :

**Président :** Mr KECHA Mouloud (Pr., U.A.M.B.)

**Rapporteur :** Mme BEDJOU Fatiha (Pr., U.A.M.B.)

**Examineur :** Mr NABTI El-Hafidh (MCA, U.A.M.B.)

**Examineur :** Mr OUCHEMOUKH Salim (MCA, U.A.M.B.)

**Invitée :** Mme OUKIL Naima (MCB, U.A.M.B.)

## *Remerciements*

Je voudrais tout d'abord remercier ma promotrice, Madame le Professeur **BEDJOU Fatiha** de m'avoir encadré et pour sa disponibilité, sa confiance, son soutien moral, et ses orientations scientifiques tout au long de ce travail.

Je remercie Messieurs : le Professeur **KECHA Mouloud**, le Docteur **NABTI Elhafidh**, et le Docteur **OUCHEMOUKH Salim** d'avoir eu l'amabilité d'accepter de partager leurs connaissances et de faire partie de mon Jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame le Docteur **OUKIL Naima** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de microbiologie, pour son assistance et ses idées. Par ailleurs, je remercie Mademoiselle **BOURBABA Lynda** (Doctorante à l'UAMB) pour son aide précieuse.

Je veux faire part aussi de toute ma gratitude à Monsieur le Docteur **BOUADAM Said** pour avoir identifié les espèces de plantes et Monsieur le Docteur **BEKDOUCHE Farid** pour avoir contribué à l'analyse statistique de nos résultats.

Je remercie Monsieur le Professeur **TOUATI Abdelaziz** pour les souches qu' il nous a fourni.

Merci également aux **secrétaires** ainsi qu'au **personnel technique des laboratoires** de la faculté des SNV.

Enfin je remercie **tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.**

## *Dédicaces*

Au nom d'ALLAH le tout miséricordieux, le très miséricordieux, « gloire à toi nous n'avons de savoir que ce que tu nous as appris, certes c'est toi l'omniscient, le sage » je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents

Mes sœurs et mes frères

Mes nièces et mes neveux

Tous mes proches

Mes amis, mes camarades et mes collègues.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ABTS** : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

**ALAT** (voir aussi SGPT) : alanine aminotransférase

**ANOVA** : analysis of variance

**ASAT** (voir aussi SGOT) : Aspartate aminotransférase

**ATCC** : *american type culture collection*

**ATP** : adénosine-5'-triphosphate

**BaCl<sub>2</sub>** : chlorure de baryum

**BMH** : bouillon Mueller Hinton

**CLSI** : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**cm** : centimètre

**CMB** : concentration minimale bactéricide

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**DO** : Densité optique

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**ERK** : *extracellular signal-regulated kinase*

**ESO** : Extrait éthanolique de *Salvia officinalis*

**FIC** : concentration inhibitrice fractionnaire

**FIC50** : concentration inhibitrice fractionnaire 50%

**FIC<sub>50</sub>I** : FIC50 index

**FICI** : FIC index

**g** : gramme

**h** : heure

**HDL** : *High density lipoprotein*

**HE** : huile essentielle

**HNSCC** : *head and neck squamous cell carcinoma*

**HSO** : fraction hexane de l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis*

**I%** : pourcentage d'inhibition

**IC50** : concentration donnant 50% d'inhibition

**IL-6** : interleukine 6

***K. pneumoniae*** : *Klebsiella pneumoniae*

**Kg** : kilogramme

**L** : litre

**LDL** : *low density lipoprotein*

**mg** : milligramme

**min** : minute

**ml** : millilitre

**mm** : millimètre

**mmol** : millimole

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : sulfate de sodium anhydre

**NCCLS** : *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

**nm** : nanomètre

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*

**PGE2** : prostaglandine E2

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*

***S. marcesens*** : *Serratia marcesens*

***S. officinalis*** : *Salvia officinalis*

**SGOT** (voir aussi ASAT) : sérum glutamo-oxaloacétate transférase

**SGPT** (voir aussi ALAT) : sérum glutamopyruvate transférase

***T. numidicus***: *Thymus numidicus*

**TNF** : tumor necrosis factor

**UFC** : unité formant colonie

**Vit. E** : vitamine E

**VLDL** : very low density lipoprotein

**%** : pourcentage

**°C** : degré Celsius

**µg** : microgramme

**µl** : microlitre

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre de la figure	Page
1	Image de <i>Salvia officinalis</i>	6
2	Répartition du genre <i>Thymus</i> dans le monde	13
3	Photographie de <i>Salvia officinalis</i> , prise en Janvier 2014 sur le site de la récolte	16
4	Photographie de <i>Thymus numidicus</i> provenant du site de la récolte, prise en Juin 2014	17
5	Montage utilisé pour l'hydrodistillation	19
6	Le protocole de l'hydrodistillation	20
7	Schéma d'une microplaque de 96 puits	21
8	Le DPPH <sup>*</sup> (radical libre) et l'hydrazine (non radical) correspondant	24
9	Illustration d'un isobologramme typique	26
10	L'HE de <i>Thymus numidicus</i>	27
11	L'HE de <i>Salvia officinalis</i>	27
12	CMI et CMBs de l'HE du Thym sur les souches testées	28
13	CMI et CMBs de l'HE de la Sauge sur les souches testées	28
14 à 26	Isobogrammes des différentes associations d'agents antibactériens	33 à 37
27	Graphique représentant les pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations (a)	39
28	Graph représentant les pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations (b)	39
29	IC50 des différents échantillons	40
30	Isobologramme de l'HE du thym combinée avec celle de la sauge	41
31	Isobologramme du thymol combiné avec l'HE de la sauge	42
32	Isobologramme la vit. E combinée avec l'HE de la sauge	42
33	Isobologramme de la vit. E combinée avec l'HE du thym	43

**Ancien Monde** : se réfère à la partie du Monde connue par les européens depuis l'antiquité, avant les voyages de Christophe Colomb : l'Europe, l'Asie et l'Afrique (Afro-Eurasie). Par distinction au Nouveau Monde : l'Amérique et l'Océanie.

**Angiogenèse** : Développement de vaisseaux capillaires à partir de capillaires préexistants. (Ce processus intervient notamment dans la cicatrisation mais pourrait jouer un rôle dans la formation de cancers.)

**Antigalactogène** : qui inhibe la sécrétion lactée.

**Antinociceptif** : Qui inhibe la nociception, la sensibilité à la douleur.

**Antiphlogistique** : Qui combat les inflammations (mot ancien).

**Antispasmodique** : Médicament utilisé dans le traitement des spasmes musculaires.

**Antisudorale** : Synonyme de antiperspirant : substance utilisée pour diminuer une transpiration excessive.

**Apoplexie** : Perte de connaissance brutale avec suspension de la motilité volontaire et de la sensibilité et conservation des fonctions végétatives.

**Aromate** : Toute substance végétale d'une odeur agréable, employée notamment en cuisine.

**Asie mineure** : ou Anatolie ; péninsule située à l'extrémité occidentale de l'Asie.

**Astringent** : Se dit d'une substance qui resserre et assèche les tissus, et peut faciliter leur cicatrisation.

**Auriculé** : Se dit d'un organe présentant latéralement à sa base des éléments en forme de petites oreilles.

**Bilabié** : Se dit d'un calice ou d'une corolle dont les éléments forment deux lèvres.

**Calice** : Verticille externe ou unique de la fleur, formé de pièces le plus souvent vertes (sépalés) et assurant la protection des autres verticilles dans le bouton floral.

**Carcinome** : Tumeur maligne développée aux dépens des tissus épithéliaux.

**Chémotype** : Ce terme s'applique à tout type de composés chimiques appartenant aux métabolites secondaires. Les huiles essentielles tiennent une place prépondérante dans ce phénomène. Le chémotype ou CT d'une huile essentielle correspond à la molécule majeure du profil biochimique de l'huile essentielle étudiée.

**Cohobage** : Recyclage dans l'alambic, pendant une distillation, de l'eau recueillie à la sortie de l'appareil après séparation de l'essence.

**Corole** : Partie d'une fleur complète qui enveloppe immédiatement les organes de la fécondation et qui est ordinairement colorée.

**Crète** : Île de la mer Méditerranée et région de Grèce.

**Denticulé** : Qui est finement denté.

**Digestive** : Qui facilite la digestion.

**DL- $\alpha$ -tocophérol** : Forme de vitamine E produite par synthèse chimique ; c'est un mélange de huit stéréo-isomères répartis de façon équivalente dont l'un d'entre eux (1/8ème) a une structure moléculaire identique à celle de la vitamine E naturelle (D-alpha-tocophérol).

**Emménagogue** : Qui favorise ou provoque la menstruation.

**Épi** : Par extension, toute inflorescence dont les fleurs sont disposées autour d'un axe central, sans pédicelle ou avec un pédicelle très court.

**Erigé** : Dressé, élevé.

**Eupeptique** : Qui favorise la digestion, en parlant d'un produit, d'un extrait de plante.

**Gargarisme** : Solution médicamenteuse utilisée pour rincer la bouche et la gorge.

**Groenland** : Très grande île du nord de l'océan Atlantique.

**H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase** : pompe à protons assurant la sécrétion de protons responsables de l'acidité du liquide gastrique.

**Herbacé** : Qui a l'aspect, qui est de la nature de l'herbe (S'oppose à ligneux.)

**Herpétique** : Qui se rapporte ou qui est dû à l'herpès ; qui est atteint de l'herpès qui est une affection de la peau et des muqueuses d'origine virale.

**Ibérique** : Qui est relatif à l'Espagne et au Portugal.

**Iléon** : Partie terminale de l'intestin grêle.

**Lancéolé** : Se dit d'une feuille en forme de fer de lance.

**Ligneux** : Qualifie une plante dont la tige a la consistance du bois, grâce à la lignine qu'elle contient.

**Ligneux** : Se dit d'une plante contenant suffisamment de faisceaux lignifiés pour que ses tiges soient résistantes.

**Limbe** : Partie la plus importante, généralement large et aplatie, d'une feuille.

**Névralgie** : Douleur provoquée par une irritation ou par une lésion d'un nerf sensitif.

**Numide** : Relatif à la Numidie (Antiquité), Pays des Numides, situé sur la bordure nord de l'Algérie et l'ouest de la Tunisie moderne, bordé par la province romaine de Maurétanie à l'ouest, la Tripolitaine à l'est, la Méditerranée au nord et le Sahara vers le sud.

**Oblongue** : D'une forme allongée.

**Peptique** : Qui a rapport à la pepsine (enzyme du suc gastrique).

**Pétiolé** : Qui est porté par un pétiole (partie rétrécie de certaines feuilles unissant le limbe à la tige), par opposition à « sessile ».

**Psychosomatique** : Se dit d'un trouble organique ou fonctionnel d'origine psychique.

**Pubescence** : Caractère d'une surface externe, animale ou végétale, couverte de poils fins et courts.

**Sessile** : Se dit d'une feuille ou d'une fleur ayant une implantation fixe dépourvue de pétiole ou de pédoncule.

**Stimulant** : Qui est propre à stimuler les fonctions organiques, à accroître l'activité physique ou intellectuelle.

**Stomatite** : Inflammation de la muqueuse de la bouche.

**Tachycardie** : Augmentation anormale du nombre des battements du cœur.

**Temporale** : Qui a rapport aux tempes (parties latérales de la tête entre l'oreille et le front).

**Thrips** : Petit insecte thysanoptère, à l'abdomen pointu, qui abonde sur diverses plantes (lin, céréales, pois, tabac, glaïeul) dont il épuise les feuilles par ses piqûres.

**Tilapia** : Nom commun d'un poisson d'eau douce très répandu en aquiculture, originaire d'Afrique et du Proche et Moyen-Orient.

**Tubuleuse** : Qui est en forme de tube.

**Verticille** : Ensemble de pièces, feuilles par exemple, disposées circulairement autour d'un même point de la tige.

**Vivace** : Se dit d'une plante dont la période de végétation s'étend sur plusieurs années, même lorsque les parties souterraines (organes dits *spérennants* : rhizomes, bulbe, tubercule, etc.) subsistent seules en hiver.

**β-amyloïde** : C'est une protéine localisée surtout au niveau du cerveau mais que l'on retrouve aussi dans la circulation sanguine. Elle provient de la protéine APP : *Amyloid Precursor Protein*. La présence d'agrégats de bêta-amyloïde ou plaque amyloïde est un signe caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

## Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Glossaire

Sommaire

**Introduction** ..... 1

### **Étude bibliographique**

MONOGRAPHIE DES DEUX PLANTES TESTÉES..... 4

I *Salvia officinalis* ..... 4

I-1 Généralités sur le genre *Salvia* ..... 4

I-2 Place de *S. officinalis* dans la systématique ..... 4

I-3 Étymologie de la sauge officinale ..... 4

I-4 Description ..... 5

I-5 Origine..... 5

I-6 Propriétés biologiques et utilisations traditionnelles de la sauge officinale ..... 6

I-7 Propriétés biologiques et utilisation de l'huile essentielle de la sauge officinale ..... 7

I-8 Propriétés biologiques et pharmacologiques de *S. officinalis* issues de l'expérimentation scientifique ..... 7

I-8-1 Activité anticancéreuse ..... 7

I-8-2 Activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice ..... 8

I-8-3 Activité gastroprotectrice ..... 9

I-8-4 Activité hypoglycémiante..... 9

I-8-5 Activité anti-hyperlipidémique..... 9

I-8-6 Effets hypotenseurs et spasmolytiques..... 10

I-8-7 Action sur le système nerveux..... 10

I-8-8 Action sur les hormones..... 11

I-8-9 Activité antisudorale..... 11

I-8-10 Activité antioxydante ..... 11

I-8-11 Activité antimicrobienne ..... 11

I-8-12 Activité insecticide ..... 12

I-9 Effets secondaires de <i>S. officinalis</i> .....	12
II <i>Thymus numidicus</i> .....	12
II-1 Généralités sur le genre <i>Thymus</i> .....	12
II-2 Étymologie du thym .....	14
II-3 Place de <i>T. numidicus</i> dans la systématique .....	14
II-4 Description .....	14
II-5 Généralités .....	14
II-6 Activités biologiques du thym numide .....	15
<b>Étude expérimentale</b>	
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	16
I Matériel.....	16
I-1 Les souches bactériennes .....	16
I-2 Le matériel végétal.....	16
I-3 Les antibiotiques.....	17
I-4 Autres composés chimiques.....	17
II Méthodes.....	18
II-1 Extraction des huiles essentielles.....	18
II-1-1 Récolte et séchage.....	18
II-1-2 Extraction .....	18
II-1-2-1 Principe de l'hydrodistillation .....	19
II-1-2-2 Le protocole .....	19
II-1-2-3 Calcul du rendement.....	20
II-2 Les essais bactériologiques.....	20
II-2-1 Préparation et standardisation des inocula bactériens .....	21
II-2-2 Technique de l'échiquier .....	21
II-2-2-1 Mise en émulsion des huiles essentielles .....	22
II-2-2-2 Expression et interprétation des résultats .....	23
II-3 Évaluation de l'activité antioxydante des différents échantillons .....	23
II-3-1 principe .....	23
II-3-2 Mode opératoire .....	24

II-3-3 Expression des résultats .....	25
II-4 Évaluation de l'activité antioxydante des échantillons en associations.....	25
II-3-1 Le protocole.....	26
<b>RÉULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>27</b>
I Rendement d'extraction des huiles essentielles .....	27
II L'activité antibactérienne.....	27
II-1 Activité antibactérienne des deux huiles essentielles seules .....	27
II-2 Activité antibactérienne des différentes associations.....	31
III L'activité antioxydante .....	37
III-1 L'activité antioxydante des différents échantillons seuls .....	37
III-2 Activité antioxydante des différentes combinaisons .....	41
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>46</b>
Références bibliographiques	
Annexes	

## INTRODUCTION

Les maladies infectieuses étaient la principale cause du décès dans les pays développés avant la découverte des antibiotiques (un tiers des décès dans le monde entier). La littérature scientifique énumère environ 1400 espèces de microorganismes pathogènes pour l'homme dont 538 bactéries (Drlica et Perlin, 2011). L'utilisation des antibiotiques, depuis la fin de la seconde guerre mondiale, a contribué à l'amélioration de l'espérance de vie de plus de dix ans. L'emploi de ces antibiotiques est assez large et couvre aussi bien le domaine de la santé humaine et animale que le domaine agroalimentaire ou environnemental (Aouni *et al.*, 2013).

Plusieurs pathogènes sont devenus résistants aux antibiotiques (Drlica et Perlin, 2011) : plus de 70% des bactéries qui causent les infections nosocomiales sont actuellement résistantes à au moins un des antibiotiques couramment utilisés (Barrett, 2005). Une résistance à toutes les classes d'antibiotiques a été décrite (Kon et Rai, 2013). La large utilisation des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes a conduit à l'émergence et la propagation de souches résistantes (Rakholiya *et al.*, 2013). L'apparition de souches multi-résistantes est devenue plus fréquente ces derniers temps en raison de l'usage inapproprié et irrationnel des antibiotiques, ce qui offre des conditions favorables pour la sélection de mutants résistants (Kon et Rai, 2013).

Les maladies infectieuses demeurent une cause principale des décès dans le monde, ceci est devenu une préoccupation mondiale (Rakholiya *et al.*, 2013) et un besoin constant pour le développement et la production de nouveaux médicaments (Kon et Rai, 2013). Ceci explique l'intérêt porté par les chercheurs aux substances naturelles, parmi elles les huiles essentielles (HE).

Les HEs et leurs composants ont montré d'excellents résultats contre les bactéries multi-résistantes (Faleiro et Miguel, 2013). Elles présentent simultanément plusieurs cibles dans les structures bactériennes en raison de la complexité de leur composition. Cela les avantage par rapport aux antibiotiques parce que de telles complexités des mécanismes d'action rendent un éventuel développement d'une résistance plus difficile, comparé à une thérapie à cible unique (Kon et Rai, 2013).

Les HEs sont des mélanges complexes de composés volatiles issus du métabolisme secondaire des plantes dites aromatiques. Elles peuvent contenir environ 20 à 60 composants à différentes concentrations. Elles sont caractérisées par deux ou trois composés majoritaires à

des concentrations assez élevées (20 à 70%) comparativement à d'autres composés présents à l'état de traces (Bakkali et *al.*, 2008).

Une approche possible pour améliorer l'étendue de la thérapie antimicrobienne actuelle est l'utilisation des combinaisons d'agents antimicrobiens. Une thérapie combinée ou synergique peut avoir plusieurs avantages comme l'élargissement du spectre de l'activité antimicrobienne et l'amélioration de son efficacité, la prévention contre l'échec thérapeutique dans le cas d'une résistance à un antibiotique ainsi que la prévention de son développement, la réduction de la toxicité liée à la dose, et la réduction des coûts (Rakholiya et *al.*, 2013). Beaucoup d'HEs ont montré une capacité d'agir *in vitro* en synergie avec différents antibiotiques (Kon et Rai, 2013). Ces HEs peuvent être également associées à des substances antioxydantes, pour lutter contre le stress généré par les radicaux libres et pouvant être à l'origine de plusieurs pathologies.

En effet, Quoique les radicaux libres soit des seconds messagers dans les fonctions physiologiques normales et participent dans plusieurs mécanismes régulateurs d'oxydoréduction, une surproduction peut surpasser les enzymes protectives et causer des dommages cellulaires par l'oxydation des biomolécules. Ils sont ainsi impliqués dans plusieurs maladies chroniques et dégénératives comme l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, le cancer, et les problèmes liés au vieillissement (Sökmen et *al.*, 2004 ; Locatelli et *al.*, 2009).

Les HEs sont extraites à partir de plantes dites aromatiques. La flore méditerranéenne est bien connue pour son abondance en ces plantes, avec une estimation de 49% des genres contenant des espèces aromatiques se retrouvant dans cette zone climatique (Thompson et *al.*, 2003). La famille des Lamiacées est représentée en Algérie par 28 genres et 146 espèces. Plusieurs espèces de cette famille sont utilisées en phytothérapie locale à cause de leur large éventail d'activités pharmacologiques, parmi lesquels : *Salvia* et *Thymus* (Laouer et *al.*, 2009).

L'objectif du présent travail est d'une part, l'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des HEs obtenues à partir des parties aériennes de *Thymus numidicus* Poir., une plantes très peu étudiée (endémique de certaines régions nord-africaines), et de *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), et d'une autre part, la détermination de la nature de l'interaction entre ces HEs et certains antibiotiques pour l'étude antibactérienne et le DL- $\alpha$ -tocophérol (vitamine E synthétique) pour l'activité antioxydante.

Ce manuscrit comporte deux parties, la première est un recueil concernant les deux plantes étudiées à partir de la bibliographie. La deuxième partie présente les travaux expérimentaux comportant deux chapitres. Le premier rassemble les matériels et les méthodes utilisés pour l'appréciation de l'activité antioxydante des deux HEs ainsi que la détermination de la nature de l'interaction entre les deux substances associées au sein de la combinaison étudiée, et la technique de l'échiquier pour l'estimation de l'activité antibactérienne que ce soit pour les HEs seules ou en association . Le second chapitre est une présentation des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

**Monographie des deux  
plantes utilisées**

---

## MONOGRAPHIE DES DEUX PLANTES TESTÉES

### I *Salvia officinalis*

#### I-1 Généralités sur le genre *Salvia*

*Salvia* comporte environ 900 espèces dans le monde, c'est l'un des genres les plus répandus de la famille des Lamiacées (anciennement appelée Labiées). Certaines espèces de *Salvia* ont été cultivées dans le monde entier pour les utiliser dans la médecine traditionnelle et à des fins culinaires. Les espèces de *Salvia*, communément appelés sauges sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle et sont une source riche en flavonoïdes polyphénoliques et des acides phénoliques (Lu et Foo, 2002 ; Kelen et Tepe, 2008).

#### I-2 Place de *S. officinalis* dans la systématique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sous-embranchement : *Magnoliophytina*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia officinalis* (D'après Goetz et Ghedira, 2012).

#### I-3 Étymologie de la sauge officinale

Le nom *salvia*, provenant du latin *salvare* « guérir ou sauver », indique les vertus attribuées à cette plante de rétablir la santé et de la sauver de la maladie. *Salvia officinalis* L. (la sauge dalmate) est la sauge de référence à laquelle les autres sauges sont comparées étant considérée comme ayant le plus caractéristique et le plus fin arôme de sauge. (Deans et Simpson, 2000).

**Synonymes** : *Herba Salviae*, *Folia Herbae saccae*, sauge officinale, sauge commune, grande sauge, herbe sacrée, thé de France (Wichtl et Anton, 2003).

#### I-4 Description

*S. officinalis* (figure 1) est un sous-arbrisseau, atteignant 70 cm de hauteur, vivace, très ramifié, devenant ligneux à la partie basale, dont les **tiges** forment des rameaux quadrangulaires dressés et velus. Chaque année, les rameaux se dessèchent, laissant les inférieurs persistants (Wichtl et Anton, 2003).

Les **feuilles** épaisses, oblongues, de couleur gris-vert en raison d'une pubescence cotonneuse sur la face inférieure, ont une odeur aromatique caractéristique. La forme et la grandeur des feuilles varient selon leur position sur la tige. En générale, elles ont de 3 à 10 cm de long et jusqu'à 3 à 4 cm de large et sont longuement pétiolées, oblongues-ovoïdes à lancéolées, très pubescentes sur les deux faces. Les feuilles supérieures sont sessiles et plus petites. Toutes possèdent un bord distinctement denticulé, rugueux, et une nervure réticulée profondément enfoncée, saillante sur la face inférieure. La base du limbe est arrondie, simplement ou doublement auriculée (Wichtl et Anton, 2003).

Les **fleurs** d'environ 2 cm de long, à corole bleu-violet nettement bilabée, sont disposées en verticilles, formant un épi mobile. La corole est tubuleuse, garnie à la base d'un anneau de poils, et la lèvre supérieure est presque droite (Wichtl et Anton, 2003).

Selon la pharmacopée européenne, les feuilles séchées, entières, contiennent au minimum 15 ml/Kg d'huile essentielle (HE), fragmentées, elles contiennent au minimum 10 ml/Kg (Wichtl et Anton, 2003).

#### I-5 Origine

*S. officinalis* est originaire d'Europe du sud et de l'Asie mineure. Elle est à la fois **cultivée** et **collectée de la nature** en Turquie, Italie, Grèce, ex-Yougoslavie, Crète, Espagne, et en France (Deans et Simpson, 2000).



Figure 1 : Image de *Salvia officinalis* (Mazoyer et al., 2002)

#### **I-6 Propriétés biologiques et utilisations traditionnelles de la sauge officinale**

La sauge est un aromate réputé et une des principales plantes médicinales (Iserin et al., 2001). « *He that would live for aye must eat sage in May* », un proverbe qui veut dire : Celui qui veut vivre éternellement doit manger la sauge en Mai" (Deans et Simpson, 2000), un dicton médiévale affirme : « Pour quelle raison un homme devrait-il mourir alors que la sauge pousse dans son jardin ? » (Iserin et al., 2001) ; ceux-ci indique clairement l'importance de *S. officinalis* en phytothérapie.

Connue depuis l'Antiquité égyptienne, la sauge est restée célèbre depuis des siècles : c'est l'« *Herba sacra* » des latins. Elle jouissait des propriétés suivantes : stimulante, digestive, antispasmodique, tonique, emménagogue, antihémorragique, antidiarrhéique, antisudorale (Wichtl et Anton, 2003). Cette plante est employée de nos jours comme antiphlogistique dans les inflammations buccales et pharyngées, dans les gingivites, les stomatites sous forme de gargarisme, mais aussi comme tisane dans les troubles digestifs, les ballonnements, les colites et les diarrhées. Elle est utilisée comme antisudorale et autrefois, elle était préconisée dans les sueurs nocturnes des tuberculeux, et pour limiter les sueurs d'origine psychosomatiques. Mais la plupart des indications ne reposent que sur des faits empiriques (Iserin et al., 2001 ; Wichtl et Anton, 2003).

En médecine traditionnelle, la sauge à des propriétés œstrogéniques ; elle est utilisée pour arrêter la lactation, en raison de ses propriétés antigalactogènes. Une activité

hypoglycémiant est décrite, ainsi que des propriétés emménagogues, probablement en liaison avec la présence du thuyone (cétone monoterpénique) dans son huile essentielle (Wichtl et Anton, 2003).

Par ailleurs, la sauge est très utilisée pour ses propriétés antioxydantes, retardant ou inhibant le rancissement des corps gras, et pour ses propriétés antiseptiques (d'où son emploi bien connu en charcuterie), elle est antibactérienne, fongistatique, virostatique et eupeptique. Enfin, elle est astringente, cicatrisante, réhydratante et trouve des applications en cosmétologie (Baricevic et *al.*, 2001 ; Wichtl et Anton, 2003).

#### **I-7 Propriétés biologiques et utilisation de l'huile essentielle de la sauge officinale**

L'HE de la sauge officinale s'emploie en cas d'affaiblissement nerveux, d'instabilité psychologique, d'irritabilité due à des nuits sans sommeil ou à des suees épuisantes. Elle combat l'inflammation, vivifie, rééquilibre et tonifie, stimule l'énergie intellectuelle, fortifie le système nerveux éprouvé, et apporte force et harmonie. Ses propriétés antiseptiques sont très utiles en cas de maux de dents ou d'infection des muqueuses buccales, de la gorge ou des voies respiratoires supérieures. Elle peut en outre s'avérer efficace en cas de névralgies maxillaires ou temporales ; elle stimule l'élaboration du sang, régule l'activité thyroïdienne et exerce une influence positive sur les paralysies et en cas d'apoplexie. En raison de ses propriétés déodorantes et antisudorales, l'HE de la sauge officinale est parfois utilisée en cosmétique (Lubinic, 2006). Elle présente également des effets répulsifs pour les insectes (Baricevic et Bartol, 2000).

#### **I-8 Propriétés biologiques et pharmacologiques de *S. officinalis* issues de l'expérimentation scientifique**

##### **I-8-1 Activité anticancéreuse**

Les résultats obtenus par el Hadri et *al.*, (2010) lors d'une étude menée *in vitro* sur différentes cellules tumorales suggèrent que l' $\alpha$ -humulène et la trans-caryophyllène contenues dans l'HE de *S. officinalis* inhibent la croissance des cellules tumorales car la concentration de ces deux composés dans l'HE est corrélée avec l'activité anti-tumorale de cette dernière.

L'extrait éthanolique de *S. Officinalis* (ESO) a fortement inhibé la **formation des tubes capillaires** (anti-angiogénèse) dans un modèle de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine et l'aorte de rat. La fraction hexane de l'ESO (HSO) a exercé l'effet inhibiteur le plus élevé. En outre, l'ESO et l'HSO ont montré une activité inhibitrice dose

dépendante sur la **migration de cellules** endothéliales d'un modèle de cicatrisation de plaie. De plus, l'ESO a inhibé la **prolifération de cellules** endothéliales d'une façon dose dépendante (Keshavarz et *al.*, 2010). L'activité antitumorale de *S. officinalis* est due à son effet **anti-angiogénique**, **anti-migrateur** et **antiprolifératifs** et non pas à un effet cytotoxique (Keshavarz et *al.*, 2011).

Sertel et *al.* (2011) ont démontré la capacité de l'HE de *S. officinalis* à inhiber la croissance des cellules cancéreuses UMSCC1 de la lignée cellulaire humaine HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*).

L'extrait aqueux de *S. officinalis* ainsi que l'acide rosmarinique (son composé phénolique majoritaire) ont provoqué l'apoptose des cellules dérivées des lignées cellulaires du carcinome du côlon humain : HCT15 et CO115, ainsi que l'inhibition de la prolifération des cellules HCT15 et de la phosphorylation de la protéine ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) dans ce dernier type de cellules (Xavier et *al.*, 2009).

L'activité antimutagénique d'un extrait aqueux de *S. officinalis* a été rapportée par Samejima et *al.*, (1995), son HE a également présenté des effets antimutagéniques *in vitro* (Simic et *al.*, 1998) et *in vivo* (Vujosevic et Blagojevic, 2004).

### **I-8-2 Activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice**

L'extrait au *n*-hexane ainsi qu'au chloroforme des feuilles de *S. officinalis* ont montré de fortes activités anti-inflammatoires qui ont été reliées avec la présence d'acide ursolique (triterpène) (Baricevic & Bartol, 2000; Baricevic et *al.*, 2001).

Un extrait à l'acétate d'éthyle de *S. officinalis* ainsi que deux de ses composés : le carnosol et de l'acide carnosique (diterpènes) ont inhibé la formation de la prostaglandine E2 (PGE2) dans un modèle physiologique approprié d'un sang entier humain, ce qui peut contribuer aux propriétés anti-inflammatoires et anticarcinogéniques de cette plante (Bauer et *al.*, 2012).

Les résultats de Rodrigues et *al.* (2012) démontrent que l'extrait hydroalcoolique de *S. officinalis* présente des effets anti-inflammatoires et aussi antinociceptifs significatifs, grâce à la présence du carnosol et des deux isomères triterpéniques l'acide ursolique et l'acide oléanolique dans cette plante.

Les phénols de la sauge possèdent une activité immunomodulatrice par activation des macrophages RAW 264.7 (infectés par *Leishmania*) à libérer le TNF et l'IL-6. En revanche, cette potentialisation a été négligeable dans les cellules non infectées (Radtke *et al.*, 2003). Les polysaccharides extraits de la sauge ont également montrés une activité immunomodulatrice (Capek *et al.*, 2003; Ebringerovda *et al.*, 2003; Capek & Hribalova, 2004).

### **I-8-3 Activité gastroprotectrice**

Son extrait éthanolique brut a montré des effets gastroprotecteurs en réduisant significativement les lésions causées par du méthanol pur dans l'estomac de rats, suggérant ainsi une activité anti-ulcérogène (Fiorentin *et al.*, 2013). De plus, son extrait hydro-alcoolique a réduit les lésions gastriques causées par le méthanol chez le même modèle animal. L'ulcère induit par l'acide acétique et l'acidité des sécrétions gastriques ont été réduits, en plus d'une inhibition *in vitro* de la H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. (Mayer *et al.*, 2009).

### **I-8-4 Activité hypoglycémiant**

Un extrait éthanol/eau de la sauge a montré des effets hypoglycémiant chez des souris saines et d'autres légèrement diabétiques (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2002).

L'administration par voie orale d'un extrait éthanolique de *S. officinalis* à des rats pendant 14 jours a exhibé des réductions significatives (dose dépendantes) des concentrations sériques du glucose, mais aussi des triglycérides, cholestérol total, urée, acide urique, créatinine, et de l'ASAT (aspartate amino-transférase) et ALAT (alanine amino-transférase), et une augmentation de l'insuline dans le plasma (Eidi et Eidi, 2009).

### **I-8-5 Activité anti-hyperlipidémique**

Les résultats de Kianbakht *et al.* (2011) suggèrent que la sauge peut être efficace dans le traitement de l'hyperlipidémie. En effet, leur étude clinique (étude randomisée en double aveugle contrôlée par des placebo) sur des patients ayant une hyperlipidémie (hypercholestérolémie et / ou hypertriglycéridémie), a montré une réduction des concentrations sanguines du cholestérol total, des triglycérides, des LDL (*low density lipoprotein*) et VLDL (*very low density lipoprotein*), et une augmentation du HDL (*High density lipoprotein*) chez les patients prenant l'extrait de feuilles de sauge (une capsule de 500 mg toutes les 8 h pendant 2 mois). Les extraits ont été sans effets important sur les concentrations de la créatinine et des enzymes hépatiques (SGOT : sérum glutamo-

oxaloacétate transférase et SGPT : sérum glutamo-pyruvate transférase), et aucun effet indésirable n'a été signalé.

Un extrait méthanolique de feuilles de sauge a montré des effets anti-hyperlipidémiques en inhibant significativement l'élévation des triglycérides sériques, ainsi qu'une activité inhibitrice de la lipase pancréatique (participe à la digestion des lipides). L'acide carnosique et le carnosol, sont les deux diterpènes isolés de la fraction active, qui ont inhibé sensiblement la lipase pancréatique, tandis que le premier a significativement inhibé l'élévation des triglycérides dans le sérum de ces souris (Ninomiya *et al.*, 2004).

#### **I-8-6 Effets hypotenseurs et spasmolytiques**

Des extraits hydro-alcooliques de *S. officinalis* ont montré des actions spasmolytiques et hypotenseurs : d'une part, en baissant la tension artérielle, d'une façon modérée mais prolongée, chez des chats et d'une autre part, en inhibant les contractions du muscle lisse induites par des molécules chimiques (acétylcholine, histamine, sérotonine et BaCl<sub>2</sub>) sur des segments isolés de l'iléon du cochon d'Inde (Todorov *et al.*, 1984).

#### **I-8-7 Action sur le système nerveux**

En 1996, Perry *et al.*, ont rapporté l'activité anticholinestérasique de l'HE de la sauge dans les tissus du cerveau humain (post-mortem), ce qui pourrait expliquer en partie les propriétés améliorante de la mémoire attribuées à cette plante (Perry *et al.*, 1999a; Perry *et al.*, 2000).

Une étude plus récente, utilisant un modèle de rat, a montré que l'extrait éthanolique de la sauge potentialise la mémorisation et interagit avec les systèmes cholinergiques (muscariniques et nicotiniques) qui sont impliqués dans le processus de la mémorisation (Eidi *et al.*, 2006).

Par ailleurs, une étude en double insu (ou double aveugle) contrôlée par des placebos, sur 30 participants en bonne santé, a confirmé que la sauge améliore l'humeur et les performances cognitives (Kennedy *et al.*, 2006). La même étude (mais *in vitro*) a aussi rapporté une inhibition dose dépendante de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase par un extrait éthanolique de la sauge.

Akhondzadeh *et al.* (2003), lors d'une étude randomisée en double aveugle menée sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont montré des résultats significativement

meilleurs chez le groupe de patients traité avec la sauge qu'avec les placebos sur les fonctions cognitives (Akhondzadeh *et al.*, 2003). En outre, un extrait hydro-alcoolique de la sauge a aussi montré des effets neuro-protecteurs contre la toxicité induite par la protéine  $\beta$  amyloïde sur les cellules PC12, ce qui corrobore la potentielle utilisation de la sauge dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Iuvone *et al.*, 2006).

#### **I-8-8 Action sur les hormones**

Une étude utilisant des patients humains a montré que la sauge était efficace dans le traitement des symptômes de la ménopause (de Leo *et al.*, 1998).

#### **I-8-9 Activité antisudorale**

L'activité antisudorale a été confirmée par des expérimentations cliniques sur l'homme, ainsi, la sécrétion sudorale induite par la pilocarpine a été rapidement supprimée (Wichtl et Anton, 2003).

#### **I-8-10 Activité antioxydante**

Des extraits alcooliques de la sauge ont révélé une forte activité antioxydante en augmentant la stabilité des huiles alimentaires (Miura *et al.*, 2002; Ozcan, 2003).

L'activité antioxydante des extraits de la sauge a été également démontrée en utilisant d'autres méthodes, telles que la prévention de l'auto-oxydation accélérée du linoléate de méthyle (Cuvelier *et al.*, 1994; Cuvelier *et al.*, 1996), par la capacité à piéger les radicaux libres tels que le DPPH<sup>·</sup> (Roby *et al.*, 2013) et l'ABTS<sup>·</sup> (Shan *et al.*, 2005). De plus, la sauge a montré une capacité à inhiber la peroxydation lipidique dans des liposomes (Hohmann *et al.*, 1999; Zupko *et al.*, 2001).

#### **I-8-11 Activité antimicrobienne**

L'HE de la sauge présente une activité **antibactérienne** et **antifongique** (Baricevic et Bartol, 2000 ; Araujo *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2004).

Un extrait hydro-éthanolique de *S. officinalis* a montré de très bons résultats sur deux bactéries résistantes aux antibiotiques : *Helicobacter pylori*, un agent causant des gastrites (aigüe et chronique) et un facteur majeur prédisposant à l'ulcère peptique et le carcinome gastrique, et sur *Campylobacter jejuni*, qui est la cause la plus commune des infections entériques particulièrement chez les enfants, engendrant de sévères diarrhées (Cwikla *et al.*, 2010).

Certaines études utilisant des patients humains ont montré que la sauge a une activité **antivirale** contre les infections herpétiques (Saller *et al.*, 2001) et est efficace dans le traitement de la pharyngite aiguë (Hubbert *et al.*, 2006). Les phénols de la sauge ont également une activité **antileishmaniales** (Radtke *et al.*, 2003).

### **I-8-12 Activité insecticide**

L'activité insecticide de *S. officinalis* a été rapportée pour son extrait méthanolique contre le ver du coton égyptien (*Spodoptera littoralis*) par Pavela (2004), tandis que son HE affecte la ponte chez le thrips de l'oignon (*Thrips tabaci* Lindeman) (Koschier et Sedy, 2003).

### **I-9 Effets secondaires de *S. officinalis***

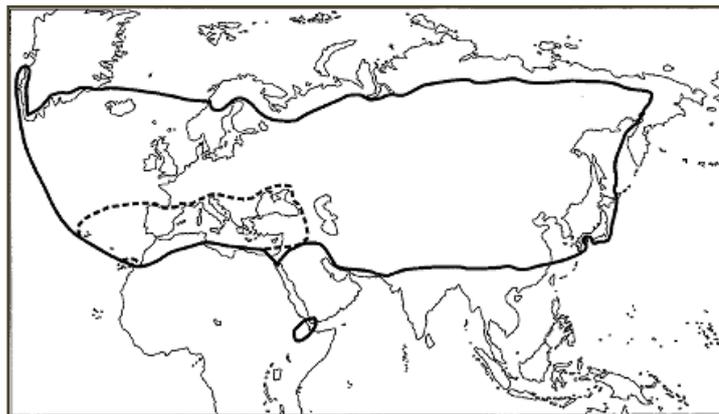
Ils ne sont à craindre qu'en cas de surdosage (plus de 15 g de feuilles de sauge par dose) ou lors d'un usage prolongé. Le constituant toxique de son HE, la thuyone, engendre alors des symptômes tels que de la tachycardie, des bouffées de chaleur, des convulsions et des vertiges. (Wichtl et Anton, 2003). L'HE de la sauge officinale peut déclencher une crise d'épilepsie même à très faibles doses chez les personnes qui y sont sujettes et elle est par ailleurs contre-indiquée durant la grossesse (Lubinic, 2006) car en stimulant les muscles utérins, celle-ci peut engendrer un avortement (Dweck, 2000).

## **II *Thymus numidicus***

Contrairement à la sauge, *T. numidicus* est très peu étudié.

### **II-1 Généralités sur le genre *Thymus***

Dans la famille des Labiées, avec environ 220 genres, le genre *Thymus* est un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces incluses, bien que ce nombre varie selon le point de vue taxonomique. Les données disponibles rapportent 215 espèces pour le genre *Thymus*. Réparti particulièrement dans la région méditerranéenne, ce genre est répandu largement dans l'ancien monde et s'étend même en dehors de ce dernier (figure 2) (Morales, 2002).



**Figure 2 : répartition du genre *Thymus* dans le monde « en trait gras » (Morales, 2002)**

Les plantes du genre *Thymus* sont des plantes aromatiques, vivaces, sous-arbrisseaux, parfois avec la forme herbacée, mais ligneuses à la base. Comme la plupart des Lamiacées, elles ont des tiges quadrangulaires (Morales, 2002).

Les thyms sont des plantes très résistantes, ce qui leur permet de subsister dans des conditions climatiques extrêmes concernant la température et l'approvisionnement en eau. La production élevée d'HEs peut être une caractéristique adaptative pour le climat sec, parce que les substances volatiles s'évaporent et produisent une atmosphère saturée autour de la plante qui rend la perte en eau plus difficile. Des cas particuliers de plantes de ce genre peuvent survivre dans des conditions climatiques très froides comme *T. glacialis* dans la Sibérie où *T. praecox* en Groenland. Les espèces qui vivent dans des climats secs sont souvent touffues, boisées et droites, tandis que celles qui vivent dans des climats plus frais et humides ont des feuilles plates, et boisées seulement à la base. Ces dernières sont habituellement herbacées, avec des tiges rampantes ou montantes. Le rendement en HEs est probablement plus élevé dans les premières que dans les secondes (Morales, 2002).

L'hybridation entre les espèces du genre *thymus* est très fréquente lorsque deux ou plusieurs espèces vivent ensemble. Soixante hybrides ont été détectés parmi les 35 espèces vivant dans la péninsule ibérique (Morales, 2002).

En Algérie, le genre *Thymus* (Lamiacées) est représenté par 12 espèces, dont neuf sont endémiques (Laouer et *al.*, 2009).

## II-2 Étymologie du thym

Le familier mot anglais « *thyme* » a été traditionnellement employé pour appeler aussi bien le genre que son espèce la plus commercialement utilisées : *Thymus vulgaris*, menant parfois à la confusion. D'une façon générale, le mot « thym » désigne une plante aromatique utilisée pour des buts médicaux et comme épice presque partout dans le monde (Morales, 2002).

## II-3 Place de *T. numidicus* dans la systématique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sous-embranchement : *Magnoliophytina*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus numidicus* (D'après Goetz et Ghedira, 2012).

## II-4 Description

C'est une plante buissonnante qui forme des pelouses, elle peut atteindre 10 à 15 cm de hauteur, ayant des **tiges** érigées et des **feuilles** opposées et généralement lancéolées (2 à 5 fois plus long que large) avec des feuilles florales nettement plus larges. Les **fleurs** sont hermaphrodites, regroupées dans des têtes terminales denses à calices inégales, sessiles et d'une couleur rose (Quezel et Santa, 1963 ; Ben El Hadj Ali et *al.*, 2014).

## II-5 Généralités

Le thym numide est une plante assez rare, endémique dans certaines régions algériennes et tunisiennes (secteur kabyle et numidien, sous-secteur de l'Atlas tellien du secteur algérois, et dans le secteur du Tell constantinois) (Quezel et Santa, 1963). C'est une espèce hermaphrodite, pollinisée principalement par les abeilles, et possède aussi la capacité de se reproduire asexuellement par multiplication végétative. Sa floraison a lieu entre Avril et Juin, elle pousse sur des sols calcaires et peu fertiles en de petites populations dispersées (Ben El Hadj Ali et *al.*, 2014).

### **II-6 Activités biologiques du thym numide**

*T. numidicus* est bien connu dans la médecine traditionnelle algérienne pour ses propriétés expectorantes, antitussives, antiseptiques, antispasmodiques, et antihelminthiques comme beaucoup d'autres *Thymus spp* (Kabouche et al., 2005).

L'HE de *T. numidicus* possède une activité antioxydante, antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire (Hadeef et al., 2007 ; Giordani et al., 2008 ; Ben El Hadj Ali et al., 2014) et insecticide (Saidj et al., 2008).

Des extraits de différentes parties de cette plante ont montré une activité antiradicalaire, tandis que ceux de ses racines ont aussi des propriétés herbicides (Ben El Hadj Ali et al., 2014).

L'HE de *T. numidicus* a montré une très bonne activité antifongique sur *Candida albicans*, 1357 fois plus forte que l'amphotéricine B (CMI 80% = 0.000479 à 0.000632 µg/ml), plus un effet synergique avec cette dernière, et 32 fois plus forte que celle de *Thymus vulgaris* à chémotype thymol qui a été considéré jusqu'à lors comme étant la meilleure (Hadeef et al., 2007 ; Giordani et al., 2008).

# ÉTUDE EXPERIMENTALE

---

## Chapitre I

# Matériel et méthodes

---

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre étude rentre dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques à travers la détermination du potentiel d'activité antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles ainsi que l'effet de leurs associations avec d'autres composés chimiques.

### I Matériel

#### I-1 Les souches bactériennes

Six souches ont été testées dont une à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Micrococcaceae) et cinq à gram négatif: *Escherichia coli* ATCC 25922 (Enterobacteriaceae), *E. coli* 161 (isolée de l'eau de mer en 2010), *Serratia marcesens* 338 (Enterobacteriaceae, isolée en 2008 à partir d'hémoculture à l'hôpital Hussein Day), *Klebsiella pneumoniae* 26 (Enterobacteriaceae, isolée en 2006 à partir d'urines à l'hôpital d'Amizour Béjaïa), *Pseudomonas aeruginosa* 867 (Pseudomonadaceae, isolée en 2009 à partir d'un pus à l'hôpital Hussein Dey).

Ces souches ont été fournies par le laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Béjaïa.

#### I-2 Le matériel végétal

Deux plantes aromatiques ont été utilisées, il s'agit de *Salvia officinalis* (figure 1) et de *Thymus numidicus* (figure 2).



Figure 3: Photographie de *Salvia officinalis*, prise en Janvier 2014 sur le site de la récolte.



Figure 4: Photographie de *Thymus numidicus* provenant du site de la récolte, prise en Juin 2014.

### I-3 Les antibiotiques

Sept antibiotiques ont été testés, ils sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Les antibiotiques testés

Antibiotiques	Origine
Ampicilline	SIGMA®, Chine
Amoxicilline	
Tétracycline	
Chloramphénicol	
Céfotaxime	Shanghai Pharmaceutical Group (SPG), Chine
Ciprofloxacine	Hikma Farmaceutica, Portugal
Imipènème	RANBAXY Laboratories, Inde

### I-4 Autres composés chimiques

Le thymol (*Riedel-de Haën*®, *Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH*, Allemagne) et le DL- $\alpha$ -tocophérol (*BASF Personal Care and Nutrition GmbH*, *Illertissen*, Allemagne) ont été également utilisés.

## II Méthodes

### II-1 Extraction des huiles essentielles

#### II-1-1 Récolte et séchage

Les parties aériennes de *Thymus numidicus* et de *Salvia officinalis* ont été récoltées respectivement en Juin 2013 sur les montagnes de la commune de Toudja (Béjaïa) et en Janvier 2014 dans la commune de Tichy (Béjaïa).

Les deux plantes ont été séchées dans un endroit aéré, à l'ombre. Pour le Thym, toute la partie aérienne a été utilisée (tiges, feuilles, et fleurs), tandis que seules les feuilles de la sauge ont été utilisées (étant récoltée hors saison de fleuraison).

#### II-1-2 Extraction

Les huiles essentielles (HEs) ont été obtenues par hydrodistillation en utilisant un montage inspiré de celui de Clevenger (Clevenger, 1928) (figure 3). Il comporte :

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



**Figure 5 : Montage utilisé pour l'hydrodistillation**

### **II-1-2-1 Principe de l'hydrodistillation**

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

### **II-1-2-2 Le protocole**

Pour les deux plantes, 50 grammes sont macérés (Hilan et *al.*, 2006) dans 1 litre d'eau de source pendant toute une nuit (16 à 20 heures). Puis l'eau dans le ballon est portée à ébullition (mais surveillé de tel sorte à ne pas trop dépasser les 100°C) pendant 2 heures pour *Thymus numidicus* et 1 heure et 30 minutes pour *Salvia officinalis*. Une série de neuf extractions a été effectuée pour les deux plantes.

Après décantation des distillats, les HEs ont été récupérées et complètement déshydratées à l'aide du sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), puis conservées à 4°C et à l'abri de la lumière (Şahin et *al.*, 2004). Le protocole expérimental est illustré dans le schéma de la figure 4.

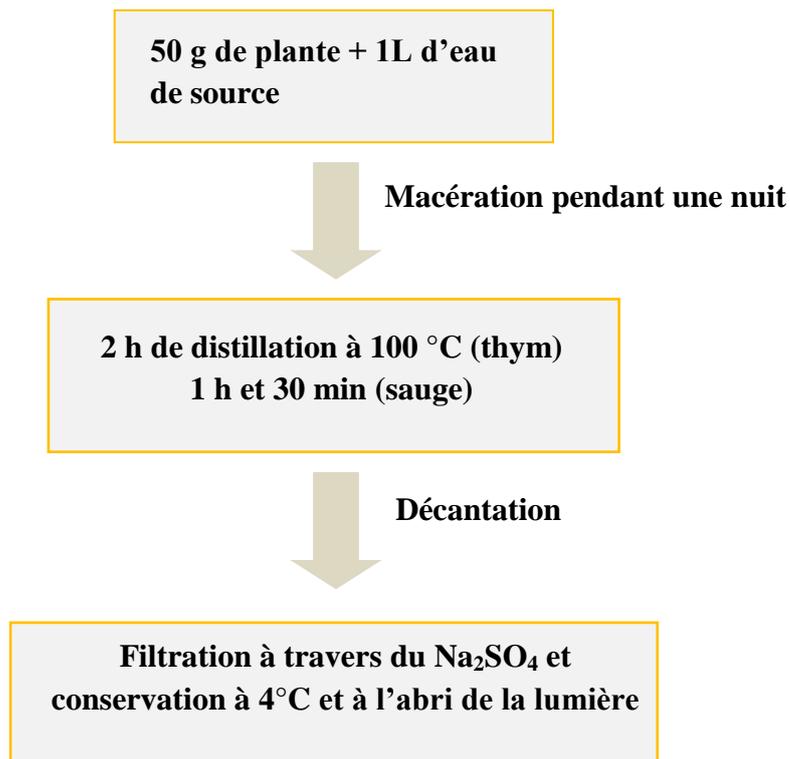


Figure 6 : Le protocole de l'hydrodistillation

### II-1-2-3 Calcul du rendement

Le rendement a été calculé comme suit :

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

### II-2 Les essais bactériologiques

La technique utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles et l'effet de leurs associations était celle de la microdilution en milieu Bouillon Mueller Hinton (BMH), appelée communément la méthode de l'échiquier (Vaubourdolle, 2007). Toutes les étapes effectuées pour réaliser cette technique étaient conformes aux directives du protocole M7A7 de *CLSI* (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2006), anciennement appelé *NCCLS* : *National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

Les associations ont été testées sur trois souches. Il s'agit de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, et *E. coli* 161.

### II-2-1 Préparation et standardisation des inocula bactériens

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

L’inoculum à tester doit avoir une charge bactérienne standard, exigée par *CLSI* pour les tests en milieu liquide (macro et micro dilution), qui équivaut à une turbidité de 0,5 McFarland. Une solution dite de McFarland a été préparée. Une fois préparée, cette solution doit avoir une densité optique (DO) comprise entre 0,08 et 0,13 à 625 nm. Les inocula sont comparés à cette solution, ils doivent aussi avoir cet intervalle de DO, ce qui correspond à une charge de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Cette solution est ensuite ramenée à 10<sup>7</sup> UFC/ml après dilution d’un dixième dans de l’eau physiologique.

### II-2-2 Technique de l’échiquier

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

La figure 5 représente un schéma d’une microplaque de 96 puits qui a été utilisée dans ce protocole.

<b>A</b>	CMI/16												
<b>B</b>	CMI/8												
<b>C</b>	CMI/4												
<b>D</b>	CMI/2												
<b>E</b>	CMI												
<b>F</b>	2.CMI												
<b>G</b>	4.CMI												
<b>H</b>		4.CMI	2.CMI	CMI	CMI/2	CMI/4	CMI/8	CMI/16					
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>

**Figure 7: Schéma d’une microplaque de 96 puits**

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

On procède comme suit :

- Le puits H1 (en rouge, sur la figure 6) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum bactérien, et 50 µl de l'agar à 0,2% (témoin de croissance).
- À l'exception du puits H1, chaque puits de la ligne H (en abscisses) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum, et **50 µl** d'une dilution de l'agent antimicrobien X (de la plus concentrée à la plus diluée), en commençant par une concentration 4 fois la CMI (la CMI de chaque agent antimicrobien est préalablement déterminée par cette même technique).
- À l'exception du puits H1, chaque puits de la colonne n° 1 (en ordonnées) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum, et **50 µl** d'une dilution de l'agent antimicrobien Y (de la plus concentrée à la plus diluée, en commençant par une concentration 4 fois la CMI).
- Chaque puits du reste de la microplaque (en violet) contient les mêmes quantités du BMH, de l'inoculum, et **25 µl** de chaque agent antimicrobien (combinaison des différentes dilutions qui correspondent à celle des deux axes ; de telle sorte que chaque puits sera unique en ses combinaisons de doses).
- Après 16 à 20 h d'incubation à 37°C, les microplaques sont lues. Les puits là où il n'y a pas de croissance (puits clairs) contiendraient des concentrations inhibitrices. Des repiquages ont été effectués à partir de ces puits sur une gélose nutritive, cette dernière est incubée à 37°C pendant 24 h. Les concentrations minimales bactéricides correspondraient à celles dont les puits n'ont donné aucune croissance après repiquage.

### II-2-2-1 Mise en émulsion des huiles essentielles

En raison de la non miscibilité des huiles essentielles dans l'eau (et donc dans le milieu de culture et la solution bactérienne), ces dernières ont été émulsionnées dans de l'agar à 0,2% (Remmal et *al.*, 1993b).

100 µl de chaque HE pure est mélangée avec 900 µl d'agar à 0,2% : c'est une solution « solution mère » qui contient 10% de l'HE pure (dilution de  $10^{-1}$ ) à partir de laquelle une série de dilutions de  $\frac{1}{2}$  est préparée avec le même émulsifiant.

Le thymol et les antibiotiques ont été également dilués par l'agar à 0,2%.

### **II-2-2-2 Expression et interprétation des résultats**

Le rapport CMB/CMI a été calculé afin de porter une affirmation sur le fait que les HEs sont bactéricides ou seulement bactériostatiques. Selon Traoré et *al.* (2012), lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance est inférieur ou égal à 4, cette substance est jugée bactéricide tandis qu'elle est dite bactériostatique, si ce rapport est supérieur à 4.

Les données portant sur les CMI des différentes associations sont transformées en des concentrations inhibitrices fractionnaires (FICs) puis en des FIC Index (FICIs). Une FIC d'un échantillon A ( $FIC_A$ ) est définie comme étant le rapport de la concentration inhibitrice de (A) en présence d'un autre échantillon B sur la CMI de l'échantillon A seul, et vice-versa pour la  $FIC_B$ . Le FICI sera la somme :  $FIC_{(A)} + FIC_{(B)}$  (Rosato et *al.*, 2010).

Pour chaque association de deux agents antimicrobiens, la FICI de la combinaison la plus efficace (FICI la plus basse d'une microplaque) a été prise pour interpréter les résultats. L'effet d'une association est considéré synergique si la FICI qui en découle est inférieure ou égale à 0,5 ; additif si elle est supérieure à 0,5 et inférieure à 1 ; indifférent si elle est égale à 1 ; et antagoniste si elle est supérieure à 1 (Rosato et *al.*, 2010).

Chaque test a été réalisé deux fois et dans les, rares, cas de différences, un troisième essai confirmatif a été réalisé, le résultat qui se répétait deux fois a été pris comme résultat final du test.

Les résultats des différentes associations sont également illustrés graphiquement par les isobogrammes (décrits en II-4) correspondants, chaque point a été tiré à partir des deux concentrations contenues dans le puits.

### **II-3 Évaluation de l'activité antioxydante des différents échantillons**

L'activité antioxydante des HEs ainsi que celle de deux standards : le DL- $\alpha$ -tocophérol (Vit. E) et le thymol, a été évaluée par la mesure de la capacité de réduction d'un radical libre synthétique : le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH').

#### **II-3-1 principe**

C'est une technique basée sur la décoloration d'une solution alcoolique de DPPH' (méthanol ou éthanol), et donc la transformation de ce dernier, après l'addition d'un agent antioxydant et l'évaluation de la décroissance de l'absorbance à 515-528 nm (Sánchez-

Moreno, 2002) qui est proportionnelle à la concentration et au pouvoir antioxydant de cet agent, et au temps de réaction (Sánchez-Moreno, 2002 ; Villano, 2007 ; Deng, 2011).

La solution alcoolique du radical libre DPPH<sup>•</sup> présente une couleur mauve-foncée avec une absorbance maximale (pic d'absorption) à 517 nm qui disparaît en présence d'un capteur de radicaux dans le système réactionnel et quand l'électron impair de l'azote du DPPH<sup>•</sup> est apparié (Deng, 2011) (figure 6). Le DPPH<sup>•</sup>, ainsi réduit par un donneur d'hydrogène le DPPH donne l'hydrazine (Sánchez-Moreno, 2002) : un composé d'une couleur jaune-pâle (Molyneux, 2004).



Figure 8 : Le DPPH<sup>•</sup> (radical libre) et l'hydrazine (non radical) correspondant  
Source : Molyneux (2004).

### II-3-2 Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire a été évaluée suivant le protocole de Blois (1958), *in* : Wu et Ng (2008).

1 ml d'une solution du radical DPPH à 0,1 mmol/L a été mélangé avec 3 ml des différentes concentrations de chaque HE, du thymol, ou de la vit. E. Le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. Les absorbances ont été lues à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre de marque *Zuzi*, Model 4111 RS. Pour le blanc réactif, 3 ml de méthanol sont mélangées avec 1 ml de la solution de DPPH.

Du méthanol (SIGMA-ALDRICH®, Allemagne) a été utilisé pour préparer la solution du DPPH ainsi que pour diluer les extraits, le thymol, et la vitamine E.

### II-3-3 Expression des résultats

Selon Sharififar et *al.* (2007), l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I\% = \frac{Abs (blanc) - Abs (échantillon)}{Abs (blanc)} \times 100 \quad \text{avec :}$$

Abs (blanc) : Absorbance du blanc.

Abs (échantillon) : Absorbance du DPPH non réduit (en présence de l'échantillon).

Les concentrations des échantillons donnant 50% d'inhibition (IC50) ont été calculées à partir des graphes présentant les pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations. Le logiciel « *Origin® Pro 9* » a été utilisé.

Chaque test a été réalisé trois fois et les résultats sont exprimés en tant que la moyenne de chacun des trois tests plus ou moins l'écart type puis comparés entre eux par analyse de la variance univariée (ANOVA) en utilisant le logiciel *XLSTAT 2009.1.02*.

### II-4 Évaluation de l'activité antioxydante des échantillons en associations

Cinq différentes combinaisons ont été réalisées : **Thym/sauge, thymol/sauge, vitamine E/sauge, Vit. E/thym, Vit. E/thymol.**

La méthode utilisée pour évaluer l'interaction entre les différents échantillons était celle de l'isobologramme qui a été décrite par Tallarida (2001) : Un isobologramme est un graphique qui présente des paires de concentrations (une combinaison de deux échantillons) qui donnent la même efficacité qu'un échantillon seul, d'où leurs nom « *isoboles* », par exemple, l'efficacité 50% d'un maximum est prise comme effet (l'IC50 dans notre cas). La figure 7 représente un exemple type d'un isobologramme dont la concentration de l'échantillon A seul donnant l'effet recherché égale à 20 (unité) et celle de B égale à 100 (unité). La ligne droite qui relie ces deux points doit théoriquement représenter toutes les combinaisons de concentrations des deux échantillons donnant le même effet dans le cas d'une indifférence. Cette droite est tracée dans chaque isobologramme, elle est la référence pour détecter s'il y a une synergie (le point Q) ou un antagonisme (le point R). Le point P est probablement un effet indifférent. Plusieurs points (plusieurs combinaisons de doses) plus une analyse statistique appropriée sont nécessaires pour conclure sur le type d'interaction.

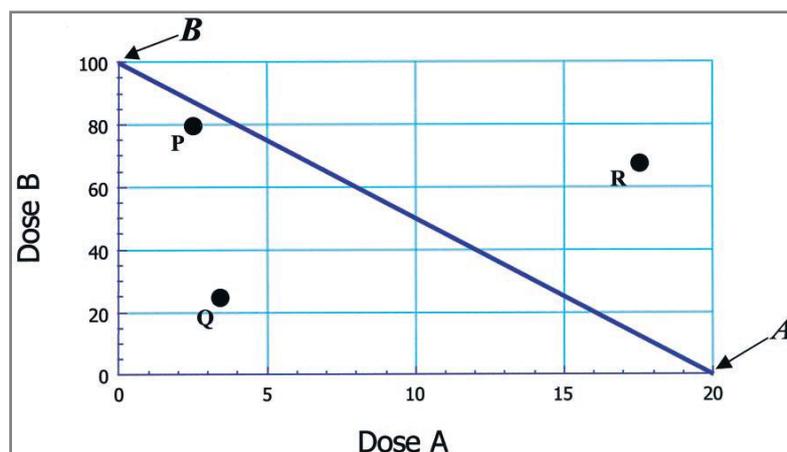


Figure 9 : illustration d'un isobogramme typique (Tallarida, 2001)

### II-3-1 Le protocole

Le protocole est le même que pour les échantillons seuls (décrit par Wu et Ng, 2008), sauf que l'échantillon à analyser se compose d'une des combinaisons précédentes.

Pour confirmer la conclusion portant sur l'effet des différentes combinaisons (tirée à partir des isobogrammes), des résultats chiffrés sont exprimés en calculant les FIC<sub>50</sub>I index (FIC<sub>50</sub>I) :

$FIC_{50}I = FIC50(A) + FIC50(B)$  avec:

$$FIC50(A) = \frac{IC50(A \text{ en présence de } B)}{IC50(A \text{ seule})}$$

$$FIC50(B) = \frac{IC50(B \text{ en présence de } A)}{IC50(B \text{ seule})}$$

Une combinaison est considérée synergique si elle présente une  $FIC_{50}I < 0,9$  ; indifférente si  $0,9 < FIC_{50}I < 1,1$  et antagoniste si la  $FIC_{50}I > 1,1$  (Santiesteban-López et al., 2007, in : Romano et al., 2009).

Les résultats ont été analysés statistiquement en réalisant, pour chaque combinaison, un test de conformité unilatéral à gauche pour comparer la moyenne des FIC<sub>50</sub>I d'une combinaison avec la moyenne théorique 0,9 et à droite pour la comparer avec 1,1. Le logiciel XLSTAT 2009.1.02 a été utilisé.

# ÉTUDE EXPERIMENTALE

---

## Chapitre II

# Résultats et discussion

---

## RÉULTATS ET DISCUSSION

### I Rendement en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle extraite à partir de *Thymus numidicus* est de 1,83%. Celui de l'HE extraite à partir de *Salvia officinalis* est de 0,97%. Les deux HEs présentent des couleurs différentes : orangée pour la première et jaunâtre très claire pour la seconde.



Figure 10 : L'HE de *Thymus numidicus*



Figure 11 : L'HE de *Salvia officinalis*

### II L'activité antibactérienne

#### II-1 Activité antibactérienne des deux huiles essentielles seules

Les résultats du tableau II et leur illustration dans les figures 12 et 13 montrent que toutes les CMBs sont égales aux CMI (CMB/CMI = 1) à l'exception de *S. aureus* dont la CMB est le double de la CMI (CMB/CMI = 2), ceci montre que les deux HEs sont bactéricides sur toutes les souches testées (CMB/CMI ≤ 4) (Traoré et al., 2012).

Tableau II : Activité antibactérienne des deux huiles essentielles seules

Bactérie	HE	Thym mg/ml			Sauge mg/ml		
		CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$
<i>E. coli</i> ATCC 25922		0,117	0,117	1	3,749	3,749	1
<i>E. coli</i> 161		0,234	0,234	1	7,497	7,497	1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923		0,234	0,469	2	7,497	14,995	2
<i>S. marcesens</i> 338		0,469	0,469	1	14,995	14,995	1
<i>K. pneumoniae</i> 26		0,234	0,234	1	14,995	14,995	1
<i>P. aeruginosa</i> 867		0,469	0,469	1	7,497	7,497	1

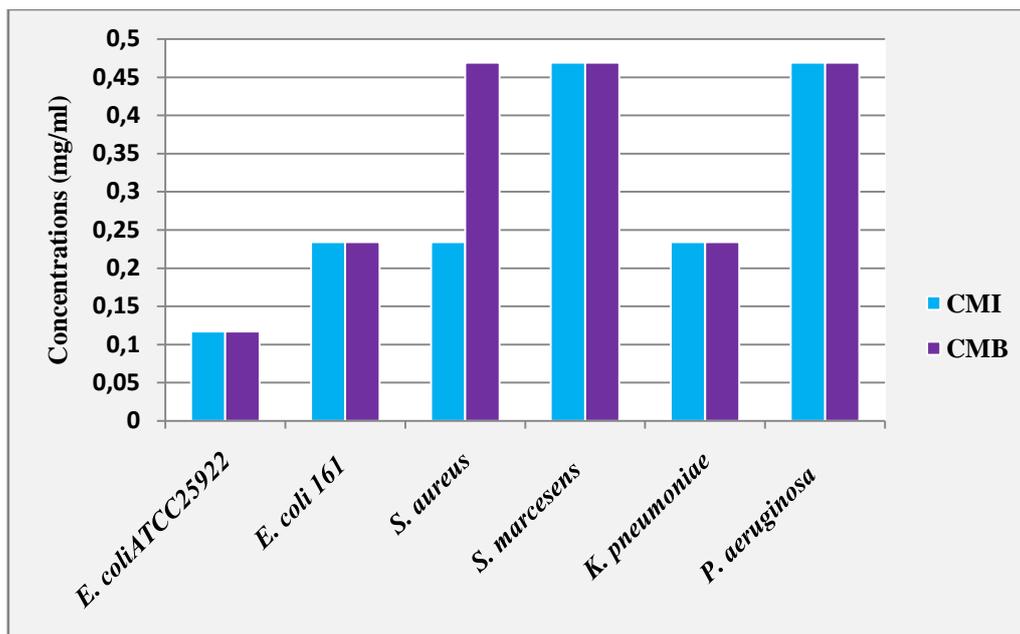


Figure 12 : CMI et CMBs de l'HE du Thym sur les souches testées

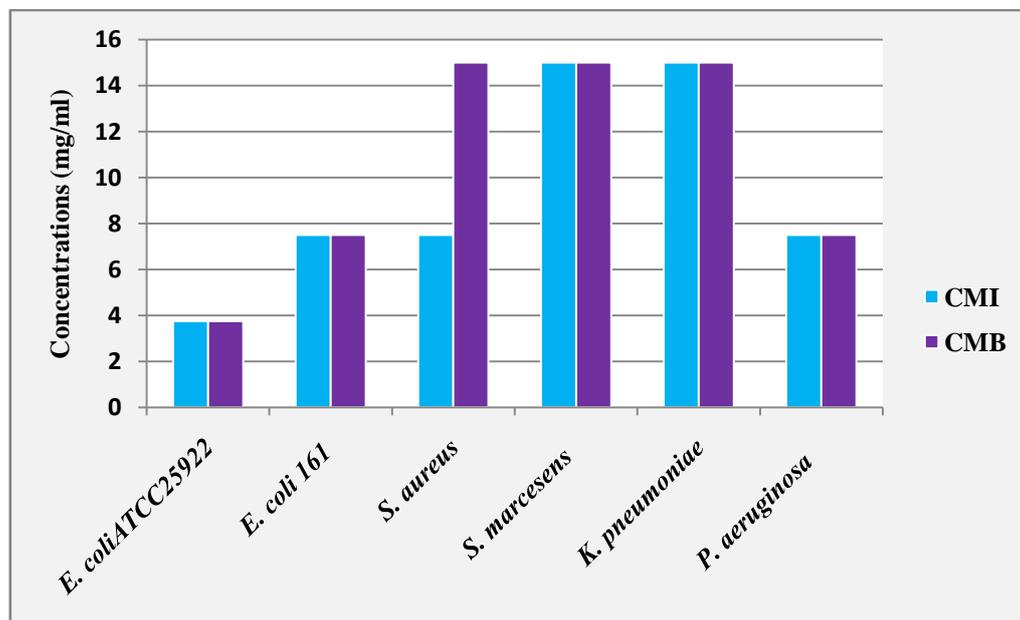


Figure 13 : CMI et CMBs de l'HE de la Saugue sur les souches testées

L'activité antibactérienne des HEs est due principalement à l'atteinte de l'intégrité et la fonction membranaire, ce qui peut conduire par la suite à la perte de l'homéostasie cellulaire, la fuite des constituants intracellulaires et finalement la mort cellulaire. Ce mécanisme d'action généralisé est soutenu par les données de plusieurs publications scientifiques (Ultee et *al.*, 1999 ; Lambert et *al.*, 2001 ; Carson et *al.*, 2002 ; Fitzgerald et *al.*, 2004 ; Trombetta et *al.*, 2005 ; Fisher et Phillips, 2009). Cette atteinte des membranes est due au caractère relativement lipophile des composants d'HEs, ce qui leur permet de fusionner dans les lipides membranaires et d'augmenter ainsi la fluidité de cette dernière (Burt, 2004 ; (Hammer et Carson, 2011).

Les dommages importants qui peuvent être causés sur la membrane bactérienne permettent aussi la fuite des macromolécules qui est généralement quantifiée en mesurant la perte des matériels intracellulaires qui absorbent à des longueurs d'onde de 260 nm (ADN) ou à 280 nm (protéines) (Hammer et Carson, 2011).

L'interaction initiale entre un composé d'une HE et une cellule bactérienne semble être sa diffusion passive à travers la paroi cellulaire des Gram-positifs ou la membrane externe des Gram-négatifs (Hammer et Carson, 2011).

Certaines études utilisant la microscopie électronique ont révélé d'importantes détériorations de la paroi bactérienne après une exposition à plusieurs différentes HEs (Rhayour et *al.*, 2003 ; Bennis et *al.*, 2004 ; Chami et *al.*, 2005 ; Park et *al.*, 2007 ; Sharma et Tripathi, 2008), indiquant que les HEs sont capables de détériorer la paroi si ce n'est pas la lyse bactérienne.

Les HEs comportent un grand nombre de composés chimiques, ce qui probablement implique, outre les actions générale susmentionnées, plusieurs cibles et modes d'action dans la cellule bactérienne. (Burt, 2004). En effet, des études ont montré des actions plus ou moins spécifiques de certains constituants d'HEs vis-à-vis de certaines bactéries (Hammer et Carson, 2011). Toutefois, une action particulière peut dépendre d'une autre action (Burt, 2004).

L'HE de *T. numidicus* a montré une excellente activité antibactérienne (16 à 64 fois plus active que celle de *S. officinalis*), ce qui peut être expliqué par la nature du chémotype de chacune car les composants phénoliques sont les principaux responsables des propriétés antibactériennes des HEs (Burt, 2004). En effet, d'après Ghorab et *al.* (2014), le composé majoritaire de l'HE de *T. numidicus* (région de Kabylie) est le carvacrol (28,10%) suivi de son

précurseur le *p*-cymène (8,00%) tandis que ceux de *Salvia officinalis*, d'après Dob et al. (2007) sont le camphre (20,4%), l' $\alpha$ -thuyone (19,6%), le 1,8 cinéol (12,3%), la  $\beta$ -Thuyone (8,0%) et le viridiflorol (8,0%). D'après les travaux de Cosentino et al. (1999) et Aligiannis et al. (2001), le carvacrol possède une bonne activité antibactérienne sur les deux souches de référence susmentionnées : CMI = 0,1 mg/ml pour les deux souches, CMB = 0,225 mg/ml pour *E. coli* ATCC 25922 et 0,450 mg/ml pour *S. aureus* ATCC 25923, ce qui est en corrélation avec nos résultats obtenus avec l'HE de thym. De plus, une synergie a été observée entre le carvacrol et le *p*-cymène (Burt, 2004). En revanche, selon Kotan et al. (2007), le camphre et le 1,8 cinéol n'ont montré aucune inhibition de la croissance de 63 souches appartenant à 37 genres différents.

Cette activité antibactérienne du carvacrol est attribuée, généralement, à sa capacité de rendre la membrane cytoplasmique perméable, et à désintégrer la membrane externe des bactéries Gram-négatif, libérant les lipopolysaccharides et augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP (Burt, 2004).

*S. aureus* ATCC 25923, étant la seule souche Gram-positif testé, avait sensibilité qui se situe au milieu de celles des autres souches. En effet, bien qu'il a été postulé que les HEs présentent des activités antibactériennes différentielles vis-à-vis les deux types de Gram, l'opinion actuelle semble favoriser l'hypothèse d'aucune relation générale entre le type de Gram et l'activité antibactérienne des HEs (Hammer et Carson, 2011).

Les HEs sont généralement des agents à large spectre antibactériens, avec des activités similaires contre les bactéries Gram-positif et Gram-négatif, les microorganismes anaérobies et aérobies, les levures et les autres champignons (Hammer et Carson, 2011).

*E. coli* ATCC 25922 a été la plus sensible à l'égard des deux HEs. *P. aeruginosa* et *S. marcescens* étaient relativement les souches les moins sensibles vis-à-vis l'HE de *T. numidicus* tandis que *K. pneumoniae* et *S. marcescens* ont été les moins sensibles vis-à-vis l'HE de *S. officinalis*.

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont généralement les moins sensibles aux HEs par rapport aux autres bactéries Gram-négatif et idem par rapport à celles de Gram-positif (Hammer et al., 1999 ; Mayaud et al., 2008). En particulier, *P. aeruginosa* est généralement peu sensible à un large éventail de composés antimicrobiens, incluant les HEs.

Ceci a été attribué à sa membrane externe et les propriétés qu'y sont associées tel que les systèmes d'efflux des médicaments (Griffin et *al.*, 2001 ; Longbottom et *al.*, 2004).

### **II-2 Activité antibactérienne des différentes associations**

Aucune des combinaisons réalisées n'a montré un effet synergique (tableau III). En revanche, il y a eu un effet additif entre l'HE de thym et la ciprofloxacine sur *S. aureus* ATCC 25923 (FICI = 0,75), quatre effets indifférents et huit effets antagonistes dont le plus marqué est obtenu avec l'association de l'HE de thym et l'imipénème sur *S. aureus* ATCC 25923 (FICI = 1,5). Pour les autres associations antagonistes, cet effet n'a pas été fortement exprimé (FICI = 1,030 à 1,034).

Tableau III : Activité antibactérienne des différentes associations

Souche	Combinaison*	CMI <sub>0</sub>	CMI <sub>C</sub>	FIC	FICI	Conclusion
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Thym	0,234	0,234	1	1,5	Antagonisme
	Imipenème	0,252	0,126	0,5		
	Thymol	0,202	0,006	0,030	1,030	Antagonisme
	Imipenème	0,252	0,252	1		
	Thym	0,234	0,117	0,5	1,00	Indifférence
	Céfotaxime	0,504	0,252	0,5		
	Thymol	0,202	0,101	0,5	1,00	Indifférence
	Céfotaxime	0,504	0,252	0,5		
	Thym	0,234	0,059	0,25	0,75	Addition
Ciprofloxacine	0,448	0,224	0,5			
<i>E. coli</i> ATTC 25922	Thym	0,117	0,004	0,034	1,034	Antagonisme
	Imipenème	0,063	0,063	1		
	Thymol	0,202	0,101	0,5	1,00	Indifférence
	Imipenème	0,063	0,031	0,5		
	Thym	0,117	0,004	0,034	1,034	Antagonisme
	Céfotaxime	0,126	0,126	1		
	Thymol	0,202	0,006	0,030	1,030	Antagonisme
	Céfotaxime	0,126	0,126	1		
	Sauge	3,749	0,117	0,031	1,031	Antagonisme
Céfotaxime	0,126	0,126	1			
<i>E. coli</i> 161	Thym	0,234	0,234	1	1,031	Antagonisme
	Sauge	7,497	0,234	0,031		
	Thym	0,234	0,007	0,030	1,030	Antagonisme
	Chloramphénicol	2,016	2,016	1		
	Thymol	0,202	0,101	0,5	1,00	Indifférence
	Chloramphénicol	2,016	1,008	0,5		
	Thym	<p><b>Résistance à 32,258 µg/ml vis-à-vis de chacun de ces antibiotiques</b></p> <p><b>Aucune de ces combinaisons n'a pu parer cette résistance</b></p>				
	Céfotaxime					
	Thym					
	Ampicilline					
	Thym					
Thym	<p><b>Résistance à 7,168 µg/ml vis-à-vis de cet antibiotique</b></p> <p><b>Cette combinaison n'a pas pu parer la résistance</b></p>					
Thym						
Thym	<p><b>Résistance à 7,168 µg/ml vis-à-vis de cet antibiotique</b></p> <p><b>Cette combinaison n'a pas pu parer la résistance</b></p>					
Ciprofloxacine						

CMI<sub>0</sub> : concentration minimale inhibitrice d'un échantillon seul.

CMI<sub>C</sub> : concentration minimale inhibitrice d'un échantillon dans la combinaison la plus efficace.

\*Les CMI des antibiotiques sont exprimées en µg/ml tandis que celles des HEs et du thymol le sont en mg/ml.

Les figures 14 à 26 représentent les isobogrammes des différentes associations citées dans le tableau III. Tous ces isobogrammes concordent avec les FICIs correspondants.

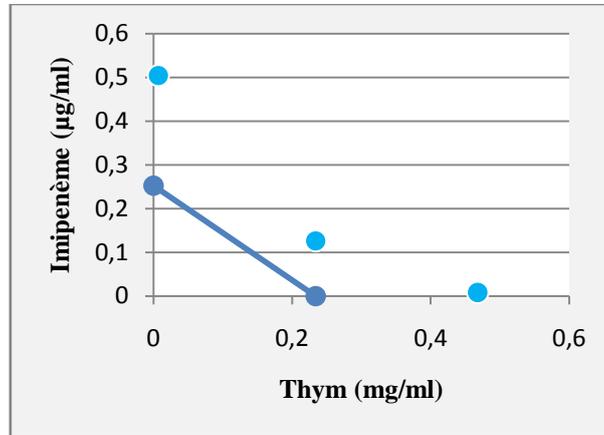


Figure 14 : Isobogramme montrant l'effet antagoniste entre l'imipenème et l'HE de thym sur *S. aureus* ATCC 25923

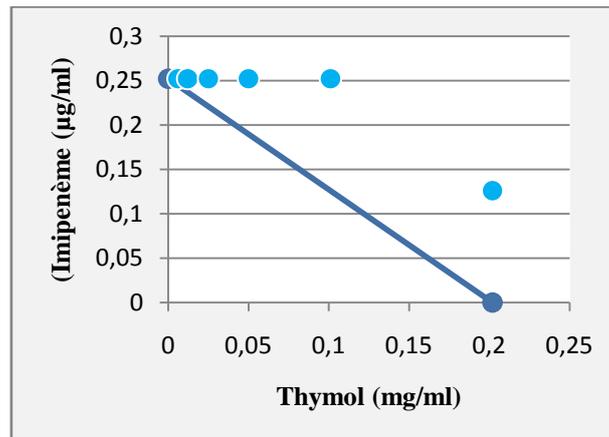


Figure 15 : Isobogramme montrant l'effet antagoniste entre l'imipenème et le thymol sur *S. aureus* ATCC 25923

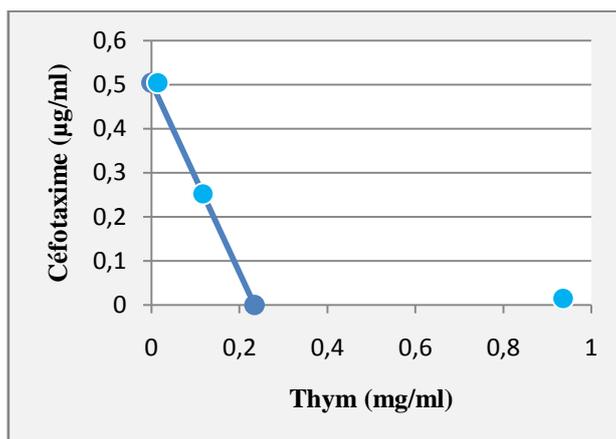


Figure 16 : Isobogramme montrant l'effet indifférent entre le céfotaxime et l'HE de thym sur *S. aureus* ATCC 25923

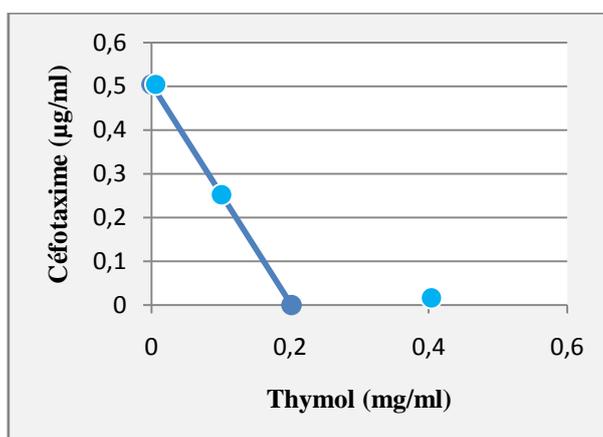


Figure 17 : Isobogramme montrant l'effet indifférent entre l'imipénème et le thymol sur *S. aureus* ATCC 25923

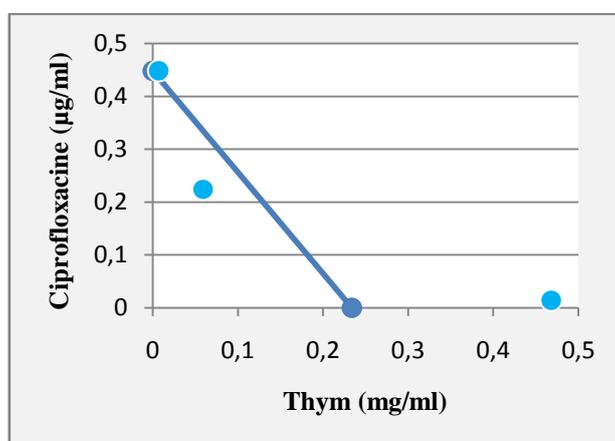


Figure 18 : Isobogramme montrant l'effet additif entre le ciprofloxacine et l'HE de thym sur *S. aureus* ATCC 25923

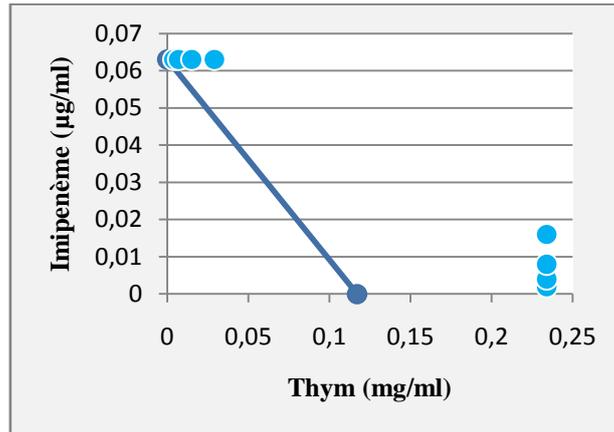


Figure 19 : Isobologramme montrant l'effet antagoniste entre l'imipénème et l'HE de thym sur *E. coli* ATCC 25922

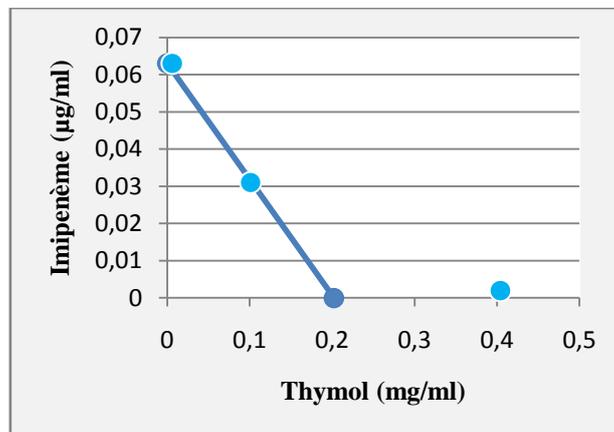


Figure 20 : Isobologramme montrant l'effet indifférent entre l'imipénème et le thymol sur *E. coli* ATCC 25922

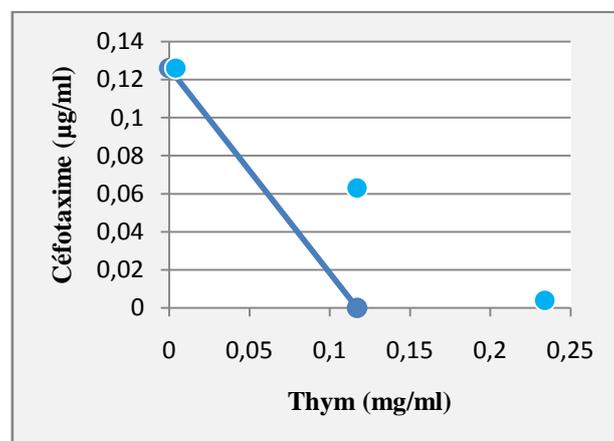


Figure 21 : Isobologramme montrant l'effet antagoniste entre le céfotaxime et l'HE de thym sur *E. coli* ATCC 25922

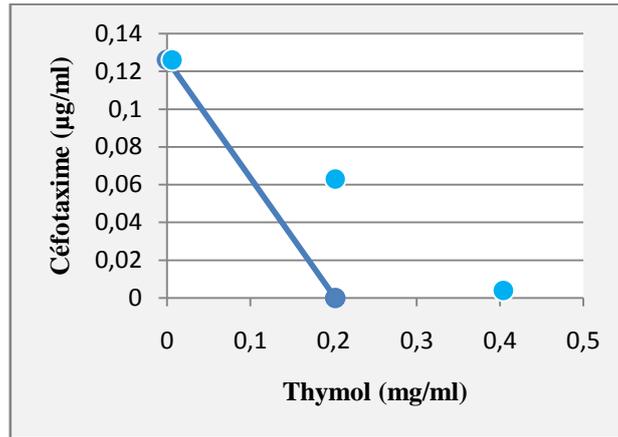


Figure 22 : Isobologramme montrant l'effet antagoniste entre le céfotaxime et le thymol sur *E. coli* ATTC 25922

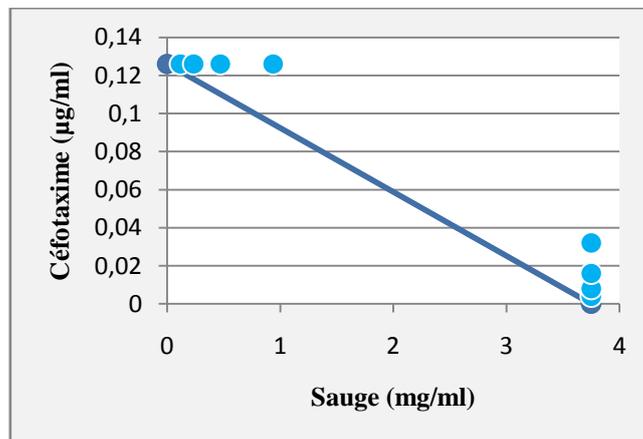


Figure 23 : Isobologramme montrant l'effet antagoniste entre le céfotaxime et l'HE de la sauge sur *E. coli* ATTC 25922

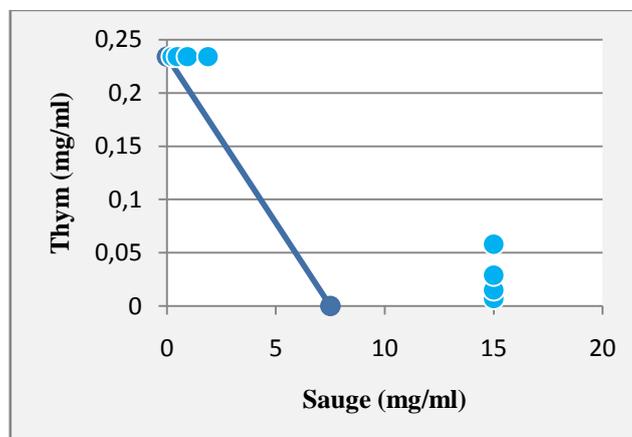


Figure 24 : Isobologramme montrant l'effet antagoniste entre l'HE de thym et celle de la sauge sur *E. coli* 161

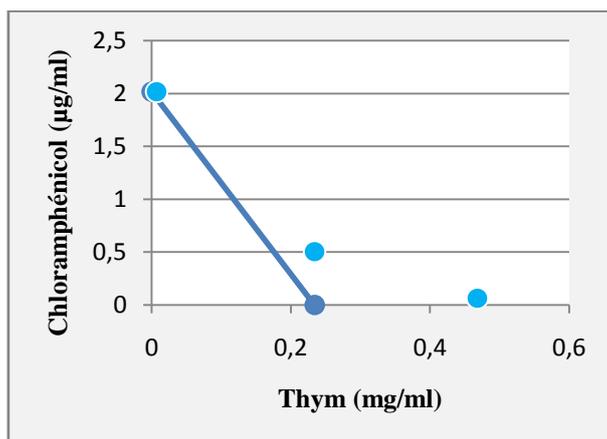


Figure 25 : Isobologramme montrant l'effet antagoniste entre le chloramphénicol et l'HE de thym sur *E. coli* 161

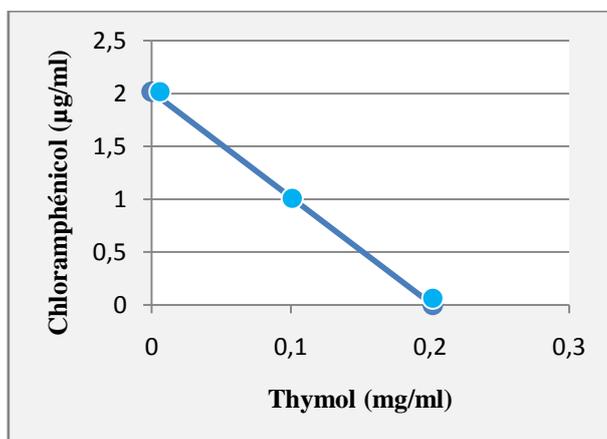


Figure 26 : Isobologramme montrant l'effet indifférent entre le chloramphénicol et le thymol sur *E. coli* 161

### III L'activité antioxydante

#### III-1 L'activité antioxydante des différents échantillons seuls

Les inhibitions de DPPH ainsi que les IC50 sont présentées dans le tableau IV :

Tableau IV : Activité antioxydante des différents échantillons seuls

Echantillon	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition (%)	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )
Thym	232,6	$67,11 \pm 3,06$	<b><math>156,53 \pm 20,23</math></b>
	116,3	$37,95 \pm 4,03$	
	58,15	$23,89 \pm 4,43$	
	29,07	$13,2 \pm 4,11$	
	14,53	$5,78 \pm 1,43$	
Thymol	212,5	$70,59 \pm 3,21$	<b><math>104,44 \pm 6,76</math></b>
	106,25	$48,84 \pm 2,99$	
	53,125	$33,61 \pm 2,27$	
	26,56	$18,97 \pm 1,71$	
	13,28	$9,61 \pm 2,00$	
Vitamine E	6,87	$85,77 \pm 3,05$	<b><math>4,11 \pm 0,25</math></b>
	3,43	$40,77 \pm 4,25$	
	1,72	$18,53 \pm 2,89$	
	0,86	$9,17 \pm 0,99$	
	0,43	$4,09 \pm 0,42$	
Sauge	5746,25	$87,73 \pm 1,44$	<b><math>1999,28 \pm 168,89</math></b>
	2871,25	$64,05 \pm 2,99$	
	1435,62	$38,41 \pm 3,99$	
	717,81	$20,93 \pm 3,45$	
	358,9	$10,52 \pm 2,61$	

Les figures 27 et 28 représentent les inhibitions en pourcentage du DPPH en fonction des concentrations des différents échantillons.

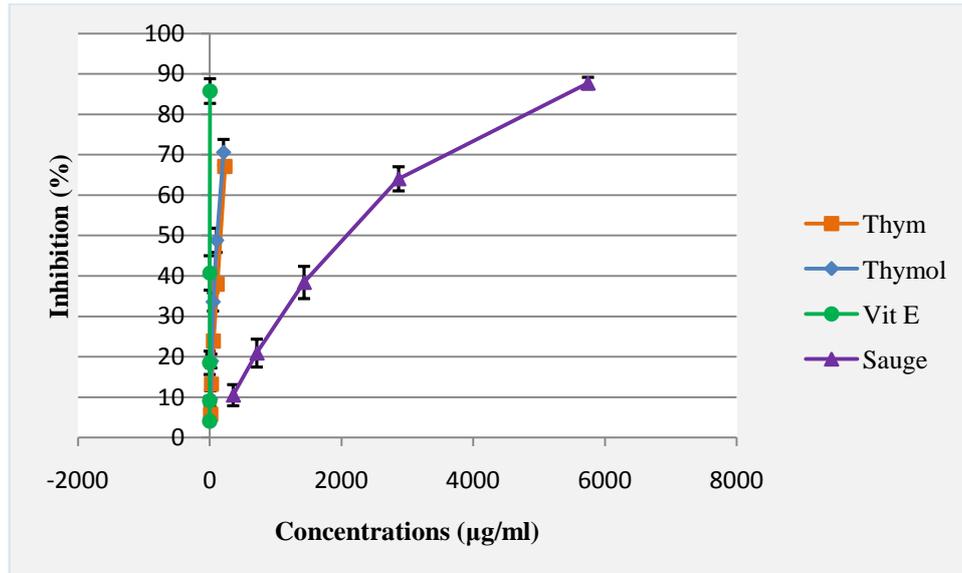


Figure 27 : Graphique représentant les pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations (a)

Vu que les résultats de la saugé sont très éloignés de ceux des autres échantillons, la différence entre ces derniers est masquée sur le graph de la figure 25 d'où la nécessité du graph de la figure 26 (sans la saugé).

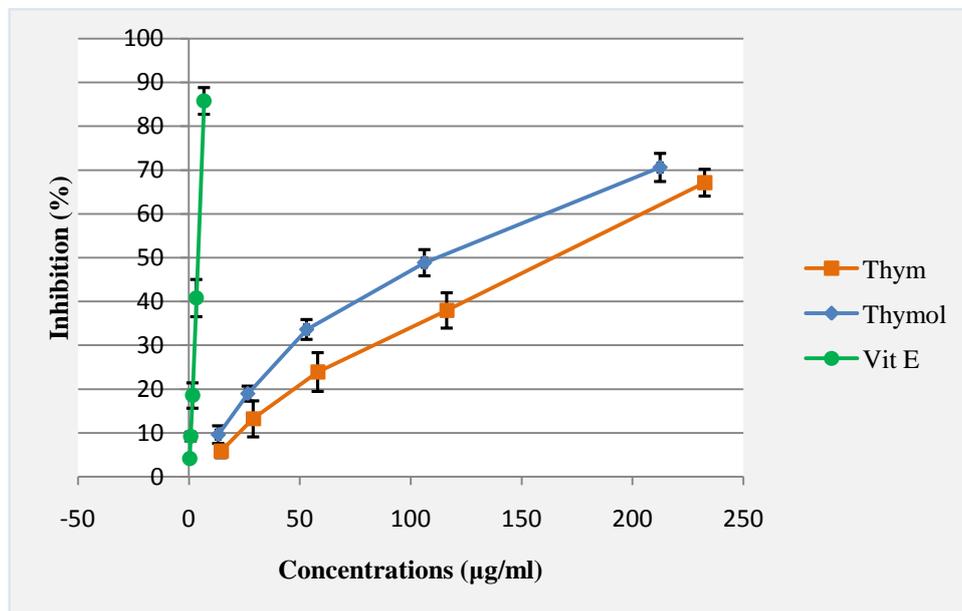


Figure 28 : graphique représentant les pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations (b)

L'analyse de la variance univariée (ANOVA) des IC50 a décelé des différences significatives entre les quatre échantillons avec un intervalle de confiance de 95%. Le test de

comparaison multiple de Ducan a permis de les subdiviser en deux groupes ; un groupe « A » constitué seulement de la sauge qui a une IC50 très éloignée des trois autres échantillons qui, eux, constituent un groupe relativement homogène « B ». L'analyse statistique détaillée est présentée en annexe 1). Les IC50 sont présentées graphiquement dans la figure 29.

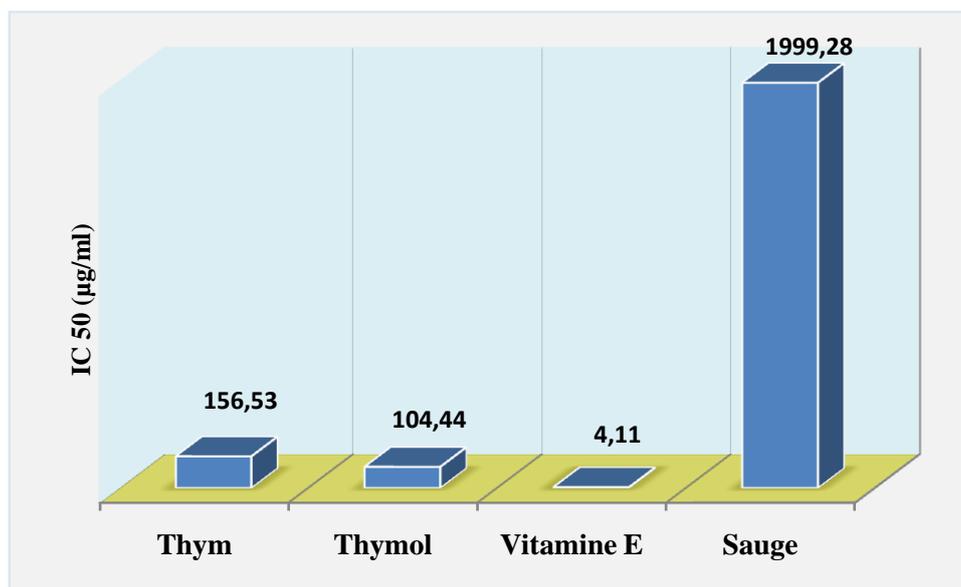


Figure 29 : IC50 des différents échantillons

L'HE de *S. officinalis* montre une très faible activité antiradicalaire, ceci a été déjà affirmé par les travaux de Politeo et al. (2006) ; Viuda-Martos et al., 2009 et ceux de Miguel et al. (2011). Il semblerait que l'activité antioxydante attribuée à *Salvia officinalis* réside plutôt dans ses polyphénols (Lu et Foo, 2001).

L'activité antioxydante d'une HE est attribuée aux composés actifs présents dans cette dernière. Ceci peut être dû à un/des composés majoritaires, mais aussi à de nombreux composés présents en petites quantités ou à la présence d'une synergie entre ces derniers (Politeo et al. 2006).

Djeridane et al. (2006), et Katalinic et al. (2006) ont démontré l'existence d'une corrélation linéaire entre l'activité antioxydante et les taux de composés phénoliques totaux de différents extraits de plantes, tandis que Viuda-Martos et al., (2010) l'ont démontré pour les composés phénoliques contenus dans les HEs. Une HE à chémotype phénolique possède une activité antioxydante meilleure qu'une HE à chémotype non phénolique (Jukié et Milos,

2005), d'autant que l'HE essentielle de *Salvia officinalis* soit pauvre en ces composés (Viuda-Martos et *al.*, 2009), sont activité antioxydante soit si faible.

En revanche, l'HE de *T. numidicus* montre une bonne activité antiradicalaire. Néanmoins, elle demeure moins efficace que la vitamine E. Cette activité est probablement due à la présence du carvacrol qui possède une importante activité antiradicalaire (Ozkan et Erdogan, 2011). En effet, Les travaux de Sokmen et *al.*, (2004) ont montré des résultats comparables aux notre ; L'IC50 de l'HE de *Origanum acutidens* sur le DPPH était de 133,7 µg/ml, une HE contenant 72% de carvacrol. Ce qui implique d'avantage la présence de ce dernier, en tant que composé majoritaire, dans l'HE de *T. numidicus*.

Les composés phénoliques agissent en donnant un atome d'hydrogène qui neutraliserait les radicaux libres, ils agissent aussi en tant que chélateurs de métaux et par interruption de la chaîne des réactions d'oxydations (Viuda-Martos et *al.*, 2009).

### III-2 Activité antioxydante des différentes combinaisons

Les figures 30, 31, 32, 33 et 34, représentent respectivement les isobogrammes des combinaisons : Thym/Sauge, Thymol/Sauge, Vitamine E/Sauge, Vit. E/Thym et Vit. E/Thymol.

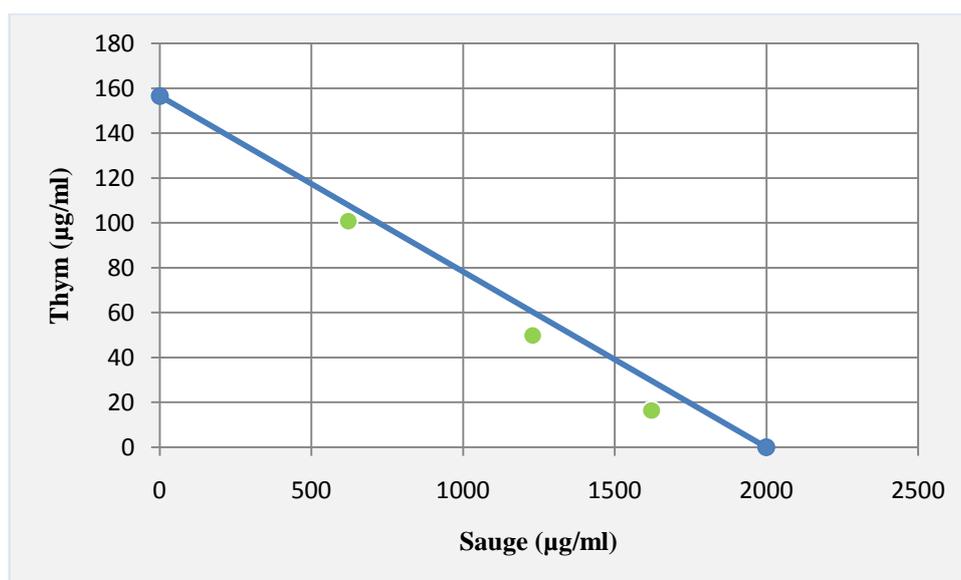
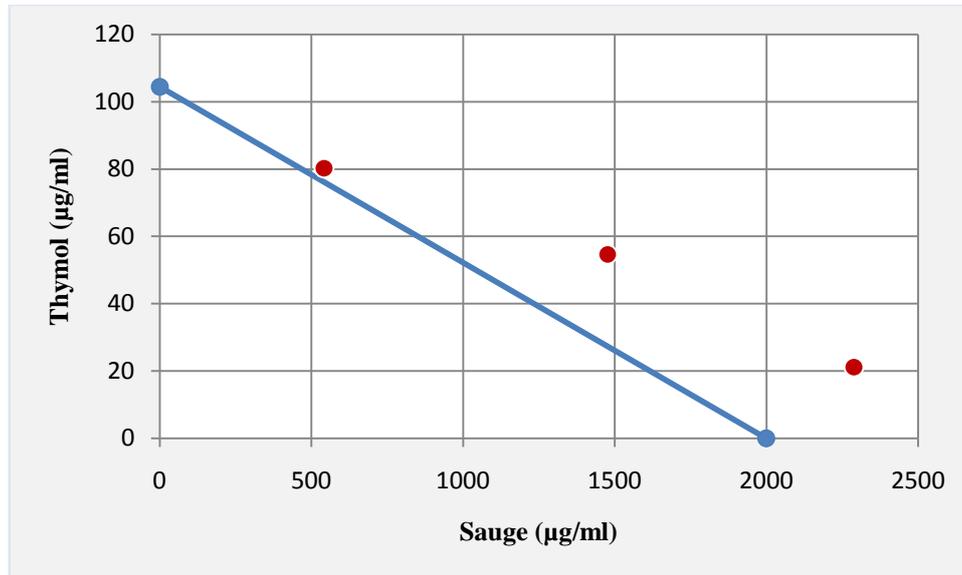


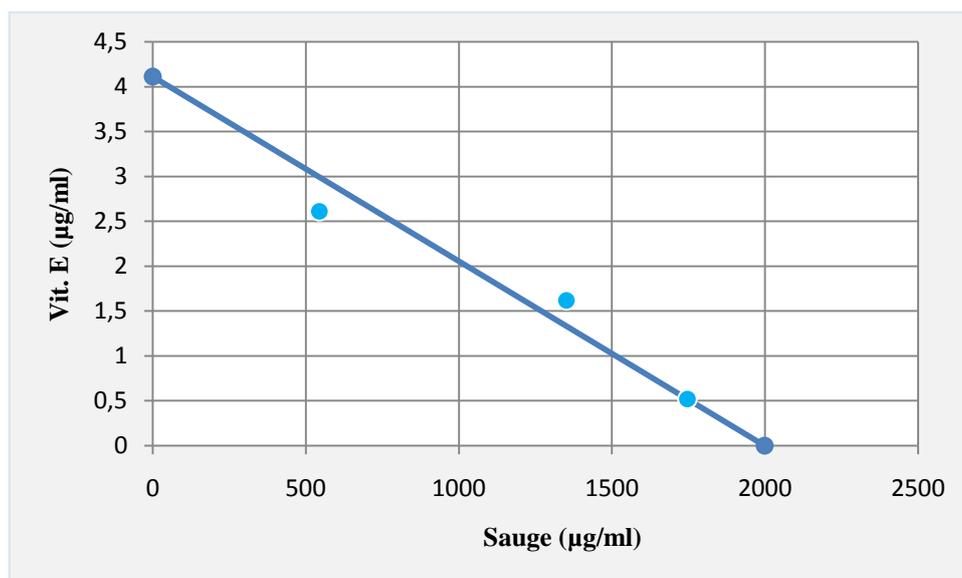
Figure 30 : Isobologramme de l'HE du thym combinée avec celle de la sauge

Les trois points sont en dessous de la droite, mais ils sont très proches, les résultats de l'étude statistique sont indispensables pour trancher entre une synergie et une indifférence (Tallarida, 2001).



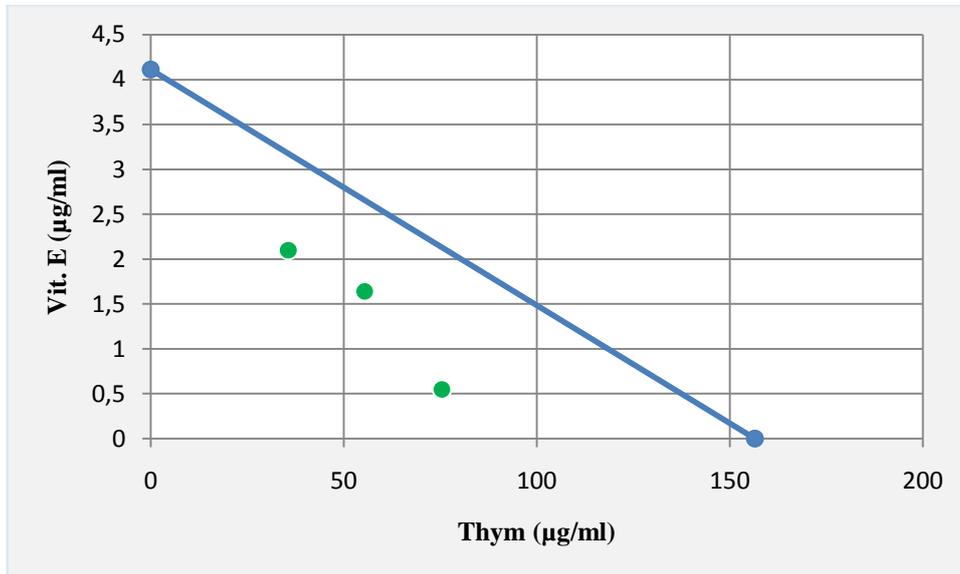
**Figure 31 : Isobogramme du thymol combiné avec l'HE de la sauge**

L'un des trois points touche la droite d'où la nécessité des résultats de l'étude statistique pour trancher entre une indifférence et un antagonisme (Tallarida, 2001).



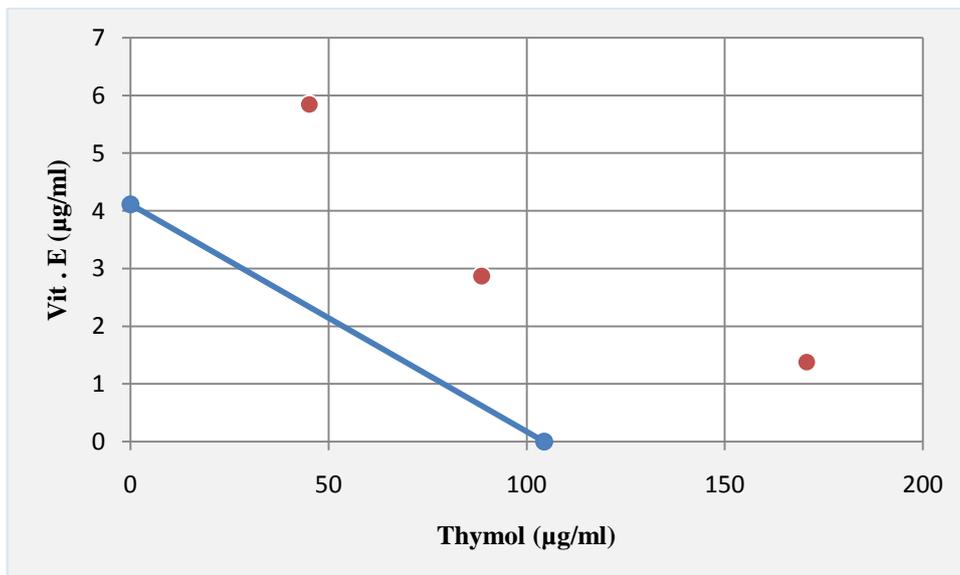
**Figure 32 : Isobogramme la vit. E combinée avec l'HE de la sauge**

Un point sur la droite et un point de chaque côté dont ils sont très proches de cette dernière, c'est un effet indifférent.



**Figure 33 : Isobogramme de la vit. E combinée avec l'HE du thym**

Les trois points sont en-dessous de la droite, c'est une synergie.



**Figure 34 : Isobogramme de la Vit. E combinée avec le thymol**

Les trois points sont au-dessus de la droite, c'est un effet antagoniste.

Les résultats chiffrés des différentes associations sont présentés dans le tableau V.

**Tableau V : FIC50 et FIC<sub>50</sub>I Index des différentes combinaisons**

Combinaison	IC50 (µg/ml)	IC50c (µg/ml)	FIC50	FIC <sub>50</sub> I	FIC <sub>50</sub> I moyenne
Thym	156,53	100,72	0,643	0,955	<b>0,934</b> ±0,019
Sauge	1999,28	621,67	0,312		
Thym	156,53	16,42	0,105	0,916	
Sauge	1999,28	1621,63	0,811		
Thym	156,53	49,79	0,318	0,933	
Sauge	1999,28	1229,35	0,61489		
Thymol	104,44	54,63	0,523	1,261	<b>1,215</b> ± 0,159
Sauge	1999,28	1476,45	0,738		
Thymol	104,44	80,23	0,768	1,039	
Sauge	1999,28	541,99	0,271		
Thymol	104,44	21,17	0,2027	1,347	
Sauge	1999,28	2288,46	1,1446		
Vit. E	4,11	1,62	0,394	1,07	<b>0,992</b> ± 0,082
Sauge	1999,28	1351,4	0,676		
Vit. E	4,11	0,52	0,126	0,999	
Sauge	1999,28	1746,91	0,8737		
Vit. E	4,11	2,61	0,635	0,907	
Sauge	1999,28	544,36	0,272		
Vit. E	4,11	1,64	0,340	0,694	<b>0,655</b> ±0,063
Thym	156,53	55,4	0,354		
Vit. E	4,11	2,1	0,512	0,739	
Thym	156,53	35,61	0,227		
Vit. E	4,11	0,55	0,133	0,614	
Thym	156,53	75,39	0,481		
Vit. E	4,11	2,87	0,698	1,546	<b>1,789</b> ±0,219
Thymol	104,44	88,63	0,848		
Vit. E	4,11	5,84	1,421	1,853	
Thymol	104,44	45,14	0,432		
Vit. E	4,11	1,38	0,336	1,97	
Thymol	104,44	170,68	1,634		

Les tests de conformité (annexe 1) confirment l'interaction **synergique** entre la **vitamine E et l'HE du thym** dans la réduction du DPPH, l'interaction **antagoniste** entre la **vit. E et le thymol**, et tranchent sur le fait que les combinaisons **Thym/Sauge**, **Thymol/Sauge**, **Vit. E/Sauge** soient **indifférentes**.

Les récents travaux d'Antache et *al.* (2014) ont révélé que l'association du thym (*Thymus vulgaris*) avec de la vit. E a un effet synergique dans la diminution de la peroxydation lipidique dans le foie, l'intestin et particulièrement au niveau du plasma d'un poisson : le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). Nous considérons que nos présents résultats soient en accord avec ceux des ces auteurs, vu que le chémotype de l'HE de *Thymus vulgaris* soit très comparable à celui de notre HE en question.

---

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation des activités antioxydantes et antibactériennes de plusieurs associations de composés naturels et synthétiques. Les résultats obtenus ont montré que certaines de ces associations pourraient être utilisées pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres. Cependant, en ce qui concerne l'activité antibactérienne, un seul effet additif a été obtenu.

L'HE de thym numide, utilisée seule, a montré d'excellents résultats surtout pour l'activité antibactérienne ; étant bactéricide sur les six souches testées, avec des CMBs très basses. *E. Coli* ATCC 25922 a été la plus sensible à l'égard des deux HEs employées dans cette étude. Selon Kon et Rai (2013), le mécanisme d'action des HEs sur les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques est considéré le même que sur les souches sensibles (à cause de la complexité de leur composition et les effets simultanés sur plusieurs cibles dans la cellule bactérienne). Nous estimons donc que l'HE de *Thymus numidicus* est également très active sur des souches résistantes.

Pour l'activité antioxydante, la capacité à réduire le radical libre DPPH est relativement bonne pour l'HE de *T. numidicus* mais elle est faible pour celle de *S. officinalis*. Ceci est certainement dû à la nature du chémotype de chacune.

Aucune combinaison n'a montré l'effet recherché (la synergie) pour les associations d'agents antibactériens. En revanche, il y a une nette synergie entre l'HE de *T. numidicus* et la vitamine E dans la réduction du DPPH. Il serait donc très intéressant de caractériser cette HE et de réaliser des tests d'association avec les composées « surtout » majoritaires, le carvacrol pourrait être l'un d'eux puisque des données bibliographiques ont rapporté un tel chémotype pour cette plante de la même région et d'autres données portant sur l'activité antibactérienne du carvacrol étaient en corrélation avec nos résultats obtenues avec l'HE de *T. numidicus* sur les souches de références testées.

En général l'effet recherché au cours d'une association est la synergie, elle permet d'utiliser une concentration d'antibiotique ou d'un antioxydant synthétique plus faible que si ce dernier était employé seul. Dans notre cas un seul effet synergique a été obtenu, pour ceci il est nécessaire d'étudier d'autres combinaisons en associant d'autres composés majoritaires d'huiles essentielles et d'autres antibiotiques pour obtenir l'effet synergique.

---

**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

---

**Akhondzadeh S., Noroozian M., Mohammadi M., Ohadinia S., Jamshidi A. H. & Khani M., 2003.** *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 28: 53–59.

**Alarcon-Aguilar F. J., Roman-Ramos R., Flores-Saenz J. L. & Aguirre-Garcia F. 2002.,** Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four mexican medicinal plants in normal and Alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Research*. 16: 383–386.

**Aliyiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S. & Chinou I. B., 2001.** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4168-4170.

**Antache A., Cristea V., Grecu I. & Crețu M., 2014.** The synergistic influence of *Thymus vulgaris* and vitamin E on growth performance and oxidative stress at *Oreochromis niloticus* species. *Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*. 62: 85-90.

**Aouni M., Pelen F. & Soulimani R., 2013.** Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie : Aromathérapie*. 11: 225-236.

**Araujo C., Sousa M. J., Ferreira M. F. & Leao C., 2003.** Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts. *Journal of Food Protection*. 66: 625-632.

**Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M., 2008.** Biological effects of essential oils: A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46 : 446–475.

**Baricevic D. & Bartol T., 2000.** The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. In: Kintzios S. E. SAGE: The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. pp. 143-184.

**Baricevic D., Sosa S., Loggia R. D., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A. & Zupancic A., 2001.** Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 75: 125–132.

**Barrett J. F., 2005.** Can biotech deliver new antibiotics? *Current Opinion in Microbiology*. 8: 498–503.

**Bauer J., Kuehnl S., Rollinger J.M., Scherer O., Northoff H., Stuppner H., Werz O. & Koeberle A., 2012.** Carnosol and Carnosic Acids from *Salvia officinalis* Inhibit Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 342: 169–176.

**Ben El Hadj Ali I., Bahri R., Chaouachi M., Boussaïd M. & Harzallah-Skhiri F., 2014.** Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. organs. *Industrial Crops and Products*. 62: 188–195.

**Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchikhi T. & Remmal A., 2004.** Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 454–458.

**Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223– 253.

**Capek P., Hribalova V., Svandova E., Ebringerova A., Sasinkova V. & Masarova J., 2003.** Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *International Journal of Biological Macromolecules*. 33: 113-119.

**Capek P. & Hribalova V., 2004.** Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry*. 65: 1983-1992.

**Carson C. F., Mee B. J. & Riley T.V., 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 46: 1914–1920.

**Chami F., Chami N., Bennis S., Bouchikhi T. & Remmal A., 2005.** Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytotherapy Research*. 19: 405–408.

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

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

**Cosentino S., Tuberoso C. I. G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. & Palmas F., 1999.** *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 130–135.

**Cuvelier M. E., Berset C. & Richard H., 1994.** Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*)? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 665-669.

**Cuvelier M. E., Richard H. & Berset C., 1996.** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 73: 645-652.

**Cwikla C., Schmidt K., Matthias A., Bone K. M., Lehmann R. & Tiralongo E., 2010.** Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytotherapy Research*. 24: 649–656.

**Deans S. G. & Simpson E. J. M., 2000.** Antioxidants from *Salvia officinalis*. In: Kintzios S. E. SAGE: The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. pp. 185-192.

**de Leo V., Lanzetta D., Cazzavacca R. & Morgante G., 1998.** Treatment of menopausal symptoms with non hormonal drug therapy. *Minerva Ginecologica*. 50: 207-211.

**Deng J., Cheng W. & Yang G., 2011.** A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*. 125: 1430–1435.

**Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Maamri S., Djireb F. & Stocker P., 2006.** Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 21 (6): 719–726.

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

**Drlica K. & Perlin D., S., 2011.** Antibiotic Resistance : Understanding and Responding to an Emerging Crisis. Pearson Education, Inc. New Jersey, USA. 270 p.

**Dweck A. C., 2000.** The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. *In*: Kintzios S. E. SAGE: The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. pp. 1-25.

**Ebringerova A., Kardosova A., Hromadkova Z. & Hribalova V., 2003.** Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia* 74: 52-61.

**Eidi A. & Eidi M., 2009.** Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 3: 40-44.

**Eidi, M., Eidi A. & Baharc M., 2006.** Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition*. 22: 321-326.

**el Hadri A., del Río M. A. G., Sanz J., Coloma A. G., Idaomar M., Ozonas B. R., González G. B. & Sánchez Reus M. I. 2010.** Cytotoxic activity of  $\alpha$ -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 76 (3): 343-356.

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

**Faleiro M. L. & M.G. Miguel M. G., 2013.** Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. *In*: Rai M. K. & Kon K., V. *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components*. Academic Press. San Diego, USA. pp. 65-94.

**Fisher K. & Phillips C., 2009.** The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.* 106 : 1343-1349.

**Fiorentin T. R., De Mello M. B., Aquino A. M. K., Rigo B. A., Loss C. G., Schwanz M., Hofmann Junior A. E. & Dias Macedo S. M., 2013.** Antiulcerogenic potential of *Salvia officinalis* L. extract in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3: (08) 032-035.

**Fitzgerald D. J., Stratford M., Gasson M. J., Ueckert J., Bos A. & Narbad A., 2004.** Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*. 97 : 104–113.

**Giordani R., Hadeif Y. & Kaloustian J., 2008.** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*. 79: 199–203.

**Goetz P. & Ghedira K., 2012.** Phytothérapie anti-infectieuse. Springer. Paris, France. 364 p.

**Ghorab H., Kabouche A. & Kabouche Z., 2014.** Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (1): 298-303.

**Griffin S. G., Wyllie S. G. & Markham J. L., 2001.** Role of the outer membrane of *Escherichia coli* AG100 and *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 and resistance/susceptibility to monoterpenes of similar chemical structure. *J. Ess. Oil Res.* 13: 380–386.

**Jukic M. & Milos M., 2005.** Catalytic oxidation and antioxidant properties of Thyme essential oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croatica Chemica Acta*. 78 (1): 105-110.

**Hadeif Y., Kaloustian J., Chefrour A., Mikail C., Abou L., Giodani R., Nicolay A. & Portugal H., 2007.** Chemical composition and variability of the essential oil of *Thymus numidicus* Poir. from Algeria. *Acta Botanica Gallica*. 154: (2) 265-274.

**Hammer K. A., Carson C. F. & Riley T. V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 985–990.

**Hammer K. A. & Carson C. F., 2011.** Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In : **Thormar H.**, Lipids and essential oils as antimicrobial agents. John Wiley & Sons, Ltd., Singapore. pp. 255-315.

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

**Hohmann J., Zupko I., Redei D., Csanyi M., Falkay G., Mathe I. & Janicsak G., 1999.** Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula*

*angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta medica*. 65: 576-578.

**Hubbert M., Sievers H., Lehnfeld R. & Kehrl W., 2006.** Efficacy and tolerability of a spray with *Salvia officinalis* in the treatment of acute pharyngitis : a randomised, double-blind, placebo-controlled study with adaptive design and interim analysis. *European Journal of Medical Research*. 11: 20-26.

**Iserin P., Masson M., Restellini J-P., Ybert E., de Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., de La Roque R., de La Roque O., Vican P., Delesalle-Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloch J. & Botrel A., 2001.** Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins. Paris, France. 335 p.

**Iuvone T., De Filippis D., Esposito G., D'Amico A. & Izzo A. A., 2006.** The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid- $\beta$  peptide-induced neurotoxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 317: 1143–1149.

**Kabouche A., Kabouche Z. & Bruneau C., 2005.** Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*. 20: 235–236.

**Katalinic V., Milos M., Kulisic T. & Jukic M., 2006.** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*. 94 : 550–557.

**Kelen M. & Bektas T., 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*. 99: 4096–4104.

**Kennedy D. O., Pace S., Haskell C., Okello E. J., Milne A. & Scholey A. B., 2006.** Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology*. 3: 845–852.

**Keshavarz M., Bidmeshkipour A., Mostafaie A., Mansouri K. & Mohammadi-Motlagh H-R., 2011.** Anti tumor activity of *Salvia officinalis* is due to its anti-angiogenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *Cell Journal (Yakhteh)*. 12: (4) 477-482.

**Keshavarz M., Mostafaie A., Mansouri K., Bidmeshkipour A., Mohammadi Motlagh H. R. & Parvaneh S., 2010.** *In vitro* and *ex vivo* antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytotherapy Research*. 24: 1526–1531.

**Kianbakht S., Abasi B., Perham M. & Hashem Dabaghian F., 2011.** Antihyperlipidemic effects of *Salvia officinalis* L. leaf extract in patients with hyperlipidemia: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*. 25: 1849–1853.

**Kon K. V. & Rai M. K., 2013.** Combining essential oils with antibiotics and other antimicrobial agents to overcome multidrug-resistant bacteria. *In*: Rai M. K. & Kon K., V. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. Academic Press. San Diego, USA. pp. 149-164.

**Koschier E. H. & Sedy K. A., 2003.** Labiate essential oils affecting host selection and acceptance of Thrips tabaci lindeman. *Crop Protection*. 22: 929–934.

**Kotan R., Kordali S. & Cakir A., 2007.** Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z. Naturforsch.* 62c, 507-513.

**Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J. & Nychas G. J. E., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 453–462.

**Laouer H., Boulaacheb N., Akkal S., Meierhenrich U. J., Baldovini N. & Prado S., 2009.** Composition and *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of two populations of *Thymus numidicus* Poiret. *Journal of Essential Oil Research*. 21: (4) 374-377.

**Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., Coisson J. D., Rinaldi M. & Arlorio M., 2009.** Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*. 114: 889–897.

**Longbottom C. J., Carson C. F., Hammer K. A., Mee B. J. & Riley T. V., 2004.** Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energydependent cellular processes. *J. Antimicrob. Chemother.* 54 : 386–392.

**Lu Y. & Foo L. Y., 2001.** Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*. 75: 197–202.

- Lu Y. & Foo L. Y., 2002.** Polyphenolics of Salvia—a review. *Phytochemistry*. 59: 117–140.
- Lubinic E., 2006.** Manuel pratique d’Aromathérapie : les huiles essentielles et leur utilisation. Editions Vigot, Paris, France. 270 p.
- Mayaud L., Carricajo A., Zhiri A. & Aubert G., 2008.** Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*. 47: 167–173.
- Mayer B., Baggio C. H., Freitas C. S., dos Santos A. C., Twardowschy A., Horst H., Pizzolatti M. G., Micke G. A., Heller M., dos Santos É. P., Otuki M. F. & Marques M. C. A., 2009.** Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. *Fitoterapia*. 80: 421–426.
- Mazoyer M., Aubineau M., Bermond A., Bougler J., Ney B. & Roger-Estrade J., 2002.** Larousse agricole. Paris, France. 767 p.
- Miguel G., Cruz C., Faleiro M. L., Simões M. T. F., Figueiredo A. C., Barroso J. G. & Pedro L. G., 2011.** *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. 25 (5): 526-541.
- Miura K., Kikuzaki H. & Nakatani N., 2002.** Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1845-1851.
- Molyneux P., 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 26 (2): 211-219.
- Morales R., 2002.** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme : The genus Thymus*. Taylor & Francis editions. London, United Kingdom. pp 1-43.
- Ninomiya K., Matsuda H., Shimoda H., Nishida N., Kasajima N., Yoshino T., Morikawa T. & Yoshikawa M., 2004.** Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 14: 1943-1946.
- Özcan M., 2003.** Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *Journal of Medicinal Food*. 6: (3) 267-270.

**Özkan A. & Erdogan A., 2011.** A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turk. J. Biol.* 35 : 735-742.

**Park M. J., Gwak K. S., Yang I., Choi W-S., Jo H-J., Chang J-W., Jeung E-B. & Choi I-G., 2007.** Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. *The Journal of Microbiology.* 45: 460–465.

**Pavela R., 2004.** Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia.* 75: 745-749.

**Pereira R. S., Sumita T. C., Furlan M. R., Jorge A. O. C. & Ueno M., 2004.** Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. *Revista de Saude Publica.* 38: (2) 1-3.

**Perry E., Pickering A. T., Wang W. W., Houghton P. J. & Perry N., 1999a.** Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 51: 527-534.

**Perry N., Court G., Bidet N., Court J. & Perry E., 1996.** European herbs with cholinergic activities: Potential in dementia therapy. *International Journal of Geriatric Psychiatry.* 11: 1063-1069.

**Perry N., Howes M. J., Houghton P. & Perry E., 2000.** Why sage may be a wise remedy: effects of *Salvia* on the nervous system. In: Kintzios S. E. SAGE: The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. pp. 207-223.

**Politeo O., Jukic M. & Milos M., 2006.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica Chemica Acta.* 79: (4) 545-552.

**Quezel P. & Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France. 603 p.

**Radtke O. A., Foo L. Y., Lu Y., Kiderlen A. F. & Kolodziej H., 2003.** Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ -release in RAW 264.7 cells. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of Biosciences.* 58: 395-400.

**Rakholiya K. D., Kaneria M. J. & Chanda S. V., 2013.** Medicinal plants as alternative sources of therapeutics against multidrug-resistant pathogenic microorganisms based on their antimicrobial potential and synergistic properties. *In: Rai M. K. & Kon K., V. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components.* Academic Press. San Diego, USA. pp. 165-179.

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

**Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Sendide K. & Remmal A., 2003.** The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research.* 15: 356–362.

**Roby M. H. H., Sarhan M. A., Selim K. A-H. & Khalel K. I., 2013.** Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products* 43: 827– 831.

**Rodrigues M. R. A., Kanazawa L. K. S., das Neves T. L. M., da Silva C. F., Horst H., Pizzolatti M. G., Santos A. R. S., Baggio C. H. & Werner P. M. F., 2012.** Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 519– 526.

**Romano C. S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A. A. & Moreno S., 2009.** Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry.* 115: 456–461.

**Rosato A., Piarulli M., Corbo F., Muraglia M., Carone A., Vitali M. E. & Vitali C., 2010.** *In vitro* synergistic action of certain combinations of Gentamicin and essential oils. *Current Medicinal Chemistry.* 17: 3289-3295.

**Rota C., Carraminana J. J., Burillo J. & Herrera A., 2004.** *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection.* 67: 1252-1256.

**Şahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G. & Özer H., 2004.** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 15: 549–557.

**Saidj F., Rezzoug S-A., Bentahar F. & Boutekedjiret C., 2008.** Chemical composition and insecticidal properties of *Thymus numidicus* (Poiret) essential oil from Algeria, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 11: (4) 397-405.

**Saller R., Buechi S., Meyrat R. & Schmidhauser C., 2001.** Combined herbal preparation for topical treatment of *Herpes labialis*. *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd*. 8: 373-382.

**Samejima K., Kanazawa K., Ashida H. & Danno G-I., 1995.** Luteolin: A strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2, in peppermint, sage, and thyme. *J. Agric. Food Chem*. 43: 410-414.

**Sánchez-Moreno C., 2002.** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 8 (3): 121–137.

**Sertel S., Eichhorn T., Plinkert P.K. & Efferth T., 2011.** Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil against HNSCC cell line (UMSCC1). *Springer-Verlag©. HNO*. 59:1203–1208.

**Shan B., Cai Y. Z., Sun M. & Corke H., 2005.** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7749-7759.

**Sharififar F., Moshafi M. H., Mansouri S. H., Khodashenas M. & Khoshnoodi M., 2007.** *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*. 18: 800–805.

**Sharma N. & Tripathi A., 2008.** Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*. 163 : 337–344.

**Simic D., Vukovic-Gacic B. & Knezevic-Vukcevic J., 1998.** Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutation Research*. 402: 51–57.

**Sokmen M., Serkedjieva J., Daferera D., Gulluce M., Polissiou M., Tepe B., Akpulat H. A., Sahin F. & Sokmen A., 2004.** In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 3309-3312.

**Tallarida R. J., 2001.** Drug Synergism: Its Detection and Applications. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 298: 865–872.

**Thompson J. D., Chalchat J. C., Michet A., Linhart Y. B. & Ehlers B., 2003.** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*. 29 : (4) 859-880.

**Todorov S., Philianos S., Petkov V., Harvala C., Zamfirova R. & Olimpiou H., 1984.** Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica*. 10: 13-20.

**Traoré Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I. & Coulibaly A., 2012.** Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied Biosciences*. 58: 4234– 4242.

**Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G. & Bisignano G., 2005.** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49 : 2474–2478.

**Ultee A., Kets, E. P. W. & Smid E. J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 4606–4610.

**Vaubourdolle M., 2007.** Infectiologie. 3<sup>e</sup> édition. Wolters Kluwer SA. France. 1037 p.

**Villano D., Fernandez-Pachon M. S., Moya M. L., Troncoso A. M. & Garcia-Parrilla M. C., 2007.** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71: 230–235.

**Viuda-Martos M., Navajas Y. R., Zapata E. S., Fernández-López J. & Pérez-Álvarez J. A., 2010.** Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*. 25: 13–19.

**Vujosevic M. & Blagojevic C., 2004.** Antimutagenic effects of extracts from Sage (*Salvia officinalis*) in mammalian system *in vivo*. *Acta Veterinaria Hungarica*. 52: (4) 439–443.

**Wichtl M. & Anton R., 2003.** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2<sup>e</sup> édition. Editions médicales internationales, et éditions Tec et Doc, Paris, France. 689 p.

**Wu S.J. & Ng L.T., 2008.** Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. Var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 41: 323-330.

**Xavier C.P.R., Lima C.F., Fernandes-Ferreira M. & Pereira-Wilson C., 2009.** *Salvia Fruticosa*, *Salvia Officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: The role in MAPK/ERK pathway. *Nutrition and Cancer*. 61: (4) 564–571.

**Zupko I., Hohmann J., Redei D., Falkay G., Janicsak G. & Mathe I., 2001.** Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta medica*. 67: 366-368.

---

# **ANNEXES**

---

**Annexe I : Étude statistique (XLSTAT 2009.1.02)****I-1 Comparaison des activités antioxydantes des différents échantillons**

Analyse de la variance univariée (ANOVA) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	8252118,981	2750706,327	253,140	< 0,0001
Erreur	8	86930,778	10866,347		
Total corrigé	11	8339049,759			

**Conclusion :** L'ANOVA a décelé des différences significatives entre les quatre échantillons analysés. Pour savoir quels sont les échantillons qui diffèrent significativement entre eux, le test suivant de comparaison multiple des moyennes est indispensable.

**Echantillon / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :**

Contraste	Différence	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
Sauge vs Vitamine E	1995,170	2,457	< 0,0001	Oui
Sauge vs Thymol	1894,833	2,403	< 0,0001	Oui
Sauge vs Thym	1842,747	2,306	< 0,0001	Oui
Thym vs Vitamine E	152,423	2,403	0,233	Non
Thym vs Thymol	52,087	2,306	0,558	Non
Thymol vs Vitamine E	100,337	2,306	0,272	Non

Modalité	Moyenne	Groupes	
Sauge	1999,280	A	
Thym	156,533		B
Thymol	104,447		B
Vitamine E	4,110		B

**Conclusion :** Le test de comparaison multiple de Duncan montre que seul l'échantillon Sauge diffère des 3 autres. Autrement, les 3 autres échantillons constituent un groupe homogène.

Ce résultat s'explique par la grande différence entre les 4 échantillons analysés et par la grande inégalité des variances des échantillons analysés et leur faible effectif. Le test est très sensible dans le cas des petits effectifs.

**I-2 Comparaison des activités antioxydantes des différentes associations****I-2-1 Test de conformité des différents FIC50 index avec 0,9**

Moyenne théorique : 0,9

Niveau de signification (%) : 5

Test t pour un échantillon / Test unilatéral à gauche

**A) Thym/Sauge**

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne :]-Inf ; 0,968[

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Thym/Sauge	0,035	3,071	-2,920	2	0,954	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est inférieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on peut valider l'hypothèse nulle H0.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 95,42%.

**B) Thymol/Sauge**

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne :]-Inf ; 1,484[

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Thymol/Sauge	0,316	3,440	-2,920	2	0,962	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est inférieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on peut valider l'hypothèse nulle H0.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 96,25%.

**C) Vitamine E/Sauge**

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne :]-Inf ; 1,130[

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Vit.E/Sauge	0,092	1,950	-2,920	2	0,905	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est inférieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on peut valider l'hypothèse nulle H0.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 90,47%.

**D) Vitamine E/Thym**

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne :]-Inf ; 0,789[

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Vit.E/Thym	-0,218	-5,955	-2,920	2	0,014	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est inférieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est inférieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on doit rejeter l'hypothèse nulle H0, et retenir l'hypothèse alternative Ha.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 1,35%.

#### E) Vitamine E/Thymol

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne : ]-Inf ; 2,159[

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Vit.E/Thymol	0,890	7,037	-2,920	2	0,990	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est inférieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on peut valider l'hypothèse nulle H0.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 99,02%.

#### I-2-2 Tests de conformité des différents FIC50 index avec 1,1

Moyenne théorique : 1,1

Niveau de signification (%) : 5

Test t pour un échantillon / Test unilatéral à droite

##### A) Thym/Sauge

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne : ] 0,902 ; +Inf [

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Thym/Sauge	-0,165	-14,645	2,920	2	0,998	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est supérieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on peut valider l'hypothèse nulle H0.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 99,77%.

**B) Thymol/Sauge**

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne :] 0,948 ; +Inf [

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Thymol/Sauge	0,116	1,261	2,920	2	0,167	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est supérieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on peut valider l'hypothèse nulle H0.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 16,73%.

**C) Vitamine E/Sauge**

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne :] 0,854 ; +Inf [

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Vit.E/Sauge	-0,108	-2,289	2,920	2	0,925	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est supérieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on peut valider l'hypothèse nulle H0.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 92,54%.

**D) Vitamine E/Thym**

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne :] 0,576 ; +Inf [

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Vit.E/Thym	-0,418	-11,426	2,920	2	0,996	0,05

Interprétation du test :

H0 : La différence entre les moyennes est égale à 0.

Ha : La différence entre les moyennes est supérieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on peut valider l'hypothèse nulle H0.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de 99,62%.

**E) Vitamine E/Thymol**

Intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne :] 1,420 ; +Inf [

Variable	Différence	t (Valeur observée)	t (Valeur critique)	DDL	p-value (unilatérale)	alpha
Vit.E/Thymol	0,690	5,455	2,920	2	0,016	0,05

Interprétation du test :

H<sub>0</sub> : La différence entre les moyennes est égale à 0.

H<sub>a</sub> : La différence entre les moyennes est supérieure à 0.

Etant donné que la p-value calculée est inférieure au niveau de signification seuil alpha=0,05, on doit rejeter l'hypothèse nulle H<sub>0</sub>, et retenir l'hypothèse alternative H<sub>a</sub>.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H<sub>0</sub> alors qu'elle est vraie est inférieur à 1,60%.

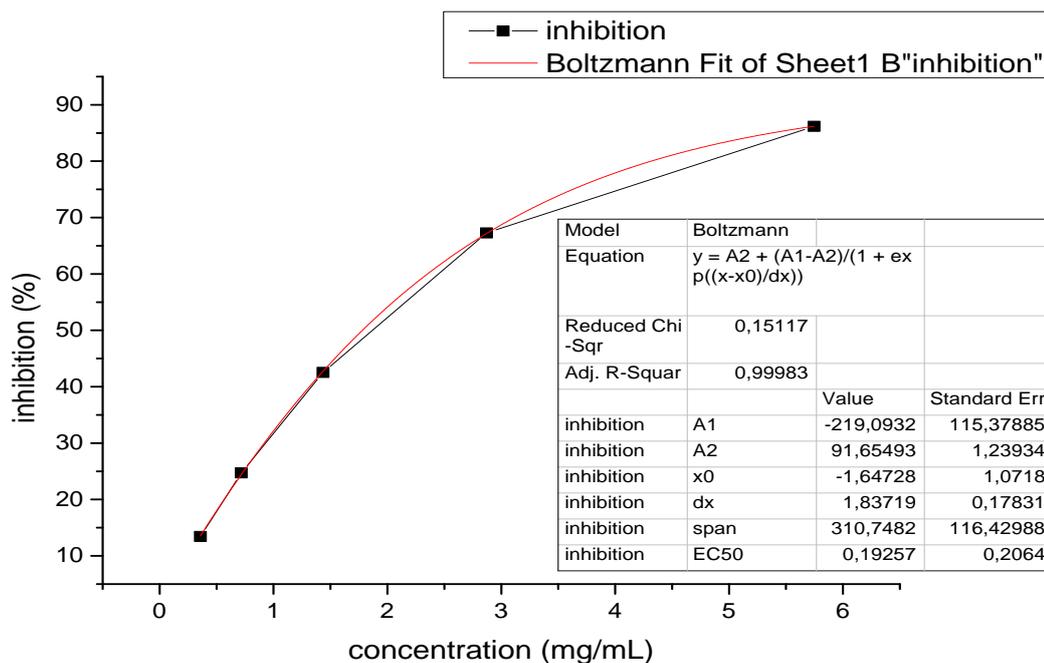
**Conclusions :**

Combinaison	Conformité de FIC <sub>50</sub> index moyenne avec 0,9	Conformité de FIC <sub>50</sub> index moyenne avec 1,1	Conclusion
Thym/Sauge	FIC <sub>50</sub> I peut être = 0,9 et ne peut pas être < 0,9	FIC <sub>50</sub> I peut être = 1,1 et ne peut pas être > 1,1	FIC <sub>50</sub> I = [0,9 ; 1,1] (Indifférence)
Thymol/Sauge	FIC <sub>50</sub> I peut être = 0,9 et ne peut pas être < 0,9	FIC <sub>50</sub> I peut être = 1,1 et ne peut pas être > 1,1	FIC <sub>50</sub> I = [0,9 ; 1,1] (Indifférence)
Vit. E/Sauge	FIC <sub>50</sub> I peut être = 0,9 et ne peut pas être < 0,9	FIC <sub>50</sub> I peut être = 1,1 et ne peut pas être > 1,1	FIC <sub>50</sub> I = [0,9 ; 1,1] (Indifférence)
Vit. E/Thym	FIC <sub>50</sub> I ≠ 0,9 et < 0,9	FIC <sub>50</sub> I peut être = 1,1 et ne peut pas être > 1,1	FIC <sub>50</sub> I < 0,9 (Synergie)
Vit. E/Thymol	FIC <sub>50</sub> I peut être = 0,9 et ne peut pas être < 0,9	FIC <sub>50</sub> I ≠ 1,1 et > 1,1	FIC <sub>50</sub> I > 1,1 (antagonisme)

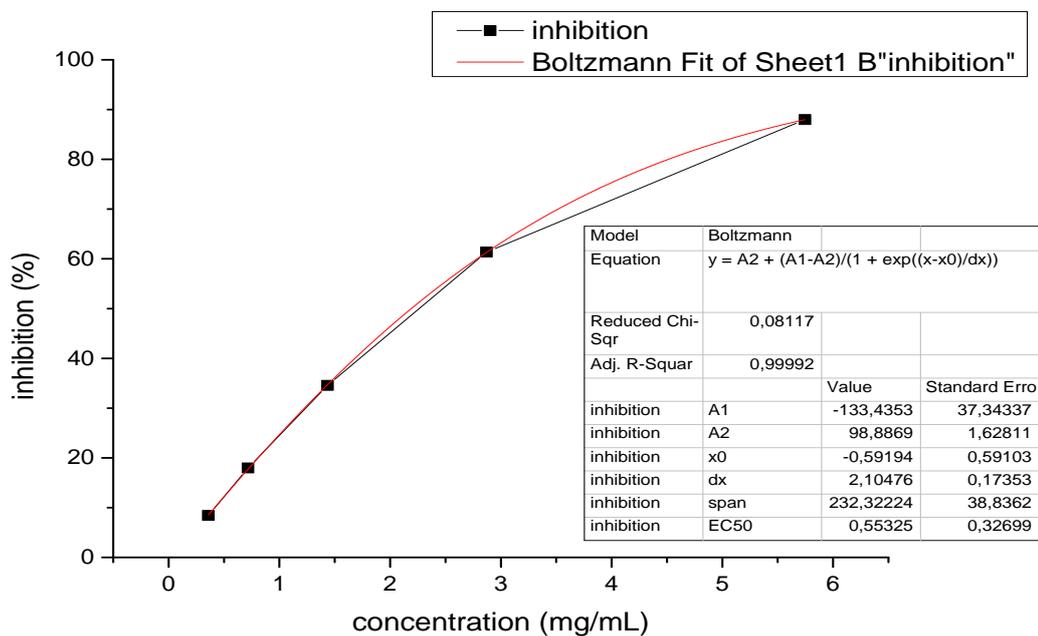
#### Annexe IV : Détermination des IC<sub>50</sub> avec le logiciel *Origin*

##### IV-1 Échantillons seuls

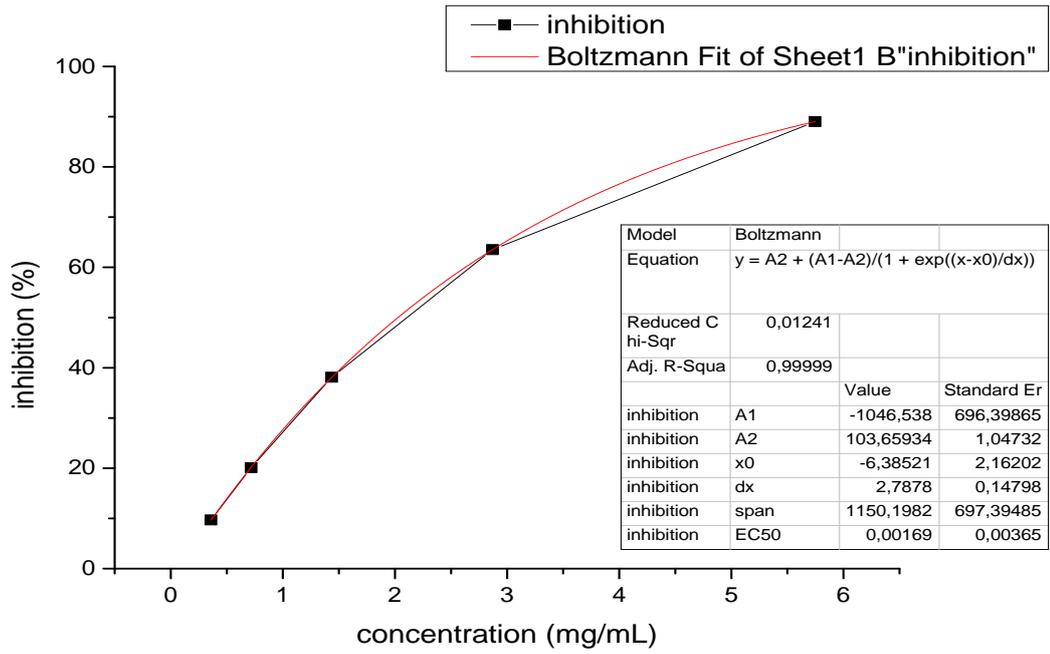
##### IV-1-1 La sauge (essais 1,2, et 3)



IC50 = 1780,25 µg/ml

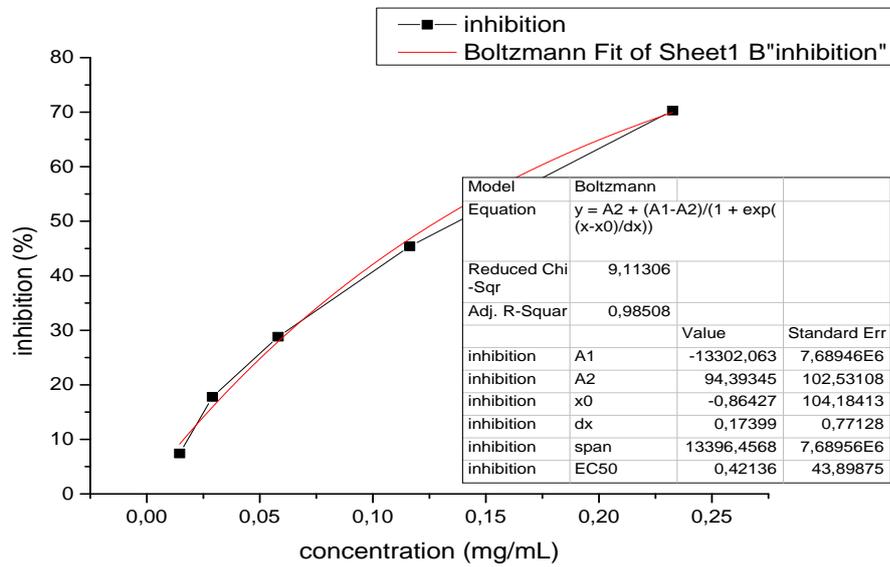


IC50 = 2191,29 µg/ml

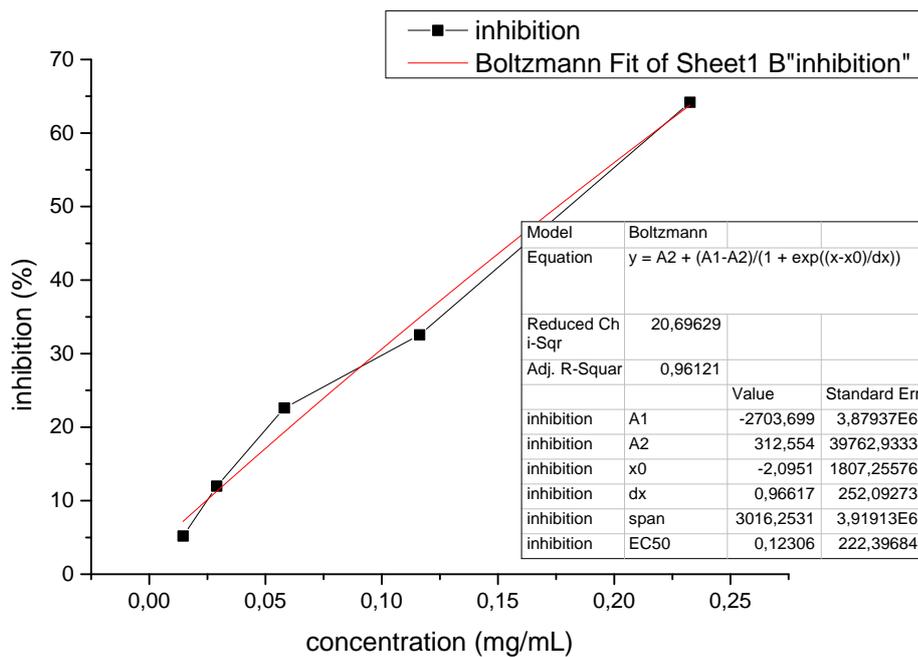


IC50 = 2026,30 µg/ml

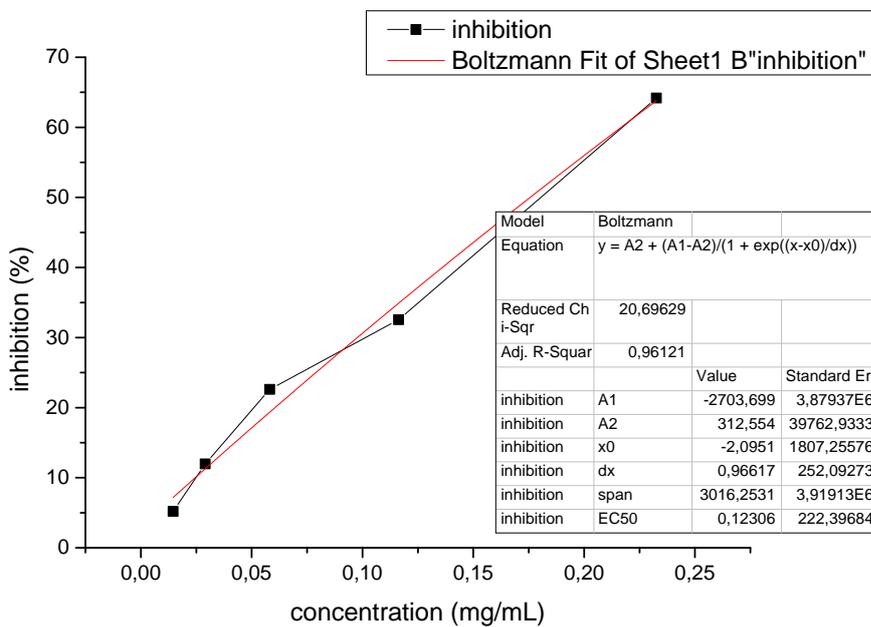
IV-1-2 Le thym (essais 1,2, et 3)



IC50 = 128,57 µg/ml

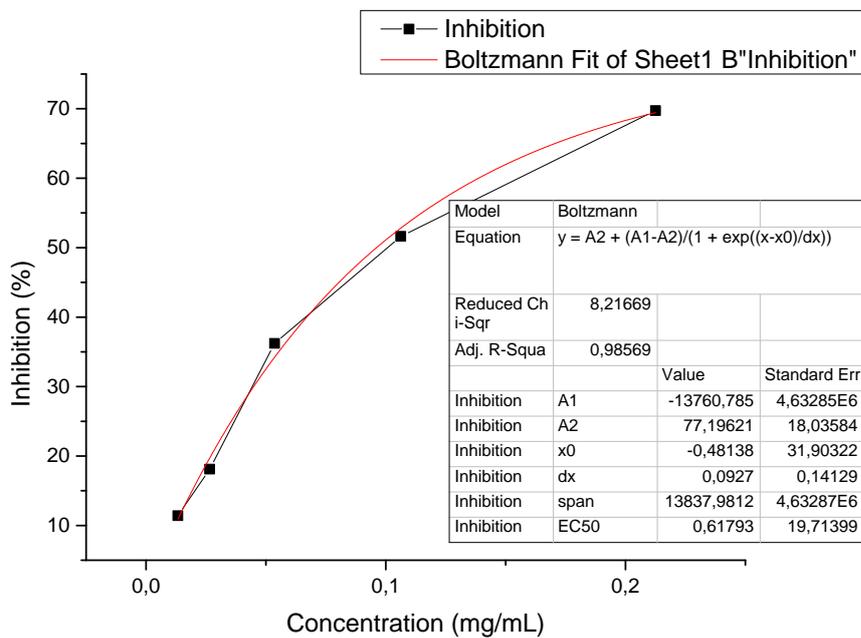


IC50 = 175,63 µg/ml

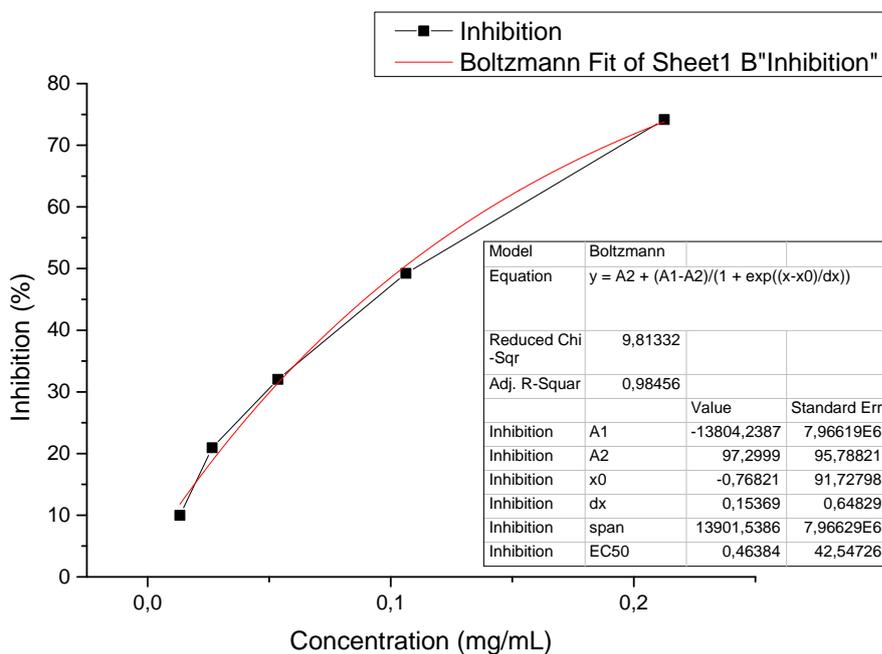


IC50 = 165,40 µg/ml

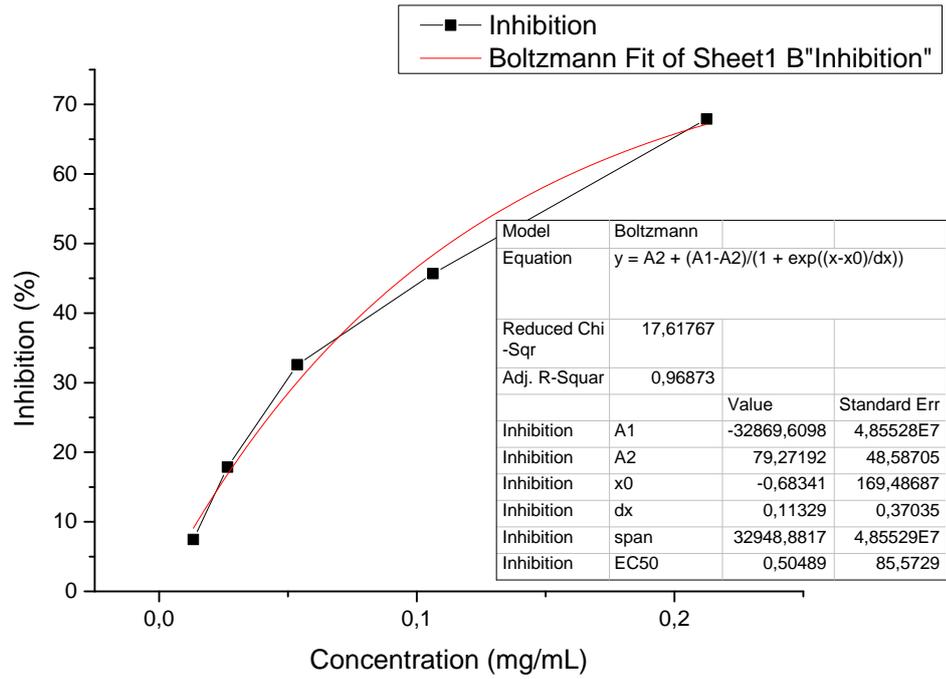
IV-1-3 Le thymol (essais 1,2, et 3)



IC50 = 96,15 µg/ml

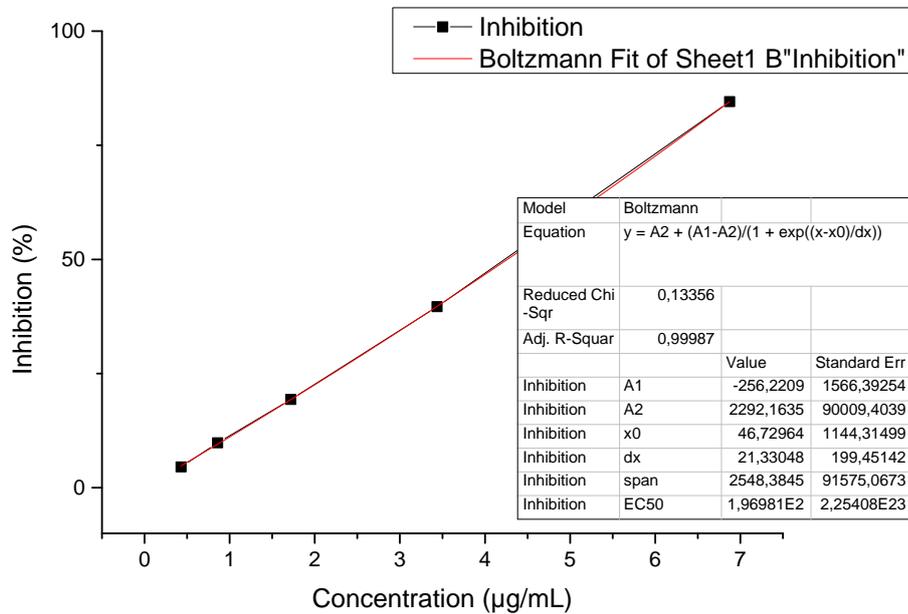


IC50 = 104,72 µg/ml

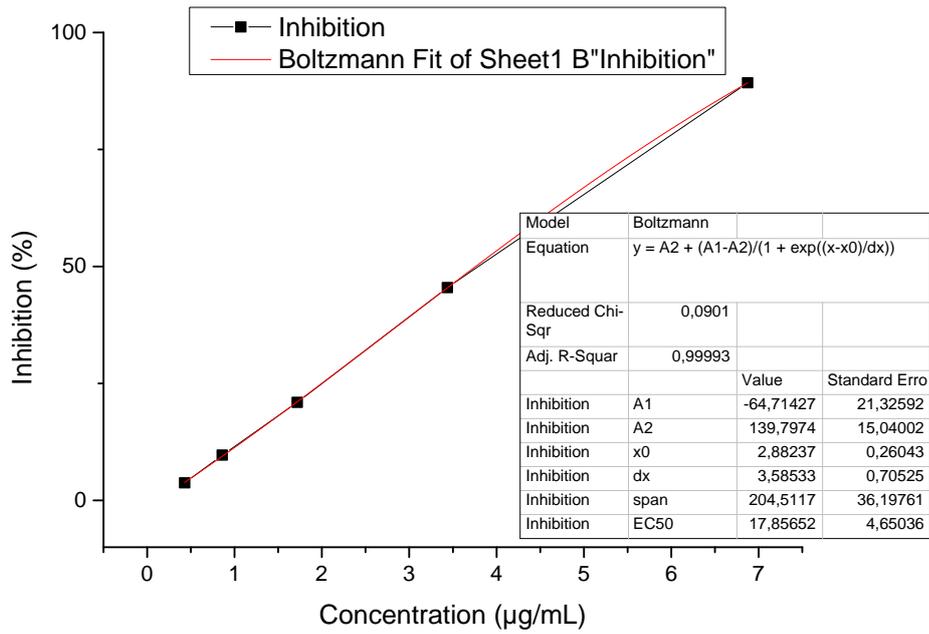


IC50 = 112,47 µg/ml

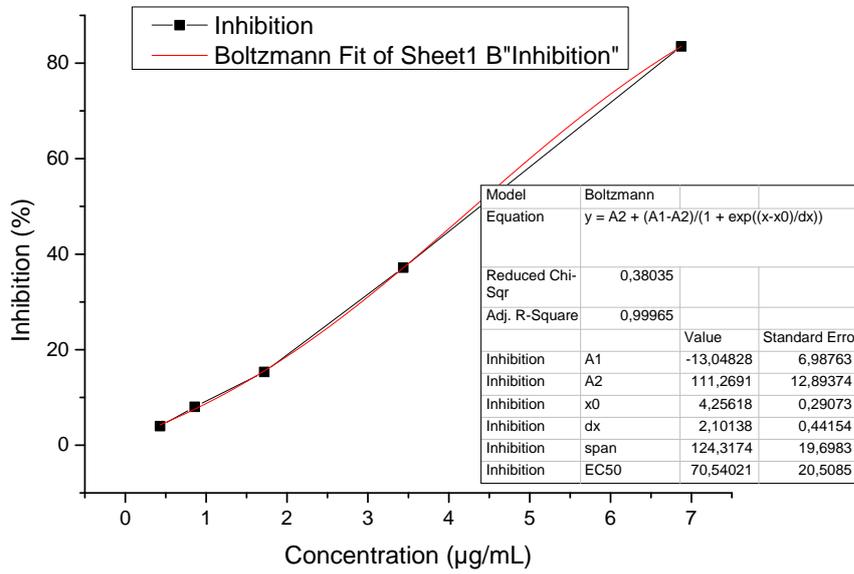
**IV-1-4 La vitamine E (essais 1,2, et 3)**



IC50 = 4,26 µg/ml



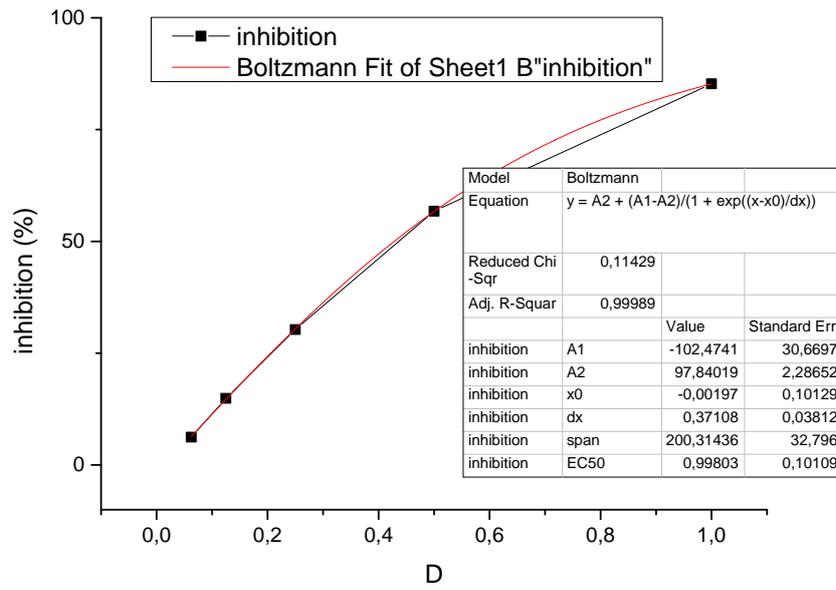
IC50 = 3,76 µg/ml



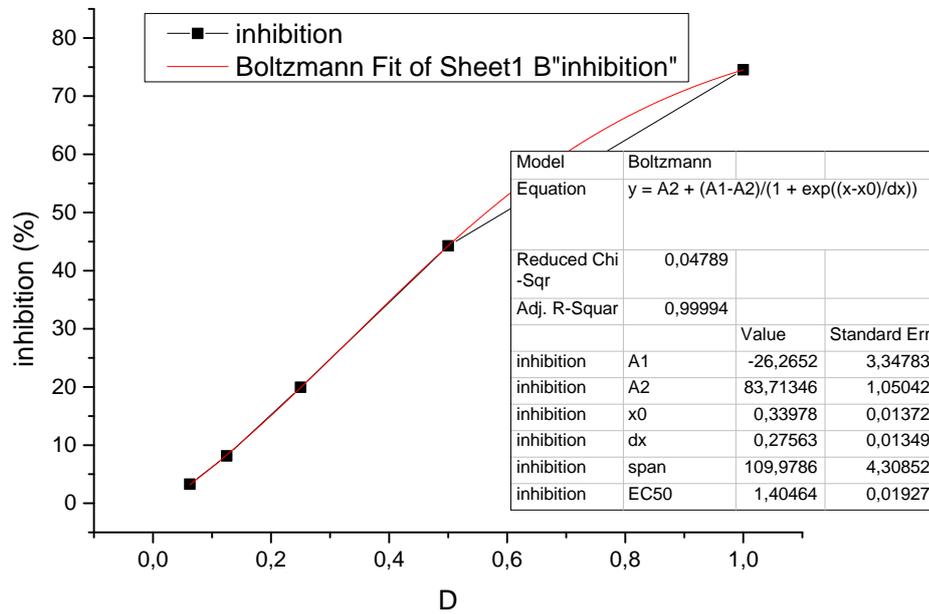
IC50 = 4,31 µg/ml

## IV-2 Échantillons en associations

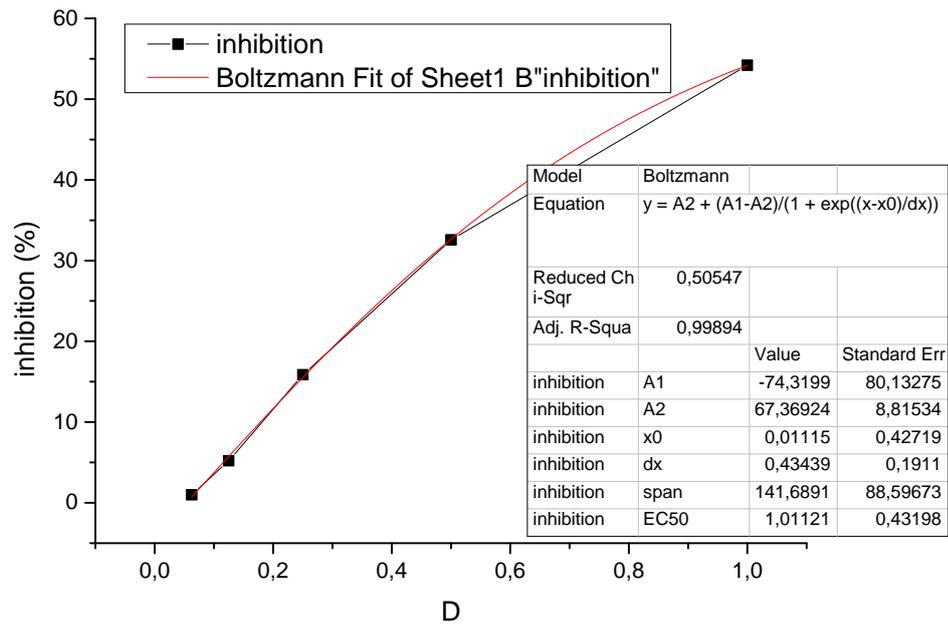
### IV-2-1 Thym+sauge (tests 1,2, et 3)



IC50c = 100,72 µg/ml (thym) + 621,67 µg/ml (saugé)

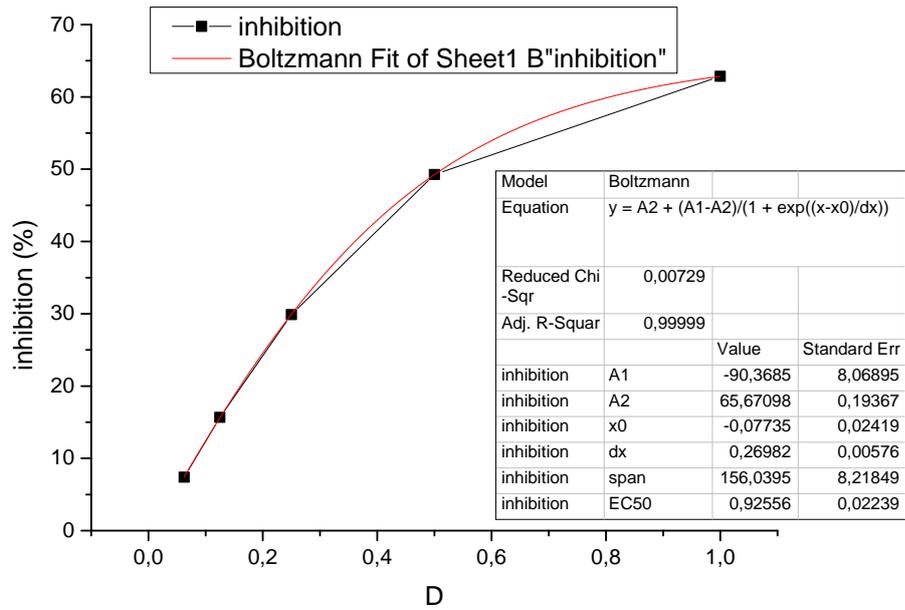


IC50c = 16,42 µg/ml (thym) + 1621,63 µg/ml (saugé)

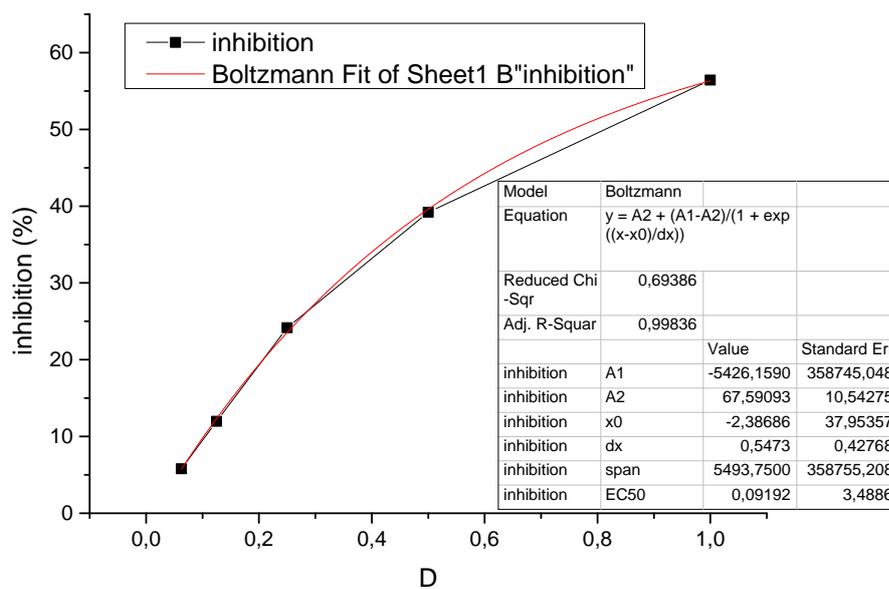


IC50c = 49,79 µg/ml (thym) + 1229,35 µg/ml (sauge)

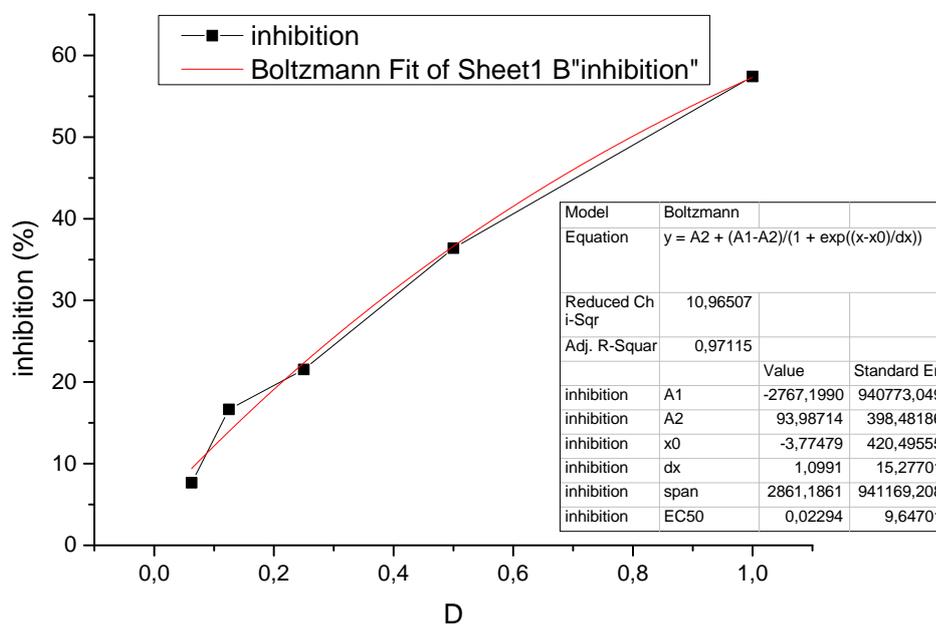
**IV-2-2 Thymol+sauge (tests 1,2, et 3)**



IC50c = 54,63 µg/ml (thymol) + 1476,45 µg/ml (sauge)

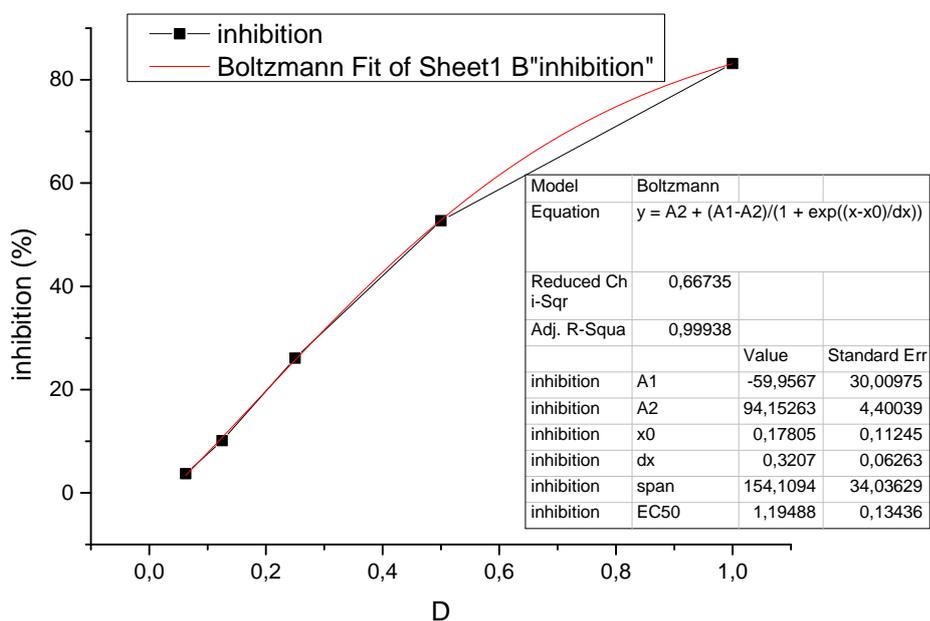


IC50c = 80,23 µg/ml (thymol) + 541,99 µg/ml (sauge)

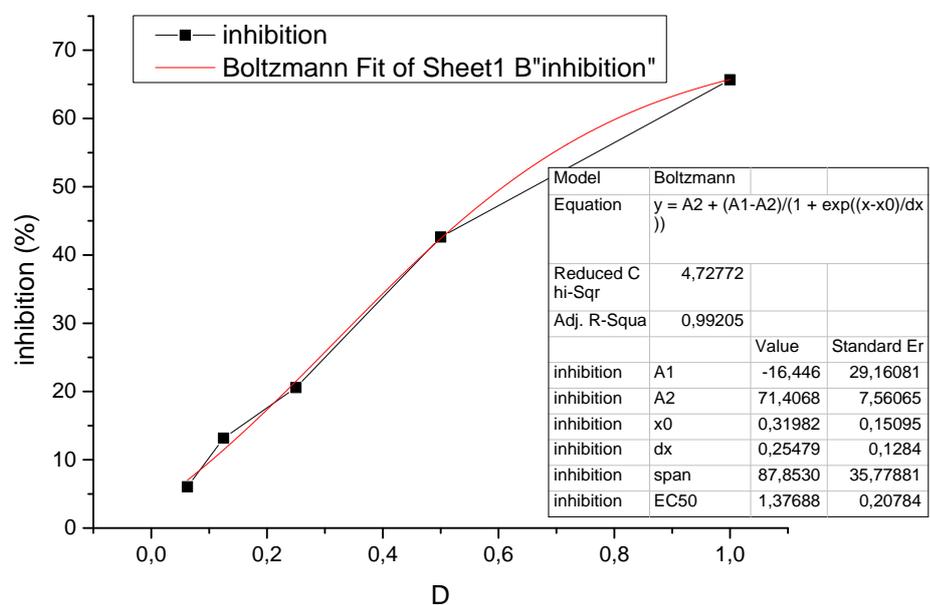


IC50c = 21,17 µg/ml (thymol) + 2288,46 µg/ml (sauge)

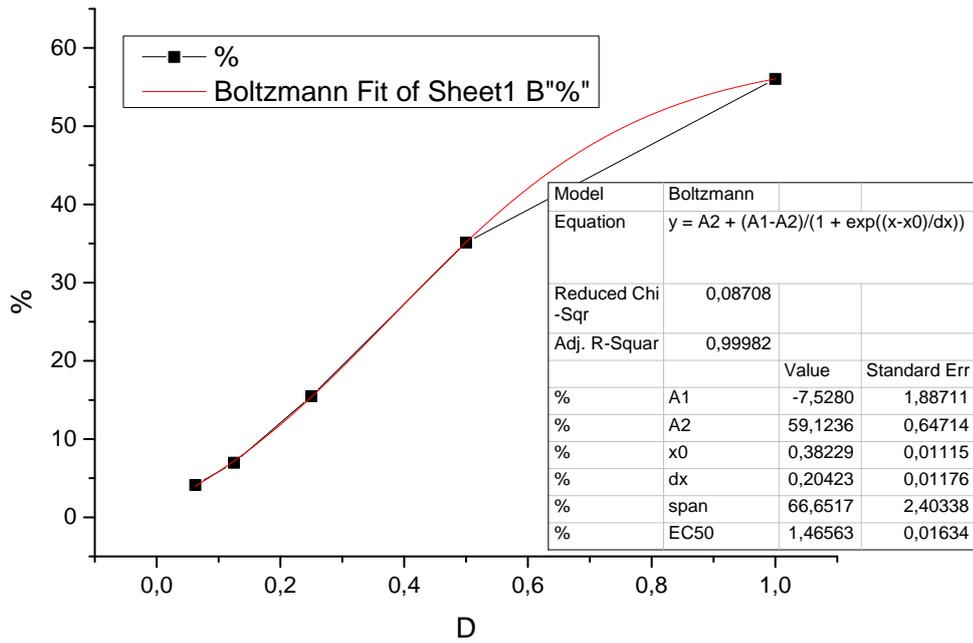
IV-2-3 Vit E.+sauge (tests 1,2, et 3)



IC50c = 1,62 µg/ml (Vit E.) + 1351,4 µg/ml (saugé)

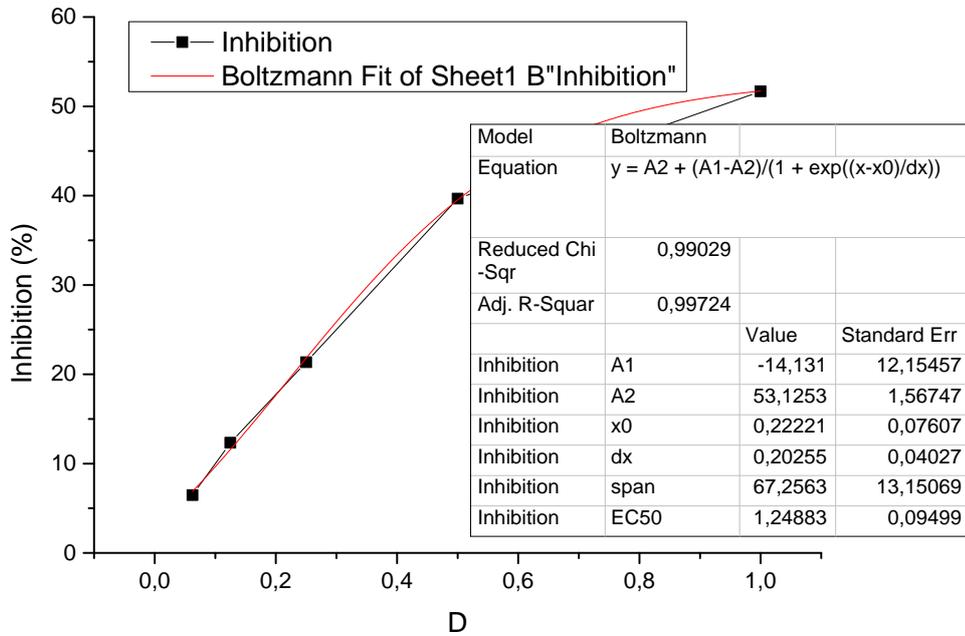


IC50c = 0,52 µg/ml (VitE.) + 1746,91 µg/ml (saugé)

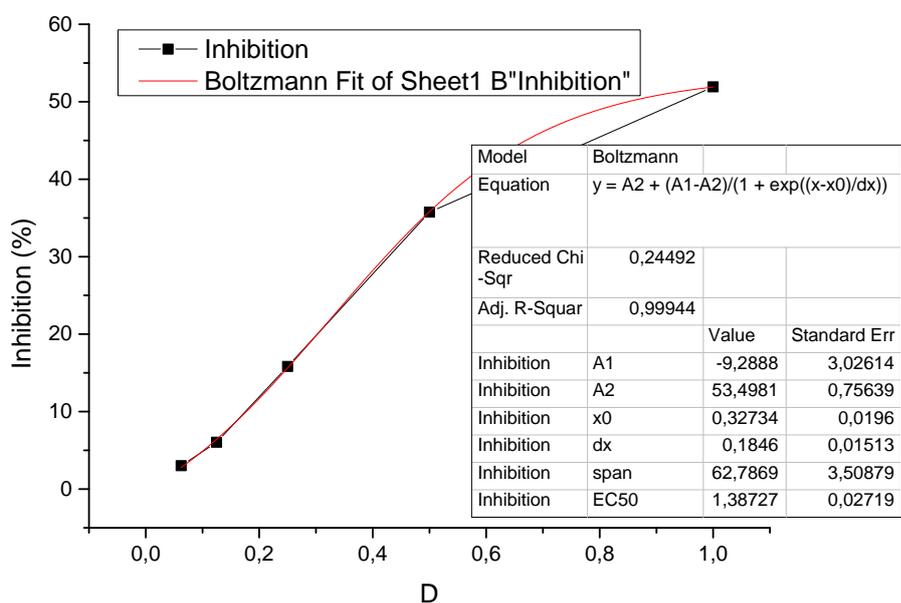


IC50c = 2,61 µg/ml (Vit E.) + 544,36 µg/ml (sauge)

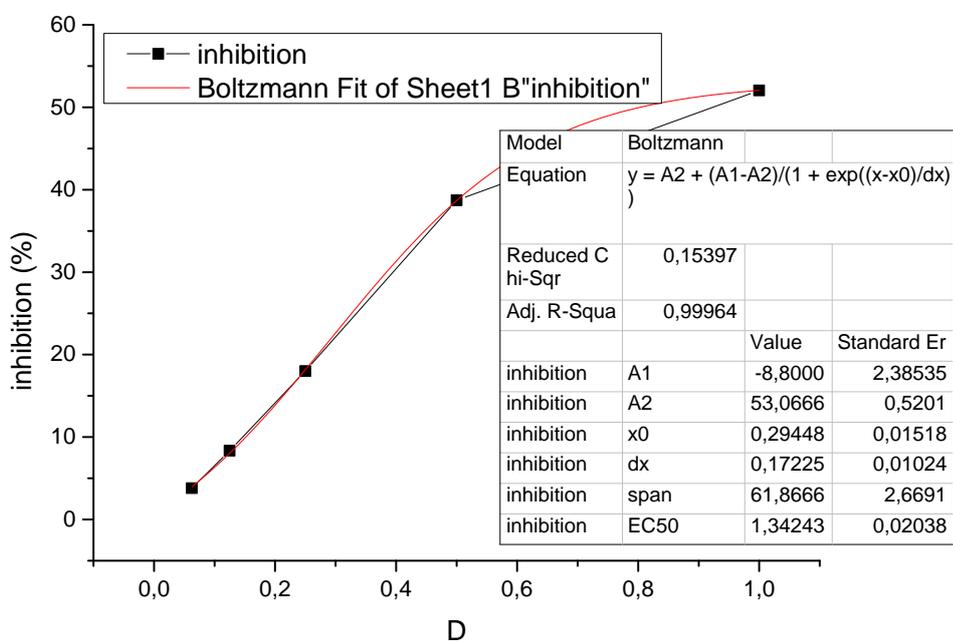
**IV-2-4 Vit E.+thymol (tests 1,2, et 3)**



IC50c = 2,86 µg/ml (Vit E.) + 88,63 µg/ml (thymol)

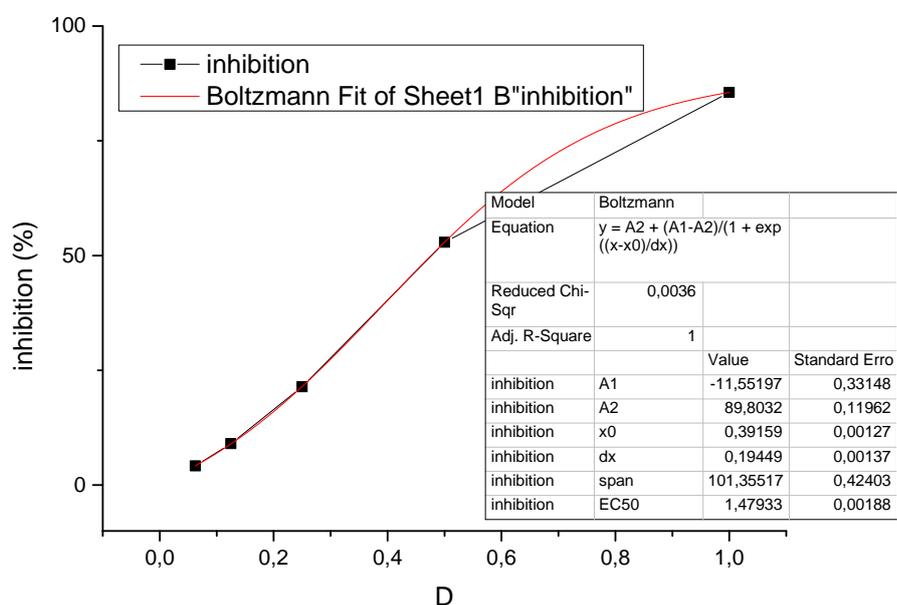


IC50c = 5,84 µg/ml (Vit E.) + 45,14 µg/ml (thymol)

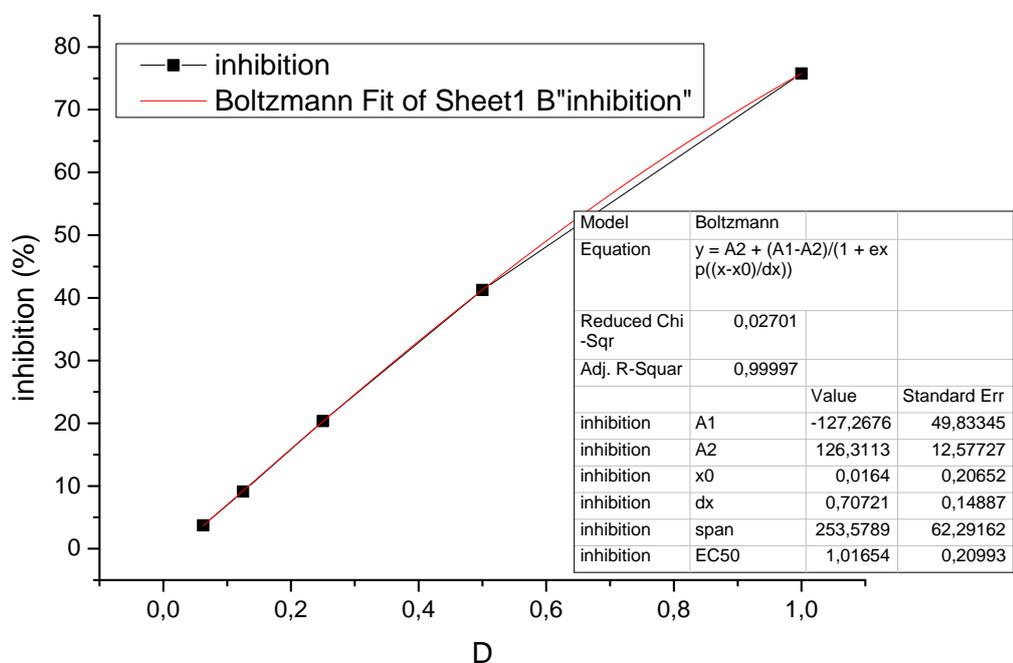


IC50c = 1,38 µg/ml (Vit E.) + 170,68 µg/ml (thymol)

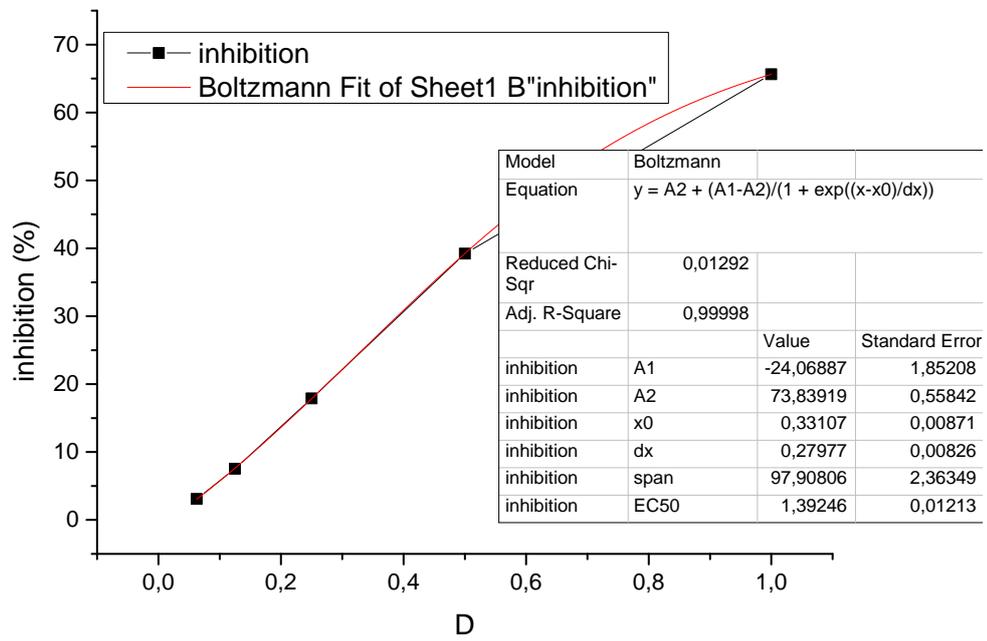
IV-2-5 Vit E.+thym (tests 1,2, et 3)



IC50c = 1,64 µg/ml (Vit E.) + 55,4 µg/ml (thym)



IC50c = 2,1 µg/ml (Vit E.) + 35,61 µg/ml (thym)



IC50c = 0,55 µg/ml (Vit E.) + 75,39 µg/ml (thym)

**Résumé:** La résolution du problème de la résistance aux antibiotiques, qui est en expansion, reste un grand défi pour traiter les maladies infectieuses. Combiner des agents antibactériens à la recherche d'un effet synergique semble être une bonne approche. La synergie entre les molécules antioxydantes a aussi un grand intérêt surtout pour l'industrie alimentaire. Le but de ce travail était, d'une part, d'évaluer l'activité antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles (HE) obtenues à partir des parties aériennes de *Thymus numidicus* Poir. et de *Salvia officinalis* L. (Labiatae) et d'une autre part, de déterminer la nature de l'interaction de ces HEs avec certains antibiotiques pour l'étude antibactérienne et le DL- $\alpha$ -tocophérol (Vit. E) pour l'activité antioxydante. L'activité antibactérienne a été évaluée sur cinq souches à Gram-négatif et une à Gram-positif mais seulement trois ont été utilisées pour les tests d'associations. La méthode de l'échiquier (méthode de microdilution en milieu BMH) a été utilisée pour cette activité. L'activité antioxydante a été évaluée par la capacité de piégeage (réduction) du radical libre DPPH. L'HE de thym a montré une très bonne activité antibactérienne sur les cinq souches testées (CMBs comprises entre 0,117 à 0,469 mg/ml), meilleure que celle de l'HE de la sauge (3,749 à 14,995 mg/ml), et aucune synergie n'a été observée pour toutes les combinaisons effectuées. L'HE de la sauge a montré une faible activité antioxydante ( $IC_{50} = 1999,28 \pm 168,89 \mu\text{g/ml}$ ). En revanche, l'HE de thym a montré une bonne activité ( $IC_{50} = 156,53 \pm 20,23 \mu\text{g/ml}$ ) mais moins bonne que celle de la vit. E ( $4,1 \pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ ). Une synergie a été observée entre la vit. E et l'HE de thym sur le piégeage du DPPH mais un effet antagoniste a été observé entre la vit. E et le Thymol.

**Mots Clés :** *Thymus numidicus*, *Salvia officinalis*, huile essentielle, Antibactérien, antioxydant, DPPH, synergie, méthode de l'échiquier, isobogramme, vitamine E.

---

**Abstract:** Resolving the problem of drug resistance by pathogens, which is increasing, is a great challenge to treat infectious diseases. The combination of antibacterial agents in order to get a synergistic effect seems to be a good way. Synergism between antioxidant molecules has also a great interest especially for the food industry. The aim of this study was to assess the antibacterial and antioxidant activity of the essential oils (EO) obtained from aerial parts of *Thymus numidicus* Poir. and *Salvia officinalis* L. (Labiatae), on another hand to define the interaction of these EOs with some antibiotics for the antibacterial study and with DL- $\alpha$ -tocopherol (Vit. E) for the antioxidant one. The antibacterial activity was performed against five Gram negative bacteria and one Gram positive bacterium but only three of them were used for the antibacterial combinations. The checkerboard method (MHB microdilution method) was used to assess this activity, while the free radical DPPH scavenging test was performed to assess the antioxidant one. The EO of thyme showed a significant antibacterial activity against all the strains tested (MBCs ranged from 0,117 to 0,469 mg/ml), higher than sage's EO (MBCs ranged from 3,749 to 14,995 mg/ml) and no synergistic effect had been shown for all the combinations performed. The EO of sage showed a weak antioxidant activity ( $IC_{50} = 1999,28 \pm 168,89 \mu\text{g/ml}$ ). In contrast, thyme's EO showed a good one ( $IC_{50} = 156,53 \pm 20,23 \mu\text{g/ml}$ ) but lower than vit. E ( $4,1 \pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ ). Synergy effect was observed in scavenging the DPPH between vit. E and thyme's EO but antagonism was shown with thymol.

**Keywords:** *Thymus numidicus*, *Salvia officinalis*, Essential oil, Antibacterial, antioxidant, DPPH, synergism, checkerboard, isobole, vitamin E.

**الخلاصة:** إن حل مشكلة مقاومة المضادات الحيوية، التي في تقاوم، لا يزال يشكل تحديا كبيرا لعلاج الأمراض المعدية. الجمع بين عوامل مضادة للجراثيم للحصول على تأثير متأزر يبدو بنهج جيد. التأزر بين الجزيئات المضادة للأكسدة له أيضا اهتماما كبيرا خاصة بالنسبة للصناعة الغذائية. كان الغرض من هذه الدراسة، أولا، تقييم النشاط المضاد للبكتيريا و المضاد للأكسدة للزيوت الطيارة (زط) التي تم الحصول عليها من الأجزاء العلوية ل: *Thymus numidicus* Poir. و *Salvia officinalis* L. ومن ناحية أخرى، تحديد طبيعة التفاعل بين هذه ال زط مع بعض المضادات الحيوية للدراسة المبينة على النشاط المضاد للبكتيريا و مع DL- $\alpha$ -tocophérol (فيت ج) بالنسبة للدراسة المبينة على النشاط المضاد للأكسدة. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا على خمسة سلالات سلبية ال: Gram و واحدة ايجابية ال: Gram فيما اختبرت فقط ثلاث سلالات منها في الدراسة الازدواجية العوامل المضادة للبكتيريا. لقد استعملت طريقة الشطرنج (مايكرو تحليل في الوسط المائي ل: ( Mueller Hinton ) لهذه الدراسة، فيما استعملت طريقة القدرة على حبس الجذر الحر DPPH لتقييم النشاط المضاد للأكسدة. لقد أظهرت ال زط لز عيطرة فعالية جيدة ضد البكتيريا الخمسة التي اختبرت ( CMI = 0,117 الى 0,469 مع/مل)، أفضل من زط ل *S. officinalis* ( CMI = 3,749 الى 14,995 مغ/مل). و لم يلاحظ أي تأزر بين جميع الازدواجيات المختبرة. ال زط ل *S. officinalis* أظهرت نشاط ضعيف في مقاومة الأكسدة ( IC50 = 1999,28 مايكروغ/مل). غير ان زط لز عيطرة اظهرت فعالية جيدة ( IC50 = 156,53 مايكروغ/مل) لكن بأقل فعالية من فيت ج ( IC50 = 4,1 مايكروغ/مل). لقد لوحظ التأزر بين فيت ج و ال زط لز عيطرة في حبس ال DPPH , غير انه لوحظ تفاعل تناقضي بين جزيء التيمول و ال فيت ج.

**الكلمات المفتاح :** الزيت الطيارة, *Thymus numidicus* , *Salvia officinalis* , مضاد للجراثيم، مضاد للأكسدة, التأزر, طريقة الشطرنج, DPPH , فايتامين ج.