

## SOMMAIRE

I – INTRODUCTION.....	1
II. BIBLIOGRAPHIE .....	4
II-1 Les huiles essentielles.....	4
II-1-1 Historique des huiles essentielles .....	4
II-1-2 Définition des huiles essentielles .....	4
II-1-3 <i>Cinnamosma fragrans</i> .....	5
II-1-4 Rôle des huiles essentielles dans la plante.....	5
II-1-5 Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante.....	6
II-1-6 Techniques d'extractions des huiles essentielles.....	7
a) Extraction au solvant et extraction au CO <sub>2</sub> .....	7
b) Expression, macération et exsudation .....	7
c) Hydro distillation .....	8
d) Entraînement à la vapeur (hydro diffusion) .....	8
e) La pyrogénéation .....	8
f) Micro-ondes .....	9
II-1-7 Composition chimique des huiles essentielles.....	9
II-1-8 Facteurs influençant la composition de ses huiles essentielles .....	9
a) L'espèce botanique .....	9
b) Le chémotype.....	9
c) Le cycle végétatif .....	9
d) La période de récolte .....	10
e) L'organe végétal .....	10
f) Les facteurs extrinsèques .....	10
g) Les procédés d'obtention .....	10
II-1-9 Les classes chimiques des huiles essentielles.....	10
a) Les terpenoïdes .....	10
b) Les composés aromatiques .....	11
c) Les composés alyphatiques .....	11
d) Les composés d'origine divers .....	11
II-1-10 Biosynthèse des composés volatiles.....	12
II-1-10-1 Les terpènes.....	13
a) Voie de l'acide mévalonique .....	14
b) Voie du 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate .....	15
c) Condensation des motifs isopréniques .....	15
d) Rôle des Terpènes Synthases (TPS) .....	15
e) Biosynthèse des monoterpènes .....	16
- Obtention des monoterpènes acycliques .....	16
- Obtention des monoterpènes cycliques .....	17
f) Biosynthèse des sesquiterpènes .....	17
- Biosynthèse des sesquiterpènes acycliques .....	17
- Biosynthèse des sesquiterpènes cycliques .....	17
g) Biosynthèse des structures aromatiques .....	18
h) Les dérivés aliphatiques.....	18
II-1-11 Propriétés des huiles essentielles.....	19
a) Caractéristiques physiques .....	19
II.1.12 Domaine d'utilisation des huiles essentielles .....	20

- Pharmacie .....	20
- Parfumerie .....	20
- Industrie Agro-alimentaire .....	20
- Diverses industries .....	20
II-2 Activités biologiques des huiles essentielles .....	20
II-2-1. Activité pesticide .....	21
II-2-2. Activité antiseptique et sur les affections respiratoires .....	21
II-2-3. Activités anthelminthique .....	22
II-2-4. Activités antioxydants .....	22
II-2-5. Activités anti-inflammatoires .....	22
II-3 Mécanismes d'action des huiles essentielles .....	22
II-3-1 Cytotoxicité .....	22
II-3-2 Phototoxicité .....	24
II-3-3 Mutagénicité nucléaire .....	25
II-3-4 Mutagénicité cytoplasmique .....	25
II-3-5 Cancérogénicité des huiles essentielles .....	26
II-3.6 Propriétés antimutagéniques des huiles essentielles .....	27
II-3.7 Mécanismes des dommages mitochondriaux et effets cytotoxiques prooxydants .....	27
II-4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles .....	29
II-4-1 Essai des huiles essentielles pour la propriété antimicrobienne (CMI et CMB) .....	29
a) La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) .....	29
b) La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) .....	29
c) Souches microbiennes .....	30
II-4-2. Rôle de la méthode dans la détermination de l'activité .....	30
a) Méthode de diffusion (aromatogramme) .....	30
b) Méthode de microdilution .....	30
1-4-3. Les effets antimicrobiens des composants d'huiles essentielles .....	31
Activité liée à la composition chimique .....	31
II-4.4- : Structure générale des principaux agents antimicrobiens .....	33
a) Alcools et phénols .....	33
b) Terpènes .....	34
c) Alcool de terpènes .....	34
d) Aldéhydes .....	35
e) Cétones .....	36
f) Esters .....	36
g) Oxydes .....	36
II-5. Crevetticulture .....	37
II-5-1. Généralités .....	37
Situation de la crevetticulture à Madagascar .....	37
II-5-2. Cycle biologique de la crevette <i>Penaeus monodon</i> .....	38
a) Taxonomie .....	38
b) Morphologie .....	38
II-5-3. Système d'élevage .....	41
a) Elevage extensif .....	41
b) Elevage semi-intensif .....	42
c) Elevage intensif .....	42
II-5-4. Technologies d'élevage de crevette <i>Penaeus monodon</i> .....	42
II-5-5. L'écloserie .....	44

a). L'unité de maturation .....	44
b). L'unité de pondoir .....	44
c). L'Unité d'élevage larvaire .....	44
d). L'unité de nurserie .....	44
e). L'unité de production d' <i>Artemia</i> .....	44
f). L'unité de production d'algues unicellulaires .....	45
g). L'unité de pathologie .....	45
II-5-6. Pré-grossissement et grossissement .....	45
II-5-7. Maladie et prévention .....	45
a) Les vibrioses .....	45
- Caractérisation des vibrios .....	46
- Morphologie et structure des vibrios .....	46
- Croissance .....	47
b) l'hépatopancréatite nécrosante (NHP) .....	47
II-5-8 Utilisation des antibiotiques en aquaculture.....	48
II-5-9. Résistance bactérienne aux antibiotiques en aquaculture .....	49
Apparition et développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques....	49
II-5-10. Alternatives aux antibiotiques .....	51
III. MATERIELS ET METHODES .....	53
III.1. Le matériel végétal et la procédure d'extraction d'huile essentielle .....	53
III.1.1. Origine des matériels végétaux.....	53
III.1.2. Extraction des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> .....	55
III.2. Analyse chimique .....	55
III.2.1.Détermination de la matière sèche des feuilles de <i>C. fragrans</i> .....	55
III.2. Détermination du rendement en huile essentielle .....	56
III.2.3 La densité relative à 20°C .....	56
III.2.4 Pouvoir rotatoire : NFT 75-113 .....	57
III.2.5. Analyses chromatographiques (GC) et chromatographies couplés à la spectrométrie de masse (Couplage CG/SM) .....	57
a) Les indices de rétention .....	58
b) Calcul des indices de Kovats .....	58
c) Méthode d'ajout (identification par enrichissement). .....	59
III.2.6. Etude des effets dates de récolte sur les compositions chimiques de <i>C. fragrans</i> .....	59
III.3. Matériel animal .....	59
III.3.1. Origine des larves et développement larvaire ( <i>Penaeus monodon</i> ) .....	59
III.3.2 Méthodes d'élevage à l'écloserie .....	62
III.3.2.1. Les principales données d'élevage .....	62
III.3.2.2. Réception et acclimatation des Nauplius .....	62
III.3.2.3. Contrôle qualité de l'élevage larvaire .....	63
a) Observation des aquariums et des larves .....	63
b) Propreté des larves et localisation de la nécrose externe .....	64
III.3.2.4. Mesure des paramètres abiotiques.....	64
III.3.2.5. Alimentation des larves .....	65
III.4. Utilisation de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> et l'antibiotique ( <i>erythromycine</i> ) .....	66
III.4.1. Etude de la dose létale 50 (DL50) et la dose de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> utilisée <i>in-vivo</i> ... ..	66
III.4.2. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> .....	67
III.4.2.1. Espèces microbiennes .....	67

III.4.2.2. Test des fractions volatiles de l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> .....	67
III.4.2.3. Choix des émulsifiants utilisés en crevetticulture .....	68
III.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) .....	69
III.4.4. Utilisation de l'huile essentielle et l'antibiotique en crevetticulture .....	69
III.4.5.. Concentration bactérienne et isolement des souches: .....	70
III.4.6. Le taux de survie des larves .....	71
III.5. Identification des souches microbiologiques .....	71
III.5.1. Isolement .....	71
III.5.2. La préparation des échantillons des larves et d'eau d'élevage.....	72
- Dilution de la suspension mère .....	72
- Ensemencement bactérien .....	72
III.5.3 Comptages des colonies bactériennes (cfu/ml) dans des prélèvements larvaires et les prélèvements d'eau d'élevage .....	73
III.6. Identification .....	74
a) Coloration gram .....	74
b) Recherche de l'oxydase .....	75
c) Recherche de catalase .....	75
d) Identification avec Galerie API-20E et API-20NE .....	75
III.7 L'analyse statistique des résultats .....	77
IV-RÉSULTATS .....	78
IV.1: Récoltes des feuilles de <i>Cinnamosma fragrans</i> .....	78
IV.2. Composition physico-chimique de <i>C. fragrans</i> .....	78
IV .2.1. : Matière sèche et rendement en huile essentielle des feuilles de <i>C. fragrans</i> ..	78
.....	78
IV.2.2. Densité relative à 20°C, l'indice de réfraction à 20°C, et le pouvoir rotatoire des huiles essentielles de <i>C. fragrans</i> .....	79
IV.2.3. Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de <i>C. fragrans</i> ...	80
V.2.4. Les effets dates de récoltes des huiles essentielles de <i>Cinnamosma fragrans</i>	83
IV.3. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>C.fragrans (in-vitro)</i> .....	84
IV.3.1 Effet des fractions volatiles de l'huile essentielle de <i>C.fragrans</i> en microplaques	84
.....	84
IV.3.2. Influence de la concentration des agents émulsifiants (Tween 20, Tween 80, DMSO et Triton X 100) sur les croissances des bactéries .....	85
IV.3.3. Identification des isolats de larves et de l'eau d'élevage de l'écloserie ...	90
IV.3.4.Détermination de CMI et CMB de <i>C. fragrans</i> avec des souches de références et les souches isolées de l'écloserie .....	91
IV.3.5. Résultats <i>in-vivo</i> de l'application de l'huile essentielle de <i>C.fragrans</i> et de l'antibiotique (Erythromycine) en crevetticulture .....	94
IV.3.5.1. Résultats du test de toxicité (DL50) des quatre stades larvaires de <i>P. monodon</i> avec l'huile essentielle de <i>C. fragrans</i> (B8 et B 143) .....	95
IV.3.5.2. Effet de l'utilisation de l'huile essentielle de <i>C.fragrans</i> et l'antibiotique (Erythromycine) sur les larves et l'eau d'élevage larvaire .....	96
V. DISCUSSION .....	104
VI. CONCLUSION .....	109
VII. PERSPECTIVES .....	110



VIII. RÉFÉRENCES .....	112
ANNEXES .....	136

## I. INTRODUCTION

L'île de Madagascar, située dans l'Océan Indien, présente tous les caractères d'un petit continent doté d'une nature extraordinairement variée. Sa flore a été reconnue comme une des plus riches du monde (environ 14 000 espèces) et, de par sa situation géographique, elle possède un très fort taux d'endémisme, de 80 à 86 % (Ministère de l'Environnement des Eaux et Forêts, 2005). Ceci fait de l'île un remarquable laboratoire naturel.

Madagascar possède de nombreuses espèces aromatiques susceptibles de fournir des huiles essentielles, utilisées dans différents domaines pour leurs propriétés thérapeutiques et organoleptiques, notamment odorantes (parfumerie, cosmétique), pharmaceutiques (aromathérapie), gustatives (additifs alimentaires) ou encore comme sources d'isolats pour les hémisynthèses. Ces plantes aromatiques sont à l'origine de produits à très forte valeur ajoutée qui peuvent contribuer au développement économique de l'île, à condition que soient respectés les critères de qualité exigés par le marché international. C'est pourquoi la valorisation des huiles essentielles et extraits végétaux nécessite une étape importante de caractérisation et d'analyse.

Le genre *Cinnamosma* de la Famille des Cannelaceae qui comprend trois espèces, à savoir *C. fragrans* Baillon, *C. madagascariensis* H. Perrier et *C. macrocarpa* Danguy (Tucker, Maciarelo, Brown & Griffeth, 2008). *C. fragrans* pousse dans les forêts tropophylles de la côte ouest de Madagascar, plus souvent aux bords du littoral. Elle n'est pas indiquée comme une espèce menacée sur la liste rouge de l'UICN (IUCN, 2009). En outre, les huiles essentielles sont extraites des feuilles, par une méthode non destructive. Ces raisons nous permettent d'envisager une exploitation durable de cette ressource à Madagascar. Depuis l'antiquité, les extraits volatils des plantes aromatiques sont l'objet de recherche à cause de leurs propriétés biologiques (Deans & Ritchie, 1987 ; Cowan, 1999). En effet, les plantes contiennent, selon leurs différents organes (feuilles, tiges, racines, fleurs...), des substances dotées de propriétés antimicrobiennes et antiparasitaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes...). Certaines huiles essentielles possèdent des propriétés biologiques (acaricides, insecticides, bactéricides, fongicides,...) et ont fait l'objet d'études phytochimiques et biologiques (Pamo, Zollo, Tendonkeng, Kana, Fongang & Tapondjou, 2004).

Les antibiotiques ont été largement utilisés en traitement et en prévention des infections bactériennes en médecine humaine et vétérinaire depuis les années 40. Cependant leurs utilisations abusives ont rapidement entraîné l'apparition de phénomènes de résistances aux activités antibiotiques (Halling-Sørensen, Nielsen, Lanzky, Ingersiev, Lützhøft &

Jørgensen, 1988 ; Miranda & Zemelman, 2002 ; Roque, Molina-Aja, Bolan-Mejia & Gomez-Gil, 2001) ; l'usage d'antibiotiques en aquaculture, à des fins curatives ou prophylactiques, a été associé au développement des résistances des bactéries opportunistes ou pathogènes chez les animaux cultivés infectés (American Academy of Microbiology, 1999 ; Holmström, Gräslund, Wahlström , Pongshompoo, Bengtsson & Kautsky, 2003 ; Khachatourians, 1998 ; Le, Munekage & Kato, 2005 ; Tendencia & de la Pena, 2001 ; Wegener, Aarestrup, Gerner-Smidt & Bager, 1999; Willis, 2000). Les organismes internationaux recommandent uniquement l'usage des antibiotiques à des fins thérapeutiques et ne prescrivent leur utilisation qu'à des usages de préventions des maladies (GESAMP, 1997; FAO, 2005).

Des alternatives aux antibiotiques ont été développées, à partir d'extraits de plantes, de manière à renforcer l'immunité des animaux ou à inhiber la croissance des bactéries indésirables (Babu, Sivaram, Immanuel, Citarasu & Punitha, 2008 ; Immanuel, Vincybai, Sivaram, Palavesam & Marian, 2004). En aquaculture, d'autres stratégies de lutte contre les maladies ont également été étudiées, comme la vaccination et l'utilisation de probiotiques (Olivier, David & Patrick, 2008 ; Qi, Zhang, Boon & Bossier, 2009), mais elles se sont avérées inefficaces dans le cas des crevettes (Defoirdt , 2007).

L'élevage des crevettes, ou crevetticulture, consiste en l'élevage de crevettes marines en vue de la consommation humaine. La production commerciale de crevettes d'élevage a commencé dans les années 1970 et a connu une croissance très rapide, stimulée par la demande du marché aux États-Unis, au Japon et en Europe occidentale.

La crevetticulture est aujourd'hui l'une des activités principales qui a rapporté le plus de devises à Madagascar. En 2001, les recettes provenant de l'exportation de crevettes se sont élevées à 155,52 milliards d'Ariary dont 71,2 milliards d'Ariary sont d'origine aquacole et correspondent à une production de 5195 tonnes. La quantité exportée en 2002 a été de 9727 tonnes dont 6225 proviennent de la crevetticulture, 7795 tonnes en 2004 et 5514 en 2007 (Madagasikara Laza, 2008) .

Cependant, l'intensification de l'aquaculture dans le monde a entraîné des pressions défavorables sur l'environnement, un exemple du développement de la résistance aux antibiotiques dû à l'utilisation abusive de ces derniers. Le développement des maladies infectieuses constitue un facteur limitant pouvant engendrer des pertes économiques importantes dans le secteur de l'aquaculture. Afin de prévenir ou de traiter ces maladies, l'aquaculteur a recours à l'utilisation des antibiotiques. Cependant, cette pratique génère des impacts négatifs car, en s'accumulant dans l'environnement, les antibiotiques favorisent

le développement d'antibiorésistance qui constitue une menace, non seulement pour le développement de l'aquaculture mais aussi pour la santé publique. La FAO et l'OMS considèrent le développement de résistances bactériennes aux antibiotiques comme « un des risques les plus graves pour la santé humaine à l'échelle mondiale » (FAO, 2002; FAO, 2007 ; WHO, 1998).

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portent sur (i) l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* de différentes origines géographiques de Madagascar ; (ii) l'évaluation de leurs activités antibactériennes vis-à-vis d'une collection de souches bactériennes dont plusieurs sont spécifiques à l'aquaculture ; et (iii) l'application en crevetticulture de 2 types d'huiles essentielles de *C. fragrans* (majoritaires en linalol ou 1,8 cinéole) de manière à substituer l'antibiotique conventionnel.

## **II. TRAVAUX ANTERIEURS**

### **II-1. LES HUILES ESSENTIELLES**

#### **II-1-1. Historique des huiles essentielles**

Les essences parfumées connues dès l'origine des civilisations, furent d'abord utilisées pour des usages sacrés. Rites funéraires, embaumement des morts, onctions des élus, sacrifices aromatiques aux ancêtres et aux divinités apparaissent comme une constante des mondes antiques (Sangwan, Farooqi, Shabih & Sangwan, 2001), de la Chine à la Perse et de l'Arabie à la Grèce (Blanc-Mouchet, 1987). Nous pensons que le nom *huile essentielle* a été inventé au 16<sup>ème</sup> siècle par le réformateur suisse de la médecine, Paracelsus von Hohenheim qui a appelé le composant efficace *essentia de Quinta* de drogue (Guenther, 1948). Trois milles huiles essentielles environ sont connues, dont environ 300 sont destinées à un usage commercial (Van de Braak, S. & Leijten, G., 1999). Parallèlement, nous retrouvons l'utilisation de végétaux dans les pratiques thérapeutiques de ces diverses civilisations, selon différents stades évolutifs liés à leur utilisation (Franchomme & Pénœl, 1990).

#### **II-1-2. Définition des huiles essentielles**

Les huiles essentielles également appelées huiles volatiles ou éthérées (Guenther, 1948) sont les liquides aromatiques obtenus à partir de la matière végétale (fleurs, bourgeons, les graines, feuilles, brindilles, écorce, herbes, bois, fruits et racines). Ils peuvent être obtenus par expression, fermentation, enfleurage ou extraction. La méthode de la distillation à la vapeur est la plus utilisée pour la production commerciale des huiles essentielles (Van de Braak, S. et al., 1999). AFNOR NF T 75-006 définit les huiles essentielles, souvent appelées essences, comme des produits odorants obtenus soit par entraînement à la vapeur d'eau des végétaux ou parties de végétaux, soit par expression du péricarpe frais de certains citrus, elles sont très volatiles et possèdent une valeur olfactive et gustative fortement aromatique.

Cette définition n'intègre cependant pas toutes les autres substances dont les propriétés et l'apparence semblent similaires, mais qui sont obtenues par des procédés différents :

- *Les concrètes* sont des concentrés aromatiques obtenus par extraction de matières végétales fraîches contenant peu de résine, à l'aide d'un solvant non aqueux, éliminé ensuite par un moyen physique.
- *Les absolues* sont des produits obtenus par extraction à l'éthanol et à basse température des concrètes pour supprimer les cires.
- *Les oléorésines* sont obtenues à partir de certaines épices par une extraction avec un solvant organique.

- *Les résinoïdes* sont les produits d'extraction par un solvant organique de résine ou de baume.

- *Les essences déterpenées* résultent de la distillation fractionnée, sous pression réduite, des huiles essentielles, entraînant l'élimination des fractions terpéniques les plus volatiles, augmentant ainsi leurs qualités organoleptiques et assurant une meilleure conservation du produit.

### **II-1-3. *Cinnamosma fragrans***

Le genre *Cinnamosma* appartient à la famille des Cannelaceae. Il comprend trois espèces : *C. fragrans* Baillon, *C. macrocarpa* H Perrier et *C. madagascariensis* Danguy (Randrianarivelo et al., 2009 ; Tucker et al., 2008). *Cinnamosma fragrans* est un arbuste, aromatique, ne possédant pas de stipules. C'est un arbuste toujours vert, très aromatique ; l'écorce, les feuilles et les fruits sont à saveur pimentée et brûlante, les rameaux sont cylindriques (Perrier de la Bâthie, 1954). Les jeunes feuilles sont ponctuées mais deviennent alternées et vert foncées. Elles sont persistantes au stade adulte. Les fleurs sont hermaphrodites et régulières. Les fruits, ayant de 1 à 15 graines par fruit, sont semblables à des baies mais leur forme et leur taille sont variables (Randrianady 2002).

L'espèce *Cinnamosma fragrans* (nom local : Motrobeatinaina, mandravarotra) se trouve en abondance dans les forêts denses sèches de l'ouest, sur des sols siliceux le long des régions côtières du nord ouest en dessous de 600 mètres d'altitude. Les densités varient suivant les localités. Cette plante est employée traditionnellement contre les infections respiratoires, gastro-intestinales (Schulte, Rücker & Lewe, 1972), et contre la malaria (Milijaona et al., 2003). Les compositions chimiques de cette plante peuvent varier en fonction de la localisation géographique (Randrianarivelo et al., 2009).

### **II-1-4. Rôle des huiles essentielles dans la plante.**

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et

prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires.

Les travaux de Croteau en 1977 puis ceux de Croteau et Hooper en 1978 ont montré que, bien qu'étant des produits du métabolisme secondaire, les composants volatils auraient en fait un rôle mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante. Certains terpènes jouent un rôle important et varié dans la relation des plantes avec leur environnement (Mahmout, 1992). Ainsi le 1,8-cinéole et le camphre inhibent la germination des organes responsables de la prolifération des infections ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes (Razafindrakoto, 1988).

Pour certains auteurs, les huiles essentielles constitueraient « les déchets » du métabolisme cellulaire de la plante (Salle, 1991). Pour d'autres, elles serviraient à attirer les insectes pour permettre la fécondation ou alors à les éloigner de la plante. L'attrait des insectes pour les plantes à fleurs en vue de la pollinisation est également crédité aux huiles essentielles que ces plantes contiennent. Les huiles essentielles constitueraient enfin un moyen de défense de la plante vis-à-vis des prédateurs tels que les microorganismes (bactéries et champignons) et les herbivores (Bruneton, 1999). Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes en tant que substances antibactérienne, antiviral, antifongique, insecticide et aussi contre les herbivores en réduisant leur appétit pour une telle plante. Elles peuvent attirer aussi des insectes en favorisant la dispersion de pollens et graines, ou au contraire repousser d'autres indésirables (Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008).

#### **II-1-5. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante.**

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont répartis dans une cinquantaine de familles botaniques parmi lesquelles les Lamiacées, les Astéracées, les Rutacées, les Cannelacées, les Lauracées, les Myrtacées et les Zingibéracées. (Bruneton, 1999). Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes: fleurs (rose) feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vetiver), rhizomes (cucurma, gingembre), fruits (anis, badiane) et graines (muscade). (Sangwan et al., 2001). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à huiles essentielles des



Lauracées ou des Zingibéracées, poils sécréteurs des Lamiacées, poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées, canaux sécréteurs des Apiacées ou des Astéracées.

## **II-1-6. Techniques d'extractions des huiles essentielles.**

Il existe plusieurs méthodes d'extraction, chacune ayant plusieurs variantes, que l'on utilise en fonction du matériel végétal à traiter. Parmi ces méthodes, les plus classiques sont :

### **a) Entraînement à la vapeur (hydro diffusion)**

Cette technique consiste à l'injection de vapeur d'eau dans un liquide organique. Ce dernier est chauffé par de la vapeur d'eau puis distillé simultanément ; il est dit entraîné par la vapeur. La distillation à la vapeur est une méthode ancienne très répandue, destinée à l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques. En principe, elle est simple et utilise un équipement peu coûteux sans produits chimiques dangereux à manipuler, (Alitonou, Avlessi, Wotto, Ahoussi, Dangou & Sohounhloue, 2004 ; Cimanga et al., 2002 ; Faleiro et al., 2003 ; Guiseppe, Filippo, Donatella, Delia, Raffaello & Leonardo, 2001 ; Silou, Malanda & Loubaki, 2004). La distillation à la vapeur « cuit à la vapeur » les éclosions cellulaires. L'essence mélangée à la vapeur passe alors dans un réservoir refroidissant ; la vapeur se condense en un liquide saturé d'eau sur lequel flotte l'huile essentielle qui est alors prélevée.

### **b) Hydrodistillation**

Il s'agit de la distillation d'un mélange hétérogène d'eau et d'un liquide organique. L'hydrodistillation sous pression est une technique qui permet d'obtenir des huiles essentielles difficilement entraînables à la vapeur d'eau; la pression permet d'économiser de la vapeur d'eau et elle augmente la production pour un même volume d'appareillage (Lahlou, 2004b).

### **c) Extraction au solvant et extraction au CO<sub>2</sub>**

L'extraction au solvant (issu de pétrole) : ce procédé permet de tripler la quantité d'huile essentielle récupérée. Ce procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition, qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite ; l'évaporation du solvant ne donne pas une huile essentielle, mais une concrète (dans le cas du traitement du matériel végétal frais), mélange odorant de consistance pâteuse ou solide due à la présence de cires et des tanins extraits par le solvant. Après traitement à l'alcool à 95 °GL à froid, la concrète est débarrassée des cires par précipitation et filtration, pour conduire à

l'absolue. Lorsque l'extraction au solvant est réalisée sur du matériel sec, notamment des épices (gingembre, poivre), il s'agit d'oléosine.

Pour L'extraction au CO<sub>2</sub> : Dans cette technique, un courant de CO<sub>2</sub> à forte pression fait éclater les poches à essence, et entraîne les huiles que l'on récupère en l'état (Lahlou ,2004b).

#### **d) Expression, Macération et Exsudation.**

L'expression c'est une technique « physique » qui consiste à écraser les zestes pour en extraire les essences. Dans la pratique, seules les essences d'agrumes sont préparées selon cette méthode ; il s'agit donc d'une technique simple, pratique, peu coûteuse mais d'emploi limité. Cette méthode qui s'applique aux pétales de fleurs fragiles ne supportant pas les températures élevées, n'est pratiquement plus utilisée. Les fleurs sont mises en contact avec un corps gras dans le but de le saturer. La pommade florale obtenue est ensuite épuisée par un solvant que l'on élimine sous pression réduite.

L'effleurage se présente sous deux méthodes qui nécessitent beaucoup de temps. La première consiste à déposer le solvant et les matières végétales sur des châssis vitrés pour avoir une pommade de haute qualité, tandis que la deuxième est une pulvérisation d'un beurre solide qui peut fondre sur les matières végétales, pour une récupération d'un produit actif très aromatique.

Pour la macération, les plantes sont macérées dans des huiles et l'on récupère les composés liposolubles.

L'exsudation consiste à recueillir le liquide qui s'écoule spontanément du matériel végétal ou à la suite d'une incision. L'extrait obtenu est en général soumis à une hydrodistillation pour en extraire l'huile essentielle (comme l'huile essentielle d'encens, obtenue par hydro distillation à partir de *Boswellia carterii*).

#### **e) La pyrogénéation**

C'est une méthode d'extraction des résines et des goudrons en cuve close. Elle est employée presque exclusivement pour l'huile de cade, un produit extrait de *Juniperus oxycedrus* et dont l'application relève de la cosmétique et des produits capillaires.

D'autres méthodes visant à produire des extraits de meilleure qualité ont été mises au point, il s'agit des techniques suivantes :

#### **f) Micro-ondes**

L'utilisation de micro-ondes permet de produire des extraits de meilleure qualité. L'irradiation du matériel végétal par les micro-ondes en présence ou non de solvant organique ou aqueux, présente l'avantage d'être très rapide, en provoquant l'éclatement des glands à huile essentielle.

#### **II-1-7. Composition chimique des huiles essentielles.**

D'une manière générale, les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants appartenant à différentes familles chimiques. Les plus couramment représentées sont les terpénoides et les composés aromatiques, mais on y trouve également des constituants aliphatiques issus de la synthèse des acides gras et plus rarement d'autres composants d'origines diverses (dérivés soufrés, nitriles, thiocyanates...) (Nyegue, 2005).

#### **II-1-8. Facteurs influençant la composition des huiles essentielles.**

En fait, les essences produites par différentes espèces de plantes varient dans leurs caractéristiques physico-chimiques selon plusieurs facteurs. Ces derniers peuvent influencer à la fois sur la composition chimique proprement dite et le rendement de leur extraction.

**a) L'espèce botanique :** Toutes les plantes ne sont pas aromatiques et même quand elles le sont, les constituants sont variables tant dans leur nature que dans leurs proportions (Sangwan et al., 2001).

**b) Le chémotype :** Une espèce morphologiquement homogène peut donner des huiles essentielles de compositions chimiques différentes. Ce phénomène a été mis en évidence pour le thym et le basilic (Kasali et al., 2005). Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, c'est à dire composées d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de rose). A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sont présents sous forme de traces. Il existe quelques huiles dites mono-moléculaires, telle le Bois de Rose (*Aniba rosaeodora*), la Menthe Pouliot (*Mentha pulegium*) ou la Gaulthérie couchée (*Gaultheria procubens*) qui sont constituées presque exclusivement d'une molécule majoritaire. La Sauge sclarée (*Salvia sclarea*), le Citron (*Citrus reticulata*) sont bi-moléculaire et le Clou de Girofle (*Eugenia caryophyllus*) est tri-moléculaire (Cole, Haber & Setzer, 2007).

**c) Le cycle végétatif :** pour une espèce donnée, la proportion des constituants d'une huile essentielle peut varier tout au long du développement de la plante. Le rendement est

généralement optimal juste avant la floraison car après, la plante perd environ 70 % de son huile essentielle (Masotti, Juteau, Bessière & Viano, 2003).

**d) La période de récolte :** dans le cas de la fleur de jasmin, la teneur en huile essentielle est plus élevée et l'arôme est plus riche au coucher de soleil. Les fleurs d'ylang-ylang donnent un meilleur rendement en huile essentielle en mai et juin, bien qu'elles s'épanouissent tout au long de l'année, (Angioni, Barra, Coroneo, Dessi & Cabras, 2006 ; Baydar & Baydar, 2005 ; Weyerstahl, Christiansen, Gundidza & Mavi, 1992).

**e) L'organe végétal :** citons le cas du *Curcuma longa* où l'huile essentielle de rhizomes contient des curcumènes que l'on ne retrouve pas dans les feuilles (Angioni et al., 2006 ; Masotti et al., 2003),.

**f) Les facteurs extrinsèques :** Ceux-ci ont trait aux facteurs environnementaux (température, nature du sol, ensoleillement...) et aux pratiques culturales qui ont également une influence certaine (Anaç, 1984).

**g) Les procédés d'obtention :** au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters, mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations ; l'état de la matière première a donc également une influence non négligeable sur la composition chimique des essences. (Baydar et al., 2005 ; Kovats, 1987).

## **II-1-9. Les classes chimiques des huiles essentielles.**

### **a) Les terpenoïdes**

Sur le plan chimique, les terpènes ou hydrocarbures terpéniques sont des composés dont la formule générale est  $(C_5H_8)_n$ .

- Les hémiterpènes :  $(n=1, C_5H_8)$ .
- Les monoterpènes :  $(n=2, C_{10}H_{16})$ .
- Les sesquiterpènes :  $(n=3, C_{15}H_{24})$ .
- Les diterpènes :  $(n=4, C_{20}H_{32})$ .
- Les sesterterpènes :  $(n=5, C_{25}H_{40})$ .
- Les triterpènes :  $(n=6, C_{30}H_{48})$ .
- Les tétraterpènes :  $(n=8, C_{40}H_{64})$ .
- Les polyterpènes :  $(n \text{ unités isopréniques})$ .

Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les plus courants dans les huiles essentielles car leur masse moléculaire faible permet leur incorporation dans la fraction volatile que constitue l'huile essentielle. Des diterpènes sont rencontrés plus rarement lorsque l'hydrodistillation est longue. Au-delà, les composés ne sont plus considérés comme volatils. La diversité des structures observées s'explique par la haute réactivité des carbocations (ion carbone) impliquées dans les processus biosynthétiques. Globalement, on y retrouve monoterpènes et sesquiterpènes acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques issus de réarrangements complexes du squelette hydrocarboné, des réactions de fonctionnalisation ultérieures, conduisant à des molécules généralement intéressantes sur le plan olfactif et même biologique tels que des alcools, aldéhydes, cétones esters, éthers, peroxydes, phénols.

#### **b) Les composés aromatiques**

Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpénoides, mais également intéressants sur le plan olfactif. Par exemple, l'eugénol est responsable de l'odeur caractéristique du clou de girofle, l'anethol de celle de l'anis, le cinnamate de méthyle et le méthylchavicol permettent de distinguer des chémotypes intéressants au sein de l'espèce d'*Ocimum basilicum*. (Bruneton, 1999).

#### **c) Les composés aliphatiques**

Certaines huiles renferment de petites quantités de composés aliphatiques généralement de masse moléculaire faible, qui peuvent être entraînés avec l'huile essentielle lors de l'hydrodistillation. Ce sont des hydrocarbures linéaires ou ramifiés ou leurs dérivés oxygénés (acides, alcools ou aldéhydes). Citons pour exemple: le (Z)-hex-3-énol (note verte de l'herbe coupée) ou l'octen-3-ol (note caractéristique du champignon de Paris : *Agaricus bisporus*), et *Olea europaea*, *Cannabis sativa*. (Bruneton, 1999).

#### **d) Les composés d'origine diverse**

Des produits de masses moléculaires plus importantes, non entraînaibles à la vapeur d'eau sont souvent retrouvées dans les concrètes, homologues de phénylpropanes, diterpènes, coumarines. Entre autres, il faut noter les produits soufrés qui sont généralement responsables des odeurs piquantes rappelant le radis, l'ail...(Bruneton, 1999).

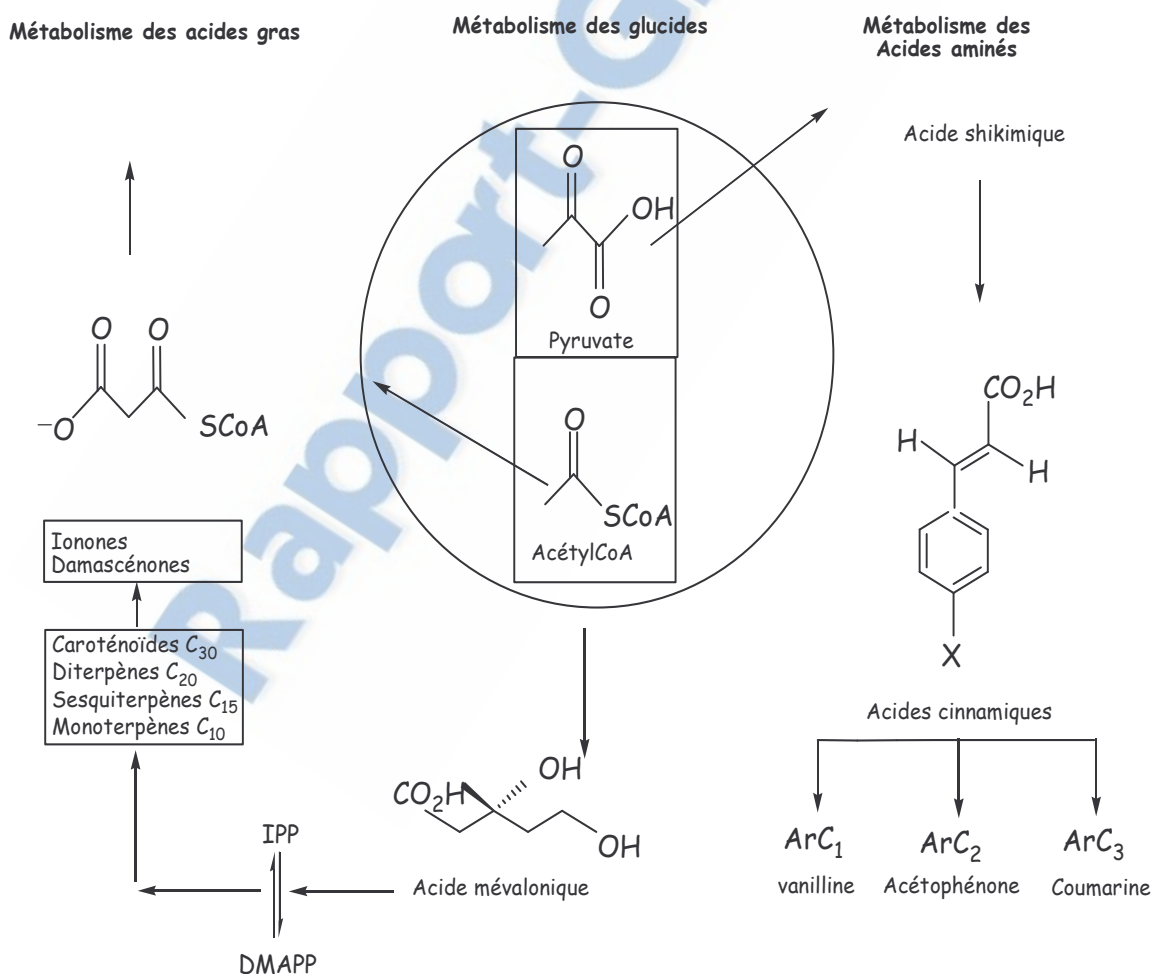
## II-1-10. Biosynthèse des composés volatiles.

L'ensemble des réactions biochimiques qui se déroulent dans un organisme est appelé métabolisme. Chez de nombreuses plantes, une partie importante du carbone qui a été assimilé et de l'énergie emmagasinée est utilisée afin de synthétiser des molécules organiques qui semblent n'avoir aucun rôle manifeste dans leur croissance et leur développement. Ces molécules sont appelées métabolites secondaires dont les constituants des huiles essentielles en font partie. Ils peuvent être issus de trois voies métaboliques principales (figure 1).

« La voie de l'acide mévalonique » est à l'origine de tous les terpènes ;

« La voie de l'acide shikimique » conduit aux composés aromatiques ;

« La voie de l'acide gras » conduit à la formation des composés aliphatiques généralement peu représentés dans les huiles essentielles.



**Figure 1 :** Principales voies de biosynthèse des composés volatils naturels (Bruneton, 1999).

L'existence d'un schéma biosynthétique des deux précurseurs qui sont le pyrophosphate d'isopentényle (PPI) et le pyrophosphate de diméthyl allyle (PPDMA) des terpènes ne faisant pas intervenir l'acide mévalonique a récemment été mise en évidence chez certaines bactéries et certaines plantes (Bruneton, 1999).

### **II-1-10-1. Les terpènes**

Les terpènes représentent la plus grande classe des produits naturels couramment connus. Plus de 20 000 (au moins 30 000) représentants ont été isolés des microorganismes, des plantes et des animaux (Rohdich, Kis, Bacher & Eisenreich, 2001; Rohdich, Bacher & Eisenreich, 2005 ; Tholl, 2006).

Les terpènes constituent un groupe de molécules très différentes tant du point de vue structural que du point de vue fonctionnel. Ils ont pourtant un caractère commun du fait qu'ils sont tous formés d'unités isopréniques (unités en C<sub>5</sub> ramifiées).

Les différents terpènes sont :

#### *Hydrocarbures :*

- acycliques (myrcène, ocimène,...),
- monocycliques ( $\alpha$ - et  $\gamma$ -terpinènes, p-cymène,  $\delta$ -élémane, ...),
- bicycliques ( $\alpha$ - et  $\beta$ -pinènes,  $\delta$ -3-carène, camphène,  $\beta$ -caryophyllène, etc...).

#### *Alcools :*

- acycliques (géraniol, linalol, citronellol, etc...),
- monocycliques ( $\alpha$ -terpinéol, ...),
- bicycliques (bornéol,...),

#### *Cétones :*

- acycliques (tagétone, etc...),
- monocycliques (menthone, carvone, etc...),
- bicycliques (camphre, fenchone, thuyone ; etc...),

#### *Aldéhydes :*

- acycliques (géraniol, néral, etc...),

#### *Esters :*

- acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle),
- monocycliques (acétate de menthyle, d' $\alpha$ -terpényle, etc...),
- bicycliques (acétate d'isobornyle, etc...),



*Éthers :*

- 1,8-cinéole,

*Peroxydes :*

- ascaridole

*Phénols :*

- thymol, carvacrol

Dans tous les cas, les substrats à l'origine de ces structures terpéniques sont les deux précurseurs isopréniques en C<sub>5</sub> : le pyrophosphate d'isopentényle (PPI) et le pyrophosphate de diméthyl allyle (PPDMA).

Deux types d'enzymes sont ensuite impliqués dans le processus biosynthétique des terpènes : les prényl transférase (PT) qui réalisent les réactions de condensation des dérivés pyrophosphates pour conduire aux précurseurs acycliques des terpènes (en C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>20</sub> ...) et les terpènes synthases (TPS), enzymes primaires impliquées dans la formation des différentes structures terpéniques (acycliques, cycliques, bicycliques...) à partir de ces précurseurs.

Bien qu'il ait été longtemps admis que la biosynthèse des unités isopréniques s'est effectuée selon un processus unique, *via* l'acide mévalonique, depuis quelques années, une alternative indépendante du mévalonate a été mise en évidence chez certaines plantes et bactéries (Bruneton, 1999).

On peut donc considérer que deux voies de biosynthèse conduisent à la formation des motifs isopréniques.

#### **a) Voie de l'acide mévalonique**

De nombreux travaux effectués sur la biosynthèse des terpènes ont permis d'établir le mécanisme qui explique la formation des motifs isopréniques (Bruneton, 1999 ; Mann, 1987 ; Richard & Multon, 1992 ; Volak & Stodola, 1994); L'acide mévalonique en est le précurseur.

Il est lui-même formé par condensations successives de trois molécules d'acétyl coenzyme A puis une réduction sous l'action d'enzymes spécifiques. Deux phosphorylations, puis une décarboxylation conduisant ensuite au pyrophosphate d'isopentényle (PPI) qui est l'unité isoprénique de base et à son isomère le pyrophosphate de diméthylallyle (PPDMA)

(Annexe 3).

### **b) Voie du 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate**

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle voie de biosynthèse des précurseurs isopréniques, ne mettant pas en jeu l'acide mévalonique, a été mise en évidence (Annexe3). La première étape porte sur la condensation (avec décarboxylation) de l'acide pyruvique (1) et du D-glycéraldéhyde-3-phosphate (2) pour obtenir le 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (3) qui subit à son tour une réduction avec réarrangement pour donner le 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (4); ce composé est converti en son dérivé cyclique diphosphorylé (7) sous l'action successive de 3 enzymes. Le 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-diphosphate (7) aboutit enfin à l'PPI et le PPDMA via le 1-hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butényl 4-diphosphate (Eisenreich, Bacher, Arigoni & Rohdich, 2004 ; Rohdich et al., 2001 ; Rohdich et al., 2005).

### **c) Condensation des motifs isopréniques**

Dans les deux cas, la condensation entre le pyrophosphate de diméthyl allyle (PPDMA) et le pyrophosphate d'isopentényle (PPI) sous l'action de prényl transférases (PT) mène à la formation des précurseurs de différentes classes de terpènes : pyrophosphate de géranyle (PPG), précurseur des monoterpènes en C<sub>10</sub> ; pyrophosphate de farnésyle (FPP), précurseur des sesquiterpènes en C<sub>15</sub> ; pyrophosphate de géranylgéranyle (PPGG), précurseur des diterpènes en C<sub>20</sub> ; pyrophosphate de géranylfarnésyle (PPGF), précurseur des sesterpènes en C<sub>25</sub> (Annexe 4).

Les terpènes synthases (TPS) interviennent ensuite dans la formation des différentes structures terpéniques issues de ces précurseurs acycliques.

### **d) Rôle des Terpènes Synthases (TPS)**

Les terpènes synthases catalysent la formation des hémiterpènes, (C<sub>5</sub>), monoterpènes (C<sub>10</sub>), sesquiterpènes (C<sub>15</sub>) ou diterpènes (C<sub>20</sub>) respectivement à partir des substrats PPDMA, PPG, FPP ou PPGG.

De nombreux terpènes synthases ont été caractérisés. Dans le règne végétal certaines de leurs gènes ont été décodées, à partir de plantes modèles représentant les genres *Arabidopsis*, *Picea*, *Medicago*, ainsi qu'à partir du maïs, du riz ou de la tomate.

Certaines TPS sont spécifiques d'un terpène tandis que d'autres sont capables de catalyser la formation de mélanges complexes de produits avec une grande mono - et stéréospécificité (Tholl, 2006). Elles jouent un rôle essentiel dans la diversité et la régulation des structures terpéniques.

Les terpènes sont effectivement impliqués dans différentes fonctions écologiques et physiologiques et leur formation est directement liée à l'expression des gènes des terpènes synthases correspondantes, au cours du développement de la plante ou en réponse à des facteurs environnementaux biotiques ou abiotiques (Annexe 5).

De nombreuses études ont été menées dans ce domaine. Il a été montré, par exemple, que certains gènes des TPS sont largement exprimés dans les fruits ou les fleurs alors que d'autres ne le sont pas, dans ces mêmes organes, qu'à certains stades de leur développement (lors de la maturation des fruits par exemple). Il a été montré que les terpènes volatils sont émis par les fleurs à partir de tissus spécifiques pour attirer les insectes pollinisateurs mais également pour défendre les tissus floraux de l'agression des microorganismes pathogènes, des insectes ou des herbivores. De même, une augmentation de l'expression des gènes des TPS et de l'émission volatile des terpènes correspondants peut être induite localement par un traumatisme subit par la plante (lumière, chaleur, agression physique du tissu).

A l'inverse des parties aériennes, les racines ont été moins étudiées. Quelques terpènes synthases ont néanmoins été identifiés. Chez l'espèce *Arabidopsis*, il a été montré, par exemple, que le gène de la 1,8-cinéole synthase et celui de la (Z)- $\gamma$ -bisabolène synthase sont exprimés spécifiquement dans les « stèles » des jeunes racines, dans le cortex et l'épiderme des racines plus anciennes. Cette observation soulève la question de la fonction biologique des terpènes dans les racines au cours du développement de la plante. Une augmentation de leur biosynthèse dans des conditions de stress a également été rapportée.

La connaissance de ces phénomènes présente un intérêt certain dans la perspective d'une régulation métabolique et génétique de la biosynthèse des arômes mais également pour une application potentielle dans le domaine phytosanitaire.

#### **e) Biosynthèse des monoterpènes**

Leur biosynthèse s'effectue à partir d'un précurseur commun le pyrophosphate de géranyle. On obtient alors des monoterpènes acycliques et cycliques.

##### **- Obtention des monoterpènes acycliques**

Les monoterpènes acycliques sont formés à partir de l'un ou l'autre des trois isomères : pyrophosphate de géranyle, pyrophosphate de néryle ou pyrophosphate de linalyle d'une structure carbonique.

La formation de l'ensemble des monoterpènes acycliques est schématisée dans l' Annexe 6.

### **- Obtention des monoterpènes cycliques**

Le cation  $\alpha$ -terpinyle, obtenu par cyclisation du pyrophosphate de linalyle formé par isomérisation du pyrophosphate de géranyle, représente le précurseur commun à l'ensemble des monoterpènes cycliques. Les différents squelettes représentatifs de cette classe de composés, sont formés à partir de ce composé monocyclique, par différents types de réarrangements de type Wagner-Meerwein ou isomérisation. (Annexe 7).

### **f) Biosynthèse des sesquiterpènes**

Les sesquiterpènes contiennent une unité isoprénique supplémentaire par rapport aux monoterpènes, ce qui leur confère une plus grande flexibilité dans la construction de ses dérivés. De 1500 à 2000 sesquiterpènes ont été identifiés. Ils représentent la classe la plus importante des terpénoides volatils. En effet, avec les 15 carbones et 3 doubles liaisons dans le FPP, les réactions possibles sont plus nombreuses qu'avec le substrat PPG.

### **- Biosynthèse des sesquiterpènes acycliques**

Comme pour les monoterpènes, il existe une interconversion entre leurs trois précurseurs acycliques : les deux isomères (Z) et (E) des pyrophosphates de farnésyle et le pyrophosphate de nérolidyle, chacune de ces formes « actives » étant le substrat de terpènes synthases dans la formation des principaux sesquiterpènes acycliques (Annexe 8).

### **- Biosynthèse des sesquiterpènes cycliques**

La cyclisation des sesquiterpènes s'opère d'une manière similaire à celle des monoterpènes. Elle requiert la présence d'une sesquiterpène cyclase. Les sesquiterpènes cycliques dérivent principalement des deux isomères géométriques du pyrophosphate de farnésyle (2Z, 6E) et (2E, 6E) ; leur formation peut être schématiquement expliquée par réarrangement de leurs carbocations (Annexe 9) pour conduire aux principaux squelettes sesquiterpéniques.

Comme pour les monoterpènes, la cyclisation enzymatique du (E), (E)-FPP (1) est initiée par l'ionisation de l'ester pyrophosphate pouvant générer un carbocation allylique sous l'action de sesquiterpènes cyclases. Celui-ci peut à son tour subir une cyclisation directe pour former deux nouveaux cations, le cation (E)-germacradiényle (2) et le cation humulyle (3).

L'isomère (Z), (E)-FPP est ionisé et permet la cyclisation pour aboutir à la formation des cations (Z)-germacradiényle (5) et bisabolyle (6). Ces quatre cations intermédiaires toujours

liés à l'enzyme vont donner de nombreux produits suite à des transpositions, cyclisations additionnelles électrophiles et transferts d'hydrocarbure avant déprotonation ou attaque nucléophile.

### **g) Biosynthèse des structures aromatiques**

Les composés aromatiques des végétaux sont issus de deux voies biosynthétiques majeures :

- La voie de l'acide shikimique qui est la plus courante et qui conduit principalement aux acides cinnamiques et à leurs dérivés *via* les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine). Les deux précurseurs de cette voie biosynthétique sont le phospho-énol-pyruvate et l'érythrose-4-phosphate qui conduit par une série de réactions à l'acide shikimique, métabolite central de l'élaboration des composés aromatiques (Annexe 10).

- La voie de l'acétate (rattachée à la biosynthèse des lipides) qui conduit aux poly  $\beta$ -céto esters engendrant par cyclisation des dérivés cycliques tels que les polyphénols (phloroglucinols, chromones, isocoumarines...).

- L'allongement des composés de type Ar-C<sub>3</sub> par additions successives d'unités, les dicarbonées, est un processus fréquent chez les végétaux : il est à l'origine de composés non volatils tels que les styrylpyrones (Ar-C<sub>3</sub>+2xC<sub>2</sub>), des stilbénoides, des flavonoides, des isoflavonoides (Ar-C<sub>3</sub>+3xC<sub>2</sub>). Le mécanisme de l'addition des unités dicarbonées sur la chaîne latérale des acides cinnamiques est tout à fait similaire au processus d'allongement des polyacétates : la molécule initiatrice (le starter) est convertie en ester du coenzymeA et les éléments dicarbonés sont apportés sous la forme activée de malonyl-coenzyme A.

On notera également l'existence de structures aromatiques d'origine terpénique (p-cymène, thymol, carvacrol et dérivés).

### **h) Les dérivés aliphatiques**

En dehors des deux classes de constituants volatils les plus représentés, (les terpènes et les dérivés aromatiques), on peut citer l'existence de certains composés aliphatiques, plus rarement rencontrés et généralement minoritaires; Ils sont dérivés du métabolisme des acides gras, dont la biosynthèse est décrite dans l'Annexe 11.

## II-1-11. Propriétés des huiles essentielles

### a) Caractéristiques physiques

Les huiles essentielles se distinguent des huiles grasses qui sont fixes et tachent le papier d'une manière permanente, alors que leurs taches sur du papier sont plutôt éphémères et qu'elles se volatilisent à la chaleur.

- Les essences de plantes sont généralement incolores, mais il en existe certaines colorées : essence de cannelle rougeâtre, essence d'absinthe verte, essence de camomille bleue, huile essentielle des feuilles *Annonidium manii* bleu ciel.

- Elles ont un indice de réfraction élevé (Exemple : *Cinnamosma fragrans* : 1,4636 ; *Laggera aurita* : 1,4987 ; *Hyptis spicigera* : 1,4739) et la plupart dévient la lumière polarisée.

- De densité généralement inférieure à celle de l'eau, elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, les huiles fixes. Elles sont insolubles dans l'eau à qui elles communiquent néanmoins leur odeur.

- Leur rendement d'extraction peut varier de moins de 1 % à plus de 10 % par rapport à la matière sèche c'est-à-dire, pour extraire quelques grammes d'huile essentielle, il faut une grande quantité de matériel végétal.

- Les huiles essentielles sont sensibles à l'oxygène atmosphérique et à la lumière, car le contact entraîne l'altération des composés aromatiques qui les constituent.

- Elles sont volatiles à température ambiante bien que leur point d'ébullition soit relativement haut (150 °C – 300 °C)

Une propriété peut être considérée comme commune à toutes les huiles essentielles. Elles ont pratiquement toutes le pouvoir de traverser la peau et de se retrouver plus ou moins rapidement dans le sang. Seul le temps de pénétration varie d'une huile essentielle à une autre : 2 minutes pour l'huile essentielle de thym, 20 minutes pour l'essence de térébenthine, 40 à 60 minutes pour celles de citron, bergamote et anis, d'où leur utilisation dans le développement de l'aromathérapie.

## II-1-12. Domaine d'utilisation des huiles essentielles.

Quatre domaines principaux exploitent les diverses potentialités qu'offrent les huiles essentielles.

- **Pharmacie** : Les huiles essentielles peuvent avoir un intérêt médicamenteux, en particulier dans le domaine des antiseptiques externes, comme par exemple : *Thymus vulgaris* (Thym), *Satureja montana* (Sariette). Elles sont aussi employées pour aromatiser des formulations médicamenteuses destinées à la voie orale. Elles constituent par ailleurs le support de l'aromathérapie. Les plantes aromatiques sont aussi utilisées à l'état brut, en particulier pour les préparations d'infusion (menthe, mélisse, verveine, fleurs d'oranger, etc.) et sous la forme de préparations galéniques simples.

- **Parfumerie** : C'est le débouché principal des huiles essentielles où la cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène en sont les marchés principaux. On note aussi l'utilisation des huiles essentielles dans les préparations pour bains (bain « calmant » ou « relaxant ») avec la possibilité d'absorption percutanée des constituants terpéniques.

- **Industrie Agro-alimentaire** : Certaines plantes sont utilisées brutes (épices et aromates), d'autres le sont sous forme d'huiles essentielles ou de résinoïdes. Tous les secteurs alimentaires en utilisent : boissons alcooliques ou non, confiserie, produits laitiers, produits carnés, soupes, sauces, boulangerie, snacks, la nutrition animale.

- **Diverses industries** : L'industrie chimique est le principal utilisateur des isolats issus des huiles essentielles comme matières premières pour la synthèse de principe actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, exemple : pinènes, sclaréol, linalol, citronellal, citral eugénol, safrol, etc... Ces isolats sont également utilisés en parfumerie.

Ces propriétés et caractéristiques des huiles essentielles nous intéressent et nous amènent à étudier une plante endémique Malgache qui est *Cinnamosma fragrans*.

## II-2. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques.

En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires (Billerbeck, 2008) ou au niveau de la microflore vaginale (Duarte, Leme, Delarmelina, Soares, Figueira & Sartoratto, 2007 ; Giron, Aguilar, Caceres & Arroyo, 1988); et d'origine fongique contre les dermatophytes (Duarte, Figueira, Sartoratto, Rehder & Delarmelina, 2005) Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques (Bakkali et al., 2008) qui



les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Dans les domaines phytosanitaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (Kurita, Miyaji, Kurane & Takahara, 1981) et en agroalimentaire, contre les microorganismes contaminant les denrées alimentaires (Smith-Palmer, Stewart & Fyfe, 2002).

### **II-2-1. Activité pesticide**

Malgré les nombreuses molécules synthétiques susceptibles d'être utilisées, la protection des végétaux peut également se faire avec certaines essences naturelles. En effet, les pesticides sont très diversifiés et se classent selon leur activité en insecticides, molluscides, nématicides, germicides. Certaines huiles sont reconnues pour leur efficacité sur les champignons phytopathogènes : tel est le cas des essences de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis* (Cheng, Liu, Tsai, Chen & Chang, 2004).

### **II-2-2. Activité antiseptique et sur les affections respiratoires.**

Certaines huiles essentielles sont dotées d'un pouvoir antiseptique marqué. Ce dernier s'exerce sur des souches bactériennes variées, y compris celles habituellement résistantes en antibiotique (Tétracycline, acide oxolinique) (Burt, 2004). En effet, elles sont « eubiotiques », (Ngassapa, Runyoro, Harvala & Chinou, 2003), c'est à dire qu'elles détruisent les parasites sans interférence avec l'organisme hôte, contrairement aux antibiotiques qui très souvent interagissent avec les parasites en les dénaturant avec des effets secondaires sur les sujets traités. Elles agissent généralement à faible dose. Les essences de sarriette, cannelle, thym, girofle, lavande, eucalyptus sont les plus antiseptiques. Certains de leurs composés tels que le citral, le géraniol, le linalol et le thymol sont en moyenne 7 à 10 fois plus antiseptiques que le phénol (Bruneton, 1999; Ngassapa et al., 2003). Certaines huiles essentielles sont utilisées dans le traitement de certaines maladies du tractus respiratoires : toux, bronchites, angines (Milijaona et al., 2003).

### **II-2-3. Activités anthelminthiques**

Certaines huiles essentielles sont reconnues pour leur action sur les vers intestinaux. Un des constituants ayant montré une activité anthelminthique est l'ascaridole qui reste le principal constituant actif de l'essence de *Chenopodium ambrosioides* et du thymol (Satrija, Nansen, Murtini & He, 1995).

### **II-2-4. Activités antioxydants**

Certains constituants des huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant très marqué et sont aujourd'hui commercialisés : c'est le cas de l'eugénol, du thymol, du carvacrol, etc. Les résultats déjà publiés montrent que les huiles essentielles constituent une bonne source d'antioxydants naturels recherchés pour leur innocuité relative (Burits & Bucar, 2000 ; Candan, Unlu, Daferera, Polissiou, Sökmen & Akpulat, 2003; Tepe, Daferera, Sokmen, Sokmen & Polissiou, 2005).

### **II-2-5. Activités anti-inflammatoires**

Les constituants des huiles essentielles tels que les monoterpènes hydrocarbonés, les sesquiterpènes hydrocarbonés et les alcools sesquiterpéniques ont montré une activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase qui est une enzyme responsable de la production de leucotriènes suspectés de jouer un rôle importante dans la maladie d'Alzheimer (Chao, Hua, Hsu, Cheng, Liu & Chang, 2005).

## **II-3. Mécanismes d'action des huiles essentielles.**

### **II-3-1. Cytotoxicité**

Les huiles essentielles ou certains de leurs constituants sont en effet efficaces contre une grande variété d'organismes tels que les bactéries (Baser et al., 2006 ; Schelz, Molnar & Hohmann, 2006), les virus (Duschatzky et al., 2005), les champignons (Hammer, Carson & Riley, 2002; Pawar & Thaker, 2006; Soylu, Soylu & Kurt, 2006), les protozoaires (Monzote, Montalvo, Almanonni, Scull, Miranda & Abreu, 2006), les parasites (Moon, Wilkinson & Cavanagh, 2006; Priestley, Burgess & Williamson, 2006), les acariens (Rim & Jee, 2006), les larves (Hierro et al., 2004 ; Morais, Cavalcanti, Bertini, Oliveira, Rodrigues & Cardoso, 2006, Pavela, 2005) les vers et les insectes (Burfield & Reekie, 2005; Chaiyasit et al., 2006; Cheng, Liu, Hsui & Chang, 2006) et les mollusques (Lahlou & Berrada, 2001).

En raison du nombre important des constituants qu'elles contiennent, les huiles essentielles n'ont pas de cibles cellulaires spécifiques (Carson, Mee & Riley, 2002). En tant que lipophiles, elles passent à travers la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, ce qui perturbe la structure des différentes couches polysaccharidiques, des couches phospholipidiques, des acides gras et rend ainsi la membrane perméable.

Chez les bactéries, la perméabilisation des membranes est associée à des pertes d'ions et de réduction du potentiel de membrane, l'effondrement de la pompe à protons et l'épuisement de stock d'ATP (Di Pasqua, Hoskins, Betts & Mauriello, 2006 ; Knobloch, Iberl, Weigand & Weis, 1989; Ultee, Bennik & Moezelaar, 2002; Ultee, Slump, Steging & Smid, 2000).

Les huiles essentielles peuvent coaguler le cytoplasme (Gustafson et al., 1998) et induire des dommages lipidiques et protéiniques (Burt, 2004 ; Ultee et al., 2002). Ces altérations de la paroi cellulaire et de la membrane entraînent la fuite des macromolécules et la lyse cellulaire (Cox, Mann & Markham, 2000 ; Lambert, Skandamis, Coote & Nychas, 2001; Oussalah, Caillet, Saucier & Lacroix, 2006).

Dans les cellules eucaryotes, les huiles essentielles peuvent provoquer la dépolarisation de la membrane mitochondriale en réduisant leur potentiel et en affectant le cycle ionique du  $\text{Ca}^{++}$  et d'autres canaux ioniques (Novgorodov & Gudz, 1996; Vercesi, Kowaltowski, Grijalba, Meinicke & Castilho, 1997). Ceci a pour effet de réduire le gradient de pH et perturber (comme chez les bactéries) le fonctionnement de la pompe à protons ainsi que le stock d'ATP. Les huiles modifient ainsi la fluidité des membranes, qui deviennent anormalement perméables, entraînant une fuite de radicaux, et de cytochrome C ; la fuite des ions calcium et des protéines peut avoir lieu, comme dans le cas du stress oxydatif et l'échec bioénergétiques. La perméabilisation des membranes mitochondriales de l'extérieur jusqu'à l'intérieur conduit à la mort cellulaire par l'apoptose et le nécrose (Armstrong, 2006 ; Yoon, Moon, Kim, Park, Jeong & Yoo, 2000). Les réactions en chaîne de la paroi cellulaire extérieure ou la membrane cellulaire envahissent la cellule, à travers les membranes des différents organites comme les mitochondries et les peroxysomes. Ces effets supposent une activité phénolique comme prooxydant (Barbehenn, Cheek, Gasperut, Lister & Maben, 2005 ; Burt, 2004 ; Cowan, 1999; Sakihama, Cohen, Grace & Yamasaki, 2002).

Ces effets cytotoxiques ont été observé *in vitro* avec la plupart des bactéries gram positives et gram négatives en utilisant la méthode de diffusion sur gélose avec le disque de papier filtre ou par la méthode de dilution ou en utilisant le bouillon de culture liquide (Burt, 2004 ; Sonboli, Mirjalili, Hadian, Ebrahimi & Yousefzadi, 2006 ; Williams, Stockley, Yan & Home, 1998). On peut observer ces effets cytotoxiques avec l'Acide Désoxyribonucléique

(ADN) ou Acide Ribonucléique (ARN) du virus (Jassim & Naji, 2003; Reichling, Koch, Stahl-Biskup, Sojka & Schnitzler, 2005) et champignons (Hammer et al., 2002 ; Kosalec, Pepeljnjak & Kustrak, 2005) y compris les levures (Carson, Hammer & Riley, 2006 ; Duarte et al., 2005 ; Pauli, 2006).

En raison de leur mode d'actions touchant plusieurs cibles, aucune résistance ou adaptation aux huiles essentielles n'a été décrite jusqu'à présent.

### II-3-2. Phototoxicité

Certaines huiles essentielles contiennent des molécules photoactives comme les furocoumarines. Par exemple, l'huile essentielle de *Citrus bergamia* contient des psoralènes, lesquels une fois exposés à une lumière ultraviolette se lient à l'ADN et produisent des mono- et bi adduits (adduct) qui sont hautement cytotoxiques et mutagènes (Averbeck, Averbeck, Dubertret, Young & Morlière, 1990). Néanmoins, cette huile n'est pas cytotoxique ou mutagène à l'obscurité. Dijoux et al., (2003) ont montré que l'huile essentielle de *Fusanus spicatus* n'a pas d'effet phototoxique bien qu'elle soit hautement cytotoxique. En d'autres termes, la cytotoxicité semble plutôt antagoniste de la phototoxicité.

Dans le cas de la cytotoxicité, les huiles essentielles entraînent des dommages au niveau des cellules et des membranes des organelles et peuvent agir comme prooxydants sur les protéines et l'ADN en produisant des réactions d'oxydation spécifiques (ROS), quant à l'exposition à la lumière, elle n'entraîne aucun changement significatif sur la réaction globale.

Dans le cas de la phototoxicité, les huiles essentielles pénètrent dans la cellule, sans pour autant endommager les membranes ou les protéines et l'ADN. Des réactions radicales par excitation de certaines molécules et le transfert d'énergie par la production de mono oxygène se produisent lorsque les cellules sont exposées à la lumière. Ceci peut causer des dommages macromoléculaires au niveau des cellules et dans certains cas la formation d'adduits (adducts) covalente à l'ADN, protéines et lipides membranaires. De toute évidence, la phototoxicité ou la cytotoxicité dépendent des types de molécules présents dans les huiles essentielles et de leur compartimentation dans la cellule, la production de différents types de radicaux, avec ou sans exposition à la lumière. Toutefois, un tel antagonisme n'est pas tout à fait une stricte règle. (Dijoux et al., (2003) ont montré que les huiles essentielles de *Citrus aurantium dulcis* et de citronnelle *Cymbopogon citratus* ont été phototoxiques et cytotoxiques. Ainsi, lorsqu'on étudie les huiles essentielles, il est important de déterminer systématiquement sa capacité cytotoxique ainsi que son possible phototoxicité.

### II-3-3. Mutagénicité nucléaire

Des études ont montré que plusieurs huiles essentielles ou leurs composés principaux n'ont pas induit de mutations nucléaires vis-à-vis des bactéries, des levures ou des insectes.

Toutefois, certaines exceptions sont à noter. Par exemple, le test servant l'huile essentielle d'*Artemisia dracunculus* a été positif avec *rec-Bacillus subtilis* (Zani et al., 1991). L'huile essentielle de *Mentha spicata* a été génotoxique avec *Drosophila melanogaster* par mutations somatiques et le test de recombinaison SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) (Franzios, Mirotsoy, Hatziaepostolou, Kral, Scouras & P., 1997; Karpouhtsis, Pardali, Feggou, Kokkini, Scouras & Mavragani-Tsipidou, 1998). L'huile essentielle d'*Anethum graveolens* a donné également des résultats positifs avec le test SMART avec *Drosophila melanogaster*, le test avec l'échange de chromatides sœur (SEC) et le test d'aberration chromosomique (CA) avec les lymphocytes humains (Lazutka, Mierauskien, G. & Dedonyt, 2001). Les huiles essentielles extraites de *Pinus sylvestris* et *Mentha piperita* se sont avérées génotoxiques lors du test SMART et le CA avec les lymphocytes (Lazutka et al., 2001).

L'huile essentielle d'*Acorus calamus* Asarone a été trouvée mutagène dans le test d'Ames (Goggelmann & Schimmer, 1983) et dans les hépatocytes (Hasheminejad & Caldwell, 1994). Elle induit le SEC dans les lymphocytes humains et dans la moelle osseuse de souris (Abel, 1987; Morales-Ramirez et al., 1992).

### II-3-4. Mutagénicité cytoplasmique

Des essais avec *Saccharomyces cerevisiae* ont été entrepris, en tant que microorganisme anaérobie facultatif. En effet, la levure peut survivre avec des mitochondries endommagées et même en l'absence de mitochondries. Dans ces conditions, les retombées néfastes sur le système respiratoire peuvent être testées sans incidence directe sur la survie des cellules, contrairement aux bactéries et aux cellules de mammifères où toute altération du système respiratoire est habituellement associée à la mort cellulaire. Un autre avantage des levures réside dans la possibilité de montrer que, entre autres, les mitochondries sont des cibles cellulaires très importantes pour les huiles essentielles. En effet, une relation entre la détérioration des mitochondries et les changements immédiats du métabolisme respiratoire a été démontrée après le traitement des cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) avec l'huile essentielle de feuille de l'arbre à thé (Schmolz, Doebner, Auste, Daum, Welge & Lamprecht, 1999). Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* ont montré un retard dans la

production d'éthanol en présence des huiles essentielles de cannelle, de clou de girofle, d'ail, d'oignon, d'origan et de thym, à partir de la mesure du volume de CO<sub>2</sub> produit (Conner, Beuchat, Worthington & Hitchcock, 1984). Chez les plantes, les mitochondries n'ont pas pu effectuer l'oxydation du métabolisme en présence d' $\alpha$ -pinène (Abraham, Francischini, Pergo, Kelmer-Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003).

### **II-3-5. Cancérogénicité des huiles essentielles**

Comme la plupart des huiles essentielles ont été jugées non cytotoxiques et non mutagènes, il est probable que la plupart d'entre elles soient également dépourvues de cancérogénicité. Cependant, certaines huiles essentielles ou plutôt certains de leurs constituants peuvent être considérés comme des agents secondaires cancérigènes après une activation métabolique (Guba, 2001). Par exemple, les huiles essentielles de *Salvia sclarea* et *Melaleuca quinquenervia* ont provoqué des sécrétions d'œstrogènes pouvant amener l'œstrogène cancers-dépendant. D'autres contiennent des molécules d'hydrocarbures photosensibles telles que flavin, cyanine, orphyrine, qui peuvent causer un érythème cutané ou le cancer. Le prosalène, molécule photosensible trouvée dans certaines huiles essentielles, par exemple de *Citrus bergamia* peut provoquer le cancer de la peau après la formation de liaison covalente de l'ADN sous ultraviolet ou à l'exposition aux rayons solaires (Averbeck et al., 1990 ; Averbeck & Averbeck, 1998). Le safrole, principal constituant des huiles essentielles de *Sassafras albidum* et *Ocotea pretiosa*, a induit des métabolites cancérigènes chez les rongeurs (Burkey, Sauer, McQueen & Sipes, 2000 ; Miller, Swanson, Phillips, Fletcher, Liem & Miller, 1983). Le méthyleugénol qui est le principal constituant des huiles essentielles de *Laurus nobilis* et *Melaleuca leucadendron* a également montré des effets cancérigènes chez les rongeurs (Burkey et al., 2000).

Le D- Limonène, un monoterpène trouvé dans les huiles essentielles d'agrumes, est cancérigène chez les rats mâles, dû à un mécanisme spécifique de rat mâle (NTP, 1990). L'estragole, un constituant des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* et d'*Artemisia dracunculus* a montré des propriétés cancérigènes chez le rat et la souris (Anthony, Caldwell, Hutt & Smith, 1987 ; Miller et al., 1983).



### II-3-6. Propriétés antimutagéniques des huiles essentielles

Jusqu'à présent, la plupart des études ont montré que la lutte contre les propriétés mutagènes peut-être due à l'inhibition de pénétration du mutagène dans les cellules (Shankel, Kuo, Haines & Mitscher, 1993). Vukovic-Gacic (Vukovic-Gacic, Nikcevic, Beric-Bjedov, Knezevic-Vukcevic & Simic, 2006) a montré que les composantes principales de *Salvia officinalis* : thujone, 1,8-cinéole, camphre et limonène inhibent l'UVC (Ultra violet C) mutagenèse chez *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. De-Oliveira (De-Oliveira, Ribeiro-Pinto & Paumgarten, 1997 ; De-Oliveira, Fidalgo-Neto & Paumgarten, 1999) ont démontré que (-) – menthol, (-)- $\alpha$ -pinène, (+)- $\alpha$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène,  $\alpha$ -terpinéol, 1,8-cinéole, d-limonène, camphor, citronellal et citral ont modulé l'interaction de l'activité mono oxygénase hépatique tels que CYP1A1 et CYP2B1 avec le promutagène ou la biotransformation xénobiotiques procarcinogène. Idaomar (Idaomar et al., 2002) a trouvé par le test SMART que les huiles essentielles de *Helichrysum italicum*, *Ledum groenlandicum*, *Ravensara aromatica* et leur mélange permettent de réduire la fréquence de mutation de l'induction de l'uréthane de *Drosophila melanogaster*. Dans une étude plus récente, ils ont montré que les huiles essentielles d'*Origanum compactum* et certaines sous fractions sont antimutagènes contre l'action mutagène indirecte de l'uréthane et aussi contre l'action directe des agents mutagènes, méthanesulfonate de méthyle (Mezzoug et al., 2007).

Il est maintenant admis que les activités prooxydantes peuvent induire l'apoptose et la fin de la nécrose (Hadi, Asad, Singh & Ahmad, 2000 ; Sakagami, Oi & Satoh, 1999 ; Schwartz, 1996). Les activités prooxydants peuvent entraîner des dommages des membranes cellulaires, en particulier ceux des mitochondries, et favorisent ainsi la libération de calcium, de cytochrome C et de ROS. Cela conduit à la mort des cellules des mammifères. (Averbeck et al., 1990 ; Bakkali, Averbeck, Averbeck, Zhiri & Idaomar, 2005, Bakkali, Averbeck, Averbeck, Zhiri, Baudoux & Idaomar, 2006).

### II-3-7. Mécanismes des dommages mitochondriaux et effets cytotoxiques prooxydants

Plusieurs études ont démontré que les légumes, les fruits, les herbes et les épices contiennent de nombreuses molécules antioxydants comme les caroténoïdes, les rétinolides, tocophérol, acide ascorbique, les acides phénoliques, flavonoïdes et polyphénols (Grassmann, 2005 ; Saura-Calixto & Goni, 2006 ; Soobrattee, Neergheen, Luximon-Ramma, Aruoma & Baborun, 2005). Les huiles essentielles contiennent également des antioxydants tels que les terpénolides et les composés phénoliques. Les propriétés antioxydants des huiles essentielles et



de ses constituants ont été vérifiées *in vitro* par des méthodes physico-chimiques (Basile et al., 2006 ; Bozin, Mimica-Dukic, Simin & Anackov, 2006 ; Singh, Marimuthu, de Heluani & Catalan, 2006 ; Trevisan, Vasconcelos Silva, Pfundstein, Spiegelhalder & Owen, 2006). En particulier, la capacité antioxydant de certains composés phénoliques a été invoquée pour promouvoir leur utilisation comme additifs alimentaires naturels (Aeschbach et al., 1994). Par exemple, certaines huiles essentielles, même si elles ont des capacités antioxydantes, présentent des effets cytotoxiques liés à la composition de l'huile et en particulier de son contenu phénolique (Bakkali et al., 2008). Tout ceci explique la question concernant les antioxydants, bien que non mutagènes, ils pourraient être cytotoxiques.

Chez les eucaryotes, les mitochondries produisent des anions super oxyde et du peroxyde d'hydrogène qui réagissent avec le fer et peuvent générer le radical hydroxyle endommageant fortement l'ADN mitochondrial. Une fois endommagé, ce dernier inhibe en effet l'expression des protéines qui assure le transport d'électrons, aboutissant à une accumulation de réaction d'oxydation spécifique (ROS) (Van Houten, Woshner & Santos, 2006).

## **II-4. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES HUILES ESSENTIELLES.**

Les qualités antiseptiques de plantes médicinales et aromatiques, et de leurs extraits ont été reconnues depuis l'antiquité. L'idée de caractériser ces propriétés en laboratoire remonte au début des années 1900 (Dorman et al., 2000 ; Hoffman & Evans, 1911; Martindale, 1910). Il a été alors identifié que certaines huiles essentielles ont des propriétés antimicrobiennes (Boyle, 1955 ; Guenther, 1948; Nychas, 1995 ; Shelef, 1983) comme les épices (Shelef, 1983). La source botanique, la période de récolte ou l'étape du développement de la plante, la technique d'extraction, le matériel de la plante frais ou séché, les souches des microorganismes et la méthodologie du test antimicrobien sont tous autant des facteurs qui influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des extraits (Cosentino & Tuberoso, 1999 ; Janssen, Scheffer & Baerheim, 1987). Par conséquent, ceux-ci doivent être pris en considération lors des observations à entreprendre.

### **II-4-1. Essai des huiles essentielles pour la propriété antimicrobienne (CMI et CMB).**

#### **a) La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

L'OMS définit la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) comme la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée. La concentration minimale inhibitrice divise les bactéries en trois catégories : sensible, intermédiaire et résistante. Cette valeur peut être déterminée par un certain nombre de méthodes d'essai standard ; les plus couramment utilisées sont les méthodes de dilution et de diffusion sur gélose (Mann & Markham, 1998 ; Mendoza-Yepes, Sanchez-Hidalgo, Maertens & Marin-Iniesta, 1997).

#### **b) La Concentration Minimale Bactéricide (CMB)**

La Concentration Minimum Bactéricide (CMB) est celle en antibiotique laissant 0,01 % de survivants par rapport à l'inoculum de départ (après 18-24 h à 37 °C). Une revue des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) pour 4 variétés de Thym portant sur 14 souches bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*) a montré que les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Ceci indique que les huiles essentielles testées sont bactéricides (Cosentino et al., 1999).

### **c) Souches microbiennes**

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé, car une huile essentielle peut être bactéricide vis-à-vis de certaines souches, et bactériostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Hermal, 1993). Il semblerait tout de même qu'en règle générale, les bactéries à gram négative soient plus résistantes aux huiles essentielles que celles à gram positive. Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (Cosentino et al., 1999; De Billerbeck, 2007; Zaika, 1988). Mais d'autres études ont montré que la susceptibilité des bactéries reste en effet indépendante du gram (Deans et al., 1987 ;Dorman et al., 2000).

## **II-4-2. Rôle de la méthode dans la détermination de l'activité.**

### **a) Méthode de diffusion (aromatogramme)**

« L'aromatogramme est à la Phytothérapie ce que l'antibiogramme décrit par la Pharmacopée française des antibiotiques est à la médecine ». Cette transposition due au Dr M. Girault dès 1971, est décrite dans le tome III du Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie (Belaiche, 1979). L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode présente l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de pouvoir s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (Fauchère & Avril 2002). Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé réalisée dans une boîte de Pétri.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle (Burt & Reinders, 2003; Carson & Riley, 1995 ; Deans et al., 1987; Faleiro et al., 2003 ; Kunle & Okogun, 2003 ; Lis-Balchin & Hart, 2000 ; Pattnaik & Subramanyam, 1996; Sivropoulou et al., 1996 ; Smith-Palmer & Stewart, 1998 ; Zaika, 1988).

### **b) Méthode de microdilution**

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques ou d'huiles essentielles selon une progression géométrique de raison 2.

En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes ou en microplaques contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le

tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration de produit et où aucune croissance n'est visible.

En milieu solide, l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier (un inoculateur à têtes multiples, appareil de Steers, permet d'ensemencer de 20 à 30 souches différentes par boîte). Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique. Rios, Recio & Villar, (1988) ont réalisé une synthèse des méthodes expérimentales employées pour étudier l'activité des extraits de plante et des huiles essentielles. Ils ont proposé l'utilisation des méthodes de diffusion pour étudier les composés polaires de petite ou moyenne taille moléculaire et pour la détermination du spectre d'activité antimicrobienne. La méthode de dilution a été recommandée pour étudier les substances polaires et non polaires aussi bien que tous les types des extraits complexes. En conclusion, la méthode de dilution en phase liquide constitue la meilleure manière d'établir le vrai pouvoir d'un composé pur, toutefois la solubilité reste une condition requise évidente.

#### **II-4-3. Les effets antimicrobiens des composants d'huiles essentielles.**

##### **a) Activité liée à la composition chimique**

Les effets antimicrobiens des composants d'huiles essentielles, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

*Indifférence* : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.

*Addition* : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.

*Synergie* : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.

*Antagonisme* : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

Exemples : Pour les bactéries à gram positives, des associations d'huiles essentielles de cannelle et de thym sont synergiques ou indifférentes sur *Staphylococcus aureus*. En revanche elles sont indifférentes sur le genre *Bacillus sp.* (Hermal, 1993).

Pour les bactéries à gram négative, comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, les associations ne sont pas plus efficaces que les huiles essentielles pures et sont souvent

indifférentes. Par contre, une prédominance de cannelle est plus efficace que celle du thym, contrairement aux bactéries à gram positive (Hermal, 1993).

L'activité biologique d'une huile essentielle dépend de sa composition chimique, des groupes fonctionnels de ses composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et des possibles effets synergiques entre ses composants. La nature des structures chimiques qui la constituent, et les proportions de ces derniers jouent aussi un rôle déterminant (Lawrence, 2000).

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004a).

Dans la littérature et dans la plupart des cas, seuls les principaux constituants de certaines huiles essentielles comme terpinéol, eugénol, thymol, carvacrol, carvone, géraniol, linalol, citronnellol, nérol, safrol, eucalyptol, limonène, cinnamaldéhyde, ont été analysés. En général, les principales composantes reflètent bien les caractéristiques biophysiques et biologiques des huiles essentielles dont elles ont été isolées (Ipek, Zeytinoglu, Okay, Tuylu, Kurkcuoglu & Husnu Can Baser, 2005). Toutefois, il est possible que l'activité des principaux éléments soit modulée par d'autres molécules mineures (Franzios et al., 1997; Hoet, Stévinny, Hérent & Quetin-Leclercq, 2006 ; Santana-Rios, Orner, Amantana, Provost, Wu & Dashwood, 2001). En outre, il est probable que plusieurs composants des huiles essentielles jouent à la fois un rôle dans la détermination du parfum, la densité, la texture, la couleur, la pénétration cellulaire (Cal, 2006), et aussi ceux relatifs à l'attraction et à la fixation des hydrophiles ou lipophiles sur les parois et les membranes cellulaires, ainsi que sur la distribution de l'huile. Cette dernière fonction est très importante car la distribution de l'huile dans la cellule détermine les différents types de réactions qui seront produites, en fonction de leur compartimentation dans la cellule. C'est dans ce sens, que pour avoir de plus ample informations et pour aboutir à des finalités biologiques, Il serait beaucoup plus intéressant d'étudier l'ensemble de l'huile plutôt que certains de ses composants d'une manière isolée, car les concepts de synergie semblent être plus significatifs.

Les molécules qui sont réputées actives sont les terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de

liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (Griffin & Wyllie, 1999). L'effet des terpénoides sur les membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles des constituants terpéniques, de la nature des groupes fonctionnels, de leur solubilité en phase aqueuse et de la stéréochimie de la molécule (Dorman et al., 2000 ; Knobloch, Weigand, Weis, Schwarm & Vogenschow, 1986 ; Knobloch et al., 1989). Les composés chimiques disposant de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes (Cosentino et al., 1999 ; Dorman et al., 2000).

#### **II-4-4. Structure générale des principaux agents antimicrobiens.**

##### **a) Alcools et phénols**

Les phénols ont des fonctions anti-infectieuses et antibactériennes, Ils ont à la fois une propriété antiseptique et désinfectante, ainsi que des propriétés antiparasitaires. Ils se révèlent également comme ayant des propriétés stimulantes, antivirales, antifongiques, et immunisantes.

Trois des phénols les plus importants des huiles essentielles sont le thymol, le carvacrol, et l'eugénol. Le thymol est retrouvé à forte concentration dans l'huile de *Thymus vulgaris* (thym) et de *Trachyspermum ammi* (ajowan). Le carvacrol est retrouvé dans les huiles d'*Origan compactum* (origan), *Origan heracleoticum* (origan grec), *Corydothymus capitatus* (origan espagnol), *Satureja serpyllum*, et de *Thymus* (thym sauvage). L'eugénol est trouvé dans les huiles d'*Eugenia caryophyllus* (clou de girofle), le verum de cannelle (feuille de cannelle), et *Ocimum gratissimum* (basilic de chénotype eugénol).

Les phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane cellulaire. La présence de thymol et de l'eugénol confèrent aux huiles essentielles des activités fongicides (Bennis & Chami, 2004) et bactéricides (Cox et al., 2000 ; Lambert et al., 2001 ; Walsh & Maillard, 2003). En effet, la molécule de thymol a un impact inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium K<sup>+</sup>. Par contre, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh et al., 2003). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (Cosentino et al., 1999). Cependant, les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité ; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (Cosentino et al., 1999).

Certaines études ont démontré que l'activité (antimicrobienne, antivirale, insecticide, larvicide et ovicide) des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément (Lahlou, 2004a). Les composés purs, comme le thymol et le carvacrol ont un net effet synergique, ce qui expliquerait les différentes activités des chémotypes de thym. Cependant une étude de Lambert et al. (Lambert et al., 2001) ne corrobore pas les effets de synergie mentionnés précédemment. Une combinaison de concentrations comparables en thymol et en carvacrol a reproduit l'inhibition de l'huile essentielle. Par contre, les autres composés minoritaires n'ont eu pour effet que de diminuer celui des principaux composés actifs phénolés.

### **b) Terpènes**

Les terpènes qui incluent les monoterpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes constituent un grand groupe des molécules disponibles dans la plupart des huiles essentielles ayant des fonctions thérapeutiques. Les différents monoterpènes ont des propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales et antibactériennes, certains sont des stimulants, d'autres sont des agents antiseptiques atmosphériques. Le limonène que l'on trouve dans la plupart des huiles de citron, possède des actions antivirales. Le pinène qui est trouvé dans les huiles de pin, cyprès, et le cymène dans l'huile de thé et du thym, ont des actions antiseptiques puissantes.

Des monoterpènes comme le camphène que l'on trouve dans les huiles essentielles de sapin, de schéranthe, de fenouil doux, de noix de muscade, de cyprès, de valériane : le sabinène (baie de genévrier, géranium rose) ; et le cadinène (hysope, myrrhe, arbre de thé). Les sesquiterpènes ont des propriétés anti-inflammatoires exceptionnelles. Ils peuvent être employées en tant qu'antimicrobiens ou pour l'inflammation chronique suite à des infections. Le groupe de sesquiterpène contient le chamazulène (chamomile, millefeuille bleue), le farnesol (les chamomiles), le valéranon (valériane), et le santalol (bois de santal). Les diterpènes sont rarement disponibles dans les huiles essentielles, car ils sont moins volatils.

### **c) Alcool de terpènes**

Les alcools sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives. Ils agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (Dorman et al., 2000).



Les alcools de terpène sont parmi les composés les plus importants des huiles essentielles. Ils ont de larges propriétés anti-infectieuses, antibactériennes, antifongiques, et antivirales.

En général, ils sont non toxiques, non irritants. Deux alcools terpéniques le plus communément trouvés dans les huiles essentielles ayant une propriété antimicrobienne sont le terpinen-4-ol dans *Melaleuca alternifolia* (arbre de thé) et dans *Origan majorana* (marjolaine douce), et l' $\alpha$ -terpinéol que l'on trouve dans *Ravensara radiata* (ravensare) et *Eucalyptus*. Il existe d'autres alcools terpéniques beaucoup plus importants disposant des actions antimicrobiennes comme le linalol, que l'on observe dans *Coriandrum sativum* (coriandre), dans *Cinnamosma fragrans*, dans le thym (chénotype linalol), et dans différentes espèces de lavande. Le géraniol se voit dans *Cymbopogon martinii* (palmarose) et dans le thym (chemotype géraniol), le thujanol se trouve dans le thym (chénotype de thujanol) et *Origan majorana* (marjolaine douce) et le menthol que l'on trouve dans *Mentha piperita* (menthe poivrée) et *Mentha arvensis* (Franchomme et al., 1990; Dorman et al., 2000).

#### **d) Aldéhydes**

Des aldéhydes de monoterpènes sont trouvés principalement dans les huiles essentielles de citron. Les huiles essentielles qui contiennent ce groupe ont des activités anti-inflammatoires, anti-infectieuses, antifongiques, antibactériennes et désinfectantes. Ces huiles doivent être employées avec prudence car elles peuvent causer l'irritation de la peau. Les aldéhydes de monoterpènes sont trouvés dans la bergamote, le citron, la schéranthe et la mélisse. Le geranial (petitgrain, orange, citron, mellisa), le neral (verveine, schéranthe, citron) et le citronellal (citronnelle, pamplemousses, rose, mélisse). Les aldéhydes aromatiques ont un large spectre anti-infectieux. Ils ont des fonctions antivirales, antifongiques, antiparasitaires puissantes et stimulantes du système immunitaire. L'aldéhyde cinnamique est un aldéhyde aromatique antimicrobien. Il est retrouvé dans les huiles essentielles de cannelle du verum ou du *Zeylandicum* (écorce de cannelle de la Ceylan), la casse de cannelle (écorce de cannelle chinoise) et le Cannelle loureirii (écorce de cannelle vietnamienne). D'autres aldéhydes aromatiques sont le cuminal, trouvé dans le *Cuminum cyminum* (cumin), et le phellandral, trouvé dans *Eucalyptus polybractea* (eucalyptus bleu de mallee) (Didry & Dubreuil, 1993).



#### **e) Cétones**

Quelques huiles contenant les cétones sont des stimulants de système immunitaire, et certains sont antifongiques. Ils peuvent être employés efficacement par leurs propriétés antimicrobiennes. Les huiles telles que celles de l'hysope, de l'eucalyptus et du romarin ont des quantités modérées de cétones. La menthe poivrée, la menthe verte, et le géranium rose, qui contiennent la menthone, sont des agents thérapeutiques une fois utilisés correctement.

#### **f) Esthers**

Les esters trouvés dans les huiles essentielles sont normalement très parfumés avec un arôme fruité. Leurs effets thérapeutiques sont les équilibres du système nerveux, calmant, anti-inflammatoire, et antispasmodique. Un exemple d'ester bien connu est l'acétate linalylique, qui est trouvé dans la lavande, la sauge de clary, et le petitgrain. Quelques esters ont également des propriétés antifongiques et antimicrobiennes. L'essence de géranium et l'hélichrysum, qui contient respectivement l'acétate géranylique et l'acétate de neryl, possèdent des propriétés antifongiques ; l'huile de schéranthe, qui contient l'acétate géranylique et l'acétate linalylique, s'est avérée bactéricide contre *Helicobacter pylorus*.

#### **g) Oxydes**

Les huiles contenant des oxydes ont des effets anti-infectieux. Un des oxydes non-toxiques le plus connu est le cinéole (eucalyptol), que l'on trouve dans *Eucalyptus* et dans les essences de romarin. Ces huiles se combinent bien avec les huiles riches en phénol tels que le thym et l'origan destinés au traitement relatifs aux infections virales et infections respiratoires d'origine bactérienne.

## II-5. CREVETTICULTURE

### II-5-1. Généralités

L'élevage des crevettes, ou crevetticulture, consiste en l'élevage de crevettes marines destinées à la consommation humaine. La production commerciale de crevettes d'élevage a commencé dans les années 1970 et a connu une croissance très rapide, stimulée par la demande du marché aux États-Unis, au Japon et en Europe occidentale. La production totale de crevettes d'élevage a dépassé 1,6 million de tonnes en 2003, pour une valeur de 9 milliards de dollars. Près des trois quarts des crevettes d'élevage sont produites en Asie, en particulier en Chine et en Thaïlande. Le reste provient principalement d'Amérique latine, dont le Brésil est le premier producteur. La Thaïlande reste le principal pays exportateur de crevettes dans le monde.

L'élevage des crevettes a évolué, passant d'une activité traditionnelle à petite échelle à une industrie, en Asie du sud-est. Les progrès technologiques ont permis d'élever des crevettes avec des densités toujours plus élevées, et d'expédier des géniteurs dans le monde entier. Les crevettes d'élevage sont essentiellement des pénaéides (famille des Penaeidae), il s'agit de deux espèces de crevettes à savoir *Penaeus vannamei* (crevette à pattes blanches) et *Penaeus monodon* (crevette géante tigrée) représentant près de 80 % des élevages. Cette monoculture industrielle est très sensible aux maladies, qui ont provoqué régionalement plusieurs vagues meurtrières dans les populations de crevettes d'élevage. Des problèmes écologiques croissants, des épidémies répétées, ainsi que la pression et les critiques venant à la fois des ONG et des pays consommateurs, ont entraîné des changements dans cette activité à la fin des années 1990 et une réglementation plus stricte par les gouvernements. En 1997, un programme visant à développer et promouvoir des pratiques d'élevage plus durables fut lancé par la FAO, programme impliquant des organismes gouvernementaux, des représentants de ce secteur économique et des organisations environnementales.

#### - Situation de la crevetticulture à Madagascar

A Madagascar, le développement de la crevetticulture a commencé dès le début des années 90. Grâce aux expériences d'un projet pilote réalisé à Nosy-Be, en 1989 sous la recommandation de la FAO (Randrianady, 2002), la création de la première ferme de crevette malgache a été rendue possible. Cette ferme a produit 2800 tonnes, en 1997. D'autres projets ont été réalisés plus tard (AQUAMEM et SOMAQUA, AQUAMAS, AQUALMA, AQUABIO, et L.G.A (O.S.O Farming). Et il existe encore d'énormes possibilités d'extension de cette activité (Maharavo, 1999).

## **II-5-2. Cycle biologique de la crevette *Penaeus monodon***

### **a) Taxonomie**

La crevette appartient au plus grand phylum dans le règne animal, les Arthropodes. Ce groupe d'animaux est caractérisé par la présence d'accessoires deux par deux et une cuticule protectrice ou exosquelette qui couvrent l'animal entier. Le subphylum de crustacés est composé de 42 000 espèces, d'une prédominance aquatique, qui appartiennent à 10 classes. Dans la classe des Malacostraceae, la crevette, avec l'écrevisse, le homard et le crabe, appartiennent à l'ordre des Décapodes. ; définition de la taxonomie de *Penaeus monodon*, *Fabricius, 1798*, (Brusca & Brusca, 1990).

### **b) Morphologie**

La crevette penaeidés est caractérisée extérieurement par un céphalothorax avec un rostre dur, et par un abdomen segmenté. La plupart des organes, tel que les branchies, le système digestif et le coeur, sont localisés dans le céphalothorax, alors que les muscles se concentrent dans l'abdomen. Les appendices du céphalothorax varient selon leur apparence et leur fonction. Dans la région de la tête, l'antennule et l'antenne ont des fonctions sensorielles. Les mandibules et les deux paires de maxillaire forment les structures de mâchoires qui sont impliquées dans l'appréhension de la nourriture (Solis, 1988). Dans la région du thorax, les maxillipèdes forment les trois premières paires d'appendices, adaptés à la capture de la nourriture, et les cinq paires restant sont adaptées à la marche (pereiopodes). Les cinq paires qui se trouvent sur l'abdomen sont adaptées à la nage (pleiopodes) (Baily-Brock & Moss, 1992 ; Lightner, 1988). Les pénaéides et les autres arthropodes ont un système circulatoire ouvert et, par conséquent, le sang et les cellules sanguines sont appelées haemolymph et haemocytés, respectivement. Les crustacés ont un cœur musclé qui est localisé dorsalement dans le céphalothorax.

Les crevettes atteignent leur maturité et se reproduisent seulement dans un habitat marin. Les femelles pondent de 50 000 à 1 000 000 d'œufs (Rosenberry, 1997), qui éclosent au bout de 24 heures et donnent naissance à des minuscules larves appelée nauplius (figure2).

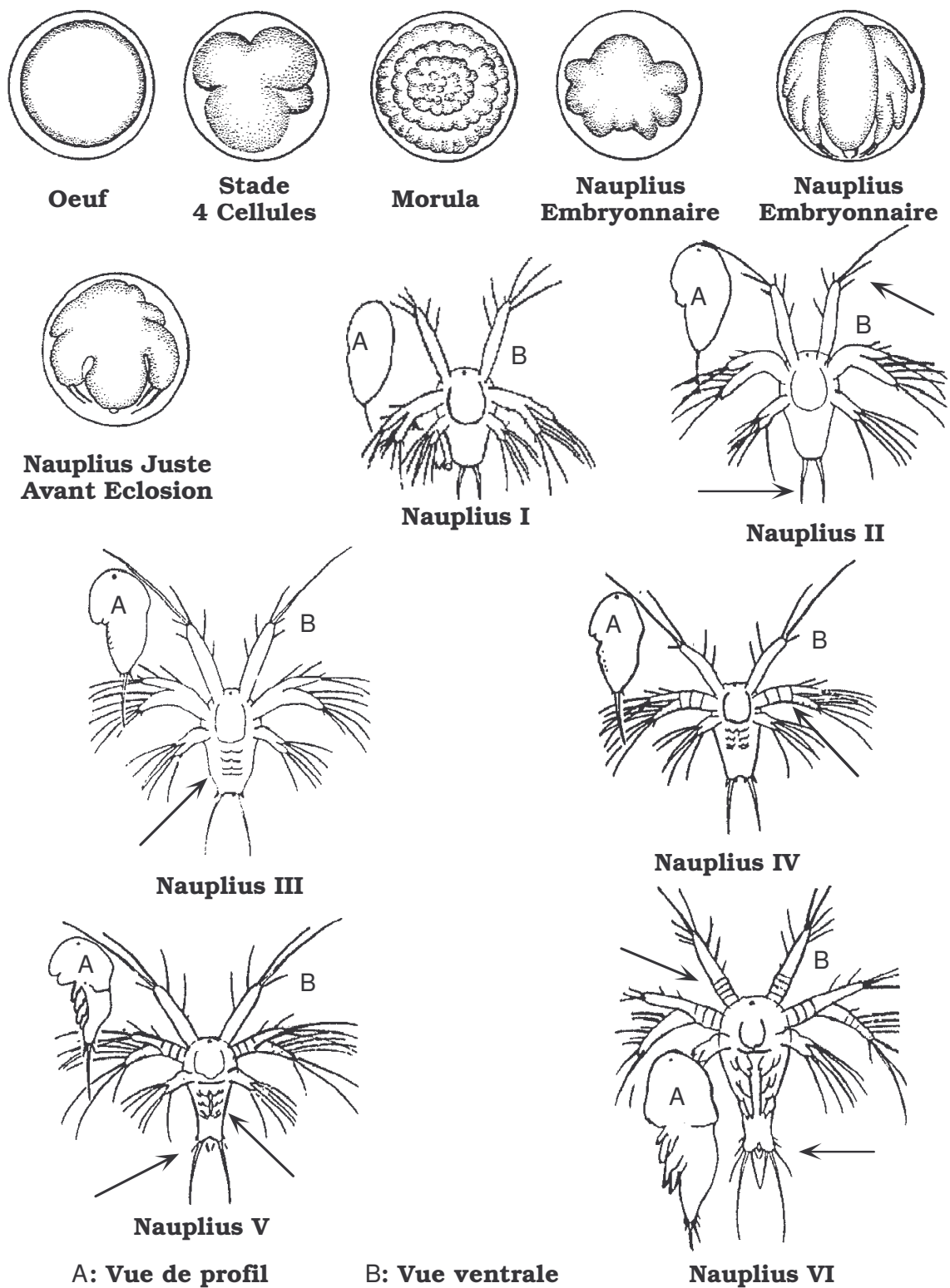


Figure 2 : Développement de l'œuf de *Penaeus monodon* jusqu'au stade Nauplius 6

Ce nauplius se nourrit des réserves de vitellus à l'intérieur de son organisme et subit une première métamorphose qui le transforme en zoé.

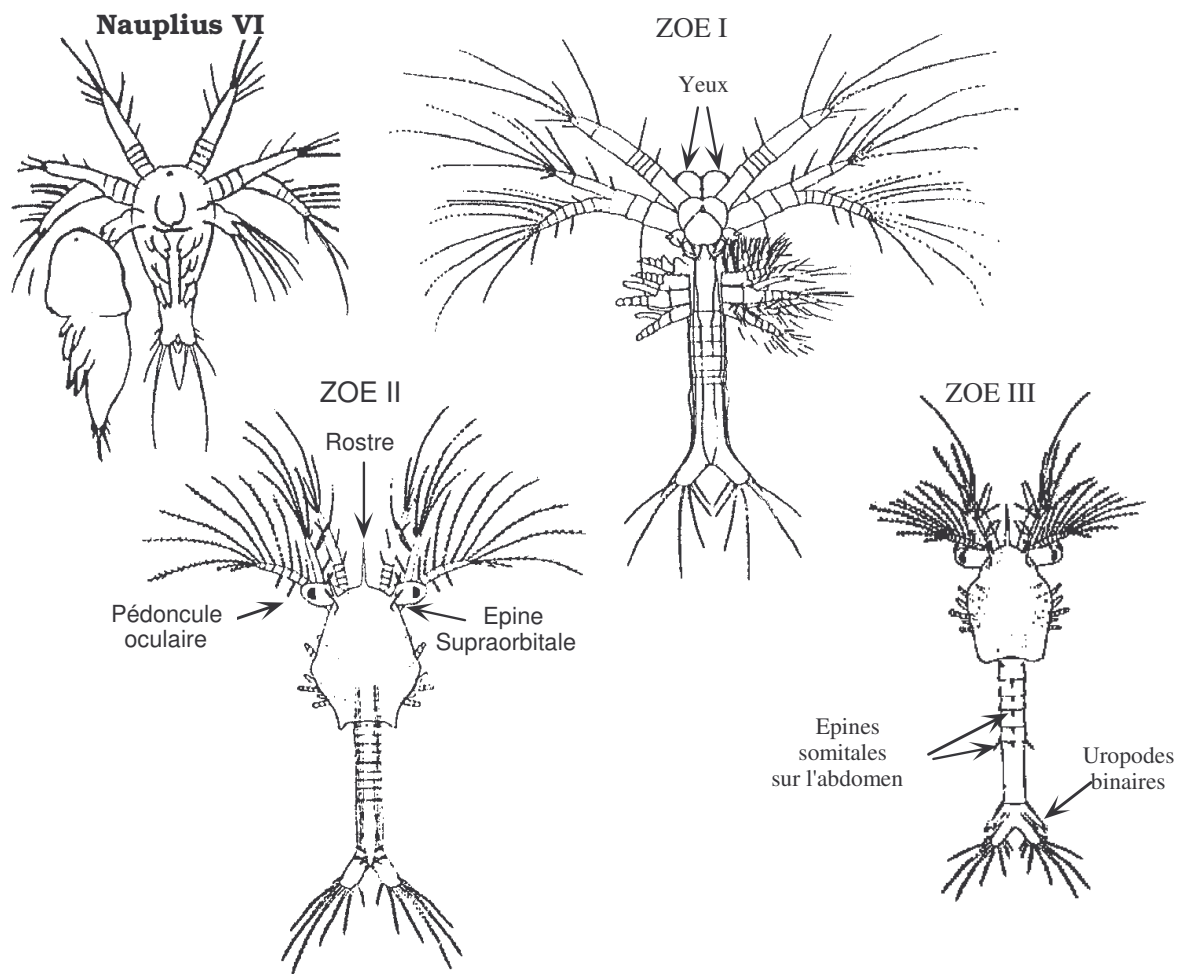


Figure 3: Développement de larve de *Penaeus monodon* du Stade zoé I au stade zoé III.

Cette seconde phase larvaire se nourrit dans la nature d'algues et au bout de quelques jours se métamorphose à nouveau en une troisième phase pour devenir des mysis.

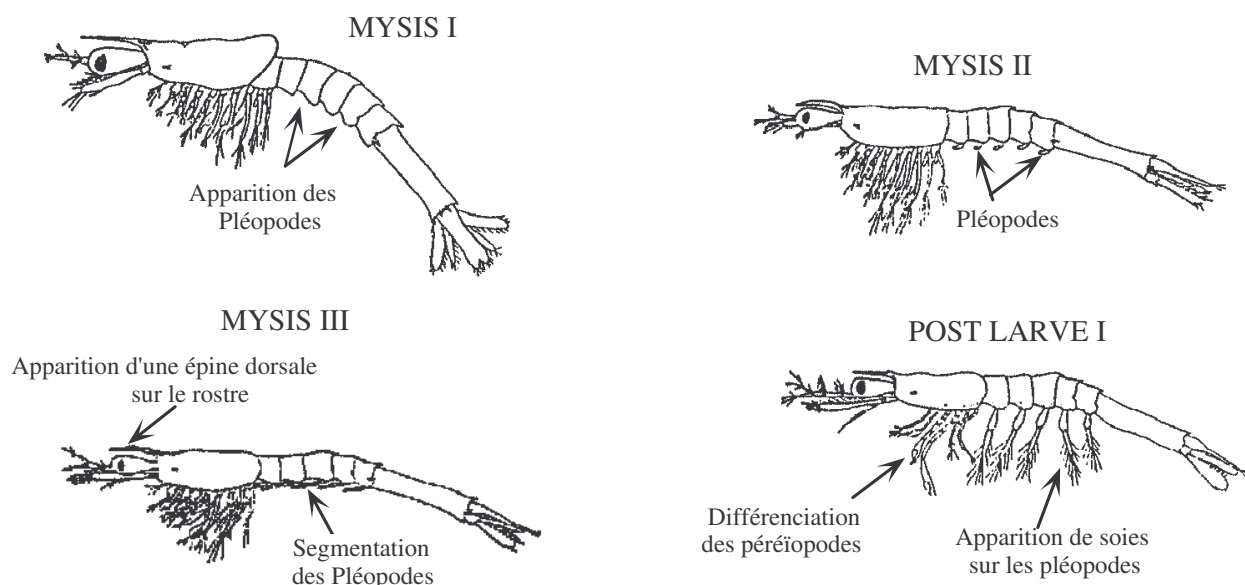


Figure 4: Développement des larves de *Penaeus monodon* du stade Mysis I au Mysis III.

Les mysis ressemblent déjà à de minuscules crevettes et se nourrissent d'algues et de zooplancton. Après trois à quatre jours supplémentaires, elles se métamorphosent une dernière fois en post-larves, jeunes crevettes ayant toutes les caractéristiques des adultes. L'ensemble du processus prend environ douze jours depuis l'éclosion. Dans la nature, les post-larves migrent alors dans les estuaires, qui sont riches en éléments nutritifs et pauvres en sel. Là, elles grandissent et migrent finalement vers les eaux ouvertes quand elles atteignent leur maturité. Les crevettes adultes sont des animaux benthiques, c'est-à-dire vivant principalement au fond de la mer.

### II-5-3. Système d'élevage

#### a) Elevage extensif

Communément utilisé au Bangladesh, en Inde, en Indonésie, à Myanmar, aux Philippines et au Viet Nam, le grossissement extensif de crevette est entrepris dans des zones de marée où il n'est pas nécessaire de pomper l'eau de mer. Les étangs avec des formes irrégulières suivant les frontières du terrain sont généralement plus grands que cinq hectares et facilement construits manuellement avec de faibles coûts. Les juvéniles sauvages, qui entrent dans les étangs, soit à travers la grille grâce au jeu de marée ou sont achetés à des collecteurs, sont normalement stockés à une densité n'excédant pas  $2/m^2$ . Les crevettes se nourrissent d'aliments naturels ramenés régulièrement dans l'étang par la marée et sont ensuite additionnés d'engrais organiques ou chimiques. Des poissons frais ou mollusques, s'ils sont

disponibles, peuvent être utilisés comme aliment supplémentaire. Dû aux faibles densités, les crevettes de grande taille ( $>50$  g) sont récoltées après six mois au plus. Le rendement est plus faible dans ces systèmes extensifs, de l'ordre de 50-500 kg/ha/an. A cause de l'augmentation du prix du terrain et le manque en juvéniles sauvages, presque aucune nouvelle ferme extensive n'est en construction à présent dans les pays cités précédemment. Après avoir acquis de l'expérience dans l'élevage de crevette, plusieurs aquaculteurs ont mis à niveau leurs étangs en systèmes semi intensifs de manière à augmenter leurs revenus.

#### **b) Elevage semi intensif**

Les étangs semi intensifs (1-5 ha) contiennent communément des juvéniles provenant d'écloserie à un taux de 5 à 20 PL/m<sup>2</sup>. Le changement de l'eau est régulièrement assuré par le jeu de marée en plus du pompage. Les crevettes se nourrissent d'organismes naturels maintenus par fertilisation de l'étang, en plus des régimes artificiels. Les rendements de production oscillent entre 500 et 4000 kg/ha/an.

#### **c) Elevage intensif**

Les fermes intensives sont généralement situées dans des zones où il n'y a pas de marée, où les étangs peuvent être complètement vidés et séchés avant chaque stockage. Ce système de culture est rencontré dans tous les pays producteurs de *Penaeus monodon*. Les étangs sont généralement petits (0,1 à 1,0 ha) de forme carrée ou rectangulaire. La densité de stockage varie entre 20 et 60 PL/m<sup>2</sup>. Une aération forte, fournie par un engin à moteur diesel ou à moteur électrique, est nécessaire afin d'assurer la circulation interne d'eau et d'apporter de l'oxygène, aussi bien pour les animaux que le phytoplancton. L'alimentation artificielle est fournie 4-5 fois par jour.

### **II-5-4. Technologies d'élevage de crevette *Penaeus monodon***

Dans l'élevage des crevettes, le cycle biologique se déroule dans des conditions dirigées. Les raisons en sont une plus grande intensification de l'élevage, un meilleur contrôle de la taille permettant une plus grande homogénéité des crevettes produites, et un meilleur contrôle des prédateurs, mais aussi la possibilité d'accélérer le cycle en contrôlant les facteurs climatiques (en particulier pour les élevages des régions tempérées, par l'emploi de serres).



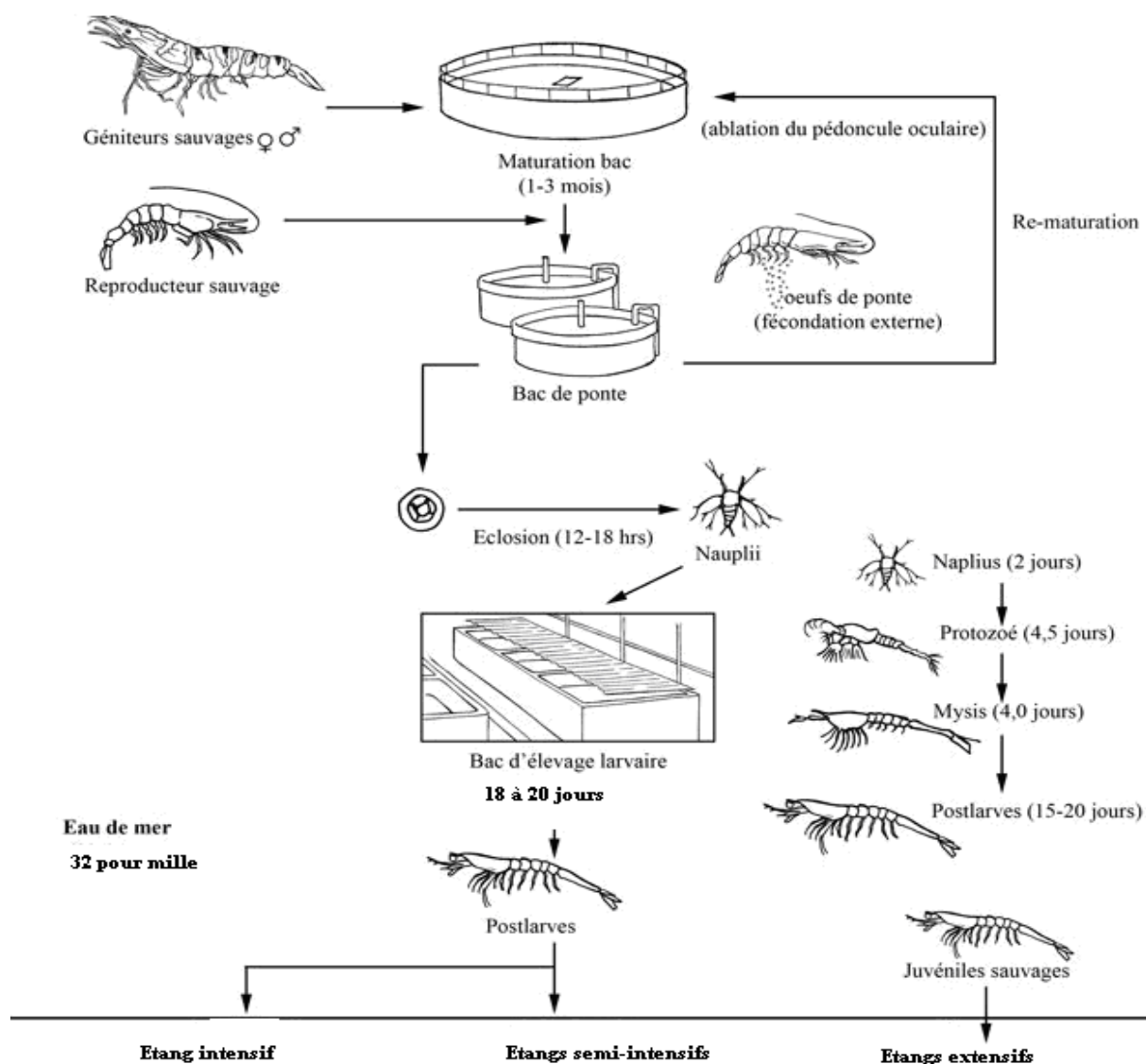


Figure 5 : Cycle de production de *Penaeus monodon* en écloserie.

Source : [www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_monodon/fr](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_monodon/fr)

Il y a trois étapes différentes dans l'élevage de crevette. L'écloserie, le pré grossissement et le grossissement.

## **II-5-5. L'écloserie**

Les écloseries élèvent des crevettes et produisent des nauplius ou même des post-larves, qu'elles vendent aux élevages. Les grands élevages de crevettes ont leurs propres écloseries et vendent des nauplius ou des post-larves à des élevages plus petits de leur région. L'écloserie assure la production de post-larves saines, prêtes à être transférées dans les bassins de pré grossissement et de grossissement.

L'écloserie comprend :

### **a) L'unité de maturation**

L'unité de maturation est un endroit où sont stockés les géniteurs pendant le cycle de production. Les géniteurs matures fournissent les conditions propices au développement des gonades afin d'obtenir une meilleure reproduction, c'est-à-dire une maturation simultanée des femelles, des pontes groupées et des œufs bien fécondés.

### **b) L'unité de pondoir**

L'unité de pondoir est le lieu où l'on transfère les femelles dont les gonades sont jugées matures, et où se déroule l'éclosion des œufs pour donner nauplius.

### **c) L'unité d'élevage larvaire**

L'unité d'élevage larvaire est l'endroit où se déroule le développement des différents stades larvaires allant du nauplius aux post-larves.

### **d) L'unité de nurserie**

La nurserie c'est l'endroit où s'effectue la croissance des post-larves (du stade P5 au stade P12) jusqu'au moment où elles sont transférées dans les bassins de prégrossissement ou directement dans les bassins de grossissement.

### **e) L'unité de production d'*Artemia***

L'unité de production d'*Artémia* assure la production des nauplius d'*Artemia* qui constituent l'aliment frais des larves à partir du stade zoé. Ces nauplius d'*Artemia* étaient obtenus à partir des cystes d'*Artemia*.

#### **f) L'unité de production d'algues unicellulaires**

Cette unité s'occupe de l'entretien et de la multiplication des souches de phytoplancton. Les espèces cultivées pour l'élevage larvaire sont : le *Chaetoceros gracilis*, le *Platimonas suesica*, l'*Isochryis sp* et le *Thalassiosira pseudonana*.

#### **g) L'unité de pathologie**

Elle a pour but de suivre l'état de santé des géniteurs, des larves et des post-larves dans l'écloserie et dans les bassins de grossissement.

### **II-5-6. Pré grossissement et grossissement.**

La phase de pré grossissement assure la production de juvéniles et dure de 30 à 50 jours. Si les post-larves n'acquièrent pas environ 2 g à l'écloserie, elles sont élevées dans le bassin de pré grossissement.

Les crevettes sont ensuite élevées dans le bassin de grossissement jusqu'à ce qu'elles atteignent le stade adulte commercialisable. C'est la dernière étape du cycle de vie des crevettes dans son milieu de culture artificiel. Au cours de ce cycle, différentes tâches sont réalisées comme le suivi des paramètres physico-chimique (pH, O<sub>2</sub> dissout,...), la distribution d'aliments, le changement d'eau et l'échantillonnage pour le suivi de la biomasse.

### **II-5-7. Maladie et prévention**

Il existe de nombreuses infections bactériennes létales pour les crevettes. Les plus communes sont les vibrioses, causée par les *Vibrionaceae*. La crevette est affaiblie et désorientée et peut montrer des blessures noires sur sa cuticule. Le taux de mortalité peut dépasser 70 %.

#### **a) Les vibrioses**

Ces infections par le *Vibrio* peuvent se développer sur la cuticule des animaux, les appendices et les branchies, en provoquant des zones nécrosées de couleur noire. Ces vibrioses surviennent généralement suite à un stress important, à des blessures, ou à des carences nutritives. Le symptôme le plus visible est la mélanisation et la nécrose des appendices des larves. On note aussi une baisse significative de l'alimentation des larves, la présence de tube digestif plein, l'absence de fèces, ainsi qu'une expansion des chromatophores dues au stress. D'autres signes peuvent accompagner une vibriose : muscle abdominal devenant opaque, anorexie, occasionnellement une légère flexure dorsale de

l'abdomen au niveau du troisième segment abdominal. En fait, toutes les bactéries répertoriées comme étant pathogènes pour les larves de *Penaeus monodon*, et pouvant provoquer des vibrioses, sont présentes naturellement, mais en très faible quantité, dans la microflore des crevettes. La rupture de l'équilibre, pour quelques raisons que ce soit, peut favoriser le développement important de ces bactéries et provoquer une vibriose. Ces infections, quand elles ne sont pas traitées rapidement, peuvent provoquer des mortalités importantes dans les bassins larvaires (Lightner, 1993).

Les espèces de *Vibrio* sp pathogènes pour les crevettes sont : *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* byotype *albensis*, *V. harveyi*, *V. damsela*, *V. fischeri*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*. (Lightner & Redman, 1998). L'infection peut être chronique, subaiguë ou aiguë. La virulence varie suivant les espèces. Toutes les espèces de crevettes peuvent être atteintes (Lightner, 1993).

#### **- Caractérisation des Vibrios**

La famille de Vibrionaceae se compose de bacilles à gram négative mobiles (à ciliature polaire ou mixte) ou immobiles. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs, croissent sur le milieu sélectif TCBS, réduisent les nitrates en nitrites, donnent une réaction oxydase positive et dégradent les glucides par métabolisme fermentaire. Cette définition permet de distinguer les Vibrionaceae des Enterobacteriaceae qui ont une réaction d'oxydase négative et des Pseudomonaceae qui sont aérobies strictes et qui dégradent les glucides par métabolisme oxydatif (Veron & Popoff, 1989).

#### **- Morphologie et structure des vibrios**

Les bactéries appartenant à la famille des Vibrionaceae sont des bacilles droits (*Aeromonas* spp.) ou incurvés « en virgule » (*Vibrio* spp.). Cet aspect en virgule, longtemps considéré comme caractère essentiel de *Vibrio* sp, peut disparaître au cours des repiquages. Par ailleurs, la forme incurvée n'est pas propre au genre *Vibrio* et peut se rencontrer chez des souches de photobacterium. Ces bacilles ont un diamètre moyen de 0,5 µm, leur longueur est variable. Il est fréquent d'observer à côté de formes longues (4 à 5 µm), des formes coccobacillaires trapues (1 à 1,5 µm).

En milieu liquide, les flagelles ont une implantation toujours polaire. Les cellules sont monotriches, exemple *Vibrio parahaemolyticus*, mais quelques espèces sont topotriches.

Chez la plupart des espèces du genre *Vibrio* sp, les flagelles sont épais (25 à 30 nm de diamètre), car entourés d'une gaine protéique qui se prolonge dans la membrane externe de la paroi.

Sur milieu solide, plusieurs espèces de *Vibrio* sp peuvent avoir, en plus des flagelles polaires caractéristiques, l'association de flagelles polaires et latéraux appelée ciliature mixte. Si l'humidité de la surface de milieu est suffisante, la production d'une ciliature mixte s'accompagne souvent d'un phénomène d'envahissement, comme pour *V. alginolyticus* par exemple.

Les Vibrionaceae ont une structure et une coloration typiques des bactéries à gram négative. Elles ne sporulent pas, quelques espèces peuvent être capsulées (*V. parahaemolyticus*) (Veron et al., 1989).

#### **- Croissance**

Les Vibrionaceae poussent sur les milieux ordinaires sans exigence nutritive particulière. Il est clair que, certains milieux pour les Enterobacteriaceae (Drigalski ; Mac Conkey ) peuvent être employés, mais seul le milieu Mac Conkey de *Salmonella* et *Shigella* inhibe considérablement la croissance de Vibrionaceae. Sur milieu gélosé, les colonies ont un diamètre de 1,5 à 2 mm. Elles sont rondes à bords nets après 18 heures d'incubation (Skjermo & Vadstein, 1999 ; Veron et al., 1989).

#### **b) L'hépatopancréatite nécrosante (NHP)**

L'hépatopancréatite nécrosante est une autre maladie bactérienne due au vibrio dont les symptômes sont un exosquelette mou et sale. La plupart de ces infections bactériennes sont fortement corrélées avec des conditions de stress telles que la surpopulation des étangs, des températures trop élevées ou une eau de mauvaise qualité, favorable à la croissance des bactéries.

Les maladies virales existent aussi. De nombreuses maladies virales affectent les élevages de crevettes. Dans les élevages en monoculture et à haute densité de population, ces infections virales se propagent très rapidement et peuvent anéantir des populations entières de crevettes. Un des principaux vecteurs de transfert de ces virus est l'eau elle-même et ainsi toute épidémie virale présente le danger de décimer également les crevettes vivant à l'état sauvage (Vaseeharan & Ramasamy, 2003). Ces maladies virales sont : la maladie de la tête jaune (YHV) Yellow head Virus , affectant *P. monodon* (Flegel, 2007) , le syndrome des taches blanches (WSSV) White Spot Syndrome Virus affecte le *P. japonicus*, (Flegel, 1997), le

syndrome de Taura (TSV) Taura Syndrome Virus affecte le *P. vannamei* (Flegel, 2007). Les virus MBV (monodon Baculovirus) affecte le *P. monodon* (Flegel, 2007 ; Vijayan, Rajendran, Alavandi & Alagarwami, 1997);.

On note également la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (IHHNV) infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus qui affecte le *P. stylirostris* et le *P. vannamei*. (Vijayan et al., 1997). Il y a la nécrose externe qui affecte le *P. monodon* et les nécroses internes qui l'attaquent à partir des stades zoés. (Lightner, 1993).

Le traitement fait appel à des antibiotiques. Les pays importateurs ont à plusieurs reprises interdit les importations de crevettes contenant divers antibiotiques. L'un de ces antibiotiques est le chloramphénicol, qui est interdit dans les pays de l'Union européenne depuis 1994, mais continue à poser des problèmes (European Commission, 2001a ; European Commission, 2001b ; Vander Stichele, Elseviers, Ferech, Blot & Goossens, 2006).

## **II-5-8. Utilisation des antibiotiques en aquaculture.**

L'intensification des productions aquacoles s'est accompagnée d'un usage important d'antibiotiques, à des fins prophylactiques ou thérapeutiques, qui a conduit à l'émergence de bactéries antibiorésistantes (American Academy of Microbiology, 1999 ; Holmström et al., 2003).

Les antibiotiques les plus utilisés en aquaculture sont :

En Europe : L'oxytétracycline, le trimethoprim-sulfadiazine, l'acide oxolinique, la flumequine et le florfenicol, l'Amoxicilline, la chlortetracycline, la sarafloxacin.

En Amérique du Nord : Les sulphonamides (ormetoprim-sulphadiméthoxine et trimethoprim-sulfadiazine) ont été enregistrés au Canada, il en est de même des tétracyclines (oxytétracycline) et des chloramphénicols (florfenicol).

En Amérique du Sud : L'utilisation de l'acide oxolinique, du flumequine, du florfenicol et de l'oxytétracycline a été observée en Chili.

En général, l'Asie se sert d'une gamme d'antibiotiques beaucoup plus large que l'Europe et l'Amérique. Il est difficile d'apprécier d'une manière qualitative l'utilisation d'antibiotiques en Asie. A titre d'exemple, au Vietnam, il a été signalé que 122 antibiotiques sont utilisés dans la culture de crevettes. Toutefois, certains d'entre eux sont connus. L'érythromycine et la tétracycline sont utilisées en crevetticulture au Sri-lanka. Aux Philippines, la tétracycline, la rifampicine, le chloramphénicol, le nitrofurantoin et l'érythromycine sont d'usage courant en crevetticulture. D'autres antibiotiques entrent dans la composition de la nourriture ou dans l'élevage d'animaux aquatiques comme l'acide

oxolinique, l'ormetoprim, le sulfadimethoxine, le sulfamerazine, le sulfisoxazole, le trimethoprim/sulfadiazine, la streptomycine, l'érythromycine, le furazolidone, le gentamycine, le kanamycine, le néomycine et le nyfurpyrinole (Cruz-Lacierda and de la Peña, 1996).

En Inde, l'oxytétracycline, le chloremphénicol et d'autres antibiotiques sont utilisés (Pathak et al., 1996).

Néanmoins, de 1988 à 1990, il a été observé que l'usage d'antibiotiques en aquaculture a connu une nette régression à cause du développement massif de vaccination (Markestad & Tombe, 1997). Alors que la vaccination est inefficace en crevetticulture (Defroidt, 2007). A côté de cette utilisation massive d'antibiotique et à titre d'exemple, le Vietnam a connu une importation en hausse des médicaments chimiques pour usage en aquaculture passant de 640 tonnes en 2001 à 85500 tonnes en 2004 ; ces médicaments chimiques proviennent de Thaïlande, des USA, de l'Inde, de Taiwan, d'Allemagne, de Hong-Kong, d'Indonésie, de France et de la Chine (van den Bogaard, 2000).

L'environnement peut être l'objet d'une contamination par les eaux résiduelles issues des élevages intensifs, contenant des antibiotiques, et favorisant ainsi l'apparition de bactéries résistantes à ces antibiotiques (Alderman & Hastings, 1998).

Par ailleurs, l'aquaculture s'efforce d'améliorer les méthodes d'élevage afin de diminuer l'impact des maladies. Cette industrie a enregistré une croissance significative, accompagnée d'un développement rapide des techniques d'élevage et d'une forte augmentation du nombre d'écloseries et de fermes dans le monde.

## **II-5-9. Résistance bactérienne aux antibiotiques en aquaculture**

### **-Apparition et développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

L'utilisation massive des antibiotiques en aquaculture peut entraîner la présence de résidus d'antibiotiques dans les animaux, l'eau et les sédiments, ainsi que le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Le et al., 2005).

Une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice ou une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace (afssa, 2006). Le développement de la résistance en antibiotique dans les bactéries est basé principalement sur la pression sélective exercée par l'usage d'antibiotiques et la présence de gènes de résistance (White et McDermott, 2001).



La résistance bactérienne est basée sur différents mécanismes :

- L'inactivation ou destruction de l'antibiotique par les enzymes, exemples bêta-lactamase (beta-lactams), estérase (macrolides), phosphorylase (aminoside, macrolides), acetyltransferase (chloramphénicol).
- L'expulsion de l'antibiotique active hors de la cellule (tétracyclines, macrolides, phenicols, quinolones, beta-lactams).
- L'expression d'une variante de la molécule cible par l'antibiotique pour avoir une faible affinité avec l'antibiotique (sulphonamides, tétracyclines, macrolides, beta-lactams, fluoroquinolones) : Modification de la cible des antibiotiques.
- Diminution de la perméabilité bactérienne aux antibiotiques.
- Création par altération ou changement par voie enzymatique de la cible de l'antibiotique.

Tous ces mécanismes limitent l'accès de l'antibiotique à son site particulier dans les bactéries cible.

L'identification des bactéries isolées des échantillons de sédiments montre que les Bacilliaceae et les Vibrionaceae sont prédominantes parmi les bactéries résistantes aux antibiotiques (Le et al., 2005). Des *Vibrio sp* et *Aeromonas sp* isolées de l'eau d'élevage et de ponte de *Penaeus monodon* de l'écloserie en Inde sont signalés résistants à l'ampicilline, au chlorotétracycline, à la tétracycline, à la kanamycine et à la néomycine. (Vaseeharan et al., 2005). L'ingestion ou les contacts directs avec des agents pathogènes provenant de l'aquaculture peut contaminer l'homme ou les animaux. Le transfert de la résistance à des bactéries pathogènes réduit l'efficacité des traitements aux antibiotiques aussi bien pour les maladies des animaux que celles de l'être humain (Holmström et al., 2003 ; Le et al., 2005 ; Tendencia et al., 2001).

Une grande partie de l'alimentation et des antibiotiques sont perdus dans l'environnement, causant ainsi la pollution de l'eau (Lee, 2003). Plusieurs études ont démontré la présence des résidus d'antibiotiques dans des exploitations de pisciculture. (Capone, Weston, Miller & Shoemaker, 1996; Herwig, Gray & Weston, 1997 ; Weston, 1996). Les antibiotiques les plus couramment utilisés en aquaculture sont le norfloxacine, l'oxytétracycline, l'enrofloxacin et les sulphonamides, le chloramphénicol, le ciprofloxacine et la tétracycline (Holmström et al., 2003). Il a été démontré que les antibiotiques persistent dans les sédiments et l'environnement aquatique pendant plusieurs mois suivant leur administration (Miranda et al., 2002 ; Tendencia et al., 2001). Par exemple, la tétracycline et

l'acide oxolinique sont connus pour être persistants dans les sédiments en fonction de la température et de la profondeur. (Tendencia et al., 2001 ; Weston, 2000).

L'épidémie de choléra en Equateur a débuté à partir des personnes ayant travaillé dans des fermes de crevette. Le phénotype multi résistant a été présent dans des non choléra *Vibrio* infections qui sont pathogènes pour les crevettes. La résistance peut-être transférée par *Vibrio cholerae* O1 à d'autres vibrio (Weber et al, 1994).

Pour ces raisons, le Code et les directives (FAO, 2005) préconisent que l'usage préventif d'antibiotiques dans l'aquaculture devrait être évité, les antibiotiques devront être administrés de préférence sous surveillance vétérinaire.

## **II-5-10. Alternatives aux antibiotiques**

Plusieurs alternatives aux antibiotiques conventionnels appliqués en crevetticulture sont rapportées dans la littérature :

- Les extraits de plantes sont utilisés comme immunostimulants pour le renforcement de l'immunité de l'organisme hôte. Les mécanismes de défense de l'hôte ont été signalés comme une stratégie pertinente pour l'inhibition de la croissance bactérienne. (Citarasu, Babu, Sekar & Marian, 2002 ; Direkbusarakom, Ezura, Yoshimizu & Herunsalee, 1998 ; Dorman & Deans, 2000; Leañó, Xi & Liao, 2007; Yeh et al., 2008). L'utilisation d'extraits de plantes pour remplacer les agents chimiothérapeutiques dans l'aquaculture a été rendue possible grâce à une administration par voie orale (Bioencapsulation) ou par mélange direct avec des ingrédients. Comme les extraits de plantes ne sont pas toujours acceptés directement par les crevettes, ils peuvent être nourris à l'*Artemia* qui agit alors comme un support biologique (Immanuel et al., 2004). Les extraits des plantes ont été prouvés comme produits tonifiants et anti stress et aussi améliorent la croissance (Citarasu, Immanuel & Marian, 1998).

- Les probiotiques : L'intérêt de l'application des probiotiques dans l'aquaculture est assez récent. Des modes d'action possibles contre les agents pathogènes ont été mentionnés dans la littérature comme (i) la production de molécules inhibitrices, (ii) la compétition pour les éléments nutritifs, (iii) la compétition pour les sites d'adhérence dans le tractus gastro-intestinal, (iv) le renforcement de la réponse immunitaire de l'hôte et (v) la production d'éléments nutritifs essentiels tels que les vitamines et les acides gras, et aussi la contribution à la digestion enzymatique (Defoirdt, Boon, Sorgeloos, Verstraete & Bossier, 2007).

- L'eau verte : Elle consiste à la culture des crevettes et des tilapias dans l'eau des étangs, dans laquelle des microalgues (telles que *Chlorella* sp) poussent en abondance.

Tendencia, dela Pena & Choresca, (2005) ont rapporté que *Vibrio harveyi* a disparu de l'eau de mer contenant des *Chlorella* sp après deux jours d'incubation.

- La vaccination et l'immunostimulation : La stimulation des défenses de l'hôte peut augmenter la résistance aux maladies infectieuses, soit par le déclenchement des réponses immunitaires spécifiques (c'est-à-dire par vaccination), soit en renforçant les systèmes de défense non spécifique (c'est-à-dire par immunostimulation), il est noté que la vaccination n'est pas efficace sur les crevettes (Defoirdt et al., 2007; Sakai, 1999).

- Le pénaidines : Ce sont des peptides antimicrobiens produits par les crustacés (Bachere, Destoumieux & Bulet, 2000) qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire contre les agents pathogènes, et confèrent aussi une propriété antibactérienne contre les bactéries gram positives (Destoumieux, Bulet, Strub, van Dorsselaer & Bachère, 1999 ; Destoumieux et al 2000).

- L'acide gras à courte chaîne : Les acides gras à chaîne courte (SCFAs) sont réputés pour être des inhibiteurs de croissance des bactéries pathogènes (Defoirdt et al., 2007).

- La vaccination : La vaccination consiste en l'administration de bactéries pathogènes affaiblies ou mortes, ou bien des parties d'entre elles, dans le but de confectionner une protection durable grâce à une mémoire immunologique. La vaccination est possible sur les poissons et non sur les crustacés. (Defoirdt et al., 2007). L'essor de l'aquaculture a été suffisamment important de manière à justifier la mise au point de vaccins efficaces qui ont largement remplacés les antibiotiques dans le cas des maladies d'origine bactérienne de la salmoniculture, en Europe et en Amérique du Nord.

- Les bactériophages : Au début des années 1920, les bactériophages ont été découverts comme des infections virales de bactéries, et leur propriété antibactérienne par la lyse de bactérie hôte a été presque reconnue. Mais les bactériophages ont été relativement peu proposés comme étant une solution de thérapeutique en aquaculture, car aucun de ces bactériophages n'était pas capable d'infecter d'autre espèce de *Vibrio* sp à part *Vibrio luminescent* (Nakai & Park, 2002 ; Defoirdt et al., 2007).

### **III. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

#### **III.1. Le matériel végétal et la procédure d'extraction d'huile essentielle**

##### **III.1.1. Origine des matériels végétaux**

Les matériels végétaux ont été collectés dans la région Nord Ouest de Madagascar, plus précisément à Mariarano, zone côtière (15°41'S : 46°43'E, altitude du niveau de la mer 7 m) et à Tsaramandroso (16° 18' S; 47° 02'E, altitude: 600 m) (Figure 6).

Pour chaque arbre, un échantillon de feuilles (environ 400 g) a été collecté au cours de la saison des pluies, en février 2005: 30 arbres ont été utilisés à Mariarano et 38 à Tsaramandroso. Un spécimen a été déposé dans l'herbier du FOFIFA, Antananarivo, Madagascar.

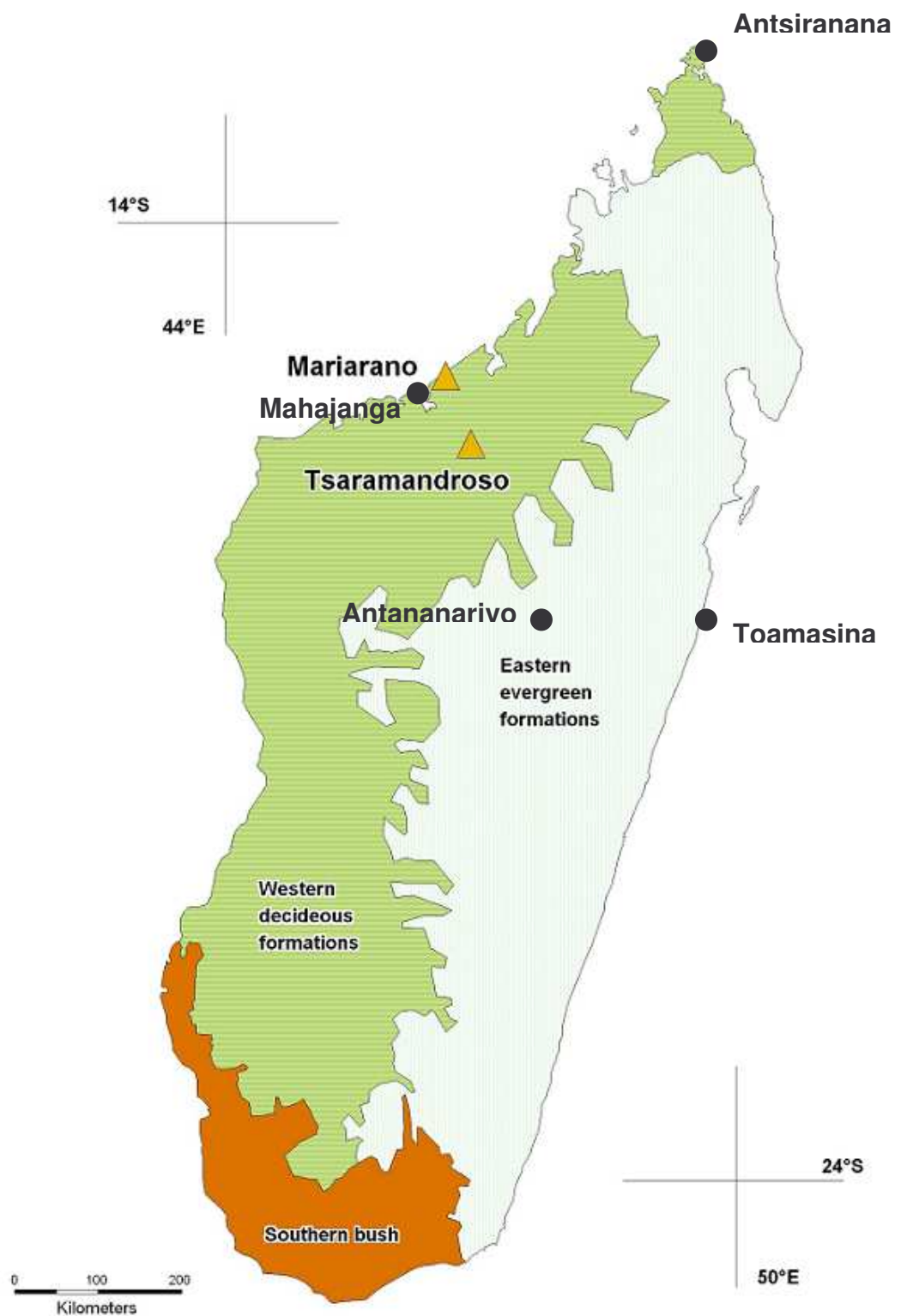


Figure 6: Localisation géographique de Mariarano (15°41'S : 46°43'E)  
et Tsaramandroso (16° 18' S; 47° 02'E)





Photo 1 : Feuilles récoltées à Mariarano



Photo 2 : Feuilles récoltées à Tsaramandroso

### III.1.2. Extraction des huiles essentielles de *C. fragrans*

Les feuilles ont été distillées à la vapeur pendant 4 heures dans un appareil type Clevenger modifié. Les distillations ont été effectuées à moins de 24 heures après le prélèvement. Les huiles essentielles ont été séchées au sulfate de sodium anhydre jusqu'à ce que les dernières traces d'eau ont été retirées, puis stockées dans des flacons en verre foncé à +4 °C.

### III.2. Analyse chimique.

#### III.2.1. Détermination de la matière sèche des feuilles de *C. fragrans*.

Pour chaque échantillon, la teneur en eau a été mesurée pour exprimer les rendements par rapport au poids sec et pour comparer les rendements quel que soit le délai de la distillation après la récolte.

Une prise d'humidité a été effectuée pour chaque échantillon. 5 g d'échantillon par lot de feuilles collectées ont été séchés dans une étuve réglée à  $102 \pm 2$  °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Après refroidissement dans le dessiccateur, l'humidité a été calculée selon la formule:

$$\%H = [(m_0 - m) / m_0] \times 100$$

Où % H : pourcentage d'humidité

$m_0$  : masse de l'échantillon avant l'étuvage.

$m$  : masse de l'échantillon après l'étuvage.

$$\text{Matière sèche} = 100 - \% H$$

### III.2.2. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle a été calculé par la formule ci-dessous ; il est exprimé en ml/100 g de matière sèche (%).

$$\text{Rdt (\%)} = (v / p) \times 100$$

Rdt: rendement en huile essentielle (exprimé en volume d'huile essentielle recueillie en ml/100 g de la matière sèche)

V : volume récupéré (ml)

p : Le poids de la matière sèche du matériel végétal utilisé (g)

Ou

$$\text{Rdt (g/100g)} = V \times D$$

D = densité

### III.2.3 La densité relative à 20 °C.

La densité relative a été déterminée selon la norme (Association Française de Normalisation (AFNOR), 1982) NF T 75-111 JUIN 1982/ISO 2 79-1993

La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20 °C, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à 20 °C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est  $d_{20}^{20}$ .

Elle est calculée par la formule suivante :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

où  $m_0$  : masse du pycnomètre à vide

$m_1$  : masse du pycnomètre rempli d'eau distillée à 20 °C

$m_2$  : masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle à 20 °C



### III.2.4 Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire a été déterminée selon la norme (Association Française de Normalisation (AFNOR), 1982) : NFT 75-113. La détermination de pouvoir rotatoire a été effectuée à l'aide d'un polarimètre. Le pouvoir rotatoire est l'angle dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de  $\lambda = 589,3$  lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm d'huile.

### III.2.5. Analyses chromatographiques (CPG) et chromatographies couplées à la spectrométrie de masse (Couplage CPG/SM).

Les échantillons d'huiles essentielles ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG / SM). Un chromatographe en phase gazeuse Varian A 3400 (Varian Inc, Palo Alto, CA) a été utilisé avec un détecteur à ionisation de flamme (FID), la colonne utilisée est le DB-Wax (A, J & W Scientific, Folsom, CA) en silice capillaire fondue (60 m x 0,32 mm id  $\pm$  0,25  $\mu$ m film). La température du four a été passée de 50 °C à 200 °C à un débit de 5 °C / min et maintenue à 200 °C pendant 20 min. La température de l'injecteur et du détecteur a été de 230 °C. L'hélium a été le gaz vecteur avec un débit de 2,0 ml par min. Les facteurs de réponse ont été pris comme 1,0 pour tous les composés, sauf pour le limonène (1,3), en référence au n-hexanol comme standard interne. Les indices de rétention linéaires ont été calculés par rapport aux n-alcanes (C<sub>5</sub>-C<sub>22</sub>). Les concentrations obtenues ont été la moyenne des trois répétitions

Les analyses CPG/SM ont été effectuées dans les mêmes conditions que CPG-FID en utilisant un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 équipé d'un détecteur de masse sélectif Agilent 5973. Les températures de l'injecteur et le transfert ont été respectivement de 220° C et 240 °C respectivement; les températures du four ont été programmées à partir de 50 °C à 200° C à 5 °C / min. Le gaz vecteur est l'hélium à 1 ml / min; le volume d'injection a été de 0,1  $\mu$ l, dans une solution d'hexane à 10 %, à un split ratio de 1:50.

Les moyens d'identification des composantes étaient les comparaisons de leur spectre de masse avec ceux de Wiley et le NIST (National Institute of Standards and Technology) McLafferty, F.W. Stauffer D.B.(1988) et les bibliothèques données de la littérature (Adams, 2001), ainsi que par comparaison de leur indice de rétention avec les valeurs trouvées dans la littérature et la co-injection avec des produits purs, comme le linalol, le 1,8-cinéole, etc. Le linalol et le 1,8-cinéole pur ont été achetés chez Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France).

### a) Les indices de rétention

L'indice de rétention est une grandeur caractéristique de chaque composé et dépend du type de colonne. Deux types de phases stationnaires sont généralement utilisés :

Sur colonne apolaire, les composés sont élués approximativement dans l'ordre de leur point d'ébullition. Une colonne imprégnée d'une phase stationnaire polaire retiendra préférentiellement les composés les plus polaires qui seront caractérisés par des temps de rétention (et par conséquent des indices de rétention) plus élevés.

### b) Calcul des indices de KOVATS

Les indices de rétention (ou indices de Kovats) ont été calculés par comparaison des temps de rétention (TR) avec ceux d'une série d'alcane permettant un étalonnage du chromatogramme.

Un mélange d'alcane de C<sub>5</sub> à C<sub>22</sub> a été injecté en CPG dans les mêmes conditions opératoires que celles des huiles essentielles. L'indice de rétention linéaire est défini par la formule suivante:

$$I.R = 100n + ( (TR_{(A)} - TR_{(Cn)}) / (TR_{(Cn+1)} - TR_{(Cn)}) ) \times 100$$

- A : composé inconnu,
- TR<sub>(A)</sub> : temps de rétention du composé inconnu
- TR<sub>(Cn)</sub> : temps de rétention de l'hydrocarbure à n atomes de carbone précédant immédiatement le composé ;
- TR<sub>(Cn+1)</sub> : temps de rétention de l'hydrocarbure à n+1 atomes de carbone suivant immédiatement le composé ;

Ces indices expérimentaux sont ensuite comparés à ceux de la littérature ainsi qu'à ceux des banques de données du laboratoire pour confirmation.

### **c) Méthode d'ajout (identification par enrichissement).**

Une série de co-injections a été entreprise afin de confirmer les pics:

- soit de l'huile essentielle et un produit étalon (1,8-cinéole pure, linalol pure, etc...).
- soit de l'huile essentielle et un mélange de produits étalons.
- soit de l'huile essentielle et une huile essentielle de composition connue.

Si l'aire du pic d'un constituant a augmenté, lorsqu'on la compare avec celle du chromatogramme de l'huile essentielle totale, il y a une forte probabilité d'identifier ce constituant à l'un des produits étalons ou à une des molécules de l'huile essentielle de référence. Si un nouveau pic apparaît, le produit correspondant est absent dans l'huile essentielle étudiée.

### **III.2.6. Etude des effets dates de récolte sur les compositions chimiques de *C. fragrans***

La composition chimique des huiles essentielles de *C. fragrans* issues d'arbres individuels provenant de Mariarano et de Tsaramandroso a été étudiée. Chaque mois de Février et chaque mois d'Août en 2005, 2006 et 2007, des échantillonnages des feuilles des arbres identifiés individuellement ont été entrepris.

Les feuilles ont été soumises à l'hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Les distillations ont été effectuées à moins de 24 heures après le prélèvement. Les huiles essentielles ont été séchées au sulfate de sodium anhydre et analysées au CPG et CPG/SM. L'un des principaux objectifs de notre travail consiste à connaître l'existence ou non des variations des constituants chimiques en termes quantitatif et qualitatif et selon la saison et le lieu d'échantillonnage.

## **II.3. Matériel animal**

Le matériel animal utilisé lors de cette expérimentation a été les larves de *Penaeus monodon*.

### **III.3.1. Origine des larves et développement larvaire (*Penaeus monodon*)**

Les larves utilisées lors de cette expérimentation proviennent de l'écloserie d'une ferme de crevettes au Nord Ouest de l'Ile (OSO Farming LGA). Les essais ont été conduits dans cette écloserie. Des larves nauplius ont été élevées dans des aquariums de 15 litres en double en 2006 et 2007 et pendant 18 jours dans les conditions d'élevage de l'écloserie.

A partir du stade nauplius, les larves vont franchir des stades larvaires successifs pour aboutir à des post-larves (Tableau 1).

Tableau 1 : L'évolution des larves de *Penaeus monodon* du stade nauplius à post-larve 8

Stade larvaire		Durée (heure)	Observation
Nauplius	N1		
Nauplius	N6		Du stade N1 à N6 : durée 42 à 46 h
Zoé 1	Z1	24	Certaines larves s'étendent jusqu'à 48 h
Zoé 2	Z2	24	
Zoé 3	Z3	24	
Mysis 1	M1	24	
Mysis 2	M2	24	
Mysis 3	M3	24	
Post-Larve 1	PL1	24	
Post-Larve2	PL2	24	
Post-Larve 3	PL3	24	
Post-Larve 4	PL4	24	
Post-Larve 5	PL5	24	
Post-Larve 6	PL6	24	
Post-Larve 7	PL7	24	
Post-Larve 8	PL8	24	

Le premier stade larvaire est le stade nauplius (Photo 3). A ce stade, la larve ne se nourrit pas encore. Le stade nauplius lui-même se subdivise en 5 stades successifs durant lesquels la larve va acquérir des caractères morphologiques de plus en plus complexes (segmentation des appendices, apparition d'organes frontaux etc.). Ce stade nauplius dure environ 42 à 46 heures suivant la température de l'eau d'élevage.



Photo 3 : Larves au stade nauplius 1 (X10)



Photo 4 : Larve au stade zoé (X10)

Les larves au stade zoé 1 (Photo 4, 5 & 6) possèdent déjà un céphalothorax et un abdomen bien différenciés ainsi qu'un appareil digestif déjà complexe (hépatopancréas et tube digestif).

Ce stade dure environ 48 heures. Les larves se nourrissent d'algues et/ou de microparticules.

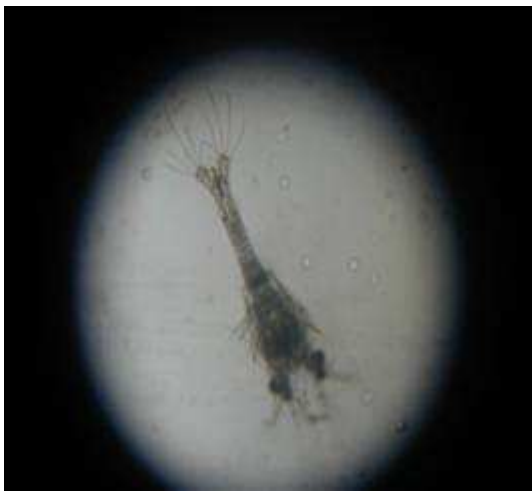


Photo 5 : Larve au stade zoé 1 (X10)

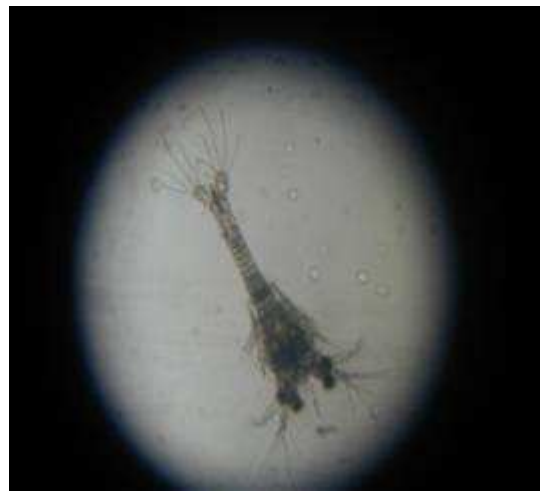


Photo 6 : Larve au stade zoé 2 (X10)

Les larves deviennent ensuite mysis 1 (Photo 6). L'apparence change assez radicalement et l'animal commence à ressembler à une petite crevette. Contrairement aux zoés qui nagent en avant, les mysis se déplacent la tête en bas et par saccades. Ils deviennent plus carnivores, se nourrissant volontairement de nauplius d'*Artemia*, entre autres les algues et les microparticules. Au stade mysis 2 (Photo 7), les larves sont plus grosses et les pléopodes commencent à apparaître. A mysis 3, les pléopodes sont bien allongés et présentent des soies. Chaque stade dure environ un jour complet.



Photo 7: Larve au stade mysis 1 (X10)



Photo 8 : Larve au stade mysis 2 (X10)

Les mysis 3 deviennent ensuite les post-larves qui ont la forme des crevettes adultes.

### III.3.2 Méthodes d'élevage à l'écloserie

#### III.3.2.1. Les principales données d'élevage.

Au début de l'élevage, le volume d'eau est 60 % du volume final de l'aquarium qui est de 15 litres. Ce volume initial estensemencé avec 400 nauplius par litre pour aboutir à une densité finale de 250 larves par litre. La température de l'eau est de 29,2 °C avec une salinité de 32‰. Le pH est de 7,8. L'eau de mer utilisée est filtrée avec des filtres de 1 à 5 microns puis stérilisée avec de l'UV à 30 mJ/cm<sup>2</sup>. Le taux d'oxygène dissout est compris entre 4,5 et 5,5 %. L'eau est renouvelée à 25 % au 11<sup>ème</sup> jour (stade PL1), 50 % au 12<sup>ème</sup> jour (stade PL2), 50 % au 14<sup>ème</sup> jour (Stade PL4) et 50 % au 16<sup>ème</sup> jour. Une aération homogène continue et forte a été utilisée. Des lumières en néon ont été utilisées pour éclairer les aquariums.

#### III.3.2.2. Réception et acclimatation des Nauplius

##### -Comptage des nauplius reçus et ensemencement

Le comptage a été effectué à partir de plusieurs échantillonnages d'un litre d'eau contenant de nauplius ; il est à noter que le seau contenant les nauplius a été bien homogénéisé par le biais d'une forte aération. Après récolte, les nauplius sont transférés dans des aquariums. Le jour de semis des nauplius est inscrit comme le jour 0, sur la fiche d'élevage. L'ensemencement se fait avec des nauplius éclos le même jour.

### **III.3.2.3. Contrôle qualité de l'élevage larvaire**

#### **a) Observation des aquariums et des larves.**

Les larves ont été observées deux fois par jour : le matin à 6 h 00 et le soir vers 15 h 00. Quant aux zoé-mysis, se trouvant dans un stade critique, une troisième observation s'avère nécessaire. L'importance de ces observations est donc primordiale pour la réussite de l'élevage.

Avant de passer au prélèvement d'un litre d'échantillon destiné à une observation microscopique, un contrôle de l'état de propreté de chaque aquarium a été entrepris, portant sur :

- la présence d'écume, de dépôt d'aliments sur les bords de chaque aquarium.
- la couleur de l'eau et le bloom d'algues (les algues mortes sont à l'origine de déchets organiques et peuvent libérer des toxines dans l'eau)
- la présence ou non d'aliments en quantité suffisante: artémia, algues, granulés.
- les paramètres abiotiques : la température, la salinité, l'oxygène dissous, le pH, la luminosité,...

A propos de ces observations microscopiques, un seul prélèvement par aquarium a été effectué. Ce prélèvement se fait au niveau du bullage. L'observation des larves a été effectuée dans le bêcher et a permis de juger :

- leur activité: nage (exemple : zoé nage en saccade), phototropisme (nage en surface ou en profondeur),
- leur comportement (exemple : présence de réplétion c'est-à-dire que la larve se courbe)...
- la mortalité éventuelle.

Au moins une cinquantaine (50) de larves ont été observées au microscope. Les larves présentes dans le bêcher de prélèvement ont été récupérées sur un tamis de maille de 100 ou 300 microns, selon les stades larvaires, puis déposées sur une lame à l'aide d'une pipette. Afin d'immobiliser les larves sur la lame, l'excès d'eau a été soutiré avec une pipette pasteur munie d'une poire d'aspiration.

L'observation microscopique de l'échantillon des larves s'est faite d'une manière progressive : grossissement 4X, puis 10X et 40X. Ceci a permis d'évaluer le stade de développement larvaire.



L'observation de la morphologie des larves a permis de connaître :

- La couleur des larves par rapport aux aliments ingérés et la pigmentation des larves :
- La dispersion des chromatophores traduit un stress .
- Les déformations morphologiques des larves.
- Le contenu stomacal des larves (pourcentage de réplétion, couleur).
- La population de parasites externes dans les branchies et autres parties du corps.

#### **b) Propreté des larves et localisation de la nécrose externe**

- L'excès d'algues ou d'aliments fixés sur les appendices, la présence ou non de protozoaires, la présence d'organismes épibiotiques (*Vorticella*, *Epistylis*,...) ont été l'objet de suivi.

- La localisation de la nécrose externe si celle-ci existe et l'évaluation du pourcentage de larves atteintes, tout en notant l'origine (cannibalisme, attaque bactérienne, mauvaise manipulation des larves) ont été menées.

- La présence de champignons (*Lagedinium*) et des bactéries filamenteuses (*Leucothrix mucor*), leur localisation sur les larves, le degré de contamination, ou s'ils sont présents uniquement sur les matières en suspension dans le milieu d'élevage, ont été l'objet d'observation.

La qualité de l'eau a été observée, tout en notant la présence de fèces, de mues, de parasites, le phénomène de cannibalisme. Ce dernier pourrait avoir lieu lorsque la quantité de nourriture n'est pas suffisante et s'il y a des larves mortes dues à ce cannibalisme.

L'état de l'aquarium a été évalué en termes de pourcentage selon l'évolution des stades larvaires et les contenus stomacaux. Ces observations ont été notées sur la fiche respective de suivi de chaque aquarium.

#### **III.3.2.4. Mesures des paramètres abiotiques.**

La température de chaque aquarium a été prise à l'aide d'un thermomètre trois fois pendant 24 heures ; celle-ci doit être comprise entre 29,2 °C – 30,2 °C.

Le taux d'oxygène dissout dans l'aquarium est mesuré régulièrement avec un oxymètre ; le taux d'oxygène dissout doit être compris entre 4,5 et 5,5 mg/l.

Le pH a été également contrôlé avec un pH-mètre ; celui-ci doit être compris 7,8 et 8,2.

La salinité de l'eau des aquariums a été mesurée à l'aide d'un salinomètre portatif ; la salinité doit être comprise entre 30 et 32 ‰.

- Les observations des larves peuvent être conduites pendant la nuit, lors de la distribution des aliments. Il en est de même pour les renouvellements d'eau des aquariums si la qualité de l'eau se détériore. Dans les conditions normales, un seul renouvellement tous les deux jours est suffisant. Les pourcentages d'apport d'eau neuve évoluent selon les stades larvaires. Ceux notés dans le tableau du changement d'eau théorique (Annexe 12) sont des apports normaux pour des élevages ne présentant pas de problème particulier. Dans la réalité, il conviendra toujours d'adapter ces pourcentages d'apport d'eau en fonction des observations journalières et de l'état sanitaire des larves.

- Toute intervention pour un changement d'eau dans un aquarium, a pour effet de provoquer un stress sur les larves qu'il faut essayer de réduire au minimum. Pour ce faire, des mailles adaptées au stade larvaire ont été utilisées.

Des contrôles de l'aération de l'aquarium ont été entrepris par le biais des mesures de l'oxygène dissout.

La température de l'eau neuve doit être identique à la température de l'aquarium, l'eau de mer avant d'être introduite est chauffée à l'aide d'un thermoplongeur.

Les apports d'eaux neuves se sont effectués le matin à partir de 6 h 30 mn. On apporte de l'eau neuve tous les jours dans les aquariums tant que les larves se trouvent au stade inférieur à M1.

### **III.3.2.5. Alimentation des larves.**

Les larves sont nourries avec des algues, des *Artemia* et des microparticules (Annexe 12). Les algues distribuées sont vivantes, en phase de croissance. Une seule variété d'algues a été employée au cours de l'élevage larvaire, il s'agit de *Chaetoceros gracilis*. Les concentrations d'algues à maintenir dans les aquariums sont données dans le tableau d'alimentation (Annexe 13). L'évolution de la concentration en phytoplancton dans les aquariums dépend directement de l'intensité lumineuse et de sa consommation par les larves. Les densités d'algues présentées dans le tableau de protocole d'élevage sont des densités minimales, car en réalité les densités observées dans les aquariums d'élevage sont parfois jusqu'à trois fois supérieures si les algues ne sont pas consommées en totalité sans que cela ne

pose de problème au niveau de l'élevage en lui-même. Par contre, les risques de "crash" des blooms d'algues sont beaucoup plus élevés.

### III.4. Utilisation de l'huile essentielle de *C. fragrans* et l'antibiotique (*Erythromycine*).

#### III.4.1. Etude de la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) et la dose d'huile essentielle de *C. fragrans* utilisée *in vivo*

La toxicité de l'huile essentielle de *C. fragrans* a été testée avec les larves de *P. monodon* en immersion dans de l'eau de mer traitée avec des concentrations croissantes : 100, 200, 400, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 mg/l pendant 24 heures. Les lots des nauplius, zoé, mysis, post-larve saines d'une densité de 100/1000 ml ont été élevés dans des béciers de 2000 ml contenant de l'eau salée et munis d'une aération continue. Les caractéristiques physico-chimiques du milieu d'élevage ont été : salinité 32 ‰, pH 8,0-8,1; température 29.2 °C et l'oxygène dissous entre 4,5 - 5,5 mg/l. Après 1 heure d'acclimatation, de l'huile essentielle a été versée. Trois répétitions pour chaque concentration, y compris le témoin, ont été effectuées. Les larves ont été laissées à jeun. Le pourcentage de survie des larves a été déterminé par la formule de Karber et Behrens (1935).

La DL<sub>50</sub> est obtenue par la formule

$$DL_{50} = DL_{100} - \frac{\Sigma (a \cdot b)}{n}$$

DL<sub>100</sub>: plus faible dose tuant tous les animaux.

a = moyenne de la somme des individus morts à deux doses consécutives.

b = différence de concentration entre deux doses successives.

n = nombre d'animaux utilisés par lot.

La dose utilisée *in vivo* est celle obtenue *in vitro* 734 mg/ml et cette concentration ne doit pas provoquer le mort de l'animal d'après le test de la DL<sub>50</sub>.

### III.4.2. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. fragrans*.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. fragrans* a été testée *in vitro* avec les souches de référence et les souches isolées de l'écloserie.

#### III.4.2.1. Espèces microbiennes

L'activité des échantillons d'huiles essentielles a été testée sur 12 différents microorganismes de référence et sur des souches isolées de larves de crevettes *P. monodon* de l'écloserie OSO Farming (Province d'Antsiranana, Madagascar). Les bactéries gram négatives sont *E. coli* 363, *Vibrio anguillarum* ATCC 19264, *V. harveyi* ATCC 14126, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. fischeri* ATCC 49387, *V. penaeicidae* (ATCC 51841), *V. splendidus* (ATCC 25914) et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Trois souches de bactéries gram positives sont *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, et un champignon *Fusarium oxysporum* ATCC 695. *V. fischeri*, *V. harveyi*, *S. aureus* et *B. subtilis* ont été achetés à la Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France). Les autres souches nous ont été données par Ifremer (Montpellier, France). Les vibrions ont été maintenus sur agar marine (Difco Laboratories, Detroit, MI), *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* et *M. luteus* sur bouillon Trypticase soja (Difco Laboratories), *F. oxysporum* sur Sabouraud dextrose agar (BBL, Beckton Dickinson Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ).

#### III.4.2.2. Test des fractions volatiles de l'huile essentielle de *C. fragrans*.

Dans une plaque contenant quatre cupules, de l'huile essentielle pure (1 ml) est placée dans la cupule n°1, les suspensions microbiennes (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio penaeicidae*, *Vibrio alginolyticus*) ont été mises dans les trois autres cupules (2, 3, 4). La plaque a été munie d'un couvercle. Des témoins ont été préparés de façon à ce qu'il n'y ait pas d'huile essentielle dans les cupules. Celles-ci ont été ensuite respectivement incubées à 37 °C pour les *S. typhimurium*, *B. subtilis* et *E. Coli* et à 30 °C pour les *Vibrio* sp. Les cupules sont schématisées ci-dessous (Figure 7).

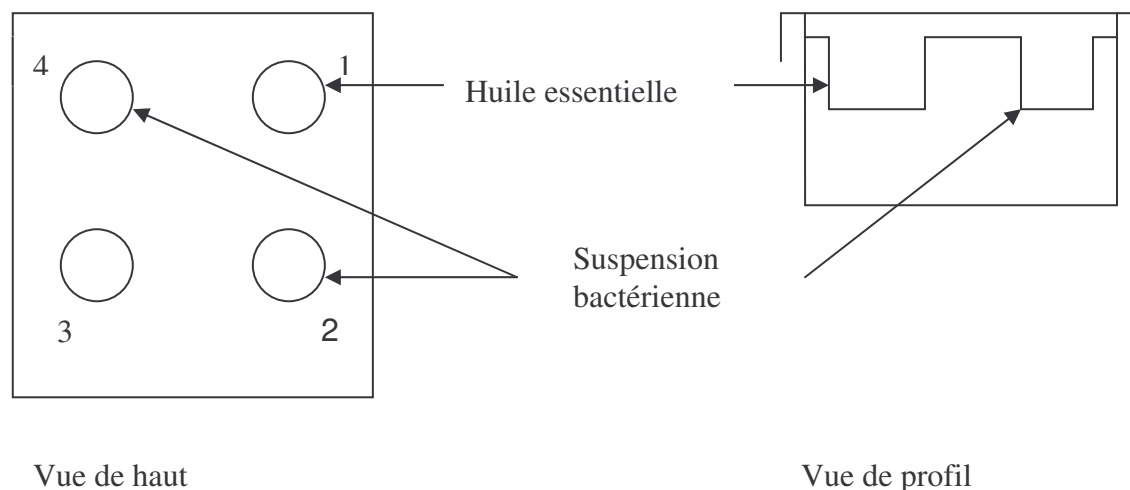


Figure 7 : Schéma de plaque en quatre cupules

### III.4.2.3. Choix des émulsifiants utilisée en crevetticulture.

Quatre agents émulsifiants ont été testés (le Tween 80, le Tween 20, le DMSO et le Triton X 100). Différentes concentrations de chaque émulsifiant ont été préparées dans de l'eau distillée stérile : 0,04 ; 0,05 ; 0,07 ; 0,1 ; 0,2 (volume/volume). 900  $\mu$ l des pré-cultures d'une nuit à 30° C ont été inoculés dans le milieu zobell pour les souches *Vibrio* spp. (Maes & Paillard, 1992) et le bouillon minimal pour les autres souches (Destoumieux et al., 1999). La densité optique de l'inoculum a été mesurée à  $D_{600} = 0,1$  et ensuite l'inoculum a été dilué pour atteindre une densité optique finale de  $D_{600} = 0,001$ .

100 $\mu$ l d'émulsifiant dilués ont ensuite été ajoutés à ces cultures pour parvenir à un volume de culture final de 1 ml. Les tests ont été effectués en trois répétitions : un témoin positif contenant la culture bactérienne sans émulsifiant, un témoin négatif ne contenant que le milieu ont été effectués. Les tubes ont été respectivement incubés pendant 24 heures à 25 °C pour *Vibrio* spp. ; 30 °C pour *M. luteus* ; 37 °C pour *E. coli* ; *B. subtilis* ; *S. aureus* et pendant 48 heures à 37 °C pour *F. oxysporum*.

Les émulsifiants qui n'ont pas eu d'effet sur la croissance des microorganismes ont été choisis.

### **III.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB).**

La CMI a été définie comme étant la plus faible concentration d'huile essentielle pour laquelle le microorganisme ne montre pas de croissance visible. 100 µl des tubes ne présentant pas de croissance ont ensuite été repiqués sur des boîtes de milieu zobell (Maes et al., 1992) et le milieu minimal (Destoumieux et al., 1999) pour déterminer si l'inhibition est réversible ou irréversible. La CMB est ainsi définie comme la plus forte dilution (concentration la plus faible) à laquelle aucune croissance n'est observée sur la boîte de gélose (Gachkar, Yadegari, Rezaei, Taghizadeh, Astaneh & Rasooli, 2007).

Les CMI et les CMB ont été déterminées pour les échantillons B8 provenant de Tsaramandroso, B143 de Mariarano, ainsi que pour le linalol et le 1,8-cinéole purs. La méthode de dilution a été utilisée pour déterminer les CMI et les CMB (Destoumieux et al., 1999). Les solutions mères des huiles essentielles ont été préparées dans de l'eau distillée stérile. Ces suspensions ont été ensuite diluées pour avoir les concentrations suivantes : 0,04 mg / ml à 23,5 mg / ml dans des tubes à essai. Environ 900 µl des pré cultures d'une nuit à 30°C ont été inoculés dans le milieu zobell pour les souches *Vibrio* spp. (Maes et al., 1992) et le bouillon minimal pour les autres souches (Destoumieux et al., 1999).

La densité optique de l'inoculum a été mesurée à  $D_{600} = 0,1$  ; l'inoculum a été ensuite dilué de manière à atteindre une densité optique finale de  $D_{600} = 0,001$ . 100µl d'huile l'essentielle dilués ont ensuite été ajoutés à ces cultures pour parvenir à un volume de culture final de 1 ml. Les tests ont été effectués en trois répétitions, un témoin positif contenant la culture bactérienne sans l'huile essentielle et un témoin négatif ne contenant que le milieu ont été effectués. Les tubes ont été respectivement incubés pendant 24 heures à 25 °C pour *Vibrio* sp., 30 °C pour *M. luteus*, 37 °C pour *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* et pendant 48 heures à 37 °C pour *F. oxysporum*.

### **III.4.4. Utilisation de l'huile essentielle et l'antibiotique en crevetticulture**

Les effets des huiles essentielles (B8 et B143) et de l'antibiotique conventionnel, érythromycine (Bouchara Levallois. France), sur la concentration de bactéries dans les larves et l'eau d'élevage ainsi que sur le taux de survie des larves pendant les 18 jours du cycle de développement ont été déterminés.

L'émulsifiant testé pour l'huile essentielle a été le Tween 80.

Les essais suivants ont été effectués en double exemplaire pendant deux campagnes en 2006 et 2007:

- Témoin A : la culture de larves n'est pas traitée, c'est-à-dire sans huile essentielle, sans antibiotique, sans Tween 80.

- Témoin B: la culture de larves a été traitée uniquement avec le Tween 80 mais sans huile essentielle et sans antibiotique.

- B8 T: la culture de larves a été traitée avec de l'huile essentielle B8 dissoute dans le Tween 80.

- B8: la culture de larves a été traitée avec l'huile essentielle B8 sans Tween 80.

- B143 T: la culture de larves a été traitée avec de l'huile essentielle B143 dissoute dans le Tween 80.

- B143: la culture de larves a été traitée avec de l'huile essentielle B143 sans Tween 80.

- E: la culture de larves a été traitée avec de l'antibiotique érythromycine.

Le traitement (huile essentielle et antibiotique) a été appliqué une fois par jour à 7 h du matin aux 3<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup>, 12<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours. La concentration d'antibiotique a été de 20 mg / ml. L'huile a été ajoutée à la concentration de 734 µg / ml (correspondant à la plus basse CMI de l'huile contre les vibrions testés par (Randrianarivelo et al., 2009), (Randrianarivelo, Sarter, Benoit, Ruez, Raherimandimby & Danthu, 2010). Pour les tests utilisant le Tween 80, de l'huile a été mélangée dans une solution de 0,04 % (v/v) de Tween 80.

Pour le témoin B, seul l'émulsifiant (Tween 80) a été ajouté à 0,04 % (v/v) à la même fréquence que les tests de l'huile.

#### **III.4.5. Concentration bactérienne et isolement des souches.**

Chaque jour, durant les 18 jours de culture de *P. monodon*, des prélèvements de larves (15 larves) et d'eau (10 ml) ont été effectués dans chaque aquarium. Les larves de *P. monodon* ont été broyées dans 5 ml d'eau saline stérile (2,5 % de NaCl dans l'eau distillée). L'échantillon étant homogénéisé, celui-ci et les échantillons d'eau ont été ensuite dilués en série jusqu'à 10<sup>-5</sup> dans une solution saline stérile. Les échantillons d'eau ont été aussi dilués dans une solution saline stérile aussi. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution (larves et eau) a été étalé sur agar marine (MA) pour le total des bactéries hétérotrophes aérobies (Difco, Le Pont de Claix, France) (Destoumieux, 1999) et TCBS agar (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose agar, Difco, Le Pont de Claix, France) en double exemplaires et incubés à 30 ° C pendant 48 heures pour agar marine et pendant 24 heures pour TCBS pour un comptage quotidien (cfu/ml).



### III.4.6. Le taux de survie des larves.

a) Le comptage des larves permet de faire une estimation de la population présente dans chaque aquarium ainsi que de visualiser la mortalité.

b) Les comptages ont été effectués avant tout prélèvement des échantillons pour les comptages des colonies bactériennes.

c) Quatre échantillons de 250 millilitres ont été prélevés dans chaque aquarium pour le comptage des larves, après une augmentation maximale de l'aération. Il est à remarquer que les échantillons ont été prélevés au niveau du bullage, dont l'un se situe à chaque extrémité de l'aquarium et deux autres au centre.

d) la moyenne des larves présentes dans les échantillons est calculée selon la formule suivante :

$$S = N \times 4 \times V$$

$$N = (n_1 + n_2 + n_3 + n_4) / 4$$

S= larves présentes dans l'aquarium

V= Volume de l'aquarium

$n_1, n_2, n_3, n_4$  = comptage dans chaque bûcher de 250 ml

Seules les larves montrant des déplacements ont été considérées comme vivantes.

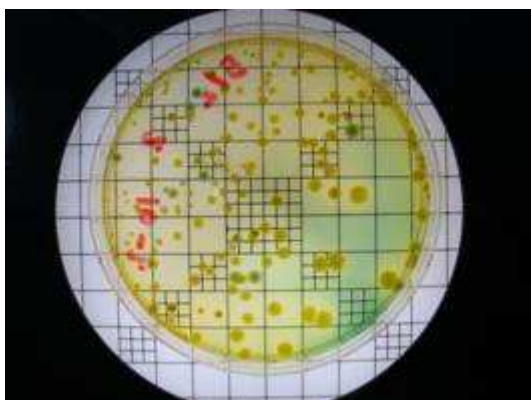
Le taux de survie (%) a été calculé selon la formule de Baruah et al.:

$$(\text{nombre total de larves vivantes chaque jour} / \text{nombre initial de larves}) \times 100.$$

### III.5. Identification des souches microbiennes

#### III.5.1. Isolement

Chaque jour, environ trois à cinq colonies ont été randomisées et isolées à partir des échantillons (eau et larves) sur gélose TCBS pendant les 18 jours (Photo 8). Une colonie plus ou moins isolée de cette première culture a été ensuite repiquée puis réensemencée et cela a été répété jusqu'à ce qu'à l'obtention de colonies pures.



**Photo 9** : Des colonies bactériennes sur le milieu TCBS  
(à gauche : solution mère ; à droite : colonies vertes et jaunes repiquées).

### III.5.2. La préparation des échantillons des larves et d'eau d'élevage

Les prélèvements des larves et d'eau d'élevage ont été réalisés dans des conditions stériles. Les larves ont été broyées dans 5 ml de NaCl à 2,5 % stérile. Cette préparation constitue la solution mère.

#### - Dilution de la suspension mère

9 ml de solution de NaCl à 2,5 % sont versés dans chaque tube de prélèvement, auquel il a été ajouté 1 ml de la solution mère. : c'est la dilution  $10^{-1}$ . Des dilutions en cascade jusqu'à  $10^{-5}$  ont été faites. 9 ml de diluant ont été répartis stérilement dans une série de tubes, 1 ml de solution mère a été transféré dans le tube N°1 à l'aide d'une pipette stérile. Après avoir homogénéisé le contenu du tube N°1, 1 ml de ce dernier a été ensuite versé dans le tube N°2 et ainsi de suite.

#### - Ensemencement bactérien.

Le milieu sélectif TCBS a été utilisé pour le dénombrement des populations de *Vibrio* sp.. Ce milieu peut favoriser la croissance rapide de *Vibrio* sp pendant une période de 18 heures à 24 heures à une température de 30 °C. Les espèces de *Vibrio* sp produisent ainsi des colonies vertes ou jaunes, mais de tailles différentes (Photo 10 et Photo 11).

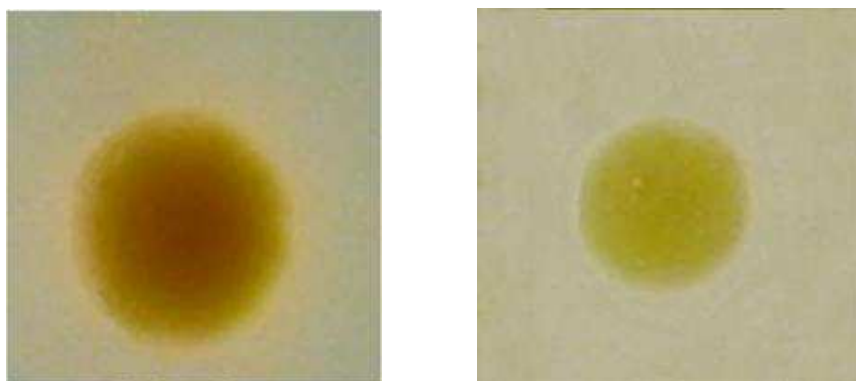


Photo 10 : Colonies jaunes sur le milieu TCBS

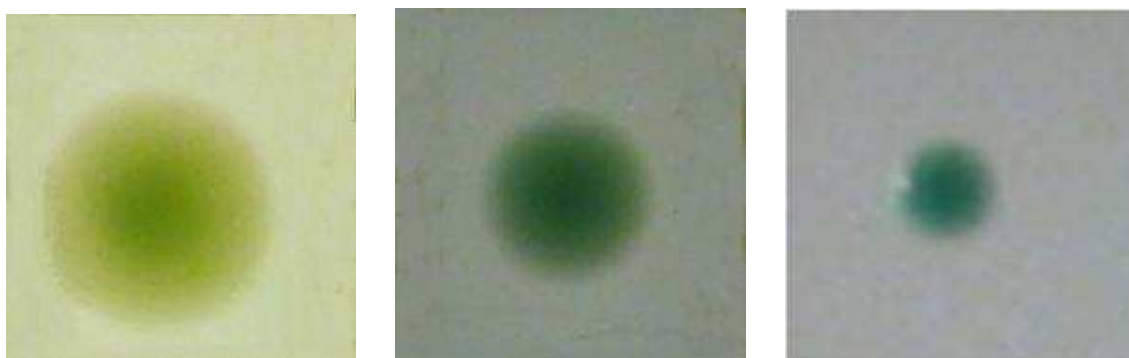


Photo 11 : Colonies vertes sur le milieu TCBS

### **III.5.3. Comptages des colonies bactériennes (cfu/ml) dans des prélèvements larvaires et les prélèvements d'eau d'élevage.**

Concernant les prélèvements larvaires, 15 larves ont été prélevées aseptiquement pour les nauplius, les zoés, les mysis et les post-larves. Une fois au laboratoire, les échantillons ont été étalés sur des coupelles en verre de montre stériles. Ensuite, ils ont été broyés, 5 ml de solution saline ont été additionnés à ce broyat. La solution ainsi obtenue a été transférée dans un tube à essai de 12 ml à l'aide d'une pipette pasteur stérile : cette solution constitue la solution mère. Des séries de dilutions ont été préparées dans des tubes à essai de 12 ml (ex : 3 tubes jusqu'aux dilutions  $10^{-4}$ ).

A l'aide d'une pipette, 9 ml de solution saline 2,5 % stérile a été ajouté dans chaque tube à essai. 1 ml de solution mère a été ajouté dans le premier tube, bien agité puis le même volume a été transféré à chaque étape de dilution.

Une dilution en cascade dans un volume final de 10 ml par tube est réalisée jusqu'à  $10^{-5}$ .

Pour les prélèvements d'eau d'élevage. L'échantillon d'eau prélevé constitue la solution mère c'est-à-dire la solution non diluée. 9 ml de solution saline 2,5% stérile ont été ajoutés dans chaque tube à essai à l'aide d'une pipette; ensuite 1 ml de solution mère a été additionné dans le premier tube, bien agité, le même volume a été transféré à chaque étape de dilution. Une dilution en cascade dans un volume final de 10 ml par tube a été réalisée jusqu'à  $10^{-5}$ .

Pour les prélèvements d'eau d'élevage. L'échantillon d'eau prélevé constitue la solution mère c'est-à-dire la solution non diluée. 9 ml de solution saline 2,5% stérile ont été préparés dans chaque tube à essai, 1 ml de solution mère a été ajouté dans le premier tube. Après agitation, le même volume a été transféré à chaque étape de dilution. Une dilution en cascade dans un volume final de 10 ml par tube a été réalisée jusqu'à  $10^{-5}$ .

Pour chaque dilution, l'homogénéisation a été effectuée au Vortex et 0,1 ml de solution a été déposé à la surface du milieu puis étalé de manière à couvrir toute la surface de façon régulière. L'incubation a été faite à 30 °C dans une étuve pendant 24 heures pour le TCBS et 48 heures pour l'agar marine. Les colonies bactériennes ont été dénombrées dans les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies. Sur le milieu TCBS, les vibrios se sont présentés sous forme de colonies jaune et verte.

### **III.6. Identification**

L'identification préliminaire a été effectuée en différentes étapes : la coloration gram, les réactions oxydase et catalase, l'observation microscopique, la motilité cellulaire, et le métabolisme du glucose.

#### **a) Coloration gram.**

Ce test a été réalisé en effectuant un frottis d'une culture pure (de 18 à 24 heures) sur une lame séchée à une flamme de bec bunsen. Le frottis a été ensuite fixé en flambant la lame à l'alcool. Le kit de réactifs « Color Gram2-E » (Biomérieux) a été ensuite utilisé pour la coloration de Gram suivant les indications du fournisseur :

- immersion du frottis dans une solution de cristal violet (capable de pénétrer dans toutes les cellules) pendant 1 minute ; rinçage à l'eau
- immersion dans une solution de lugol (fixateur) pendant 1 minute ; rinçage à l'eau
- décoloration à l'alcool (les bactéries à gram positive, imperméables à l'alcool, demeurent violettes, les bactéries à gram négative deviennent incolores) ; rinçage à l'eau

- immersion dans une solution de safranine pendant 1 minute (les bactéries à gram négative deviennent roses) et rinçage à l'eau.

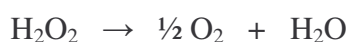
La lame a été séchée à l'air et ensuite observée au microscope optique à immersion. Les souches à gram négative apparaissent roses, tandis que les souches à gram positive sont violettes.

#### **b) Recherche de l'oxydase.**

Le test a été réalisé en déposant une goutte de réactif « oxydase reagent 55635 » (Biomérieux) sur la surface d'une bande de papier filtre de type Whatman. Une colonie de la bactérie à tester, issue d'une culture pure sur gélose nutritive (18 à 24 heures) a été étalée sur le papier filtre saturé de réactif. Une coloration violette apparaît en 10 à 30 secondes indiquant que le test est positif.

#### **c) Recherche de catalase.**

La catalase est une enzyme du système respiratoire catalysant la destruction de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) selon la réaction suivante :



Cet enzyme est utilisé en bactériologie systématique pour l'identification. Si la catalase est présente, elle pourra dégrader les sucres uniquement en présence d'oxygène car la bactérie a un métabolisme oxydatif : Par contre si elle est absente, la bactérie pourra dégrader les sucres en présence ou en absence d'oxygène, car la bactérie a un métabolisme fermentaire.

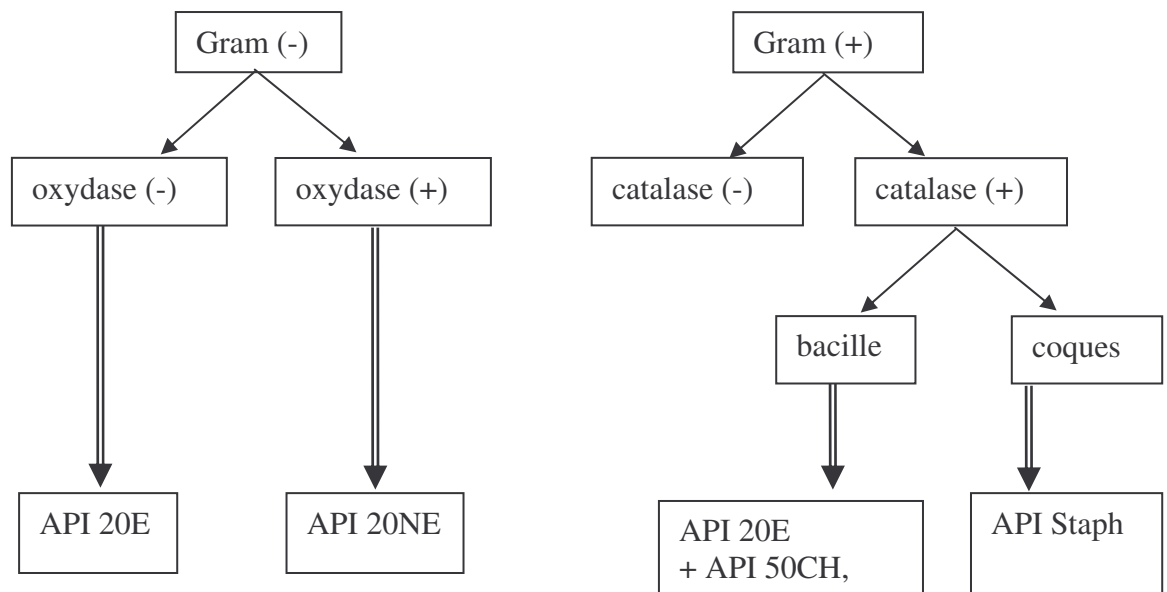
Le but du test a été de mettre en contact une colonie de la bactérie à tester issue d'une culture pure en présence d'eau oxygénée (« ID color catalase ID-ASE », Biomérieux). Une effervescence (présence de bulles d'air à la surface de la goutte), due à un dégagement d'oxygène, indique la présence d'une catalase

#### **d) Identification avec Galerie API-20E et API-20NE**

##### ***Galleries API System®***

Les isolats de bactéries gram négatives ont ensuite été identifiés avec le kit API System (Biomérieux à Marcy l'Etoile. France): API 20NE pour les bacilles gram négatives oxydase positif (non entérobactéries). Les galeries API ont été préparées selon les instructions du fabricant. La galerie API est un kit d'identification rapide qui réunit un grand nombre de

tests biochimiques miniaturisés. Selon les résultats obtenus avec la coloration de Gram et les tests de l'oxydase et de la catalase, la galerie utilisée est spécifique du groupe auquel appartient la bactérie :



**Figure 8** : Utilisation des galeries API selon les caractéristiques obtenues

La galerie API® 20 E sert à l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à gram négative non fastidieux ; elle comprend 21 tests biochimiques miniaturisés auxquels il faut ajouter la réaction de l'oxydase pour obtenir l'identification.

La galerie API 20 NE est utilisée pour l'identification des bacilles à gram négative non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*...). Cette galérie combine 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et le test de la réaction de l'oxydase.

La galerie API associe 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. Elle est associée avec le milieu API 50 CHB/E Medium pour l'identification des *Bacillus* et apparentés, des *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*.

L'interprétation des profils numériques obtenus avec ces galeries a été réalisée grâce à des catalogues Biomérieux.

Pour les isolats gram positif, l'identification a été faite par l'Institut Pasteur de Lille (Lille, France) en utilisant l'API 50CHB de *Bacillus spp.* et APISTAPH pour *Micrococcus spp.*.

Les isolats ont été maintenus sur gélose solide utilisant l'agar marine (Difco Laboratories, Detroit, USA).

### **III.7. L'analyse statistique des résultats**

#### *La partie huile essentielle :*

La composition chimique de l'huile essentielle a été obtenue par la moyenne  $\pm$  écartype. L'analyse statistique utilisée dans le traitement des données ont été l'ANOVA avec le test de Fisher LSD. Concernant, la variabilité des huiles essentielles, l'ACP réduite suivie d'une ACH et l'AFD ont été utilisées.

#### *La partie microbiologie*

Afin de pouvoir comparer les valeurs des CMI et CMB, les tests ont été effectués en trois exemplaires. Le test non paramétrique Kruskal-Wallis a été utilisé pour déterminer la différence significative entre les groupes testés à un seuil de  $p < 0,05$ . Avant d'entreprendre l'analyse statistique, les valeurs en pourcentages ont été normalisées en utilisant une transformation *arcsin*. La reproductibilité des données recueillies en 2006 et 2007 a été validée par le test de Kruskal-Wallis avec un seuil de  $p < 0,05$ . Comme l'analyse des données recueillies sur la concentration bactérienne et le pourcentage de survie des larves en 2006 et 2007 a montré des p-value supérieures à 0,05, les données présentées correspondent aux deux années 2006 et 2007 (échantillons quadruples). La corrélation à chaque stade larvaire, entre la concentration bactérienne et la survie des larves a été analysée en utilisant la méthode de corrélation de Spearman.



## IV-RÉSULTATS

### IV.1: Récoltes des feuilles de *Cinnamosma fragrans*

68 échantillons de feuilles ont été récoltés en Février 2005 dont 30 à Mariarano et 38 à Tsaramandroso. A partir de mois d'Août 2005, Février 2006, Août 2006 et Février et Août 2007, 15 pieds ont été identifiés et récoltés aux mêmes endroits.

### IV.2. Composition physico-chimique de *C. fragrans*

La matière sèche des feuilles, le rendement en huile essentielle, la densité de l'huile essentielle, le pouvoir rotatoire et l'indice de réfraction sont déterminés (Tableau 2 et 3). Les constituants de l'huile sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) (Tableau 4).

#### IV.2.1. Matière sèche et rendement en huile essentielle des feuilles de *C. fragrans*

La teneur en matière sèche et les rendements en huile essentielle des feuilles de *C. fragrans* collectées à Mariarano et Tsaramandroso sont donnés dans le Tableau (2).

Tableau 2 : Les teneurs en matières sèches (en %) et les rendements en huiles essentielles (g/100g) de *C. fragrans* récoltées à Mariarano et à Tsaramandroso aux mois de Février et d'Août de 2005, 2006 et 2007. Les valeurs correspondent à la moyenne de dix prélèvements ( $n = 10 \pm \text{sd}$ ).

		Mariarano			Tsaramandroso		
	mois	2005	2006	2007	2005	2006	2007
Matière sèche (%)	Février	19,8±0,3	20,1±0,2	20,4±0,4	22,3±0,2	23,1±0,2	23,2±0,2
	Août	30,6±0,2	29,9±0,4	29,8±0,5	31,2±0,2	32,1±0,3	31,9±0,3
Rendement (p/p)	Février	1±0,2	0,8±0,2	1±0,1	1,7±1,3	1,6±1,4	1,5±1,2
	Août	1,6±1,9	2,2±1,8	2±1,8	2,1±1,3	2,9±1,2	3,2±0,6

D'une manière générale, les valeurs de la matière sèche des feuilles récoltées à Mariarano et à Tsaramandroso ne montrent pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) entre les années 2005, 2006 et 2007. Par contre, les échantillons prélevés aux mois de Février et Août sont significativement différents entre eux selon le test de Fisher LSD ( $p < 0,05$ ). En effet, les échantillons prélevés à Mariarano sont significativement différents de ceux provenant de Tsaramandroso, selon le test de Fisher LSD ( $p < 0,05$ ).

A propos des rendements obtenus au cours des années 2005, 2006 et 2007 ne sont pas significativement différents ( $p > 0.05$ ), alors que ce rendement est significativement différent ( $p < 0.05$ ) entre les mois de Février et Août dans les deux régions : Mariarano et Tsaramandroso ( $p < 0.05$  selon le test de Fisher LSD).

Il y a une différence significative entre les rendements d'huile essentielle obtenus à Mariarano et Tsaramandroso ( $p < 0.05$ ).

#### IV.2.2. Densité relative à 20 °C, l'indice de réfraction à 20 °C, et le pouvoir rotatoire des huiles essentielles de *C. fragrans*

Le tableau (3) montre la densité relative à 20 °C, l'indice de réfraction à 20 °C et le pouvoir rotatoire des huiles essentielles collectées à Mariarano et Tsaramandroso.

Tableau 3 : Densité relative à 20 °C, indice de réfraction et pouvoir rotatoire des huiles essentielles de *C. fragrans* récoltées à Mariarano et à Tsaramandroso aux mois de Février et Août.

		Mariarano	Tsaramandroso
Densité	Février	0,9445	0,9386
	Août	0,9452	0,9371
Indice de réfraction	Février	1,4634	1,4558
	Août	1,4638	1,4562
Pouvoir rotatoire en °	Février	+2	+2,1
	Août	+2	+2

La densité des échantillons collectés à Mariarano (moyenne = 0,945) et ceux de Tsaramandroso (moyenne = 0,938) sont significativement différents ( $p > 0.05$ ).

Les rendements obtenus aux mois de Février et Août ne sont pas significativement différents à Mariarano et à Tsaramandroso selon le test de Fisher LSD.

Les indices de réfraction des échantillons de Mariarano et Tsaramandroso ne sont pas significativement différents ( $p < 0.05$  test de Fisher LSD).

Les pouvoirs rotatoires des échantillons de Mariarano et Tsaramandroso ne sont pas significativement différents ( $p < 0.05$  test de Fisher LSD).

#### **IV.2.3. Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *C. fragrans*.**

La composition de l'huile essentielle de *C. fragrans* identifiée par CPG/MS, coinjection est montrée dans le tableau suivant (Tableau 4).

Tableau 4 : Compositions chimiques des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* collectées à Tsaramandroso (dont B8), et à Mariarano (dont B143).

		IR	Tsaramandroso		Mariarano		méthode d' Identification
			moyenne	B8	moyenne	B143	
Monoterpènes hydrocarbonés							
1	$\alpha$ -pinène	1012	1,0 $\pm$ 1,3	0,1	3,5 $\pm$ 1,5	1,1	a ; b ; c
2	camphène	1056	1,1 $\pm$ 1,6	0,1	4,8 $\pm$ 2,2	1,2	a ; b
3	$\beta$ -pinène	1097	0,9 $\pm$ 1,0	0,1	8,0 $\pm$ 3,8	2,1	a ; b ; c
4	sabinène	1113	0,9 $\pm$ 1,0	0,2	1,8 $\pm$ 0,9	3,2	a ; b
5	$\delta$ -3-carène	1142	0,5 $\pm$ 0,7	0,1	1,7 $\pm$ 1,1	0,5	a ; b
6	$\alpha$ -phellandrène	1157	0,2 $\pm$ 0,2	tr	0,4 $\pm$ 0,7	2,1	a ; b
7	myrcène	1160	0,2 $\pm$ 0,4	0,2	0,6 $\pm$ 1,0	1,2	a ; b
8	pseudolimonène	1167	0,3 $\pm$ 0,4	-	0,7 $\pm$ 1,3	0,2	a ; b
9	$\alpha$ -terpinène	1174	1,4 $\pm$ 3,7	0,2	0,9 $\pm$ 1,5	0,1	a ; b
10	limonène	1191	0,7 $\pm$ 2,3	0,2	1,3 $\pm$ 1,9	0,6	a ; b
11	$\beta$ -phellandrène	1201	0,4 $\pm$ 0,6	tr	0,4 $\pm$ 0,9	0,4	a ; b
12	(Z)- $\beta$ -ocimène	1232	0,7 $\pm$ 0,8	-	1,1 $\pm$ 1,3	0,2	a ; b
13	(E)- $\beta$ -ocimène	1248	0,2 $\pm$ 0,3	-	0,3 $\pm$ 0,3	0,1	a ; b
14	p-cymène	1263	0,4 $\pm$ 1,1	0,2	0,8 $\pm$ 1,1	0,5	a ; b
15	terpinolène	1278	0,8 $\pm$ 1,4	0,1	0,6 $\pm$ 0,8	0,1	a ; b
16	allo-ocimène	1284	0,0 $\pm$ 0,0	tr	0,1 $\pm$ 0,3	0,1	
Total				1,5		13,7	
Monoterpènes Oxygénés							
17	1,8-cinéole	1207	0,5 $\pm$ 0,9	0,4	47,3 $\pm$ 10,2	71,6	a ; b ; c
18	perillène	1294	tr	0,1	0,1 $\pm$ 0,2	tr	a ; b
19	cis-oxyde de linalol (furanoid)	1439	0,7 $\pm$ 0,9	0,1	0,5 $\pm$ 0,9	0,1	
20	trans-oxyde de linalol (furanoid)	1468	1,2 $\pm$ 2,7	0,2	0,0 $\pm$ 0,1	0,1	a ; b
21	citronellal	1472	0,1 $\pm$ 0,1	tr	0,2 $\pm$ 0,4	0,2	a ; b
22	Linalol	1549	72,5 $\pm$ 23,3	95,8	1,1 $\pm$ 1,5	2,9	a ; b ; c
23	camphre	1505	0,2 $\pm$ 0,7	tr	0,2 $\pm$ 0,2	0,4	a ; b
24	acétate de bornyle	1575	0,2 $\pm$ 0,4	-	0,7 $\pm$ 0,8	0,3	a ; b
25	myrtenal	1600	0,2 $\pm$ 0,4	tr	0,1 $\pm$ 0,2	0,2	a ; b
26	terpinèn-4-ol	1606	1,5 $\pm$ 2,3	0,3	2,2 $\pm$ 2,0	2,5	a ; b ; c
27	(E)-2,6 diméthyl-3,7-octadien-2,6-diol	1669	0,3 $\pm$ 0,6	0,1	0,5 $\pm$ 1,3	-	a ; b
28	$\alpha$ -terpinyl acétate	1687	0,1 $\pm$ 0,2	0,1	0,3 $\pm$ 0,5	0,4	a ; b
29	(Z)-2,6 diméthyl-3,7-octadien-2,6-diol	1696	0,0 $\pm$ 0,1	tr	0,1 $\pm$ 0,2	-	a ; b
30	1-terpinèol	1700	1,2 $\pm$ 1,4	0,2	4,2 $\pm$ 3,0	2,1	a ; b ; c
31	acétate de néryle	1720	0,0 $\pm$ 0,1	tr	0,2 $\pm$ 0,5	0,2	a ; b
32	geranial	1735	0,0 $\pm$ 0,1	tr	0,2 $\pm$ 0,2	0,1	a ; b
33	citronellol	1751	0,0 $\pm$ 0,1	-	0,1 $\pm$ 0,2	0,1	a ; b
34	nerol	1795	0,8 $\pm$ 1,8	-	0,5 $\pm$ 0,9	0,1	a ; b
35	isogeraniol	1811	0,1 $\pm$ 0,1	-	0,0 $\pm$ 0,1	tr	a ; b
36	geraniol	1845	0,8 $\pm$ 1,5	tr	1,2 $\pm$ 2,1	0,4	a ; b
Total				97,5		81,1	
Sesquiterpènes hydrocarbonés							
37	$\alpha$ -cubebène	1455	0,1 $\pm$ 0,2	tr	0,2 $\pm$ 0,4	0,2	a ; b
38	$\alpha$ -copaène	1480	0,4 $\pm$ 1,2	-	1,4 $\pm$ 1,8	0,2	a ; b
39	$\beta$ -cubebène	1535	0,9 $\pm$ 1,9	tr	0,5 $\pm$ 1,0	0,2	a ; b
40	$\beta$ -caryophyllène	1654	0,7 $\pm$ 1,3	0,1	1,1 $\pm$ 1,8	0,5	a ; b
41	$\alpha$ -humulène	1667	0,2 $\pm$ 0,3	-	0,9 $\pm$ 1,9	0,3	a ; b
42	germacrene-D	1713	0,5 $\pm$ 0,7	-	0,7 $\pm$ 1,3	0,2	a ; b
43	epi-bicyclosesquiphellandrene	1730	0,0 $\pm$ 0,1	tr	0,1 $\pm$ 0,2	0,1	a ; b
44	$\delta$ -cadinène	1760	0,6 $\pm$ 1,7	-	0,5 $\pm$ 0,9	0,1	a ; b
45	cadina-1,4-diene	1783	0,6 $\pm$ 1,4	-	0,0 $\pm$ 0,2	0,2	a ; b
46	cis calamenène	1853	0,3 $\pm$ 1,3	tr	0,4 $\pm$ 1,0	0,2	a ; b
Total				0,2		2,9	
Sesquiterpènes Oxygénés							
47	oxyde de caryophyllène	1987	0,4 $\pm$ 1,1	0,1	0,4 $\pm$ 1,1	0,4	a ; b
48	elemol	2083	0,0 $\pm$ 0,1	tr	0,0 $\pm$ 0,1	0,1	a ; b
49	nerolidol	2089	0,1 $\pm$ 0,1	tr	0,0 $\pm$ 0,1	0,1	a ; b
50	$\gamma$ -eudesmol	2166	0,1 $\pm$ 0,1	tr	0,1 $\pm$ 0,1	0,2	a ; b
51	torreyol	2147	0,0 $\pm$ 0,1	tr	0,0 $\pm$ 0,0	0,1	a ; b
52	levomenol	2197	0,0 $\pm$ 0,1	0,1	0,1 $\pm$ 0,2	0,1	a ; b
53	$\alpha$ -eudesmol	2205	0,0 $\pm$ 0,1	tr	0,0 $\pm$ 0,1	0,1	a ; b
54	$\beta$ -eudesmol	2213	0,1 $\pm$ 0,2	tr	0,1 $\pm$ 0,1	0,4	a ; b
55	driminol	2287	0,0 $\pm$ 0,1	-	0,0 $\pm$ 0,1	0,1	a ; b
Total				0,2		1,7	
Autres							
56	6-méthyl-5-hepten-2-one	1279	0,4 $\pm$ 0,5	0,2	0,3 $\pm$ 0,8	tr	a ; b
57	2-hexen-1-ol	1288	0,1 $\pm$ 0,4	0,1	0,2 $\pm$ 1,0	0,1	a ; b
Total				0,3		0,1	

où

a : Indice de rétention : DB Wax

b : CPG/SM : Librairie NIST & Wiley

c : Co-injection

Moyenne de valeurs  $\pm$  écartype de 30 échantillons d'huile essentielle de *C. fragrans* à Tsaramandroso et 38 à Mariarano

tr : trace (entre 0,02 % et 0,1 %), les constituants en trace <0,01 % ne sont pas enregistrés.

Les huiles essentielles extraites à partir des feuilles de *C. fragrans* collectées à Mariarano et Tsaramandroso sont caractérisées respectivement par leur haute teneur en 1,8-cinéole et linalol (Tableau 3). Les échantillons recueillis à Tsaramandroso ont montré une concentration élevée en linalol ( $72,5 \pm 23,3$  %) et en oxydes (1,9 %). Seuls, deux autres monoterpénoides oxygénés ont été présents à plus de 1% (terpinen-4-ol et le 1-terpinéol). Les monoterpènes hydrocarbonés, qui affichent moins de 10% du mélange, sont surtout formés par des structures p-menthane,  $\alpha$ -phellandrène,  $\beta$ -phellandrène, p-cymène et terpinolène. Par ailleurs, le  $\beta$ -cubébène, le  $\beta$ -caryophyllène, le germacrène-D, le  $\delta$ -cadinène et le caryophyllène oxyde sont les principaux composants des sesquiterpénoides. Pour les plantes collectées à Mariarano, les monoterpènes oxygénés constituent la classe chimique majeure. Il s'agit du 1,8-cinéole ( $47,3 \pm 10,2\%$ ), constituant majoritaire, et de quatre autres, tels le 1-terpinéol ( $4,2 \pm 3,0\%$ ), le terpinen-4-ol ( $2,2 \pm 2,0\%$ ), le géraniol ( $1,2 \pm 2,1\%$ ) et le linalol ( $1,1 \pm 1,5\%$ ) mais minoritaires. Quant aux monoterpènes hydrocarbonés, ce sont les pinènes qui dominant et représentent plus de 10% de l'ensemble de l'huile. Par contre, dans le groupe des sesquiterpènes, l' $\alpha$ -copaène ( $1,4 \pm 1,8\%$ ), le  $\beta$ -caryophyllène ( $1,1 \pm 1,8\%$ ) et l' $\alpha$ -humulène ( $0,9 \pm 1,9\%$ ) sont les plus abondants. Il apparaît que les huiles essentielles de *C. fragrans* analysées dans cette étude pourraient être classées comme « type 1,8-cinéole » et « type linalol »

#### IV.2.4. Les effets dates des récoltes des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans*.

Les figures suivantes montrent l'Analyse en Composantes Principales (ACP) des 30 échantillons dont 15 provenant de Mariarano et 15 de Tsaramandroso.

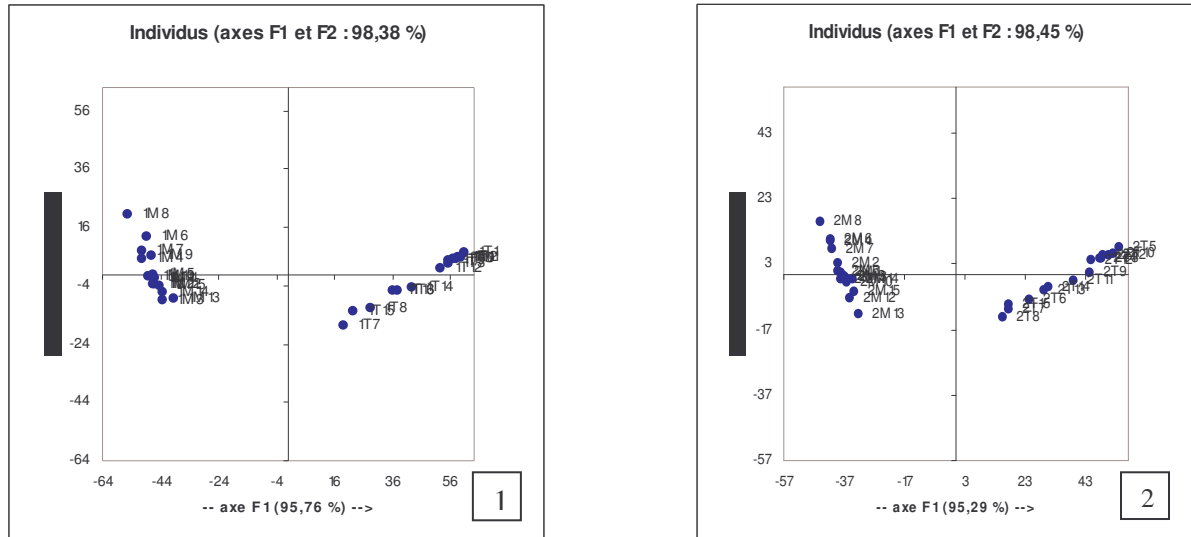


Figure 9 : ACP réduite des échantillons provenant de deux régions en mois de Février (1) et mois d'Août (2). Les axes F1 et F2 véhiculent 98,38 % d'information

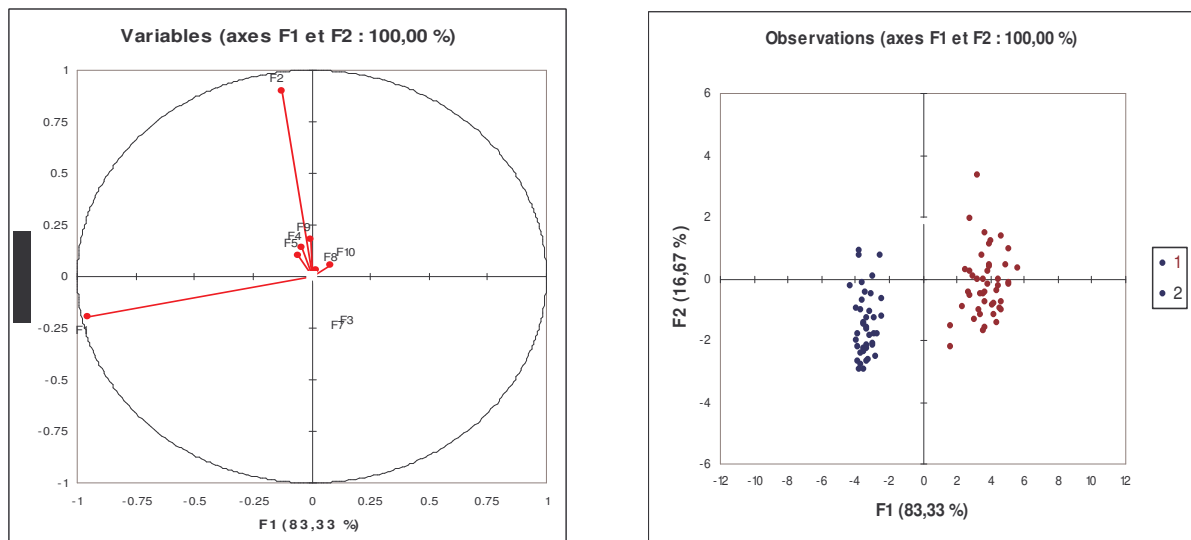


Figure 10 : AFD (Analyse Factorielle Discriminante) des échantillons provenant de deux régions. Les axes F1 et F2 véhiculent 100 % d'information

La représentation graphique des variables, selon les axes F1 et F2, permet de distinguer deux groupes de composés aromatiques : une famille chimique caractérisée par le 1,8-cinéole (Mariarano), et une autre par le linalol (Tsaramandroso). Ces deux groupes ont été observés aux mois de Février (1) et Août (2).

Cette ACP met en évidence l'existence de deux familles chimiques pour les huiles essentielles de feuilles de *C. fragrans*, selon l'origine (Tsaramandroso et Mariarano). Ces résultats ont été confirmés en 2005, 2006 et 2007.

L'AFD (Analyse factorielle discriminante) des échantillons provenant de deux régions montre l'existence de deux types chimiques pour les huiles essentielles de feuilles de *C. fragrans*, selon l'origine (Tsaramandroso « type linalol » et Mariarano « type 1,8-cinéole »). Ces résultats ont été confirmés en 2005, 2006 et 2007.

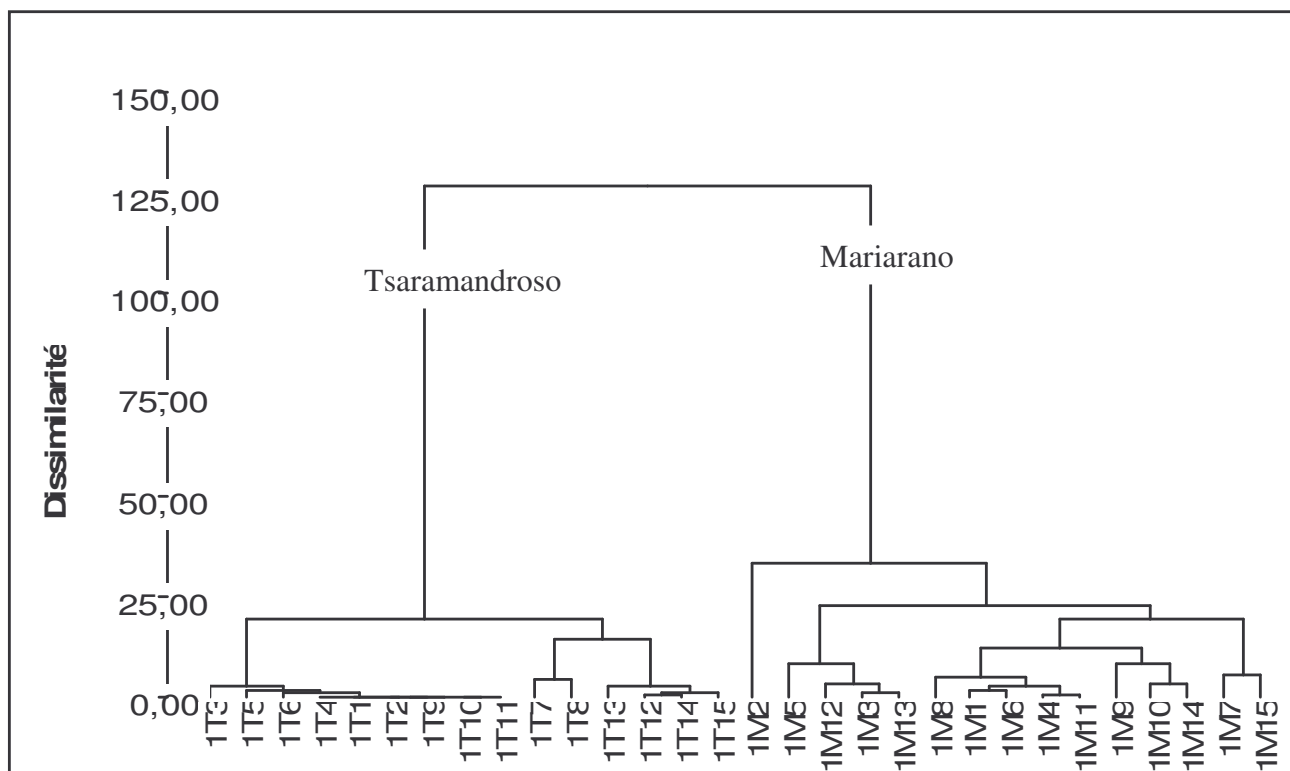


Figure 11 : Classification Ascendante Hierarchique (CAH) des échantillons provenant de deux régions en mois de Février

Cette CAH (Classification Ascendante Hierarchique) montre que toutes les huiles essentielles riches en linalol sont issues de la branche de Tsaramandroso, et que celles riches en 1,8-cinéole proviennent de la branche de Mariarano. Il est à noter que les résultats obtenus en Février et Août entre 2005 et 2007 sont similaires.



### IV.3. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. fragrans* (in vitro)

#### IV.3.1. Effet des fractions volatiles de l'huile essentielle de *C. fragrans*

La figure suivante montre l'effet des fractions volatiles des huiles essentielles sur la croissance de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio fischeri*, *V. penaeicidae*, *V. alginolyticus*, dans des cupules contenant des huiles essentielles de *C. fragrans*.

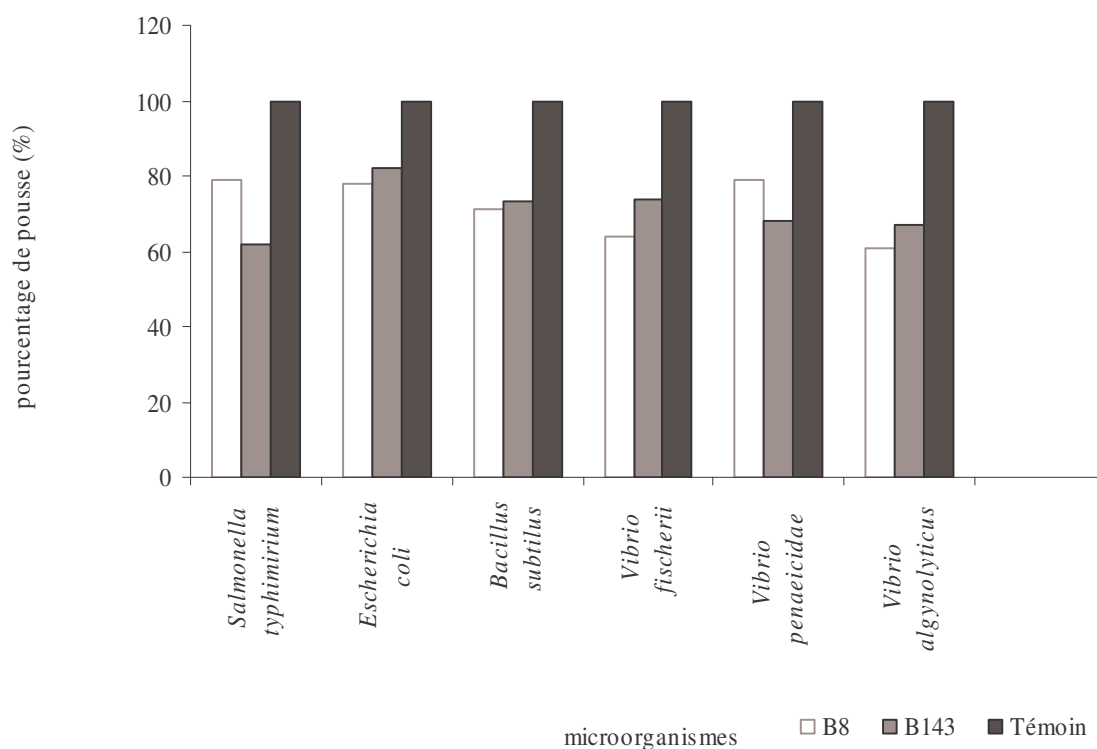


Figure 12 : Effet de la fraction volatile de l'huile pure (B8 et B 143) en microplaques contenant de l'huile essentielle et de suspension bactérienne

La fraction volatile de l'huile inhibe la croissance de tous les microorganismes testés par rapport au témoin (cupule sans huile). Ceci nous amène à utiliser des tubes isolés pour les tests *in vitro* des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de *C. fragrans*

#### IV.3.2. Influence de la concentration des agents émulsifiants (Tween 20, Tween 80, DMSO et Triton X 100) sur les croissances des bactéries.

Les figures suivantes (13 ; 14 ; 15 et 16) montrent les croissances de *Salmonella typhimirium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio fischeri*, *V. penaeicidae*, *V. alginolyticus* à différentes concentrations d'agent émulsifiant (Tween 20, Tween 80, DMSO et Triton X 100).

Les émulsifiants ont été testés de manière à pouvoir choisir celui qui n'a pas d'effet sur la croissance des microorganismes.

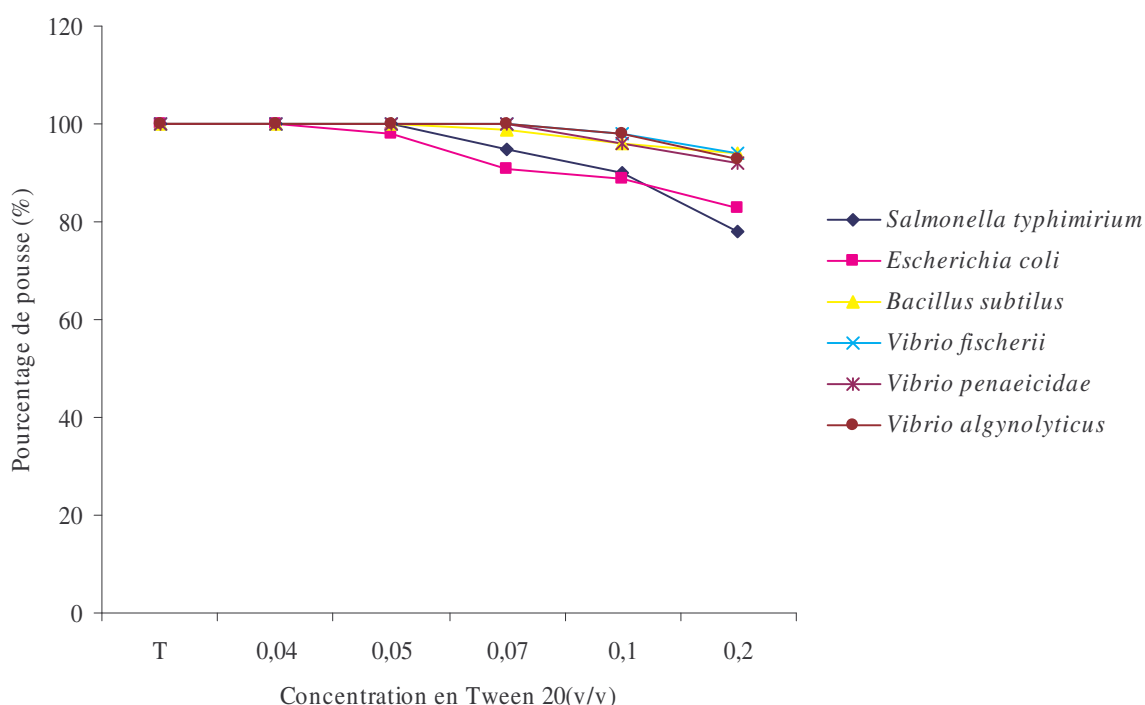


Figure 13: Effet de la concentration en Tween 20 (v/v) sur les croissances des microorganismes en pourcentage de pousse (%) par rapport au témoin (T) sans Tween 20.

Cette figure montre que la croissance des bactéries est inhibée lorsque la concentration de Tween 20 est supérieure à 0,04 (v/v). Pour une concentration de Tween 20 à 0,2 (v/v) cette croissance est respectivement de 78 % pour *S. typhimirium*, 83 % pour *E. coli*, et 92 % pour *V. penaeicidae*, par rapport au témoin sans émulsifiant (100 %). La concentration d'agent émulsifiant a donc une influence sur la croissance des microorganismes.

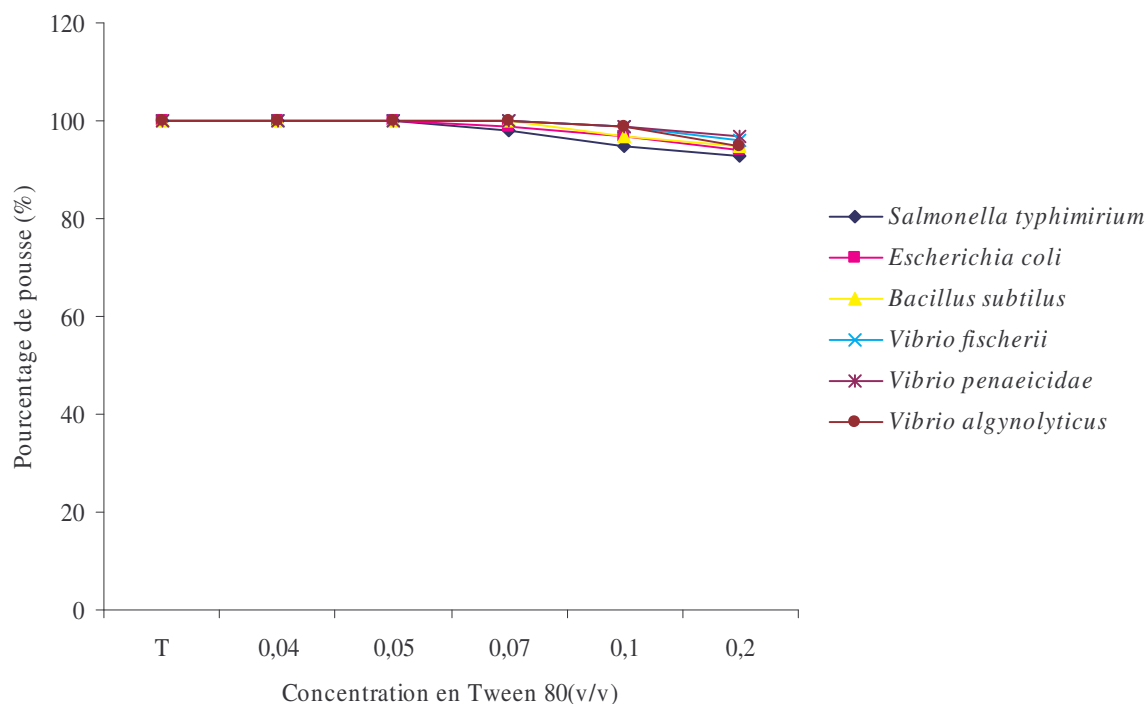


Figure 14 : Effet de la concentration en Tween 80 (v/v) sur les croissances des microorganismes en pourcentage de pousse (%).

Sur cette figure, nous observons que la présence du Tween 80 influe sur la croissance des microorganismes lors que la concentration est supérieure à 0,05 (v/v). Cette croissance est respectivement de 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % pour *S. typhimirium*, *E. coli*, *B. subtilis*, *V. fischeri* et *V. penaeicidae*, ceci à une concentration de 0,2 (v/v) de Tween 80.

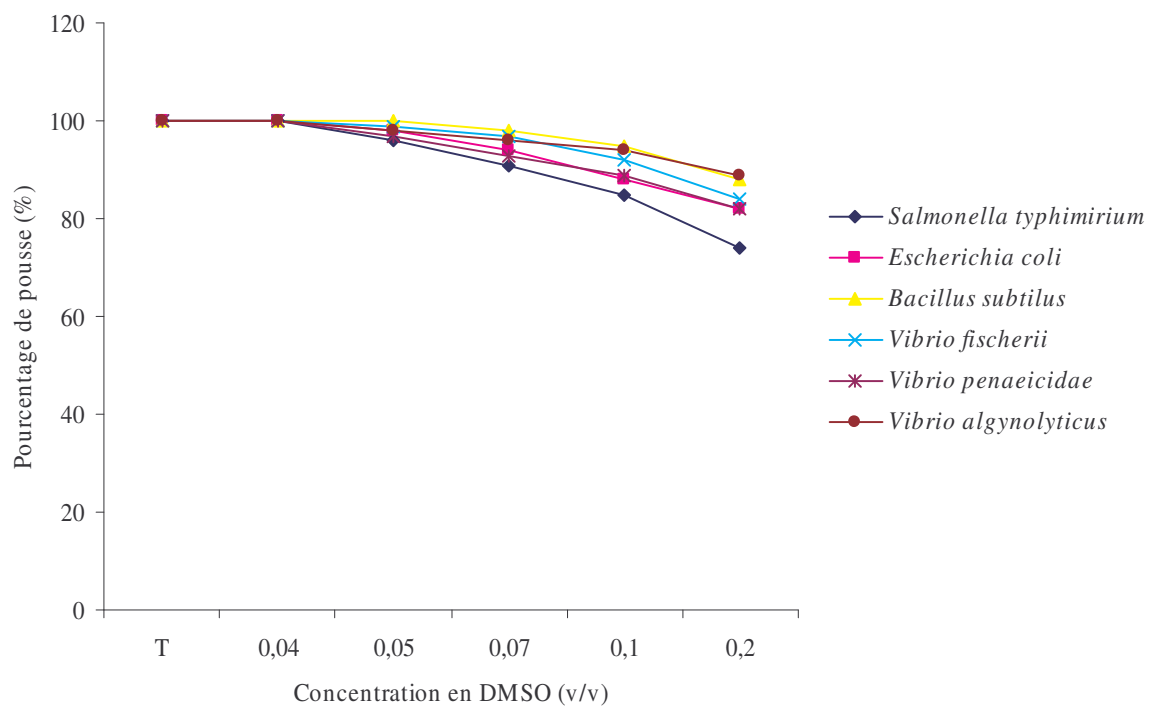


Figure 15: Effet de la concentration en DMSO (v/v) sur les croissances des microorganismes en pourcentage de pousse (%).

La DMSO a une répercussion sur la croissance des microorganismes lors que sa concentration est supérieure à 0,04 (v/v). En effet, elle inhibe à 74 %, 82 % et 84 % la croissance de *S. typhimurium*, *E. coli* et *V. fischeri* respectivement, correspondant à une concentration de DMSO à 0,2 %.

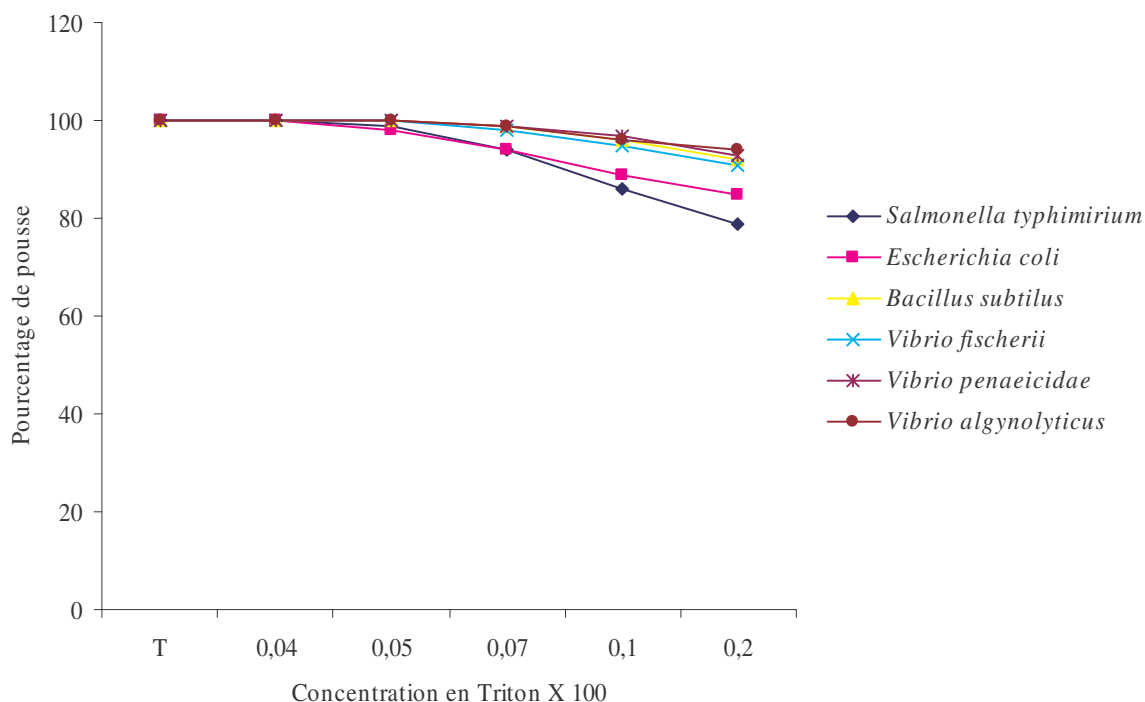


Figure 16 : Effet de concentration de Triton X 100 (v/v) sur les croissances des microorganismes en pourcentages de pousse

A une concentration supérieure à 0,04 (v/v), le triton X 100 inhibe la croissance de microorganismes testés, celles des *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. subtilis*, *V. fischeri*, *V. penaeicidae* et *V. alginolyticus* correspondant respectivement à 79, 85, 92, 91, 93 et 94 %.

D'une manière comparative, ces quatre émulsifiants ont tous une influence sur la croissance de tous les microorganismes testés à des concentrations 0,1 et 0,2 (v/v). Par contre, le Tween 20 et Tween 80 n'ont pas d'effet sur les croissances des *V. fischeri*, *V. penaeicidae*, *V. alginolyticus* à une concentration de 0,07(v/v) ; il en est de même pour le Tween 80 sur *B. subtilis*. Par ailleurs, à une concentration 0,04(v/v), ces émulsifiants n'ont aucune influence sur les croissances des microorganismes testés. A cause de son effet sur les microorganismes, le Tween 80 a été choisi comme émulsifiant.

#### .IV.3.3. Identification des isolats de larves et de l'eau d'élevage de l'écloserie

Chaque jour, pendant les 18 jours à partir d'échantillons (eau et larves) et avec les *trois* à cinq colonies isolées sur gélose TCBS, 80 souches ont été finalement purifiées par stries successives sur gélose TCBS. Le tableau ci-dessous nous montre l'identification préliminaire des isolats des larves et de l'eau d'élevage *par coloration de Gram* avec le kit de réactifs « Color Gram2-E » (Biomérieux), le test d'oxydase avec le kit « oxydase reagent 55635 » (Biomérieux), le test catalase avec le kit (« ID color catalase ID-ASE », Biomérieux).

Tableau 5 : Caractéristiques des isolats des larves et de l'eau d'élevage de l'écloserie.

Espèces	Gram	Oxydase	Catalase
<i>Vibrio hollisae</i>	-	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	+	+
<i>Vibrio damsella</i>	-	+	+
<i>Vibrio</i> spp	-	+	+
<i>Bacillus pumulus</i>	+	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+
<i>Micrococcus</i> spp	+	+	+

Les bactéries gram négatives ont ensuite été identifiées avec le kit API System (Biomérieux Marcy l'Etoile. France): API 20NE pour les bacilles gram négative oxydase positif (non entérobactéries). Les gram positives isolats ont été identifiés par l'Institut Pasteur de Lille (Lille, France) en utilisant l'API 50CHB de *Bacillus* spp. et APISTAPH pour *Micrococcus* spp Les répartitions des isolats sont montrées au tableau suivant.

Tableau 6 : Répartition des souches isolées de l'eau d'élevage (n=32) et des larves (n=48)

Espèces	Eau		Larves	
	Nb des souches isolés	(%)	Nb des souches isolés	(%)
<i>Bacillus pumilus</i>	3	9	1	2
<i>Bacillus cereus</i>	2	6	1	2
<i>Bacillus subtilis</i>	2	6		
<i>Micrococcus spp</i>	4	13		
<b>total Gram positive</b>		<b>34</b>		<b>4</b>
<i>Vibrio hollisae</i>	2	6	7	15
<i>Vibrio alginolyticus</i>	7	22	13	27
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	6	5	10
<i>Vibrio vulnificus</i>	3	9	6	13
<i>Vibrio damsella</i>	2	6	4	8
<i>Vibrio spp</i>	5	16	11	23
<b>total Gram negative</b>		<b>66</b>		<b>96</b>
<b>Total des souches isolés</b>	<b>32</b>		<b>48</b>	

A l'issue des prélèvements de l'eau d'élevage, 32 souches ont été isolées dont 34 % sont des gram positives et tous les gram négatives sont des *Vibrio* spp. Pour les prélèvements larvaires, nous avons isolé 48 souches dont 96 % sont des gram négatives et sont tous des *Vibrio* spp.

#### IV.3.4. Détermination de CMI et CMB de *C. fragrans* avec des souches de référence et les souches isolées de l'écloserie.

Les tableaux 7 et 8 montrent l'activité de l'huile essentielle B8 en provenance de Tsaramandroso et celle de B143 issue de Mariarano ; elles sont comparées par rapport à leur composé majoritaire, respectivement le linalol et le 1,8-cinéole pure, vis-à-vis de souches de référence et de souches isolées de l'écloserie.



Tableau 7 : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles B8 et B143 provenant de Tsaramandroso (altitude) et Mariarano (littoral) respectivement et du linalol et de 1,8-cinéole purs vis-à-vis de différents microorganismes (Souches de références).

	Linalool		1,8-cineole		B8		B143	
					Tsaramandroso		Mariarano	
					(95.8% linalool)		(71.6% 1,8-cineole)	
	CMI mg/ml	CMB mg/ml	CMI mg/ml	CMB mg/ml	CMI mg/ml	CMB mg/ml	CMI mg/ml	CMB mg/ml
Gram positive								
<i>Micrococcus luteus</i>	5.88a	11.75b	11.75b	11.75b	5.88a	5.88a	11.75b	11.75b
<i>Bacillus subtilis</i>	0.18a	0.18a	0.37b	0.73c	0.18a	0.18a	0.37b	0.73c
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.18a	0.18a	0.37b	0.73c	0.18a	0.18a	0.37b	0.73c
Gram négative								
<i>Salmonella typhimurium</i>	2.93a	5.88d	11.75c	11.75b	5.88d	5.88d	2.93a	5.88d
<i>Escherichia coli</i>	1.47a	1.47a	2.93b	2.93b	1.47a	2.93b	1.47a	1.47a
<i>Vibrio fischeri</i>	0.73a	1.47b	1.47b	1.47b	0.73a	0.73a	0.73a	0.73a
<i>Vibrio anguillarum</i>	1.47a	2.93b	2.93b	2.93b	1.47a	1.47a	1.47a	1.47a
<i>Vibrio harveyi</i>	1.47a	2.93b	2.93b	2.93b	1.47a	1.47a	1.47a	1.47a
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.47a	1.47a	5.88c	5.88b	2.93b	2.93b	1.47a	1.47a
<i>Vibrio penaeicidae</i>	0,18a	0,18a	2.93b	2.93b	2.93b	2.93b	0,18a	0,18a
<i>Vibrio splendidus</i>	5,88b	5,88b	2,93a	5,88b	2,93a	5,88b	5,88b	5,88b
Champignon								
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.93a	ND	2.93a	ND	5.88b	ND	5.88b	ND

CMI : Concentration Minimum Inhibitrice.

CMB : Concentration Minimum Bactéricide.

Les valeurs suivies de lettre sont significativement différentes par le test de Fisher LSD (p=0,05)

ND : Non déterminé.

Le tableau 7 montre l'activité de l'huile essentielle et de ses composants majoritaires (Linalol et 1,8-cinéole) sur des souches de références.

Les valeurs des CMI varient de 0,18 à 5,88 mg / ml, pour l'échantillon de B8 (95.8 % linalol) et de 0,37 à 11,8 mg / ml pour le B143 (71,6 % 1,8-cinéole). Parmi les souches de bactéries gram positives, *Micrococcus* spp. s'avère être la souche la plus résistante à B8 et B143. Par contre, au niveau des bactéries gram négatives, les souches les plus résistantes sont : *V. alginolyticus* et *V. vulnificus* à B8; et *V. parahaemolyticus* et *V. splendidus* à B143. Quant à B8, elle est plus active que B143 contre *V. parahaemolyticus* et moins active contre *V. alginolyticus*. Cependant, B143 se montre beaucoup plus active contre *V. penaeicidae*.

Dans la plupart des cas, les valeurs de la CMB pour B8 et B143 étaient équivalentes aux valeurs de CMI (effet bactéricide), sauf pour B8 contre *E. coli* et pour B143 contre *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. et *Staphylococcus* spp. dont les valeurs CMB étaient plus élevées que les valeurs CMI (effet bactériostatique). Les deux huiles B8 et B143 montrent des valeurs de CMI plus faibles contre deux bactéries gram positives (*B. subtilis* et *S. aureus*). En général, les échantillons de *C. fragrans* présentaient des valeurs similaires de CMI contre toutes les bactéries gram positives que leurs composants majeurs purs respectifs, linalol et 1,8-cinéole. Les CMI de B143 est plus faibles contre toutes les souches gram négatives testées par rapport au composé pur 1, 8-cinéole. B8 montre des valeurs de CMI plus élevées que le linalol pur contre *S. typhimurium* et *V. alginolyticus*, et la valeur de CMI est semblable à celle du linalol contre les autres souches de bactéries gram négative. Les deux huiles essentielles ont montré des valeurs CMI plus élevées contre le champignon *F. oxysporum* que leur constituant majeur pur respectif.

Tableau 8: Activités antimicrobiennes des huiles essentielles B8 et B143 provenant de Tsaramandroso (altitude) et Mariarano (littoral) respectivement et du linalol et 1,8-cinéole purs vis-à-vis de souches bactériennes isolées de l'écloserie.

					B8		B143	
	Linalool		1,8-cinéole		Tsaramandroso		Mariarano	
					(95,8% linalool)		(71,6% 1,8-cinéole)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
<b>Gram positive</b>								
<i>Bacillus pumulus</i>	0,18 a	0,18 a	0,37 a	0,73 a	0,18 a	0,18 a	0,37 a	0,73 a
<i>Bacillus cereus</i>	1,47 c	1,47 b	1,47 b	2,93 b	0,73 b	1,47 b	1,47 c	2,93 c
<i>Bacillus subtilis</i>	0,18 a	0,18 a	0,37 a	0,73 a	0,18 a	0,18 a	0,37 a	0,73 a
<i>Micrococcus spp</i>	5,88 d	11,75 d	11,75 d	11,75 d	5,88 d	5,88 d	5,88 e	11,75 e
<b>Gram négative</b>								
<i>Vibrio hollisae</i>	0,73 b	1,47 b	2,93 c	2,93 b	0,73 b	1,47 b	0,73 b	0,73 a
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0,73 b	1,47 b	2,93 c	2,93 b	5,88 d	11,75 e	2,93 d	2,93 c
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5,88 d	5,88 c	2,93 c	5,88 c	2,93 c	2,93 c	5,88 e	5,88 d
<i>Vibrio vulnificus</i>	5,88 d	5,88 c	5,88 c	5,88 c	5,88 d	5,88 d	2,93 d	2,93 c
<i>Vibrio damsella</i>	1,47 c	1,47 b	2,93 c	2,93 b	2,93 c	2,93 c	1,47 c	1,47 b
<i>Vibrio spp</i>	5,88 d	5,88 c	1,47 b	2,93 b	2,93 c	5,88 d	1,47 c	2,93 c

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

Les valeurs suivies de lettre sont significativement différentes par le test de Fisher LSD (p=0,05)

\* : CMI<CMB

Les valeurs des CMI varient de 0,18 à 5,88 mg / ml, pour l'échantillon de B8 (95,8 % linalol) et de 0,37 à 5,88 mg / ml pour le B143 (71,6 % 1,8-cinéole) (tableau 8).

Les valeurs de la CMB pour B8 (95,8 % linalol) sont équivalentes aux valeurs de la CMI (effet bactéricide) pour *Bacillus pumulus*, *B. subtilis*, *Micrococcus spp.*, *Vibrio penaeicidae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. damsella*. L'échantillon B 143 (71,6 % de 1,8-cinéole) a été bactéricide pour *V. penaeicidae*, *V. splendidus*, *V. hollisae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. damsella* (tableau 8). Parmi les souches de bactéries gram positives, *Micrococcus spp.* a été la souche la plus résistante à la fois pour B8 et B143. Parmi les bactéries gram négatives, les souches les plus résistantes ont été *V. alginolyticus* et *V. vulnificus* pour B8 et *V. parahaemolyticus* et *V. splendidus* pour B143. B8 a été plus actif que le B143 vis-à-vis de *V. parahaemolyticus* et moins actif vis-à-vis *V. alginolyticus*. B143 a été la plus active contre *V. penaeicidae*. Pour les souches isolées de la ferme de crevette (ou de l'écloserie), B8 et B143 ont montré des CMI inférieures contre *B. pumulus* et *B. subtilis*. En général, les échantillons d'huile essentielle de *C. fragrans* ont montré des différences contre la majorité des souches que leur constituant majeur pur respectif, le linalol et le 1,8 cinéole. B8 et B143 ont montré une CMI supérieure à celles du linalol et du 1,8-cinéole respectivement contre *V. alginolyticus* et *V. parahaemolyticus*. Pour les souches isolées de la ferme, les *Bacillaceae* ont été plus sensibles que les *Vibrionaceae*.

#### **IV.3.5. Résultats *in vivo* de l'application de l'huile essentielle de *C. fragrans* et de l'antibiotique (Erythromycine) en crevetticulture.**

Dans ces résultats, nous avons montré les résultats moyens obtenus lors de test de toxicité avec des concentrations allant de 0 à 1000 mg/ml d'huiles essentielles de *C. fragrans*, les résultats des tests de concentrations en émulsifiants et l'évolution des concentrations bactériennes sont présentés. Ainsi les survies des larves lors de l'utilisation des huiles essentielles de *C. fragrans* et de l'antibiotique (Erythromycine) ont été montrées.

#### IV.3.5.1. Résultats du test de toxicité (DL50) des quatre stades larvaires de *P. monodon* avec l'huile essentielle de *C. fragrans* (B8 et B 143).

Avec les concentrations des huiles essentielles allant de 0 à 1000 mg/ml, les moyennes de dose létale 50 obtenues à chaque stade (nauplius, zoé, mysis et post-larve) sont données dans le tableau 9.

Tableau 9 : Concentration létale DL50 des larves de *P. monodon* exposées à des huiles essentielles de *C. fragrans* (B8 et B143).

Valeur de la DL50 (mg/ml) pendant 24h avec 95% de limite de confiance		
Concentration (mg/ml) *		
Stade	B8	B143
Nauplii	856,75	856,25
Zoé	859,00	890,5
Mysis	864,75	892,5
Post-larves	867,5	902,25

\* Moyenne de deux répétitions.

Pour l'effet stade, on constate qu'il existe:

- pour B143: une différence significative entre les DL50 de différents stades
- Les valeurs des DL50 Nauplius < Zoé, Mysis < Post -larve
- pour B8: il n'y pas de différence de toxicité entre les stades.

Pour l'effet huile, on constate qu'il existe:

- une différence significative entre les DL50
- la DL50 de B8 est significativement inférieure à celle de B143

La moyenne de DL 50 de B8 est de 862,000 mg/ml et celui de B143 est 885,375 mg/ml. La DL50 de B8 est significativement inférieure à celle de B143.

Les tests de toxicité des huiles B8 et B143 avec le nauplius, zoé, mysis et post larves ont montré que la valeur moyenne de la DL50 a été significativement inférieure pour B8 (863 mg/ml) que pour B143 (885 mg/ml) ( $p < 0.05$ , Fisher LSD).

#### **IV.3.5.2. Effet de l'utilisation de l'huile essentielle de *C. fragrans* et de l'antibiotique (Erythromycine) sur les larves et l'eau d'élevage larvaire**

Le dénombrement des bactéries totales sur agar marine et le dénombrement sur TCBS du jour d'ensemencement N1 (jour 0) jusqu'à PL 8 (jour 18) ont été faits, les concentrations bactériennes dénombrées à partir des larves et de l'eau d'élevage traitée avec B8, B143 et antibiotique (E) ont été significativement plus faibles ( $p < 0,05$ ) que celles du témoin (Fig. 17, 18, 19, 20).

La survie des larves a été significativement plus élevée pour chaque traitement que celle du témoin (Fig. 21).

L'utilisation d'un émulsifiant (Tween 80) n'a pas eu d'effet significatif sur la concentration de bactéries dans les larves et sur leur taux de survie ( $p > 0,05$ ) (Fig. 21) de même sur les concentrations des bactéries dans l'eau d'élevage (Fig. 23).

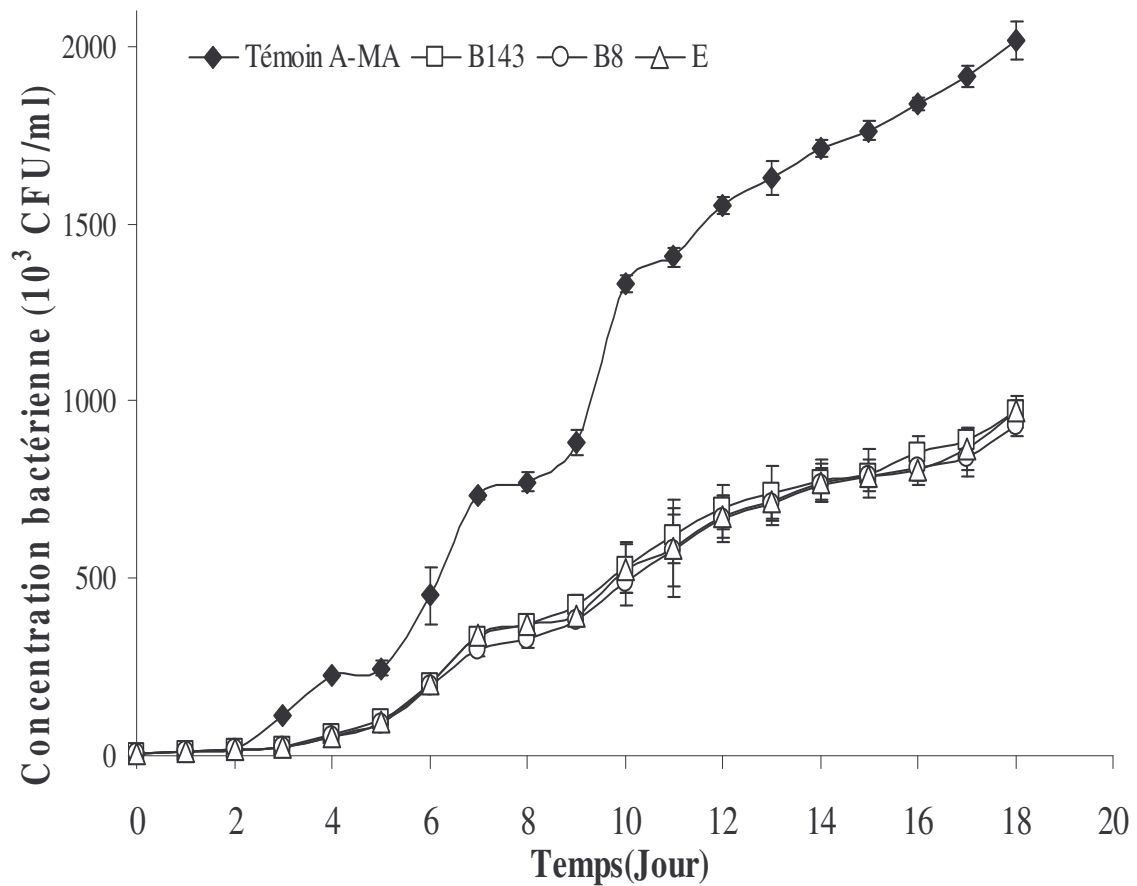


Figure 17 : Evolution de la concentration bactérienne en cfu/ml obtenue sur agar marine avec des prélèvements larvaires de *P. monodon* pendant 18 jours de culture avec le témoin (sans huile essentielle ni antibiotique) et pour les tests utilisant des huiles essentielles de *C. fragrans* (B8 et B143) et l'érythromycine (E). Valeurs correspondant à la moyenne de quatre répétitions ( $n = 4 \pm sd$ ).

Sur cette figure, des différences significatives ont été observées entre le témoin et les traitements (B8, B143, E) avec le test de *Kruskal-Wallis* ( $p < 0.05$ ) alors qu'il n'y a pas de différence entre les trois traitements B8, B143 et E ( $p > 0.05$ ).

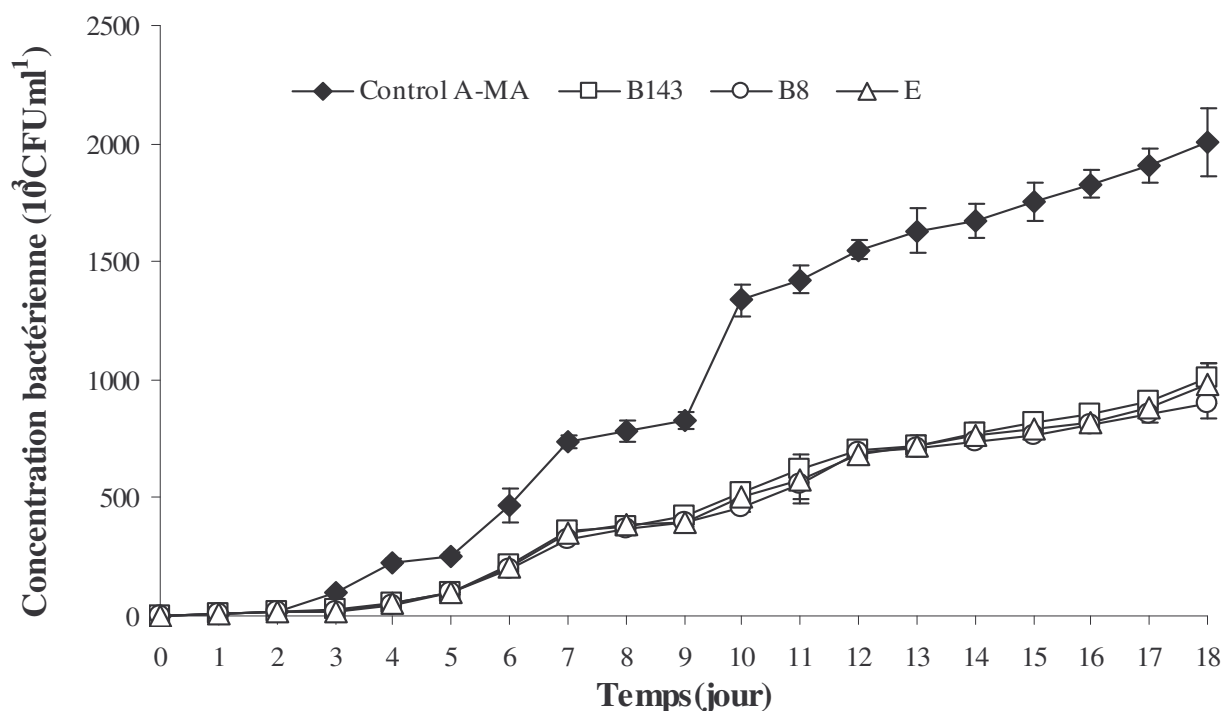


Figure 18 : Evolution de la concentration bactérienne en cfu/ml obtenue sur agar marine avec des prélèvements d'eau d'élevage de *P. monodon* pendant 18 jours de culture avec le témoin (sans huile essentielle ni antibiotique) et pour les tests utilisant des huiles essentielles de *C. fragrans* (B8 et B143) et l'érythromycine (E). Valeurs correspondant à la moyenne de quatre répétitions ( $n = 4 \pm sd$ ).

Entre les traitements B8, B143 et E, il n'y a pas de différence significative  $p > 0.05$ . Par contre des différences significatives ont été constatées entre le témoin et les traitements (B8, B143, E) avec le test de *Kruskal-Wallis*  $p < 0.05$ .



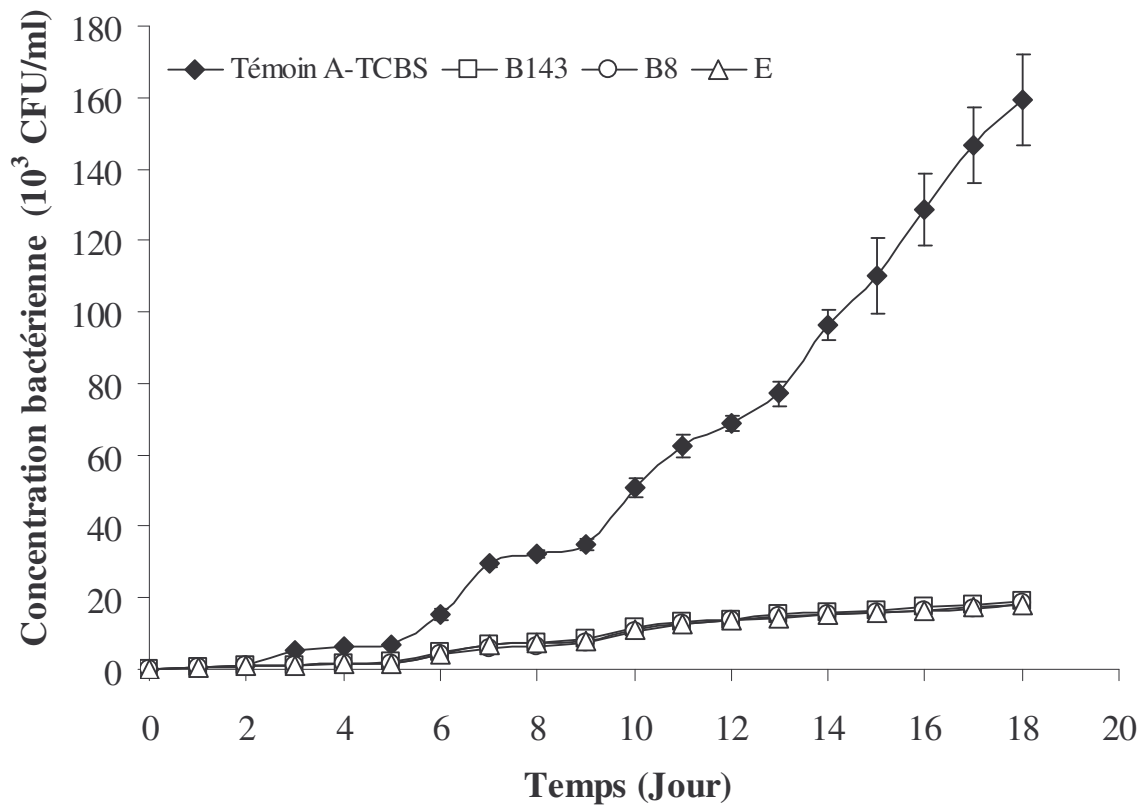


Figure 19 : Evolution de la concentration bactérienne (cfu/ml) obtenue sur TCBS avec des prélèvements larvaires de *Penaeus monodon* pendant 18 jours de culture avec le témoin (sans huile essentielles et antibiotiques) et pour les tests utilisant des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* (B8 et B143) et l'érythromycine (E). Valeurs correspondant à la moyenne de quatre répétitions ( $n = 4 \pm sd$ ).

Il n'y a pas eu de différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les trois traitements, B8, B143 et E.

Pour chacun des traitements (B8, B143, E) et pour le témoin A, une corrélation significative a été observée entre les concentrations bactériennes des prélèvements larvaires et les prélèvements d'eau d'élevage, avec des coefficients de corrélation importants ( $r > 0,90$ ) et  $p < 0,05$  pour chacune des traitements ( $p < 0,02$ ).

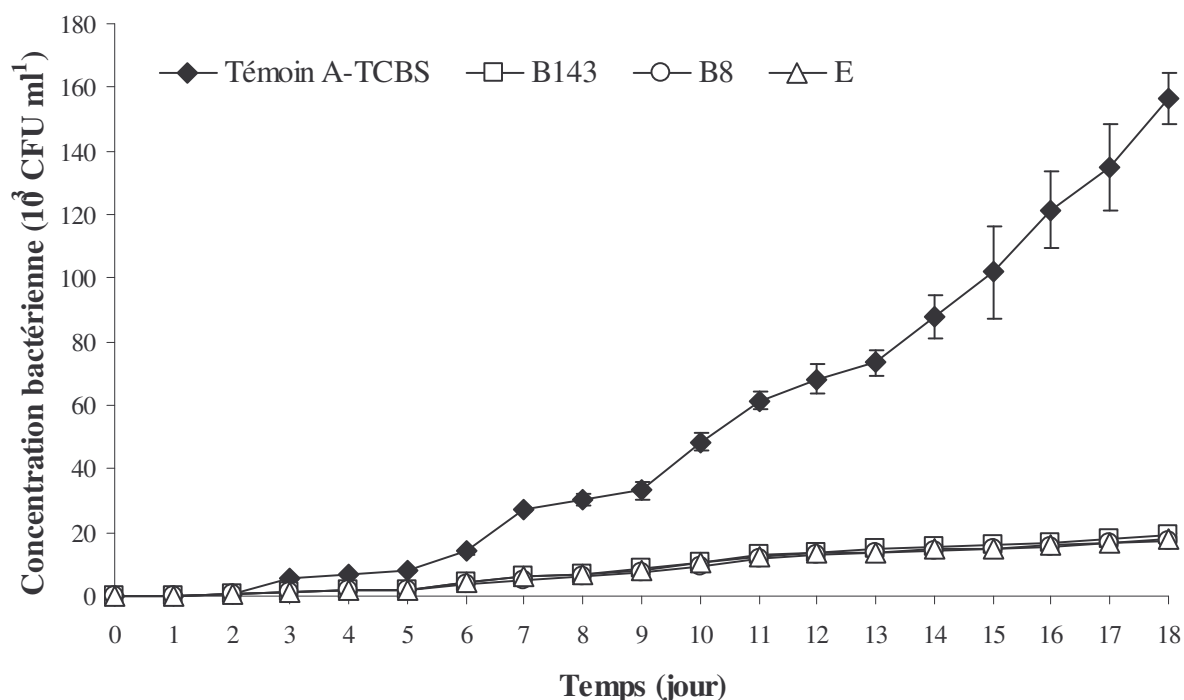


Figure 20 : Evolution de la concentration bactérienne (cfu /ml) obtenue sur TCBS avec des prélèvements d'eau d'élevage larvaire de *P. monodon* pendant 18 jours de culture avec le témoin (sans huile essentielle et antibiotiques) et pour les tests utilisant des huiles essentielles de *C. fragrans* (B8 et B143 sans Tween) et l'érythromycine (E). Valeurs correspondant à la moyenne de quatre répétitions ( $n = 4 \pm sd$ ).

La concentration bactérienne d'eau d'élevage larvaire traités avec B8 et B143 sans Tween et l'antibiotiques (E) ont été significativement plus faible ( $p < 0,05$ ) que celle du témoin. En outre, il n'y avait pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) entre les trois traitements avec B8, B143 sans Tween et l'antibiotique (E).

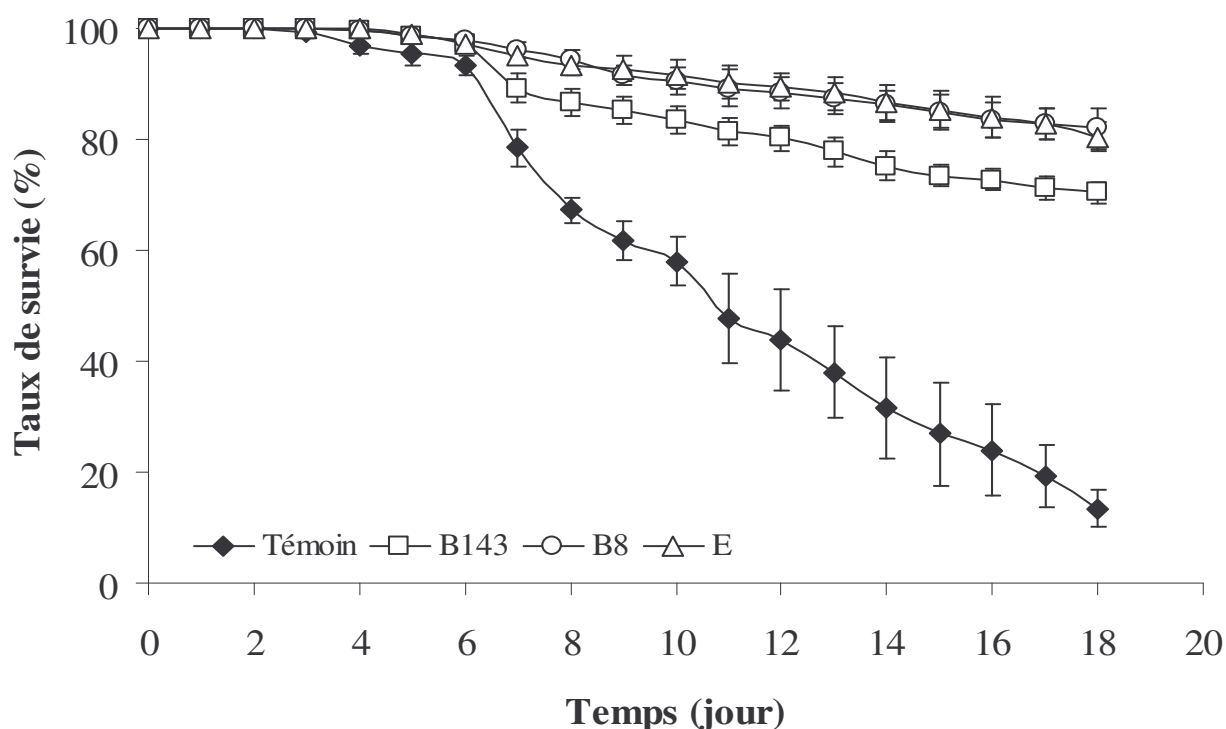


Figure 21 : Evolution du taux de survie (%) de larves de *P. monodon* pendant 18 jours de culture pour le témoin (sans huile essentielle et antibiotiques) et pour les tests utilisant des huiles essentielles de *C. fragrans* (B8 et B143) et l'érythromycine (E). Les valeurs correspondent à la moyenne de quatre répétitions ( $n = 4 \pm sd$ ).

La survie des larves a été significativement plus élevée dans chaque traitement que celle du témoin (Fig. 21). Le test *Kruskal-Wallis* a montré que les effets de B8 et B143 ont été significativement différents ( $p < 0,05$ ), et que les effets de l'antibiotique (E) et B8 ne sont pas significatifs ( $p > 0,05$ ). Pour les trois traitements, B8, B143 et E, la survie des larves de *P. monodon* à PL 8 a atteint respectivement 82,6 %, 69,3 % et 80,5 %, tandis que celle de l'essai témoin n'a pas dépassé 15,1 %.

Une corrélation significative a été observée entre les concentrations bactériennes des larves (bactéries totales sur agar marine et vibrions sur TCBS) et le taux de survie à tous les stades larvaires. Par exemple, la corrélation entre le taux de survie des larves à M3 (jour 9), PL1 (jour 11) et PL3 (jour13) et leur concentration bactérienne respectives sur TCBS a montré une corrélation négative significative ( $r = -0,97$ ,  $-0,97$  et  $-0,98$  respectivement,  $p < 0,05$ ). Concernant l'effet du Tween 80, l'utilisation de l'huile essentielle avec ou sans tween durant les 18 jours de culture montre une  $p\text{-value} > 0,05$  c'est-à-dire que la différence entre l'utilisation de l'huile essentielle en présence ou en absence de tween n'est pas significative.

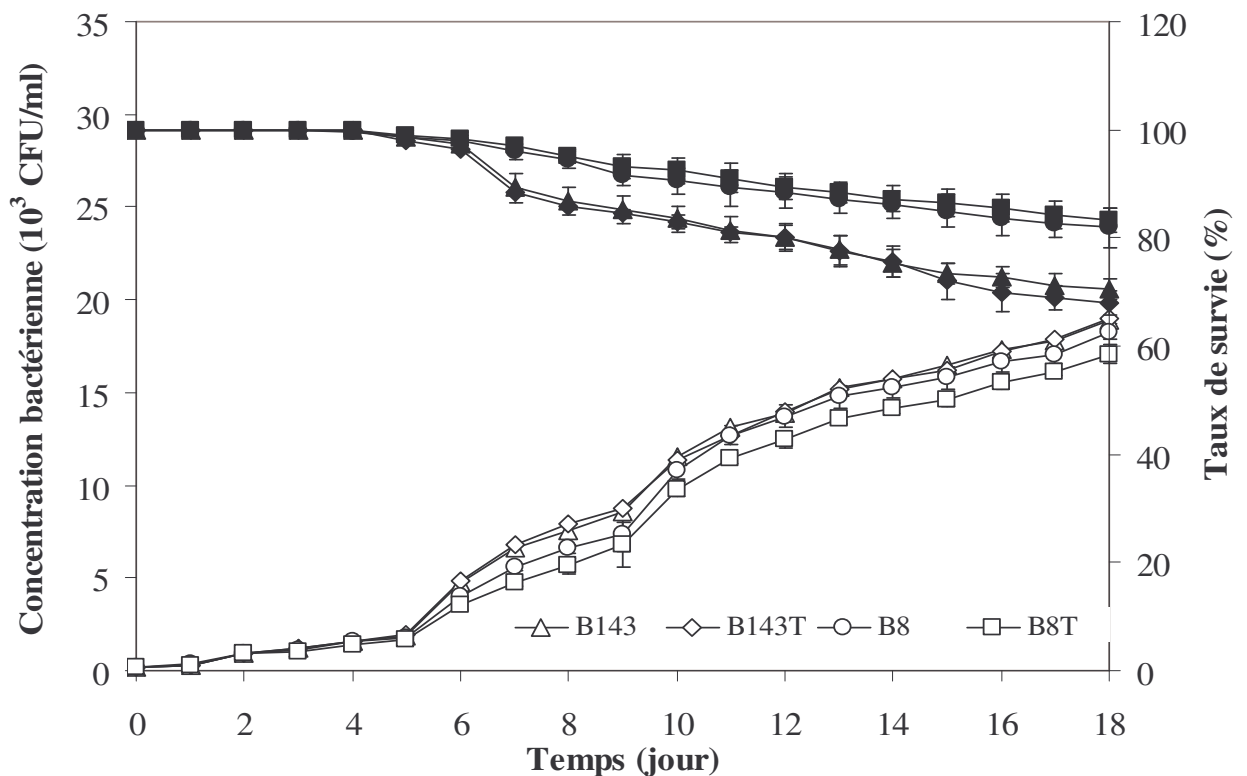


Figure 22 : Evolution de la concentration bactérienne (cfu/ml) des prélèvements larvaires et le taux de survie (%) de larves de *P. monodon*, pour les essais utilisant des huiles essentielles de *C. fragrans* avec Tween 80 (B8T, B143T) et sans Tween 80 (B8, B143). Le symbole blanc correspond à la concentration bactérienne (cfu/ml), et noir pour le taux de survie (%).

Aucune différence significative n'est constatée entre B8/B8T et B143/B143T ( $p > 0,05$ ). Dans tous les tests, l'utilisation de l'émulsifiant tween 80 n'a pas eu d'effet significatif sur la concentration bactérienne dans les larves et leur taux de survie ( $p > 0,05$ ).

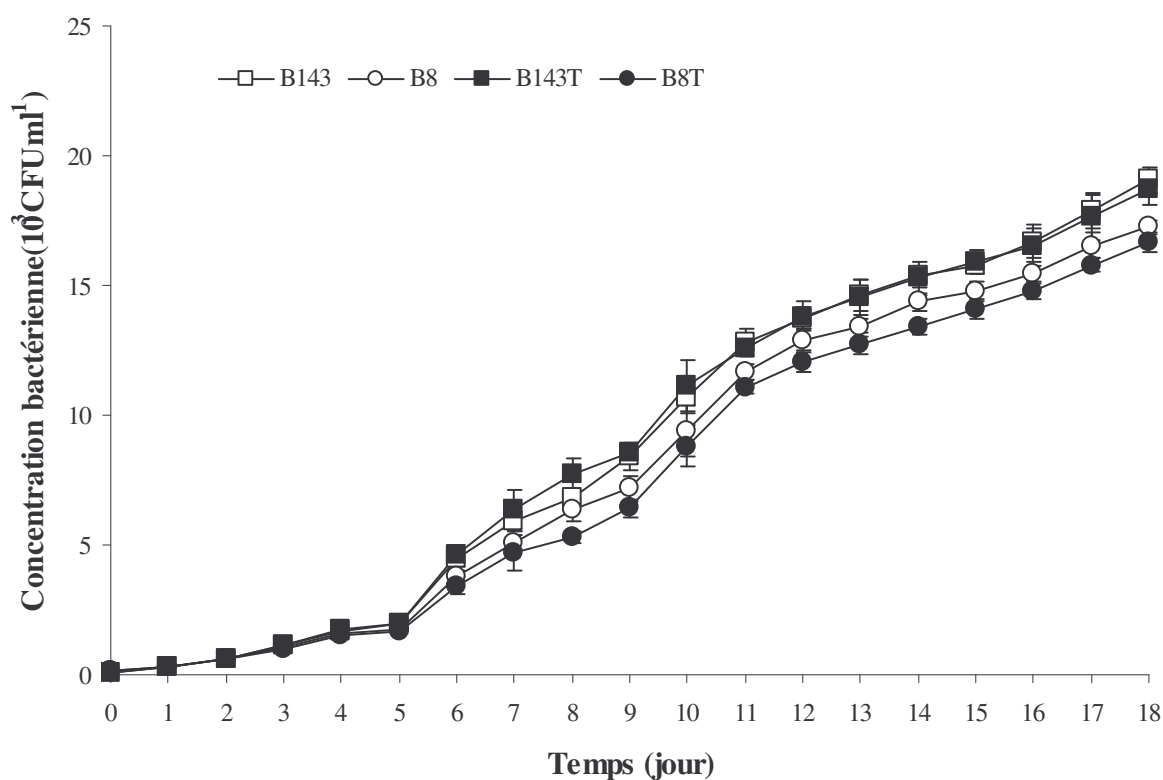


Figure 23 : Evolution de la concentration bactérienne (cfu/ml) des prélèvements d'eau d'élevage larvaire de *P. monodon*, pour les essais utilisant des huiles essentielles de *C. fragrans* avec tween 80 (B8T, B143T) et sans tween 80 (B8, B143). Symbole blanc pour la concentration bactérienne (cfu/ml) obtenue avec (B8, B143) sans Tween 80, et noir obtenue avec les huiles essentielles (B8T, B143T) avec Tween 80.

Sur cette figure, l'utilisation d'un émulsifiant (Tween 80) n'a pas eu d'effet significatif sur la concentration de bactéries dans l'eau d'élevage larvaire.

## V.DISCUSSION

Nous avons ainsi prouvé que le rendement en huile essentielle dépend de la saison de récolte (Sivropoulou, Nikobu, Papanikolaou, Kokkini, Lanaras & Arsenakis, 1997). Pendant la saison de pluie, la teneur en essence de la plante diminue. La sève est diluée et la lumière est insuffisante. Le rendement en huiles essentielles obtenu à Mariarano ne montre pas de différences depuis 2005 jusqu'en 2007 ; de même pour Tsaramandroso alors que cette différence des rendements en huile essentielle est observée entre les deux endroits. Ceci est en accord avec Gil, Ghera & Leicach (2000) qui ont montré qu'il n'y a pas de différences des rendements en huile essentielle de *Tagetes minuta* depuis 1995 jusqu'en 1997 récoltés à Buenos Aires et à Mendoza alors qu'il y a des différences entre les rendements de deux régions. Il n'y a pas de corrélation entre les biomasses aériennes et les rendements en huiles essentielles (Gil et al., 2000).

Les résultats de la composition chimique de l'huile essentielle de *C. fragrans* sont proches des travaux décrivant d'autres huiles essentielles, dans lesquels les composants majeurs peuvent représenter jusqu'à 95 % de l'huile essentielle, alors que les autres composants sont présents en faible quantité (Bauer, Garbe & Surburg, 2001). Citons comme exemple les compositions chimiques des huiles essentielles de romarin et de sauge : elles ont été également caractérisées par la présence prédominante de 1,8-cinéole, à hauteur de 88,9 % et 78 % respectivement (Daferera, Ziogas & Polissiou, 2000). La littérature a montré que de nombreux facteurs, tels que l'origine géographique, les facteurs génétiques, le matériel végétal et la saison au cours de laquelle les plantes ont été récoltées peuvent être à l'origine des variations de la composition chimique d'une l'huile essentielle (Sivropoulou et al., 1997). Andrianoelisoa, Menut, Chatelperron., Sarraco, Ramanoelina & Danthu, 2006 ont ainsi décrit plusieurs chémotypes figurant dans les huiles essentielles de *Ravensara aromatica*. Faleiro et al. en 2003 ont montré deux grands types d'espèces de *Thymus* sp: l'une riche en linalol (61,4 %) et la seconde riche en linalol (44,4 %) et 1,8-cinéole (37,4 %). (Chang, Chang, Chang & Cheng, 2008) ont signalé la variation des composants majeurs de l'huile essentielle extraite à partir de feuilles de *Cinnamomum osmophloem* dans plusieurs régions du Taiwan. Les constituants principaux étaient le trans-cinnamaldéhyde à 91,3 %, ou l'acétate de cinnamyle (56,4 %), ou le camphre (53,7 %), ou le linalol (95,4 %) selon l'origine géographique. Randrianarivelo (Randrianarivelo et al., 2009) a montré deux types de famille chimique de *C. fragrans* récoltés dans deux régions de Madagascar, les principaux constituants étaient le linalol (95,8 %) et le 1,8-cinéole (71,63 %).

Pour *C. fragrans*, la composition de l'huile essentielle a été très différente entre les deux sites choisis dans cette étude (Mariarano et Tsaramandroso). Nous pouvons noter que ces deux sites représentent la limite altitudinale de l'aire de répartition de *C. fragrans* (Perrier de la Bâthie, 1954). Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur la base de ce travail si la différence des compositions d'huiles essentielles entre Tsaramandroso et Mariarano est d'origine géographique ou environnementale. L'hypothèse d'une variation due à une origine génétique ne peut pas être exclue (ainsi que celle de l'interaction entre le génotype et l'environnement notamment).

Parmi les souches isolées de l'écloserie, *Vibrio* représente respectivement 66 % et 96 % du prélèvement d'eau d'élevage et du prélèvement larvaires.

La famille de Vibrionaceae fait partie de la flore autochtone des organismes marins et l'un des groupes les plus importants dans les environnements marins (tableau 6). Il est reconnu que certaines espèces de *Vibrio* sp sont difficiles à identifier au niveau des espèces en utilisant des caractères biochimiques (Gopal, Otta, Kumar, Karunasagar, Nishibuchi & Karunasagar, 2005). L'espèce *Vibrio* fait partie de la diversité de la communauté dans les étangs de culture de *P. monodon* (Leaño, Lavilla-Pitogo & Paner, 1998; Sung, Li, Tsai, Ting & Chao, 1999). Les *Bacillus* sp, *Micrococcus* sp, *Staphylococcus* sp ont été signalés dans les systèmes d'aquaculture (Nedoluha & Westhoff, 1997), et ont été isolés sur milieu TCBS avec de l'eau d'élevage d'*Artemia* (López-Torres & Lizárraga-Partida, 2001; Kennedy, Venugopal, Karunasagar & Karunasagar, 2006). Les bactéries gram négatives sont le principal groupe isolé des larves et des juvéniles pénéides sains; (Oxley, Shipton, Owens & McKay, 2002 ; Vandenberghe et al., 1998). La domination de la population de *Vibrio* sp dans les larves et leur plus grande résistance aux huiles testées peuvent donner aux espèces résidentes un avantage concurrentiel par rapport au gram positive dans la reproduction des larves, alors que dans l'eau d'élevage larvaire, l'alimentation à l'*Artemia* peut expliquer la présence de bactéries à gram positive plus élevée (Hammed et al, 2004 ; Kennedy et al, 2006). Les plantes sont généralement considérées comme des sources riches en composés sûrs et économiques actifs (Citarasu et al., 2002).

Les principaux éléments constituant les huiles essentielles de *C. fragrans*, 1,8 -cinéole et le linalol sont bien connus pour leurs activités antibactériennes (Knobloch et al., 1989 ; Randrianarivelo et al., 2009 , Randrianarivelo et al., 2010 ; Viljoen et al., 2003). D'autres constituants mineurs ont également été signalés pour leur activité antimicrobienne comme le p-cymène,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, limonène,  $\alpha$ -terpinène,  $\alpha$ -terpinolène, caryophyllène oxyde et camphène (Sökmen et al., 2004). Nos résultats ont montré une activité antibactérienne



supérieure contre les bactéries gram négatives pour le linalol, comparé au 1, 8-cineole, qui est en accord avec d'autres résultats (Faleiro et al., 2003). En général, les échantillons de *C. fragrans* présentaient des valeurs similaires de CMI contre toutes les bactéries gram positives par rapport à leur composant majeur pur respectif, le linalol et le 1,8-cinéole. Des échantillons d'huile essentielle, testés sous forme de mélanges complexes, présentent des activités antimicrobiennes qui diffèrent de celles de leurs principaux composants testés seuls (Delaquis, Stanich, Girard & Mazza, 2002).

Les deux huiles B8 et B143 ont eu des valeurs de CMI plus faibles contre deux bactéries gram positives *B. subtilis* et *S. aureus*. Dans la plupart des travaux publiés, les microorganismes gram positives semblent être plus sensibles aux huiles essentielles que ceux à gram négatives (Dubber & Harder, 2008). Toutefois, cette observation n'est pas toujours confirmée et certaines bactéries gram positives ont été trouvées plus résistantes ou de sensibilité égale aux bactéries gram négatives (Burt, 2004 ; Elgayyar, Draughon, Golden & Mount, 2001 ; Sarter, Kha Nguyen, Hung, Lazard & Montet, 2007). Les bactéries gram négatives possèdent une membrane externe qui joue un rôle pour l'augmentation de la résistance aux éléments hydrophobes (Griffin et al., 1999). Nos résultats en l'occurrence, ont montré que deux souches gram positives sont les plus sensibles : *B. subtilis* et *S. aureus*. Pour les souches isolées de la ferme, les Bacillaceae étaient plus sensibles que les Vibrionaceae. Cependant, *Micrococcus* sp a été la souche la plus résistante à B143 et elle a été aussi plus résistante que *Salmonella typhimurium* à B8. La perméabilité des membranes des bactéries, la présence de pores protéiniques chez les bactéries gram négatives et la distribution intracellulaire des constituants des huiles sont des éléments clés qui influent sur la diffusion et l'action de l'huile essentielle dans la cellule. Bien que les activités antimicrobiennes des huiles essentielles soient bien établies, leur mode d'action est encore mal compris (Baser et al., 2006). Des effets cytotoxiques ont été observés in vitro dans des bactéries gram positives et gram négatives (Burt, 2004). Les terpènes ont été signalés pour provoquer la rupture des membranes de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus* entraînant la fuite des constituants intracellulaires (Andrews, Parks & Spence, 1980 ; Ultee, Kets & Smid, 1999). Le thymol et le carvacrol, deux des principaux composants de l'huile essentielle d'Origan, ont été retrouvés à endommager l'intégrité de la membrane d'*Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (Helander et al., 1998). Cette huile essentielle a perturbé la membrane de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et entraînait des troubles au niveau de l'homéostasie, du pH et l'équilibre des ions inorganiques (Knobloch et al., 1989; Lambert et al., 2001; Ultee et al., 2002). Outre ces effets sur les membranes cellulaires, les composés actifs d'huiles

essentielles comme les terpènes peuvent inhiber les croissances bactériennes. Des effets inhibiteurs impliquant l'absorption du substrat (dysfonction de la membrane) ou de transport des électrons ont également été rapportés (Tassou, Koutsoumanis & Nychas, 2000).

En raison de leur mode d'action touchant plusieurs cibles, l'absence de résistance particulière ou une adaptation aux huiles essentielles ont été décrites jusqu'à présent dans la littérature (Bakkali et al., 2008).

La corrélation négative observée dans les expériences entre la concentration bactérienne et la survie des larves était conforme aux résultats de Regunathan et Wesley (Regunathan & Wesley, 2004). L'inhibition de la croissance bactérienne a confirmé le potentiel des deux origines de *C. fragrans* pour contrôler la charge bactérienne dans des conditions *in vivo* de la culture larvaire. Ce potentiel peut être attribué à leurs effets antimicrobiens comme en témoigne leur faible CMI contre les différents isolats testés. Ceci peut expliquer les variations de l'activité de l'huile essentielle observées sur les différents groupes de bactéries testés. Les huiles essentielles sous forme de mélanges complexes, présentent des activités antimicrobiennes qui diffèrent de celles de leurs principaux composants testés uniquement (Delaquis et al., 2002). En fait, l'activité inhibitrice d'une huile essentielle est le résultat d'une interaction complexe entre ses différents constituants, qui produisent des effets, additif, synergique ou antagoniste, même pour ceux qui sont présents à des concentrations plus faibles (Xianfei, Xiaoqiang, Shunying & Guolin, 2007).

Plusieurs études ont signalé la possibilité d'utiliser des extraits de plantes comme alternative aux antibiotiques dans l'aquaculture et en agriculture biologique en particulier. Abutbul et al. (Abutbul, Golan-Goldhirsh, Barazani & Zilberg, 2004) ont constaté une mortalité similaire entre les tilapia infectés par *Streptococcus iniae* et qui ont été traités avec l'extrait ou la poudre de feuilles de *Rosmarinus officinalis* et ceux traités avec de l'oxytétracycline. Les juvéniles de *Penaeus indicus* nourris avec une alimentation enrichie de plantes terrestres donne une meilleure croissance et survie en inhibant la charge en *V. parahaemolyticus* (Immanuel et al., 2004). L'ajout d'Artémia enrichi aux extraits de plantes *Withania somnifera* et de *Mucuna pruriens* a montré un indice de qualité positive y compris la survie des larves de *P. monodon* (Babu et al., 2008). La protection obtenue par *Dendrilla nigra*, une éponge marine, a été signalée comme étant due à son effet antibiotique contre *V. harveyi* et *V. alginolyticus* plutôt que son influence sur le système de défense de crevettes hôtes (Selvin & Lipton, 2004). D'autres études ont conclu qu'il était inutile d'ajouter des émulsifiants pour l'utilisation des huiles essentielles (Dorman et al., 2000; Lambert et al., 2001). Dans certains cas, les solvants et détergents ont été rapportés avoir un effet antagoniste

diminuant significativement l'activité antibactérienne des huiles essentielles (Remmal, Bouchickhi, Rhayour & Ettayebi, 1993). Le Tween 80 a été rapporté avoir divers effets sur les bactéries à des concentrations aussi faibles que 1 %, 0,5 % et 0,05 % (Hood, Wilkinson & Cavanagh, 2003). Afin de minimiser tout effet négatif du Tween 80, ces auteurs ont recommandé de conserver sa concentration inférieure à 0,05 % dans les tests d'huile essentielle. Toutefois, des études sont nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'action des huiles dont les compositions chimiques sont complexes sur les microorganismes (Lambert et al., 2001).

Il a été rapporté dans la littérature que l'activité inhibitrice d'une huile essentielle résulte d'une interaction complexe entre ses différents constituants. En effet, ceux-ci peuvent produire des effets additifs, synergiques ou antagonistes, même pour ceux qui sont présents à de faibles concentrations (Xianfei et al., 2007). Sibanda (Sibanda et al., 2004) qui ont testé l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de feuilles de *Heteropyxid dehniae* (le linalol étant le composant majeur 58,3 %) contre différentes bactéries et champignons, ils ont trouvé que l'huile présentait des activités plus élevées, similaires ou faibles par rapport au linalol pur, selon le microorganisme testé. Faleiro (Faleiro et al., 2003) ont montré que *E. coli*, sensible au linalol pur, est devenue hautement résistante à un mélange qui contient de linalol et de 1,8-cinéole de rapport (1:1). Savelev et al. (Savelev, Okello, Perry, Wilkins & Perry, 2003) ont étudié *in vitro* les activités anticholinestérasiques de huit constituants terpenoïdes de l'huile commerciale de *Salvia lavandulifolia* (1,8-cinéole, camphore,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, bornéol, caryophyllène oxyde, linalol et l'acétate de bornyle). Ils ont trouvé une synergie mineure entre 1,8-cinéole /  $\alpha$ -pinène et le 1,8-cinéole / oxyde de caryophyllène à des concentrations plus élevées, et un effet antagoniste entre 1,8-cinéole / camphre avec un indice d'interaction de 2.

## VI. CONCLUSION

La flore malgache est l'une des plus riches du monde et possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales. Les huiles essentielles qui en sont extraites constituent des produits à très forte valeur ajoutée qui peuvent contribuer au développement économique de l'île.

D'une manière globale, nous avons constaté que les huiles essentielles sont composés d'un grand nombre de constituants chimiques. La composition de l'huile essentielle que nous avons analysée varie de 88,3 à 99,4%. Nous avons identifiés 57 composants.

Pour les deux échantillons de *Cinnamosma fragrans* originaires de deux régions géographiques de Madagascar, nous avons constaté une variabilité chimique importante de l'huile essentielle, notamment par la présence d'une huile essentielle dominée par la 1,8 cinéole à Mariarano ( $47,3 \pm 10,2\%$ ) dont 71,6% pour 143, mais également d'une huile essentielle riche en linalol à Tsaramandroso ( $72,5 \pm 23,3\%$ ) dont 95,6% pour B8.

La composition d'huile essentielle B8 et B143 riche en linalol et 1,8-cinéole respectivement est confirmée le mois de Février et mois d'août, de 2005 à 2007.

Les rendements sont plus élevés le mois d'août jusqu'à 4,2 ml/100g alors que le mois de février le maximum est de 3,2 ml/100g donc c'est mieux de récolter le mois d'Août.

Les deux échantillons présentaient une forte activité antimicrobienne. Des effets synergiques et antagonistes sont possibles et peuvent se produire avec ces échantillons d'huile contre les bactéries gram négatives et *F. oxysporum*.

Sur la base des ces résultats, l'huile essentielle de *C. fragrans* peut s'avérer être un agent potentiellement antibactérien ou antifongique.

Le test *in vitro* avec l'huile essentielle doit être conduite séparément car l'huile est volatile et inhibe la croissance des microorganismes.

Le tween 80 n'a pas d'influence sur les microorganismes testés quand on utilise à une concentration 0,04 (v/v).

En crevetticulture, le milieu est fortement agité, l'utilisation de tween 80 n'est pas significative.

Le  $DL_{50}$  des huiles B8 et B143 avec le nauplius, zoé, mysis et post larves ont montré que B8 (863 mg/ml) est moins toxique que B143 (885 mg/ml).

Cette étude a démontré également la potentialité de l'huile essentielle de *C. fragrans* de contrôler la charge bactérienne et d'améliorer le taux de survie des larves de *P. monodon*.

En raison de son activité antibactérienne puissante contre *Vibrio sp.*, l'huile essentielle de *C. fragrans* pourrait constituer une option pertinente pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens pour la gestion respectueuse de l'environnement de la maladie causée par des vibrions dans la culture et l'écloserie de crevettes.

Toutefois, pour nos perspectives futures, d'autres études doivent être menées pour déterminer la nature spécifique des agents bioactifs des huiles essentielles de *C. fragrans*.

## VII. Perspectives

La capacité cytotoxique des huiles essentielles sur la base d'une activité prooxydante peut les rendre des excellents antiseptiques et agents antimicrobiens pour usage personnel, c'est-à-dire pour la purification de l'air, l'hygiène de personnel, ou même un usage interne par la consommation par voie orale, pour l'utilisation en insecticide, pour la préservation des cultures ou les stockage des aliments. En outre, certains d'entre eux montrent une capacité antimutagenique qui pourrait bien être liée à une activité anticancérigène. Des études récentes ont démontré que l'activité prooxydante des huiles essentielles ou certains de leurs constituants, de même que celui de certains polyphénols, est très efficace pour réduire le volume des tumeurs locales ou la prolifération des cellules tumorales par apoptose et / ou effets nécrotiques (Carnesecchi et al., 2004; Kachadourian & Day, 2006 ; Yoo et al., 2005 ; Manosroi, Dhumtanom & Manosroi, 2006 ; Salim & Fukushima, 2003 ; Sylvestre, Legault, Dufour & Pichette, 2005 ; Sylvestre, Pichette, Longtin, Nagau & Legault, 2006 ; Wu, Stahl, Hu, Kassie & Mersch-Sundermann, 2006). Sylvestre (Sylvestre et al., 2005, 2006) ont montré que l'huile essentielle de *Myrica gale* a une activité anticancerogène sur le poumon et le cancer des lignées cellulaires du côlon. Salim (Salim et al., 2003) a montré une activité antiproliférative et inhibitrice de la 1,2-diméthylhydrazine induite par le cancer chez le rat par *Nigella sativa*. Manosroi et al. en 2006 ont montré une inhibition de la prolifération de leucémie murine et de lignées cellulaires, carcinome épidermique de la bouche humaine par les huiles essentielles d'*Ocimum sanctum*, *Citrus citratus*, *Alpinia officinarum*, *Lavandula angustifolia*, *Vetiveria zizanioides*, *Zingiber montanum*, *Piper nigrum*, *Cymbopogon nardus*, *Curcuma longa*, *Ocimum basilicum*, *Citrus hystrix*, *Piper betel*, *Albizia lebbek*, *Ocimum americanum*, *Mentha spicata* et *Psidium guajava*. Yoo et al. 2005 a démontré que l'eugénol de *Eugenia caryophyllata* inhibe la prolifération des cellules cancéreuses. Le géraniol inhibe également la prolifération des cellules cancérigènes du côlon en induisant la dépolarisation membranaire et interfère avec les canaux ioniques et les voies de signalisation. Carnesecchi (Carnesecchi et al., 2004) a également démontré que le géraniol inhibe la synthèse de l'ADN et réduit le volume des tumeurs du côlon. De nombreuses cellules tumorales sont caractérisées par de graves changements dans le métabolisme de l'énergie, mitochondriale et la surproduction permanente de stress oxydatif (Czarnecka, Golik & Bartnik, 2006).

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus importante que le développement de « thérapeutique » telles que l'aromathérapie ainsi que la connotation « produit naturel » conduisent à une utilisation souvent abusive de ces extraits. La toxicité des

huiles essentielles est assez démontrée. La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue, on manque de données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérigènes. On connaît mieux les risques de toxicité aiguë liée à l'ingestion massive, en particulier la neurotoxicité des huiles essentielles à thujone (thuya, sauge officinale) ou à pinocamphone.



## Références

1. Abel, G. (1987). Chromosomal damaging effect of  $\beta$ -asarone on human lymphocytes. *Planta Medica*, 53, 251-253.
2. Abraham, D., Francischini, A. C., Pergo, E. M., Kelmer-Bracht, A. M., & Ishii-Iwamoto, E. L. (2003). Effects of  $\alpha$ -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 985-991.
3. Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., & Zilberg, D. (2004). Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 238, 97-105.
4. Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 31-36.
5. Alderman, D. J., & Hastings, T. S. (1998). Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology*, 33, 139-155.
6. Alitonou, G., Avlessi, F., Wotto, V. D., Ahoussi, E., Dangou, J., & Sohounhloue, D. C. K. (2004). Composition chimique, proprietes antimicrobiennes et activites sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1051-1055.
7. American Academy of Microbiology (1999). *Antimicrobial Resistance, an Ecological Perspective*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
8. Anaç, O. (1984). Gas chromatographic analysis on Turkish rose oil. *Perfum. Flavor* 9, 1-14.
9. Andrews, R. E., Parks, L. W., & Spence, K. D. (1980). Some effects of douglasfir terpenes on certain microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(2), 301-304.
10. Andrianoelisoa, H. S., Menut, C., Chatelperron, P. C. d., Sarraco, J., Ramanoelina, P., & Danthu, P. (2006). Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oil from *Ravensara aromatica* Sonnerat, a tree endemic to Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 102-106.
11. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4364-4370.

12. Anthony, A., Caldwell, G., Hutt, A. G., & Smith, R. L. (1987). Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 1'-hydroxyestragole. *Food and Chemical Toxicology*, 25, 799-806.
13. Armstrong, J. S. (2006). Mitochondrial membrane permeabilization : the sine qua non for cell death. *BioEssays* 28, 253-260.
14. Association Française de Normalisation (AFNOR) (1982). Huiles essentielles NF T 75.
15. Averbeck, D., & Averbeck, S. (1998). DNA photodamage, repair, gene induction and genotoxicity following exposures to 254 nm UV and 8-methoxypsoralen plus UVA in a eukaryotic cell system. . *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 98, 289-295.
16. Averbeck, D., Averbeck, S., Dubertret, L., Young, A. R., & Morlière, P. (1990). Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 7, 209-229.
17. Babu, M. M., Sivaram, V., Immanuel, G., Citarasu, T., & Punitha, S. M. J. (2008). Effects of Herbal Enriched Artemia Supplementation over the Reproductive Performance and Larval Quality in Spent Spawners of the Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 301-307.
18. Bachere, E., Destoumieux, D., & Bulet, P. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*, 191(1-3), 71-88.
19. Baily-Brock, J. H., & Moss, S. M. (1992). Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. In: A. W. a. L. Fast, L. J. (editors), *Marine shrimp culture: principles and practices*: Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 9-28.
20. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
21. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudoux, D., & Idaomar, M. (2006). Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutation Research*, 606, 27-38.
22. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., & Idaomar, M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 585, 1-13.
23. Barbehenn, R., Cheek, S., Gasperut, A., Lister, E., & Maben, R. (2005). Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. *J. Chem. Ecol.*, 31, 969-988.
24. Baser, H. C., Demirci, K., Iscan, B., Hashimoto, G., Demirci, T., Noma, F., & Asakawa, Y. (2006). The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* BOISS. var. *discoidea* BOISS. *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 222-225.

25. Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D., & Vuotto, M. L. (2006). Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, Mar 28 Epub ahead of print.
26. Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. (2001). *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. Wiley-VCH, Weinheim.
27. Baydar, H., & Baydar, N. G. (2005). The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.). *Industrial Crops and Products*, 21(2), 251-255.
28. Belaiche, P. (1979). *L'aromatogramme*. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M.S.A. Editeur. Paris. tome 1- (204)
29. Bennis, S., & Chami, F. S. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 454-458.
30. Billerbeck, V.-G. d. (2008). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
31. Blanc-Mouchet, J. (1987). *"Odeurs. L'essence d'un sens."* Autrement. Paris.
32. Boyle, W. (1955). Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review* 66, 25– 28.
33. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1822-1828.
34. Bruneton, J. (1999). *"Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales"*. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris.1120p.
35. Brusca, R. C., & Brusca, G. J. (1990). Invertebrates. *Sunderland, MA:Sinauer Associates*, 595-666.
36. Burfield, T., & Reekie, S. L. (2005). Mosquitoes, malaria and essential oils. *International Journal of Aromatherapy* 15, 30-41.
37. Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oils. *Phytotherapy Research*, 14, 323–328.
38. Burkey, J. L., Sauer, J. M., McQueen, C. A., & Sipes, I. G. (2000). Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners – a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutation Research* 453, 25-33.
39. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

40. Burt, S. A., & Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36(3), 162-167.
41. Cal, K. (2006). Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Medica*, 72, 311-316.
42. Candan, F., Unlu, M. T., B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 87, 215-220.
43. Capone, D. G., Weston, D. P., Miller, V., & Shoemaker, C. (1996). Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*, 145, 55-75.
44. Carnesecchi, S., Bras-Gonçalves, R., Bradaia, A., Zeisel, M., Gossé, F., Poupon, M. F., & Raul, F. (2004). Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett*, 215, 53-59.
45. Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* , 19, 50-62.
46. 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.
47. Carson, C. F., & Riley, T. V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 264-269.
48. Chaiyasit, D., Choochote, W., Rattanachanpichai, E., Chaithong, U., Chaiwong, P., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Riyong, D., & Pitasawat, B. (2006). Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. *Parasitol. Res.*, 99, 715-721.
49. Chang, C.-W., Chang, W.-L., Chang, S.-T., & Cheng, S.-S. (2008). Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Research*, 42(1-2), 278-286.
50. Chao, L. K., Hua, K. F., Hsu, H. Y., Cheng, S. S., Liu, J. Y., & Chang, S. T. (2005). Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7274-7278.

51. Cheng, S.-S., Liu, J.-Y., Hsui, Y.-R., & Chang, S.-T. (2006). Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology*, 97(2), 306-312.
52. Cheng, S. S., Liu, J. Y., Tsai, K. H., Chen, W. J., & Chang, S. T. (2004). Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4395-4400.
53. Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., & Vlietinck, A. J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 213-220.
54. Citarasu, T., Babu, M. M., Sekar, R. R. J., & Marian, M. P. (2002). Developing *Artemia* Enriched Herbal Diet for Producing Quality Larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius. *Asian Fisheries Science*, 15, 21-32.
55. Citarasu, T., Immanuel, G., & Marian, M. P. (1998). Effect of feeding *Artemia* enriched with stressol and Cod Liver oil on growth and stress resistance in the Indian white Shrimp *Penaeus indicus* postlarvae. *Asian Fisheries Science*, 12, 65-75.
56. Cole, R. A., Haber, W. A., & Setzer, W. N. (2007). Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(12), 877-886.
57. Conner, D. E., Beuchat, L. R., Worthington, R. E., & Hitchcock, H. L. (1984). Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 1, 63-74.
58. Cosentino, S., & Tuberoso, C. I. G. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130-135.
59. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 564-582.
60. Cox, S. D., Mann, C. M., & Markham, J. L. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170-175.
61. Croteau, R. (1977). Site of monoterpene biosynthesis in *Majorana hortensis* leaves. *Plant Physiol* 59, 519-520.
62. Croteau, R., & Hooper, C. L. (1978). Metabolism of monoterpenes: Acetylation of (-)-menthol by a soluble enzyme preparation from peppermint(*Mentha piperita*) leaves. *Plant Physiol* 61, 737-742.



63. Cruz-Lacierda, E. R., & de la Peña, L. D. (1996). The use of chemicals in aquaculture in the Philippines. In: Use of chemicals in Aquaculture in Asia, *Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia*. 20-22 May 1996. Tigbauan, Iloilo, Philippines.
64. Czarnecka, A. M., Golik, P., & Bartnik, E. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J. Appl. Genet.*, 47, 67-78.
65. Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2576-2581.
66. De-Oliveira, A. C. A. X., Fidalgo-Neto, A. A., & Paumgarten, F. J. R. (1999). In vitro inhibition of liver monooxygenases by  $\beta$ -ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpineol. *Toxicology*, 135(1), 33-41.
67. De-Oliveira, A. C. A. X., Ribeiro-Pinto, L. F., & Paumgarten, F. J. R. (1997). In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by  $\beta$ -myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicology letters*, 92(1), 39-46.
68. De Billerbeck, V. G. (2007). Essential oils and antibiotic-resistant bacteria. *Phytothérapie* 5(5), 249-253.
69. Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 162-180.
70. Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, 25(10), 472-479.
71. Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of *Dill*, *Cilantro*, *Coriander* and *Eucalyptus* essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 101-109.
72. Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.-M., van Dorsselaer, A., & Bachère, E. (1999). Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 266, 335-346.
73. Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2745-2749.
74. Dickançaitė, E., Nemeikaitė, A., Kalvelytė, A., & Cenas, N. (1998). Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: structure-activity relationships. *Biochemistry & Molecular Biology International*, 45, 923-930.
75. Didry, N., & Dubreuil, L. (1993). Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmacize*, 48(H4), 301-304.

76. Dijoux, N., Guingand, Y., Bourgeois, C., Durand, S., Fromageot, C., Combe, C., & Ferret, P. J. (2003). Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicol. in vitro*, 20, 480-489.
77. Direkbusarakom, S., Ezura, Y., Yoshimizu, M., & Herunsalee, A. (1998). Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathology*, 33, 437-441.
78. Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
79. Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 305-311.
80. Duarte, M. C. T., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A. A., Figueira, G. M., & Sartoratto, A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 197-201.
81. Dubber, D., & Harder, T. (2008). Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture*, 274, 196–200.
82. Duschatzky, C. B., Possetto, M. L., Talarico, L. B., Garcia, C. C., Michis, F., Almeida, N. V., De Lampasona, M. P., Schuff, C., & Damonte, E. B. (2005). Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antivir. Chem. Chemother*, 16, 247-251.
83. Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., & Rohdich, F. (2004). Review, Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci*, 61, 1401-1426.
84. Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., & Mount, J. R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection* 64(7), 1019– 1024.
85. Essawi, T., & Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 343–349.
86. European Commission (2001a). Commission Decision of 19 September Concerning certain Protective Measures with regard to certain Fishery and Aquaculture Products intended for Human Consumption and Originating in China and Vietnam, 2001/699/EC. Brussels: European Commission.
87. European Commission (2001b). Commission Decision of 27 September Concerning certain Protective Measures with regard to certain Fishery and Aquaculture Products intended for Human Consumption and Originating in Indonesia, 2001/705/EC. Brussels: European Commission.

88. Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., Figueiredo, A. C., & Pedro, L. G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(1-5).
89. FAO (1997). FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries,. No. 5. Rome: FAO.
90. FAO (2002). Fisheries Department. Fishery Information. Data and Statistics Unit., *Fishstat plus: Universal software for fishery statistical times series*. Version 2.3.
91. FAO (2005). *Fisheries Technical Paper*. No. 469 : 97p. Rome, Italy.
92. FAO (2007). Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: Trends and policy implications. *FAO Fisheries Circular*, N°1018.
93. Fauchère, J.-L., & Avril , J. L. (2002). *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses, Editions Paris, (365).
94. Flegel, T. (1997). Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol*, 13, 433-442.
95. Flegel, T. W. (2007). Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(3), 217-231.
96. Franchomme, P., & Pénoël, D. (1990). *Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information*. Limoges.
97. Franzios, G., Mirotsoy, M., Hatziaepostolou, E., Kral, J., Scouras, Z. G., & P., M.-T. (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2690-2694.
98. Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), 898-904.
99. GESAMP (1997). *Joint group of experts on the scientific aspects of marine environmental protection. Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. Reports and studies* No 65: 40 p. Rome. Italy.: FAO.
100. Gil, A., Ghersa, C. M., & Leicach, S. (2000). Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 261-274.
101. Giron, L. M., Aguilar, G. A., Caceres, A., & Arroyo, G. (1988). Anticandidal activity of plants used for the treatment of vaginitis in Guatemala and clinical trial of a *Solanum nigrescens* preparation. *Journal of Ethnopharmacology*, 22, 307-313.



102. Goggelmann, W., & Schimmer, O. (1983). Mutagenicity testing of beta-asarone and commercial calamus drugs with *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 121, 191-194.
103. Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., & Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 151-159.
104. Grassmann, J. (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm*, 72, 505-535.
105. Griffin, S. G., & Wyllie, S. G. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* 14, 322-332.
106. Guba, R. (2001). Toxicity myths – essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy* 11, 76-83.
107. Guenther, E. (1948). *The Essential Oils: history, origin in plants, production and analysis*. New York: D Van Nostrand.
108. Guiseppe, L., Filippo, C., Donatella, G., Delia, D., Raffaello, P., & Leonardo, B. (2001). Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of calycotome villosa(Poiret) Link Leaves. *Il Farmaco* 56, 433-436.
109. Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J. L., Bell, H. C., Wyllie, S. G., & Warmington, J. R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 194-198.
110. Hadi, S. M., Asad, S. F., Singh, S., & Ahmad, A. (2000). Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life* 50, 167-171.
111. Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingersiev, F., Lützhøft, C. H., & Jørgensen, S. E. (1988). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review. *Chemosphere*, 36, 357–393.
112. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2002). *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother*, 50, 195-199.
113. Hasheminejad, G., & Caldwell, J. (1994). Genotoxicity of the alkenylbenzenes  $\alpha$ - and  $\beta$ -asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 223-231.
114. Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & Wright, A. v. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590–3595.

115. Hermal, C. (1993). Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles., *Faculté de Pharmacie: Université de Montpellier*.
116. Herwig, R. P., Gray, J. P., & Weston, D. P. (1997). Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. *Aquaculture*, 149, 263–283.
117. Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., Gonzalez, P., Cabo, M. M., Montilla, M. P., & Navarro, M. C. (2004). Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.I. L3 larvae. *Phytomedicine*, 11, 77-82.
118. Hoet, S., Stévigny, C., Hérent, M. F., & Quetin-Leclercq, J. (2006). Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*, 72, 480-482.
119. Hoffman, C., & Evans, A. C. (1911). The uses of spices as preservatives. *Journal of Indian Engineering and Chemistry* 3, 835–838.
120. Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B.-E., & Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 255–266.
121. Hood, J. R., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. A. (2003). Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 428-432.
122. Idaomar, M., El Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A., Baudoux, D., Munoz-Serrano, A., Liemans, V., & Alonso-Moraga, A. (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 513, 61-68.
123. Immanuel, G., Vincylai, V. C., Sivaram, V., Palavesam, A., & Marian, M. P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236, 53–65.
124. Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B. A., Kurkcuoglu, M., & Husnu Can Baser (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food Chemistry*, 93, 551-556.
125. IUCN (2009). IUCN red list of threatened species. version 2009.2.
126. Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., & Baerheim, S. (1987). Antimicrobial activity of essential oils : a 1976 -1986 literature review. Aspect of the test methods. *Planta Medica*, 53, 395-398.
127. Jassim, S. A., & Naji, M. A. (2003). A Review. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 412-427.

128. Kachadourian, R., & Day, B. J. (2006). Flavonoid-induced glutathione-depletion: Potential implications for cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.*, 41, 65-76.
129. Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z. G., & Mavragani-Tsipidou, P. (1998). Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1111-1115.
130. Kasali, A. A., Eshilokun, A. O., Adeola, S., Winterhalter, P., Knapp, H., Bonnländer, B., & Koenig, W. A. (2005). Volatile oil composition of new chemotype of *Ocimum basilicum* L. from Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 45-47.
131. Kennedy, B., Venugopal, M. N., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2006). Bacterial flora associated with the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, in the hatchery system. *Aquaculture*, 261(4), 1156-1167.
132. Khachatourians, G. G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal*, 159, 1129-1136.
133. Knobloch, K., Iberl, A. P. B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1, 119-128.
134. Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.-M., & Vogenschow, H. (1986). Action of terpenoids on energy metabolism. In: E. J. E. Brunke, Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils. De Gruyter, Berlin, pp. 429-445.
135. Kosalec, I., Pepeljnjak, S., & Kustrak, D. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharm.*, 55, 377-385.
136. Kovats, E. (1987). Composition of essential oils. Part 7. Bulgarian oil of rose (*Rosa damascena* Mill.). *Journal of Chromatography*, 406, 185-222.
137. Kunle, O., & Okogun, J. (2003). Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, 10, 59-61.
138. Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., & Takahara, Y. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 945-952.
139. Lahlou, M. (2004a). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(2), 159-165.
140. Lahlou, M. (2004b). Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
141. Lahlou, M., & Berrada, R. (2001). Potential of essential oils in schistosomiasis control in Morocco. *International Journal of Aromatherapy*, 11, 87-96.

142. 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. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
143. Lawrence, B. M. (2000). Progress in essential oils- *Ravensara* oil. *Perfumer and flavourist*, 25(5), 68-71.
144. Lazutka, J. R., Mierauskien, J., G., S., & Dedonyt, V. (2001). Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 485-492.
145. Le, T. X., Munekage, Y., & Kato, S.I. (2005). Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Science of The Total Environment*, 349(1-3), 95-105.
146. Leaña, E. M., Lavilla-Pitogo, C. R., & Paner, M. G. (1998). Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture*, 164, 367-374.
147. Leaña, E. M., Xi, Y. C., & Liao, I. C. (2007). Effects of steiva extract on growth, non-specific immune response and disease resistance of grass prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius), juveniles. *J Fish Soc Taiwan* 34, 165-175.
148. Lee, C.-S. (2003). Biotechnological advances in finfish hatchery production: a review. *Aquaculture*, 227(1-4), 439-458.
149. Lightner, D. V. (1988). *Vibrio* disease of Penaeid shrimp In: C. J. S. a. D. V. Lightner, *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture* (pp. 42-47): Elsevier Publishers, Amsterdam.
150. Lightner, D. V. (1993). Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J. P. McVey-editor, *CRC handbook of mariculture, Crustacean aquaculture* (pp. 393-486). 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.
151. Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *AquaculturePhytotherapy Research*, 14, 623-629.
152. Longaray Delamare, A. P., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100(2), 603-608.
153. 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 energy-dependent cellular processes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 386-392.

154. López-Torres, M. A., & Lizárraga-Partida, M. L. (2001). Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture*, 194, 11-20.
155. Madagasikara Laza (2008). Exportation de crevette de Madagascar. N°1011, 10/04/08.
156. Maes, P., & Paillard, C. (1992). Effet du vibrio p1, pathogene de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves. In: *Les mollusques marins, biologie et aquaculture*, vol. 14 (pp. 141-148): Société française de malacologie. Ifremer.
157. Mahmoud (1992). Contribution à l'étude de quelques aromates et condiments utilisés au Tchad. *Thèse de Doctorat*: Université des sciences et techniques de Languedoc, Montpellier II.
158. Mann, C. M., & Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538-544.
159. Mann, J. (1987). *Secondary metabolism*. 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press.
160. Manosroi, J., Dhumtanom, P., & Manosroi, A. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.*, 235, 114-120.
161. Markestad, A., & Grave, K. (1997). Reduction of antibacterial drug use in Norwegian fish farming due to vaccination. *Development in Biological Standardization*, 90, 365-369.
162. Martindale, W. H. (1910). Essential oils in relation to their antiseptic powers as determined by their carbolic coefficients. *Perfumery and Essential Oil Research* 1, 266-296.
163. Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J. M., & Viano, J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7115-7121.
164. McMahon, M. A., Blair, I. S., Moore, J. E., & McDowell, D. A. (2007). Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 125-127.
165. Mendoza-Yepes, M. J., Sanchez-Hidalgo, L. E., Maertens, G., & Marin-Iniesta, F. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*, 17(47-55).



166. Mezzoug, N., Elhadri, A., Dallouh, A., Amkiss, S., Skali, N. S., Abrini, J., Zhiri, A., Baudoux, D., Diallo, B., El Jaziri, M., & Idaomar, M. (2007). Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. 629, 100-110.
167. Milijaona, R., Rasidimanana, V., Rabarison, H., Cheplogoi, P. K., Ratsimbason, M., Mulholland, D. A., & Maucière, P. (2003). Plant traditionally prescribed to treat tazo (malaria) region of Madagascar *Malaria journal*, 2, 25.
168. Miller, E. C., Swanson, A. B., Phillips, D. H., Fletcher, T. L., Liem, A., & Miller, J. A. (1983). Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Research*, 43, 1124-1134.
169. Ministère de l'Environnement des Eaux et Forêts (2005). Troisième rapport national de la convention sur la diversité biologique. *Rapport* (p. 181). Antananarivo: Ministère de l'Environnement, des Eaux et Forêts.
170. Miranda, C. D., & Zemelman, R. (2002). Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 212, 31– 47.
171. Monzote, L., Montalvo, A. M., Almanonni, S., Scull, R., Miranda, M., & Abreu, J. (2006). Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy* 52, 130-136.
172. Moon, T., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. (2006). Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol. Res.* , 99, 722-728.
173. Morais, S. M., Cavalcanti, E. S., Bertini, L. M., Oliveira, C. L., Rodrigues, J. R., & Cardoso, J. H. (2006). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against *Aedes aegypti* L. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22, 161-164.
174. Morales-Ramirez, P., Madrigal-Bujaidar, E., Mercader-Martinez, J., Cassini, M., Gonzalez, G., Chamorro-Cevallos, G., & Salazar-Jacobo, M. (1992). Sister chromatid exchange induction produced by *in vivo* and *in vitro* exposure to  $\alpha$ -asarone. *Mutation Research*, 279, 269-273.
175. Nakai, T., & Park, S. C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research Microbiology*, 153, 13-18.
176. Nedoluha, P. C., & Westhoff, D. (1997). Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. *Food Microbiology*, 14, 255-264.
177. Ngassapa, O., Runyoro, D. K. B., Harvala, E., & Chinou, I. B. (2003). Composition and antimicrobial activity of essential oils of two populations of Tanzanian *Lippia javanica* (Burm.F.) Spreng (Verbenaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 18, 221-224.

178. Novgorodov, S. A., & Gudz, T. I. (1996). Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 28, 139-146.
179. NTP, N. T. P. (1990). Toxicology and carcinogenesis studies of d-Limonene (CAS N° 5989-27-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *National Toxicology Program technical report series*, 347, 1-165.
180. Nychas, G. J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In: L. Gould G.W. (Ed.). *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, pp. 58– 89,.
181. Nyegue, M. A. (2005). Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de quelque plantes aromatiques et/ou médicinales du Cameroun : Evaluation de leurs activités antiradicalaires, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. *Thèse de doctorat en chimie organique, minérale, analytique et industrielle* (p. 184): Université des sciences et techniques de Languedoc, Montpellier.
182. Nygaard, K., Lunestad, B. T., Hektoen, H., Berge, J. A., & Hormazabal, V. (1992). Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*, 104, 31–36.
183. Olivier, D., David, J. W. M., & Patrick, L. (2008). Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*, 39(4), 334-338.
184. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73(2), 236-244.
185. Oxley, A. P. A., Shipton, W., Owens, L., & McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 214–223.
186. Pamo, E. T., Zollo, P. H. A., Tendonkeng, F., Kana, J. R., Fongang, M. D., & Tapondjou, L. A. (2004). Composition chimique et effet acaricide des huiles essentielles des feuilles de *Chromolaena odorata*(L) King and Robins d'*Eucalyptus saligna* smith sur les tiques (*Rhinicephalus lunulatus* Neumann) de la chèvre naina de Guinée dans l'ouest Cameroun. *Livestock Research for Rural Development* 16(9), 312-316.
187. Pathak, S. C., Ghosh, S. K., & Palanisamy, K. (1996). The use of chemicals in aquaculture in India. In: *Use of Chemicals in aquaculture in Asia, Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Asia*. 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines.
188. Pattnaik, S., & Subramanyam, V. R. (1996). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. *Microbios*, 86, 237-246.

189. Pauli, A. (2006). Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Med. Res. Rev.*, 26, 223-268.
190. Pavela, R. (2005). Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*, 76, 691-696.
191. Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2006). *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 49, 316-323.
192. Perrier de la Bâthie, H. (1954). Canellacées. In: H. Humbert, *Flore de Madagascar et des Comores*, vol. 138 (pp. 1-9). Paris: Typographie Firmin-Didot et Cie
193. Priestley, C. M., Burgess, I. F., & Williamson, F. M. (2006). Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia* 77, 303-309.
194. Qi, Z., Zhang, X.-H., Boon, N., & Bossier, P. (2009). Probiotics in aquaculture of China -- Current state, problems and prospect. *Aquaculture*, 290(1-2), 15-21.
195. Rafii, F., & Shahverdi, A. R. (2007). Comparison of essential oils from three plants for enhancement of antimicrobial activity of nitrofurantoin against enterobacteria. *Chemotherapy*, 53, 21-25.
196. Randrianady, H. T. (2002). Application des propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite de la plante *Cinnamosma fragrans* (Mandravasarotra II) dans l'élevage larvaire de Crevettes *Penaeus monodon*., *Faculté des sciences, Option Biotechnologie-Microbiologie*, vol. Mémoire de DEA (p. 70): Antananarivo.
197. Randrianarivelo, R., Danthu, P., Benoit, C., Ruez, P., Raherimandimby, M., & Sarter, S. (2010). Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: Effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae : Essential oils as antimicrobials in shrimp hatchery. *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04694.x.
198. Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., Menut, C., Andrianoelisoa, H. S., Raherimandimby, M., & Danthu, P. (2008). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Congrès nternational Genève*.
199. Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., Menut, C., Andrianoelisoa, H. S., Raherimandimby, M., & Danthu, P. (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*, 114, 680-684.
200. Razafindrakoto, B. S. (1988). Huiles essentielles d'*Eucalyptus* de Madagascar variabilité de la composition chimique et des rendements en fonction de la période de récolte, essais de classement chimiotaxonomique et propriétés pharmacologiques. *Thèse de doctorat en chimie organique, minérale, analytique et*



*industrielle* (p. 168): Université des sciences et techniques de Languedoc, Montpellier

201. Regunathan, C., & Wesley, S. G. (2004). Control of *Vibrio* spp. in Shrimp Hatcheries Using the Green Algae *Tetraselmis suecica*. *Asian Fisheries Science*, 17, 147-158.
202. Reichling, J., Koch, C., Stahl-Biskup, E., Sojka, C., & Schnitzler, P. (2005). Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Medica*, 71, 1123-1127.
203. Remmal, A., Bouchickhi, T., Rhayour, K., & Ettayebi, M. (1993). Improved Method for the Determination of Antimicrobial Activity of Essential oils in Agar Medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2), 179-184.
204. Richard, H., & Multon, J. L. (1992). *Epices et Arômes*. Ed. Lavoisier Tec et Doc. 332p.
205. Rim, I. S., & Jee, C. H. (2006). Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). *Korean J. Parasitol*, 44, 133-138.
206. Rios, J. L., Recio, M. C., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. . *Journal of Ethnopharmacology* 23, 127– 149.
207. Rohdich, F., Bacher, A., & Eisenreich, W. (2005). Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets. *Biochemical Society*, 785-791.
208. Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., & Eisenreich, W. (2001). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. . *Current opinion in Chemical Biology*, 5, 535-540.
209. Roque, A., Molina-Aja, A., Bolan-Mejia, C., & Gomez-Gil, B. (2001). *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(5), 383-387.
210. Rosenberry, B. (1997). World Shrimp Farming 1997. Shrimp News International. (p. 284). San Diego.
211. Sakagami, H., Oi, T., & Satoh, K. (1999). Prevention of oral diseases by polyphenols (Review). *In vivo* 13, 155-172.
212. Sakai, M. (1999). Current status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63–92.

213. Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities : phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67-80.
214. Salim, E. I., & Fukushima, S. (2003). Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer.*, 45, 195-202.
215. Salle, J. L. (1991). *Les huiles essentielles, synthèse d'arômes et introduction à la sympathicothérapie*. Ed. Frison-Roche, Paris.
216. Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34, 3-21.
217. Santana-Rios, G., Orner, G. A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S. Y., & Dashwood, R. H. (2001). Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, 495, 61-74.
218. Sarbach, R. (1962). Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères. *Faculté de Pharmacie* (p. 181): Université de Rennes
219. Sarter, S., Kha Nguyen, H. N., Hung, L. T., Lazard, J., & Montet, D. (2007). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*, 18(11), 1391-1396.
220. Satrija, F., Nansen, P., Murtini, S., & He, S. (1995). Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 48, 161-164.
221. Saura-Calixto, F., & Goni, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94, 442-447.
222. Savelev, S., Okello, E., Perry, N. S. L., Wilkins, R. M., & Perry, E. K. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 661-668.
223. Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77(4), 279-285.
224. Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., & Larsen, J. L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 11, 4908-4915.
225. Schmolz, E., Doebner, R., Auste, R., Daum, R., Welge, G., & Lamprecht, I. (1999). Bioenergetic investigations on tea-tree and related essential oils. *Thermochimica Acta* 337, 71-81.

226. Schulte, V. K. E., Rücker, G., & Lewe, W. A. (1972). Über die Inhaltsstoffe von *Cinnamosma fragrans* Baillon-einer arzneipflanze aus Madagaskar. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 41, 1578-1579.
227. Schwartz, J. L. (1996). The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: Their effects on tumor cell growth. *Journal of Nutrition* 126, 1221S-1227S.
228. Selvin, J., & Lipton, A. P. (2004). *Dendrilla nigra*, a marine sponge, as potential source of antibacterial substances for managing shrimp diseases. *Aquaculture*, 236, 277–283.
229. Shankel, D. M., Kuo, S., Haines, C., & Mitscher, L. A. (1993). Extracellular interception of mutagens. *Basic Life Science Research* 61, 65-74.
230. Shelef, L. A. (1983). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6, 29-44.
231. Sibanda, S., Chigwada, G., Poole, M., Gwebu, E. T., Noletto, J. A., Schmidt, J. M., Rea, A. I., & Setzer, W. N. (2004). Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 107-111.
232. Silou, T., Malanda, M., & Loubaki, L. (2004). Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cympogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 2<sup>3</sup> *Journal of food engineering* 65, 219 – 223.
233. Singh, G., Marimuthu, P., de Heluani, C. S., & Catalan, C. A. (2006). Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 174-181.
234. Sivropoulou, A., Nikobu, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (8), 3197–3201.
235. Sivropoulou, A., & Papanikolaou, E. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Food Chemistry* 44, 1202-1205.
236. Skjermo, J., & Vadstein, O. (1999). Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177, 333-343.
237. Smith-Palmer, A., & Stewart, J. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26(2), 118-122.
238. Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (2002). Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholine-specific production in *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. *Journal of Medical Microbiology*, 51(7), 567-608.

239. Sökmen, A., Gulluce, M., Askin Akpulat, H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sökmen, M., & Sahin, F. (2004). The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15(8), 627-634.
240. Solis, N. B. (1988). Biology and ecology. In: Biology and culture of *Penaeus monodon*. SEAFDEC, Brackish water aquaculture Information System. Aquaculture Department Southeast Asian Fisheries Development Center Tigbauan, Iloilo, pp. 3-15.
241. Sonboli, A., Mirjalili, M. H., Hadian, J., Ebrahimi, S. N., & Yousefzadi, M. (2006). Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *bungeana* (Juz). *Rech. f. from Iran. Z. Naturforsch.*, 61c, 677-680.
242. Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Baborun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200-213.
243. Sørum, H. (1999). Antibiotic resistance in Aquaculture. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 92, 29-36.
244. Soyulu, E. M., Soyulu, S., & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161, 119-128.
245. Sung, H.-H., Li, H.-C., Tsai, F.-M., Ting, Y.-Y., & Chao, W.-L. (1999). Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(2), 261-271.
246. Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., & Pichette, A. (2005). Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12, 299-304.
247. Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F., & Legault, J. (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 99-102.
248. Tassou, C., Koutsoumanis, K., & Nychas, G.-J. E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33, 273-280.
249. Tendencia, E. A., & de la Pena, L. D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, 195(3-4), 193-204.

250. Tendencia, E. A., & de la Pena, L. D. (2002). Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from Shrimp ponds. *Aquaculture*, 213, 609-613.
251. Tendencia, E. A., dela Pena, M. R., & Choresca, J. C. H. (2005). Efficiency of *Chlorella sp.* and *Tilapia hornorum* in controlling the growth of luminous bacteria in a simulated shrimp culture environment. *Aquaculture*, 249(1-4), 55-62.
252. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333-340.
253. Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current opinion in Plant Biology*, 9(3), 297-304.
254. Trevisan, M. T., Vasconcelos Silva, M. G., Pfundstein, B., Spiegelhalder, B., & Owen, R. W. (2006). Characterization of the volatil pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4378-4382.
255. Tucker, A. O., Maciarelo, M. J., Brown, R., & Griffeth, M. (2008). A commercial essential oil of Mandravasarotra (*Cinnamosma fragrans* Baill., Canelaceae) from Madagascar. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 259–260.
256. Tuley de Silva, K. E. (1996). A Manual on the Essential Oil Industry. United Nations Industrial Development Organization, Vienna.
257. Ultee, A., Bennik, M. H., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568.
258. Ultee, A., Kets, E. P., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4606–4610.
259. Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G., & Smid, E. J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection* 63, 620–624.
260. Van de Braak S.A.A.J. , & Leijten G.C.J.J. (1999). Essential Oils and Oleoresins : A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. (p. 116): CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam.
261. Van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics, links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327-335.
262. Van Houten, B., Woshner, V., & Santos, J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair*, 5, 145-152.



263. Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. S., & Swings, J. (1998). Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 169(1-2), 121-132.
264. Vander Stichele, R. H., Elseviers, M. M., Ferech, M., Blot, S., & Goossens, H. (2006). European Surveillance of Antibiotic Consumption (ESAC), Project Group. Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries: results of the ESAC Retrospective Data Collection (1997-2002),. *J Antimicrob Chemother*, 58(1), 159-167.
265. Vaseeharan, B., & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(2), 83-87.
266. Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Murugan, T., & Chen, J. C. (2005). In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio spp.* and *Aeromonas spp.* isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(4), 285-291.
267. Vercesi, A. E., Kowaltowski, A. J., Grijalba, M. T., Meinicke, A. R., & Castilho, R. F. (1997). The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep*, 17, 43-52.
268. Veron, M., & Popoff, M. (1989). Vibrionaceae. In: Le Minor L Veron M, *Bactériologie Médicale*, 2è édition. Paris Flammarion médecine-sciences 473-500.
269. Vijayan, K., Rajendran, K., Alavandi, S., & Alagarwami, K. (1997). An epizootic of infectious hepatopancreatic and lymphoid organ necrosis disease in cultured *Penaeus monodon*: a case study. *NAGA ICLARM Q*, 20, 15-18.
270. Viljoen, A., van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Baser, H., & van Wyk, B.-E. (2003). *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2-3), 137-143.
271. Volak, J., & Stodola, J. (1994). *Plantae medicinales*. Librairie Gründ, Paris. 319p.
272. Vukovic-Gacic, B., Nikcevic, S., Beric-Bjedov, T., Knezevic-Vukcevic, J., & Simic, D. (2006). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chemical Toxicology*, May 26 Epub ahead of print.
273. Walsh, S. E., & Maillard, J. Y. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 240-247.
274. Wang, Q. Y., Cai, S. L., & Li, J. (1997). The shrimp farming industry in China. *World Aquaculture*, 3, 23-29.

275. Weber, J. T., Mintz, E. D., Canizares, R., Semiglia, A., Gomez, I., Sempertegui, R., Davila, A., Greene, K. D., Puhr, N. D., & Cameron, D. N. (1994). Epidemic cholera in Ecuador: multidrug-resistance and transmission by water and seafood. *Epidemiology and Infection*, 112(1), 1-11.
276. Wegener, H. C., Aarestrup, F. M., Gerner-Smidt, P., & Bager, F. (1999). Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta Veterinaria Scandinavica, Supplementum*, 92, 51–57.
277. Weston, D. P. (1996). Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: *Aquaculture and Water Resources Management*, edited by D. Baird, M.C.M. Beveridge, L.A. Kelly & J.F. Muir (pp. 140–165). Oxford.: Blackwell Science.
278. Weston, D. P. (2000). *Ecological Effects of the Use of Chemicals in Aquaculture. Use of Chemicals in Aquaculture in Asia* (edited by J. R. Arthur, C. R. Larilla-Pitogo & R. P. Subasinghe), Pp. 23–30. *Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia ,20–22 May 1996*, Tigbauan, Iloilo, Philippines. Tigbauan, Iloilo: Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department.
279. Weyerstahl, P., Christiansen, C., Gundidza, M., & Mavi, S. (1992). Constituents of the essential oil of *Heteropyxis natalensis*. *Journal of Essential Oil Research*, 4, 439–445.
280. White, D. G., & McDermott, P. F. (2001). Emergence and transfer of antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 84, 151-155.
281. WHO (1998). Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health
282. WHO/EMC/ZDI/98.10., Geneva: WHO. (<http://www.who.int/emcae>).
283. Williams, L. R., Stockley, J. K., Yan, W., & Home, V. N. (1998). Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. *International Journal of Aromatherapy* 8, 30-40.
284. Willis, C. (2000). Antibiotics in the food chain: their impact on the consumer. *Reviews in Medical Microbiology*, 11, 153–160.
285. Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., & Kusk, O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40, 723–730.
286. Wu, X. J., Stahl, T., Hu, Y., Kassie, F., & Mersch-Sundermann, V. (2006). The production of reactive oxygen species and the mitochondrial membrane potential are modulated during onion oil-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *J. Nutr*, 136, 608-613.

287. Xianfei, X., Xiaoqiang, C., Shunying, Z., & Guolin, Z. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. *Food Chemistry*, 100(4), 1312-1315.
  
288. Yeh, R.-Y., Shiu, Y.-L., Ju, J.-Y., Cheng, S.-C., Huang, S.-Y., Lin, J.-C., & Liu, C.-H. (2008). Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(1), 26-32.
  
289. Yoo, C. B., Han, K. T., Cho, K. S., Ha, J., Park, H. J., Nam, J. H., Kil, U. H., & Lee, K. T. (2005). Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett*, 225, 41-52.
  
290. Yoon, H. S., Moon, S. C., Kim, N. D., Park, B. S., Jeong, M. H., & Yoo, Y. H. (2000). Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276, 151-156.
  
291. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs -their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety* 9(2), 97-118.
  
292. Zani, F., Massino, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M., Vampa, G., Bellotti, A., & Mazza, P. (1991). Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Planta Medica*, 57, 237-241.



## ORIGINAL ARTICLE

## Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae

R. Randrianarivelo<sup>1</sup>, P. Danthu<sup>2</sup>, C. Benoit<sup>3</sup>, P. Ruez<sup>4</sup>, M. Raherimandimby<sup>5</sup> and S. Sarter<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Centre National de Recherches Appliquées au Développement Rural/Département de Recherches Technologiques (FOFIFA/DRT), Antananarivo, Madagascar

<sup>2</sup> CIRAD, URP Forêts et Biodiversité, Antananarivo, Madagascar and Campus de Baillarguet, Montpellier Cedex, France

<sup>3</sup> Laboratoire d'Analyse Sensorielle FOFIFA, Ambatobe, Madagascar

<sup>4</sup> OSO Farming, Site d'Ambavanakarana, Province d'Antsiranana, Madagascar

<sup>5</sup> Université d'Antananarivo, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Antananarivo, Madagascar

<sup>6</sup> CIRAD, UMR QUALISUD, Madagascar; and CIRAD, UMR QUALISUD, Montpellier, France

### Keywords

antimicrobial activity, aquaculture, *Cinnamosma fragrans*, essential oil, *Penaeus monodon*.

### Correspondence

Samira Sarter, CIRAD, BP 853  
Ampandrianomby, 101 Antananarivo,  
Madagascar. E-mail: samira.sarter@cirad.fr

2009/2166: received 18 December 2009,  
revised 18 January 2010 and accepted  
20 January 2010

doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04694.x

### Abstract

**Aims:** The activity of two essential oils (EOs) of *Cinnamosma fragrans*, an endemic plant to Madagascar (B8: linalool-type and B143: 1,8-cineole-type), against bacterial isolates from a shrimp hatchery of *Penaeus monodon* and their effects on the survival and bacterial concentration of larvae were determined.

**Methods and Results:** Minimum inhibitory concentrations were determined using a broth dilution technique. The bacterial concentrations of both larvae and water tank were assessed on Marine agar and Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar. The assays took place in OSO Farming's shrimp hatchery in Madagascar. EOs were directly added to the water tank. Regarding the survival, the assays in larval culture (four replicates each of B8, B143, E and control) showed that B8 oil had a similar effect ( $P > 0.05$ ) as the antibiotic (Erythromycin) and was more active than B143 ( $P < 0.05$ ). A negative correlation was observed between the bacterial concentration and the survival of larvae for all assays.

**Conclusion:** Both *C. fragrans* essential oils, as antibiotic, exhibited significantly higher survival rates and lower bacterial concentrations of the larvae than the control (oil and antibiotic free).

**Significance and impacts of the study:** The potential of *C. fragrans* essential oil to control the bacterial load in *in vivo* conditions, thereby enhancing survival rate of *P. monodon* larvae, makes it a relevant option for developing a novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery culture.

### Introduction

The worldwide application of antibiotics in aquaculture for prophylactic and therapeutic purposes has resulted in an increase in bacterial resistance in exposed microbial ecosystems, impacting both animal and public health. International agencies recommend that antibiotics should be restricted to therapeutic purposes only, and that preventative approaches to disease management should be preferred over costly posteffect treatments (GESAMP 1997; FAO 2005). Therefore, to make the aquaculture industry more sustainable, new strategies to control

infection are urgently needed (Defoirdt *et al.* 2007; Hsieh *et al.* 2008; Parisien *et al.* 2008).

Among alternatives to antibiotics in shrimp aquaculture, use of plant extracts as immunostimulants for enhancement of nonspecific, host defence mechanisms or as antimicrobials for bacterial growth inhibition has been reported as a relevant strategy. (Direkbusarakom *et al.* 1998; Dorman and Deans 2000; Citarasu *et al.* 2002; Leão *et al.* 2007; Yeh *et al.* 2008). Use of plant extracts to replace chemotherapeutics in aquaculture has been generally achieved through oral administration (biocapsulation) or direct mixture with feed ingredients. As the plant extracts are nonpalatable

to shrimps, they could be first fed to *Artemia*, which acts as a biological carrier (Immanuel *et al.* 2004).

*Cinnamosma fragrans*, an endemic species of Madagascar, belonging to the Canellaceae family grows in the tropophytic forests though is often found near the coast as well. Randrianarivelo *et al.* (2009) demonstrated that 1,8-cineole and linalool were the main constituents of essential oil samples of *C. fragrans* originating from these two geographical regions of Madagascar. In describing the chemical composition of this species' extracts, Schulte *et al.* (1972) assumed that linalool is the main compound in the essential oil isolated from *C. fragrans* leaves. Recently, 26 constituents were identified for *C. fragrans* of which 1,8-cineole (51.0%) and sabinene (10.6%) were the major components (Tucker *et al.* 2008).

*Cinnamosma fragrans* is used traditionally against respiratory, parasitic and gastrointestinal infections, syphilis and malaria (Pernet and Meyer 1957; Schulte *et al.* 1972; Milijaona *et al.* 2003). Its essential oil from leaves exhibited strong antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, including several vibrio strains specific to aquaculture (Randrianarivelo *et al.* 2009). These results could presume consideration of this EO for application in shrimp aquaculture to confirm *in vitro* activities *in vivo*, determining whether there is a difference because of chemical type. This knowledge is important for planning sustainable management of such an endemic species, as well as to initiate selection of the most interesting chemo-type for large scale utilisation as with other species of Madagascar (Danthu *et al.* 2010). *Cinnamosma fragrans* is a common species in the western forests of Madagascar. It is not indicated as a threatened species on the IUCN Red List (IUCN, 2009). Moreover, essential oils (EOs) are extracted from leaves, which is not a destructive method. These reasons allow us to envisage a sustainable exploitation of this resource in Madagascar.

The objective of this work was to determine the effects of two chemical types (B8 and B143) of the EOs of *C. fragrans* on the survival and the bacterial concentration of larvae (total bacteria and vibrios) of *Penaeus monodon* in comparison with the control and the antibiotic: Erythromycin. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of both oil samples were determined for bacterial isolates from the shrimp hatchery. The effect of an emulsifier was also evaluated to optimize feasibility of use of EOs in an aquatic medium.

## Material and methods

### Essential oil extraction

*Cinnamosma fragrans* leaf samples were collected during the rainy season, in February 2005: essential oil sample

B143 was harvested in Mariarano (15°41'S: 46°43'E, altitude: 7 m) and B8 sample in Tsaramandroso (16°18'S; 47°02'E, altitude: 600 m). The leaves were steam distilled for 4 h in a Clevenger-type apparatus, <24 h after sampling. The EOs were dried over anhydrous sodium sulfate until any trace of water was removed, and then stored in opaque glass bottles at 4°C as described by Randrianarivelo *et al.* (2009).

### Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The activity of the essential oil samples was tested for different bacterial isolates from the *P. monodon* hatchery of OSO Farming (Antsiranana Province, Madagascar) and two reference strains, *Vibrio penaeicidae* (ATCC 51841) and *Vibrio splendidus* (ATCC 25914) that were given by Ifremer (Montpellier, France).

MIC (minimum inhibitory concentration as the lowest concentration of the essential oil at which the micro-organism does not demonstrate visible growth) and MBC (minimum bactericidal concentration as the lowest concentration at which no growth occurred on the agar plates) were determined in triplicate, using a broth dilution method for samples B8, B143, pure linalool and 1,8-cineole as described by Randrianarivelo *et al.* (2009). Pure linalool and 1,8-cineole were purchased from Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France).

Stock solutions of EOs were prepared in sterile distilled water. These suspensions were further diluted from 0.04 mg ml<sup>-1</sup> to 23.5 mg ml<sup>-1</sup> in test tubes. And 30°C-overnight cultures were inoculated in 900 µl of Zobell (Maes and Paillard 1992) for *Vibrio* strains or Poor broth (Destoumieux *et al.* 1999) for the other strains. The optical density of the inoculum was measured at D<sub>600</sub> = 0.1 and then diluted to reach a final optical density of D<sub>600</sub> = 0.001 in the assay. To these cultures, 100 µl of the essential oil dilution were then added to reach a final volume of 1 ml. A positive control containing the bacterial culture without the essential oil and a negative control containing only the medium were also established. Tubes were incubated 24 h at 25°C for *Vibrio* spp., 30°C for *Micrococcus* spp., and 37°C for *Bacillus* spp. and their optical density was measured after incubation at D<sub>600</sub>.

### Essential oil and antibiotic assays

The *in vivo* experiments were all carried out at the OSO organic shrimp hatchery in Madagascar. The Nauplii larvae were cultured during 18 days in duplicate. The assays were carried out twice in 2006 and 2007. Sea water was filtered and sterilised by a UV system. Initially, a water volume of 9 l was maintained, with daily addition

of 0.75 l during the 7 first days. The water lost from the aquarium through evaporation was replenished by sterile sea water. The water exchange rate was then 25% by the 11th day (stage PL1), 50% by the 12th day (stage PL2), 50% by the 14th (stage PL4) and 50% by the 16th day (stage PL6). Aquarium was individually provided by continuous aeration and light in neon. The aquaria were inoculated with 400 larvae per litre. The culture conditions were maintained at 29.2°C; salinity of 32‰; pH 7.8; 4.5–5.5% of dissolved oxygen levels. Feeding was carried out according to the official 'AB Label' organic standards applied by the farm protocols (Anon 2007). Larvae were reared on a mixed diet of resuspended *Chaetoceros gracilis* paste, Nauplii of *Artemia* and Frippak micro-capsules.

Effects of the EOs (B8 and B143 samples) and the antibiotic [Erythromycin (E), Bouchara Levallois, France] were investigated on the bacterial concentration of both larvae and water tank and on the survival rate of larvae during the 18 days of the development cycle. Tween 80 was tested as an emulsifier for oils to compare its effects to Tween-free oil assays.

The following assays were performed in duplicate and during two campaigns in 2006 and 2007:

1. Control A: the larvae culture was neither treated (no EOs, no antibiotic, no Tween 80).
2. Control B: the larvae culture was conducted with Tween 80 (no EOs, no antibiotic).
3. B8 T: the larvae culture treated with B8 essential oil with Tween 80.
4. B8: the larvae culture treated with B8 essential oil without Tween 80.
5. B143 T: the larvae culture treated with B143 essential oil with Tween 80.
6. B143: the larvae culture treated with B143 essential oil without Tween 80.
7. E: the larvae culture treated with antibiotic Erythromycin.

The treatment (essential oil and antibiotic) was applied once a day at 7 AM, on the following days: 3, 5, 7, 10, 12 and 14. The antibiotic concentration was 20 µg ml<sup>-1</sup>. The oil was added at the concentration of 734 µg ml<sup>-1</sup> (corresponding to the lowest MIC of oil against tested vibrios as determined by Randrianarivelo *et al.* (2009). For the assays using Tween 80, the oil was mixed in a solution of 0.04% (v/v) of Tween 80.

In the control B, a solution of only the emulsifier (Tween 80) was added at 0.04% (v/v) at the same frequency as the oil assays.

#### Bacterial concentration and strain isolation

Every day during the 18 days of the *P. monodon* culture, both larvae (15 larvae) and water (10 ml) from each

aquarium were sampled. *Penaeus monodon* larvae were crushed into 5 ml of sterile saline water (2.5% NaCl in distilled water). The homogenized sample was serially diluted to 10<sup>-5</sup> in sterile saline solution. The water samples were diluted in sterile saline solution as well. A volume of 0.1 ml from each dilution from both larvae and water samples were plated onto Marine agar (MA) for total heterotrophic aerobic bacteria (Difco, Le Pont de Claix, France) and onto TCBS agar for vibrios (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar; Difco), both in duplicate, and incubated at 30°C during 48 h for MA and 24 h for TCBS. About three to five colonies growing on TCBS agar media were randomly isolated from samples (water and larvae) every day during the 18 days. A total of 80 strains were finally purified by successive streaking on TCBS media. The preliminary identification was carried out by Gram staining, oxidase and catalase reactions, microscopic observation, cell motility, glucose metabolism. The Gram-negative isolates were then identified by API System strips (Biomérieux at Marcy l'Etoile, France): API 20NE for bacilli Gram-negative oxidase positive (non-*Enterobacteriaceae*). All API strips were prepared according to the instructions of the manufacturer. The Gram-positive isolates were identified by Institut Pasteur of Lille (Lille, France) using API 50CHB for *Bacillus* spp. and APISTAPH for *Micrococcus* spp. The isolates were maintained on MA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

#### Larval survival rate

The larval survival rate was verified every day at 6 AM for all the experiments, with four 250 ml cultures counted visually. These larvae were restored to their original container to reduce mortality because of sampling. Only those larvae showing movement were considered alive.

The survival rate (%) was calculated as described by Baruah *et al.* (2009):

$$\text{Larval survival(\%)} = \left( \frac{\text{Total numbers of live larvae each day}}{\text{Initial number of larvae}} \right) \times 100$$

The toxicity of the EOs of *C. fragrans* was tested by bathing healthy larvae of *P. monodon* in treated seawater for 24 h. Batches of each of Nauplii, Zoe, Mysis, Postlarvae at a density of 100 per 1000 ml were reared in flasks containing sterile seawater (2000 ml) with varying concentrations of oil (0, 100, 200, 400, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 mg l<sup>-1</sup>). The physicochemical characteristics of the rearing environment were salinity: 32‰, pH: 7.8, temperature: 29.2°C and dissolved oxygen: 4.5 mg l<sup>-1</sup>. After 1 h of acclimation, the essential oil was added. Three replicates for each concentration of oil

were carried out. Live larvae were counted after 24 h of treatment, and survival rate was determined using the following formula (Yilmaz *et al.*, 2004):

$$LC50 = LC100 - \sum(ab)/n$$

LC50 and LC100 correspond to the lethal doses for the 50 and 100% of the samples, 'a' gives the difference between the two consecutive doses, 'b' the arithmetic mean of the mortality caused by two consecutive doses and 'n' the number of samples in each group.

#### Statistical analysis

Kruskal–Wallis test was used to determine the significant difference between the tested groups at a threshold of  $P < 0.05$ . Before analysis, percent data were normalized using an arcsin transformation (Yeh *et al.* 2008). The reproducibility of the data collected in 2006 and 2007 was validated by Kruskal–Wallis test with the threshold of  $P < 0.05$ . As the analysis of the data collected (bacterial concentration and survival percentage) in duplicate for 2006 and 2007 have demonstrated that all  $P$ -values were higher than 0.05, the data presented in this article corresponded to both years 2006 and 2007 (four replicates).

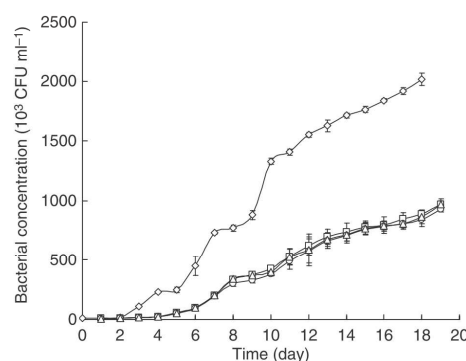
The correlation at each stage between the bacterial concentration and the survival of larvae was analysed using Spearman's correlation coefficient method.

#### Results

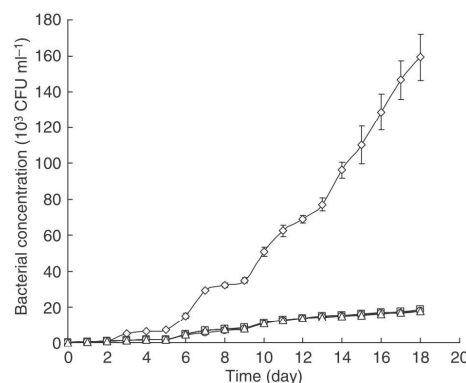
The culture spanned from Nauplii stage (day 0) to post-larvae PL 8 (day 18). The initial mean bacterial concentrations at T0 ( $n = 16 \pm \text{SD}$ ) were  $8.67 \times 10^3 \pm 1.58 \times 10^2$  CFU ml<sup>-1</sup> on MA (Fig. 1) and  $1.53 \times 10^2 \pm 3.69$  CFU ml<sup>-1</sup> on TCBS (Fig. 2). The isolated microflora from larvae ( $n = 48$ ) consisted mainly of species of the genus *Vibrio*. From the water samples ( $n = 32$ ), the isolates were mainly represented by *Vibrio* spp. and *Micrococcus* spp. (Table 1).

The MBCs values of B8 (95.8% linalool) were equivalent to the MICs values (bactericidal effect) for *Bacillus pumulus*, *B. subtilis*, *Micrococcus* spp., *Vibrio penaeicidae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *Photobacterium damsela* B 143 sample (71.6% 1,8-cineole) was bactericidal for *V. penaeicidae*, *V. splendidus*, *V. holllisae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *Photobacterium damsela* (Table 2).

Among Gram-positive strains, *Micrococcus* spp. was the most resistant strain for both B8 and B143. Among Gram-negative, the most resistant strains were *Vibrio alginolyticus* and *V. vulnificus* to B8 and *V. parahaemolyticus*



**Figure 1** Evolution of total bacterial concentration (CFU ml<sup>-1</sup>) of *Penaeus monodon* larvae during 18 days of culture for the control A (essential oil and antibiotic free) and for assays using the essential oils of *Cinnamomum fragrans* (B8 and B143) and Erythromycin (E). Values correspond to the mean of four replicates ( $n = 4 \pm \text{SD}$ ). (—○—) Control A; (—□—) B143; (—◇—) B8 and (—△—) E.



**Figure 2** Evolution of *Vibrio* concentration (CFU ml<sup>-1</sup>) of *Penaeus monodon* larvae during 18 days of culture for the control A (essential oil and antibiotic free) and for assays using the essential oils of *Cinnamomum fragrans* (B8 and B143) and Erythromycin (E). Values correspond to the mean of four replicates ( $n = 4 \pm \text{SD}$ ). (—○—) Control A; (—□—) B143; (—◇—) B8 and (—△—) E.

and *V. splendidus* to B143. B8 was more active than B143 towards *V. parahaemolyticus* and less active towards *V. alginolyticus*. B143 was the most active against *V. penaeicidae*. Towards the isolated strains, B8 and B143 oils exhibited the lowest MICs against *Bacillus pumulus* and *B. subtilis*. Globally, *C. fragrans* essential oil samples exhibited different MICs against the majority of strains than their respective pure major component, linalool and

**Table 1** Identification of randomly selected bacterial isolates on TCBS medium from water ( $n = 32$ ) and larvae ( $n = 48$ ) samples of EOs assays and controls

Bacterial species	Water		Larvae	
	Nb isolates ( $n = 32$ )	(%)	Nb isolates ( $n = 48$ )	(%)
<i>Bacillus pumilus</i>	3	9	1	2
<i>Bacillus cereus</i>	2	6	1	2
<i>Bacillus subtilis</i>	2	6		
<i>Micrococcus</i> spp.	4	13		
Total Gram positive		34		4
<i>Vibrio hollisae</i>	2	6	7	15
<i>Vibrio alginolyticus</i>	7	22	13	27
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	6	5	10
<i>Vibrio vulnificus</i>	3	9	6	13
<i>Photobacterium damsela</i>	2	6	4	8
<i>Vibrio</i> spp.	5	16	11	23
Total Gram negative		66		96

1,8 cineole. B8 and B143 showed higher MICs than linalool and 1,8-cineole against *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*, respectively.

**Table 2** Minimum inhibitory concentration (mg ml<sup>-1</sup>) of B8 and B143 samples of *Cinnamomum fragrans* essential oils from Tsaramandroso and Mariarano origins, respectively, and pure linalool and 1,8-cineole against shrimp farm isolates ( $n = 10$ ) and two reference strains (ATCC)

Bacterial species	MIC (mg/ml)			
	B8		B143	
	(95-8% linalool)	(71-6% 1,8-cineole)	(95-8% linalool)	(71-6% 1,8-cineole)
Gram positive				
<i>Bacillus pumilus</i>	0.18a	0.37b*	0.18a	0.37b*
<i>Bacillus cereus</i>	0.73a*	1.47b*	1.47b	1.47b*
<i>Bacillus subtilis</i>	0.18a	0.37b*	0.18a	0.37b*
<i>Micrococcus</i> spp.	5.88a	5.88a*	5.88a*	11.75b
Gram negative				
<i>Vibrio penaeicidae</i>	2.93b	0.18a	0.18a	2.93b
ATCC 51841				
<i>Vibrio splendidus</i> ATCC 25914	2.93a*	5.88b	5.88b	2.93a*
<i>Vibrio hollisae</i>	0.73a*	0.73a	0.73a*	2.93b
<i>Vibrio alginolyticus</i>	5.88c*	2.93b	0.73a*	2.93b
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.93a	5.88b	5.88b	2.93a*
<i>Vibrio vulnificus</i>	5.88b	2.93a	5.88b	5.88b
<i>Photobacterium damsela</i>	2.93b	1.47a	1.47a	2.93b
<i>Vibrio</i> spp.	2.93a*	1.47a*	5.88b	1.47a*

MBC, minimum bactericidal concentration; MIC, minimum inhibitory concentration.

Values followed by different letters within a line are significantly different by Fisher LSD ( $P < 0.05$ ).

\*Indicates that MBC > MIC.

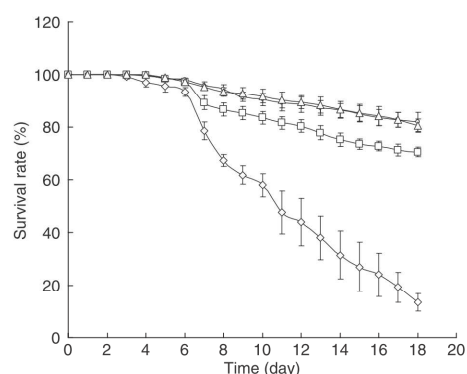
Values without \* indicate that MBC=MIC.

For each treatment (B8, B143, E) and control A, a significant correlation was observed between bacterial concentrations of both water and larval samples, with large correlation coefficients ( $r > 0.98$ ) and associated  $P$ -values lower than 0.05 for each experiment ( $P < 0.0001$ ). This article shows only the results related to the bacterial concentration of larvae (Figs 1 and 2). The bacterial concentration of larvae in B8, B143 and antibiotic (E) tanks were significantly lower ( $P < 0.05$ ) than in the control (Figs 1 and 2). Furthermore, there was no significant difference ( $P > 0.05$ ) between the three treatments (B8, B143 and E). Inversely, the survival in those assays was significantly higher than in the control (Fig. 3). The linalool-type oil (B8), which had similar effects than the antibiotic (E), was more active than the 1,8-cineole-type oil (B143). Among the three treatments (B8, B143, E), the survival of *P. monodon* larvae at PL 8 reached 82.6% with B8 and 80.5% with the antibiotic (E), followed by B143 at 69.3%, while the control had a survival rate of 15.1%.

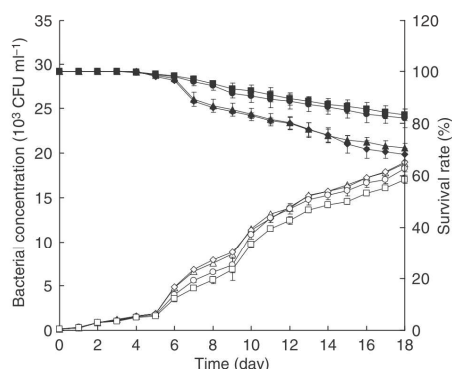
A significant correlation was observed between the bacterial concentration of the larvae (for both total bacteria and vibrios counts) and the survival rate at all larval stages ( $r = -0.98$  for the control;  $-0.97$  for B143; and  $-0.96$  for B8 and  $-0.96$  for E;  $P < 0.05$ ).

In all assays, use of an emulsifier (Tween 80) did not have a significant effect on the bacterial concentration of the larvae and their survival rate ( $P > 0.05$ ) (Fig. 4).

The toxicity tests of B8 and B143 oils on Nauplii, Zoé, Mysis and Postlarvae showed that the mean value of

**Figure 3** Evolution of the survival rate (%) of *Penaeus monodon* larvae during 18 days of culture for the control A (essential oil and antibiotic free) and for assays using the essential oils of *Cinnamomum fragrans* (B8 and B143) and Erythromycin (E). Values correspond to the mean of four replicates ( $n = 4 \pm SD$ ). (—○—) Control A; (—□—) B143; (—◇—) B8 and (—△—) E.





**Figure 4** Evolution of the *Vibrio* concentration (CFU ml<sup>-1</sup>) and the survival rate (%) of *Penaeus monodon* larvae, for assays using essential oils of *Cinnamomum fragrans* with Tween 80 (B8T, B143T) and without (B8, B143). White symbols correspond to bacterial concentration (CFU ml<sup>-1</sup>) and black symbols to survival rate (%). No significant difference between B8/B8T and B143/B143T ( $P > 0.05$ ). (—△—) B143; (—○—) B143T; (—□—) B8 and (—○—) B8T.

LC50 was significantly lower for B8 (863 mg l<sup>-1</sup>) than B143 (885 mg l<sup>-1</sup>) ( $P < 0.05$ , Fisher LSD).

## Discussion

Vibrionaceae family is part of the autochthonous flora of marine organisms and one of the most important groups in marine environments (Table 1). It is recognized that some *Vibrio* species are difficult to identify at the species level using biochemical characters (Gopal *et al.* 2005). The species found in this work participate to the diversity of the *Vibrio* community in *P. monodon* culture ponds (Leaño *et al.* 1998; Sung *et al.* 1999). Bacillaceae and Micrococcaceae isolates, which have been isolated on TCBS medium as well (López-Torres and Lizárraga-Partida 2001), have been reported in aquaculture systems (Nedoluha and Westhoff 1997), in *Artemia* and *Artemia* rearing water (López-Torres and Lizárraga-Partida 2001; Kennedy *et al.* 2006). Gram-negative bacteria are the major group isolated from healthy penaeid larvae and juveniles (Vandenberghe *et al.* 1998; Oxley *et al.* 2002). Both dominance of the *Vibrio* population in larvae and their higher resistance to tested oils may give the resident species a competitive edge over Gram-positive reproducing in the larvae. While in the water tank, feeding with *Artemia* may explain the higher presence of Gram-positive bacteria. Plants are generally considered as rich sources of safe and economical active compounds (Citarasu *et al.* 2002). The EOs extracted from the leaves

of *C. fragrans* collected in two regions in Madagascar (B143 in Mariarano and B8 in Tsaramandroso) were characterized by their high content in oxygenated monoterpenes, 1,8-cineole and linalool, respectively (Randrianarivelo *et al.* 2009), which are known for their antimicrobial properties (Sivropoulou *et al.* 1997). Others minor constituents found have also been reported for their antimicrobial activity, such as p-cymene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinolene, caryophyllene oxide and camphene (Sökmen *et al.* 2004). For the majority of the isolates, Bacillaceae were more sensitive than the Vibrionaceae isolates, which is in accordance with several reports (Dubber and Harder 2008). Gram-negative organisms possess an outer membrane, which may account for the increase in resistance to hydrophobic components (Griffin *et al.* 2001). Although the antimicrobial activities of EOs are well established, their mode of action is still poorly understood (Baser *et al.* 2006). Cytotoxic effects were observed *in vitro* in Gram-positive and Gram-negative bacteria (Burt 2004). Terpenes have been reported to cause the disruption of the membranes of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* causing the leakage of intracellular constituents (Andrews *et al.* 1980; Ultee *et al.* 1999). Oregano essential oil and two of its main components (thymol and carvacrol) were found to damage the membrane integrity of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (Knobloch *et al.* 1989; Helander *et al.* 1998; Lambert *et al.* 2001; Ultee *et al.* 2002). Besides these effects on cellular membranes, essential oil active compounds (e.g. terpenes) might have several targets that inhibit bacteria involving the substrate uptake (membrane dysfunction) or electron transport (Tassou *et al.* 2000). Because of their mode of action affecting several targets, no particular resistance or adaptation to EOs has been described so far in the literature (Bakkali *et al.* 2008).

The negative correlation observed in the experiments between the bacterial concentration and larval survival was in accordance with Regunathan and Wesley (2004). The inhibition of the bacterial growth confirmed the potential of both *C. fragrans* origins to control the bacterial load in *in vivo* conditions of larval culture (Figs 1–3). This may be attributed to their antimicrobial effects as demonstrated by their low MIC against different tested isolates (Table 2). Essential oils as complex mixtures may exhibit antimicrobial activities, which differ from those of their major component tested solely (Delaquis *et al.* 2002). In fact, the inhibitory activity of an essential oil results from a complex interaction between its different constituents, which may produce, additive, synergistic or antagonistic effects, even for those present at lower concentrations (Xianfei *et al.* 2007).

Several studies have reported the potential to use plant extracts as an alternative to antibiotics in aquaculture and in organic farming in particular. Abutbul et al. (2004) found similar mortalities between *Streptococcus iniae*-infected tilapia, which were treated with *Rosmarinus officinalis* extract or leaf powder and those treated with oxytetracycline. Juveniles of *Penaeus indicus* fed with an enriched diets from terrestrial plants displayed better survival and growth in addition to inhibiting bacterial load of *V. parahaemolyticus* (Immanuel et al. 2004). The supplementation of enriched *Artemia* with plant extracts of *Withania somnifera* and *Mucuna pruriens* showed higher larval quality indices including the cumulative larval survival of *P. monodon* (Babu et al. 2008). The protection elicited by *Dendrilla nigra*, a marine sponge, has been reported to be because of its antibiotic effect against *V. harveyi* and *V. alginolyticus* rather than its influence on the host defence system of shrimps (Selvin and Lipton 2004).

Other studies found it unnecessary to add emulsifiers for the use of EOs (Dorman and Deans 2000; Lambert et al. 2001). In some cases, solvents and detergents have been reported to have an antagonist effect, which significantly decreases the antibacterial activity of EOs (Remmal et al. 1993). The Tween 80 has been reported to have various effects on bacteria at concentrations as low as 1, 0.5 and 0.05% (Hood et al. 2003). To minimize any adverse effect of Tween 80, these authors have recommended keeping its concentration below 0.05%.

This study demonstrated the potential of the essential oil of *C. fragrans* to control the bacterial load and enhance the survival rate of *P. monodon* larvae. Because of its potent antibacterial activity against *Vibrio* spp., the essential oil of *C. fragrans* could form a relevant option for developing novel antimicrobial agents for eco-friendly management of disease caused by vibrios in shrimp hatchery culture. Further studies need to be conducted to determine the specific nature of the bioactive agents of *C. fragrans* EOs.

## References

- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O. and Zilberg, D. (2004) Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture* **238**, 97–105.
- Andrews, R.E., Parks, L.W. and Spence, K.D. (1980) Some effects of douglasfir terpenes on certain microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **40**, 301–304.
- Anon. (2007) Cahier des charges concernant le mode de production et de préparation biologiques des espèces aquacoles et leurs dérivés. Avenant n° 7 au cahier des charges concernant le mode de production et de préparation biologique des animaux et des produits animaux (CC REPAB F) définissant les modalités d'application du règlement CEE n° 2092/91 modifié du Conseil et/ou complétant les dispositions du règlement CEE n°2092/91 modifié du Conseil. J.O.R.F., 1–36.
- Babu, M.M., Sivaram, V., Immanuel, G., Citarasu, T. and Punitha, S.M.J. (2008) Effects of herbal enriched *Artemia* supplementation over the reproductive performance and larval quality in spent spawners of the tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Turk J Fish Aquat Sci* **8**, 301–307.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol* **46**, 446–475.
- Baruah, K., Cam, D.T.V., Dierckens, K., Wille, M. and Defoirdt, T. (2009) *In vivo* effects of single or combined N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals on the performance of *Macrobrachium rosenbergii* larvae. *Aquaculture* **288**, 233–238.
- Baser, H.C., Demirci, K., Iscan, B., Hashimoto, G., Demirci, T., Noma, F. and Asakawa, Y. (2006) The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* BOISS. var. *discoidea* BOISS. *Chem Pharm Bull* **54**, 222–225.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol* **94**, 223–253.
- Citarasu, T., Babu, M.M., Sekar, R.R.J. and Marian, M.P. (2002) Developing *Artemia* enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius. *Asian Fish Sci* **15**, 21–32.
- Danthu, P., Lubrano, C., Flavet, L., Rahajanirina, V., Behra, O., Fromageot, C., Rabevohitra, R. and Roger, E. (2010) Biological factors influencing production of xanthones in *Aphloia theiformis*. *Chem Biodivers* **7**, 140–150.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. and Bossier, P. (2007) Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol* **25**, 472–479.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol* **74**, 101–109.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.-M., van Dorsselaer, A. and Bachère, E. (1999) Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem* **266**, 335–346.
- Direkbusarakom, S., Ezura, Y., Yoshimizu, M. and Herunsalee, A. (1998) Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathol* **33**, 437–441.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* **88**, 308–316.
- Dubher, D. and Harder, T. (2008) Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata*



- inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture* **274**, 196–200.
- FAO (2005) *Fisheries Technical Paper N°469*. p. 97. Rome, Italy: FAO.
- GESAMP (1997) Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. In *Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection Reports and Studies*. p. 40. Rome, Italy: FAO.
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. and Karunasagar, I. (2005) The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int J Food Microbiol* **102**, 151–159.
- Griffin, S.G., Grant Wyllie, S. and Markham, J.L. (2001) Role of the outer membrane of *Escherichia coli* AG 100 and *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 and resistance/suceptibility to monoterpenes of similar chemical structure. In *The Antimicrobial/Biological Activity of Essential Oils* ed. Lawrence, B.M. pp. 373–379 Illinois, USA: Publishing corporation.
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and Wright, A.v. (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* **46**, 3590–3595.
- Hood, J.R., Wilkinson, J.M. and Cavanagh, H.M.A. (2003) Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *J Essent Oil Res* **15**, 428–433.
- Hsieh, T.-J., Wang, J.-C., Hu, C.-Y., Li, C.-T., Kuo, C.-M. and Hsieh, S.-L. (2008) Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish Shellfish Immunol* **25**, 581–588.
- Immanuel, G., Vincybai, V.C., Sivaram, V., Palavesam, A. and Marian, M.P. (2004) Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture* **236**, 53–65.
- IUCN 2009. *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2*. <http://www.iucnredlist.org> (accessed 15th January 2010).
- Kennedy, B., Venugopal, M.N., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. (2006) Bacterial flora associated with the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, in the hatchery system. *Aquaculture* **261**, 1156–1167.
- Knobloch, K., Iberl, A.P.B., Weigand, H. and Weis, N. (1989) Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res* **1**, 119–128.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and 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.
- Leaño, E.M., Lavilla-Pitogo, C.R. and Paner, M.G. (1998) Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture* **164**, 367–374.
- Leaño, E.M., Xi, Y.C. and Liao, I.C. (2007) Effects of steiva extract on growth, non-specific immune response and disease resistance of grass prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius), juveniles. *J Fish Soc Taiwan* **34**, 165–175.
- López-Torres, M.A. and Lizárraga-Partida, M.L. (2001) Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture* **194**, 11–20.
- Maes, P. and Paillard, C. (1992) Effet du vibrio p1, pathogene de *Ruditapes philippin arum*, sur d'autres espèces de bivalves. In *Les mollusques marins, biologie et aquaculture* ed. Ifremer. pp. 141–148. Ifremer: Société française de malacologie.
- Milijaona, R., Rasidimanana, V., Rabarison, H., Cheplogoi, P.K., Ratsimbason, M., Mulholland, D.A. and Maucière, P. (2003) Plant traditionally prescribed to treat tazo (malaria) region of Madagascar. *Malar J* **2**, 25.
- Nedoluha, P.C. and Westhoff, D. (1997) Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. *Food Microbiol* **14**, 255–264.
- Oxley, A.P.A., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D. (2002) Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J Appl Microbiol* **93**, 214–223.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. and Lan, C.Q. (2008) Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* **104**, 1–13.
- Pernet, R. and Meyer, G. (1957) *Pharmacopée de Madagascar* Tsimbazaza: Institut de Recherche Scientifique Tananarive.
- Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., Menut, C., Andrianolisoa, H.S. et al. (2009) Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chem* **114**, 680–684.
- Regunathan, C. and Wesley, S.G. (2004) Control of *Vibrio* spp. in shrimp hatcheries using the green algae *Tetraselmis suecica*. *Asian Fish Sci* **17**, 147–158.
- Remmal, A., Bouchickhi, T., Rhayour, K. and Ettayebi, M. (1993) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J Essent Oil Res* **5**, 179–184.
- Schulte, V.K.E., Rücker, G. and Lewe, W.A. (1972) Über die inaltstoffe von *Cinnamosma fragrans* Baillon-einer arzneipflanze aus Madagaskar. *Dtsch Apoth Ztg* **41**, 1578–1579.
- Selvin, J. and Lipton, A.P. (2004) *Dendrilla nigra*, a marine sponge, as potential source of antibacterial substances for managing shrimp diseases. *Aquaculture* **236**, 277–283.
- Sivropoulou, A., Nikobu, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. (1997) Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J Agric Food Chem* **45**, 3197–3201.
- Sökmen, A., Gulluce, M., Askin Akpulat, H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sökmen, M. and Sahin, F. (2004)

- The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* **15**, 627–634.
- Sung, H.-H., Li, H.-C., Tsai, F.-M., Ting, Y.-Y. and Chao, W.-L. (1999) Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *J Exp Mar Biol Ecol* **236**, 261–271.
- Tassou, C., Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J.E. (2000) Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res Int* **33**, 273–280.
- Tucker, A.O., Maciarello, M.J., Brown, R. and Griffith, M. (2008) A commercial essential oil of *Mandravasarotra* (*Cinnamosma fragrans* Baill., Canellaceae) from Madagascar. *J Essent Oil Res* **20**, 259–260.
- Ultee, A., Kets, E.P. and Smid, E.J. (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4606–4610.
- Ultee, A., Bennik, M.H. and Moezelaar, R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1561–1568.
- Vandenbergh, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H.S. and Swings, J. (1998) Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* **169**, 121–132.
- Xianfei, X., Xiaoqiang, C., Shunying, Z. and Guolin, Z. (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. *Food Chem* **100**, 1312–1315.
- Yeh, R.-Y., Shiu, Y.-L., Ju, J.-Y., Cheng, S.-C., Huang, S.-Y., Lin, J.-C. and Liu, C.-H. (2008) Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* **27**, 26–32.
- Yılmaz, M., Gül, A. and Erbasli, K. (2004) Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). *Chemosphere* **56**, 381–385.



Contents lists available at ScienceDirect

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*Roger Randrianarivelo<sup>a,\*</sup>, Samira Sarter<sup>b</sup>, Eric Odoux<sup>c</sup>, Pierre Brat<sup>c</sup>, Marc Lebrun<sup>c</sup>, Bernard Romestand<sup>d</sup>, Chantal Menut<sup>e</sup>, Hanitriniaina Sahondra Andrianoelisoa<sup>f</sup>, Marson Rahehimandimby<sup>g</sup>, Pascal Danthu<sup>h</sup><sup>a</sup> Centre National de Recherches Appliquées au Développement Rural/Département de Recherches Technologiques (FOFIFA/DRT), Ambatobe BP 1444, 101 Antananarivo, Madagascar<sup>b</sup> CIRAD, UMR QUALISUD, 101 Antananarivo, Madagascar<sup>c</sup> CIRAD, UMR QUALISUD, 34398 Montpellier Cedex 05, France<sup>d</sup> Equipe Ecosystèmes Lagunaires RIAE, UMR 5119 (UMI, IFREMER, CNRS), Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France<sup>e</sup> ENSCM, Equipe Glycochimie, IBMM, UMR 5247, 8 Rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier Cedex 05, France<sup>f</sup> Centre National de Recherches Appliquées au Développement Rural/Département de Recherches Forestières et Piscicoles (FOFIFA/DRFP), Antananarivo, Madagascar<sup>g</sup> Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, Département de Biochimie, Antananarivo, Madagascar<sup>h</sup> CIRAD, URP Forêts et Biodiversité, Antananarivo, Madagascar and Campus de Baillarguet, 34392 Montpellier Cedex 05, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 April 2008

Received in revised form 9 September 2008

Accepted 6 October 2008

## Keywords:

*Cinnamosma fragrans*

Essential oil

Antimicrobial activity

Linalool

1,8-Cineole

Madagascar

## ABSTRACT

Essential oil samples of *Cinnamosma fragrans* from two regions in Madagascar, Tsaramandroso (38 samples) and Mariarano (30 samples), were analysed by GC/MS. Fifty-seven components were identified, accounting from 88.3% to 99.4% of the oils' composition. The major components were linalool ( $72.5 \pm 23.3\%$ ) in Tsaramandroso and 1,8-cineole ( $47.3 \pm 10.2\%$ ) in Mariarano.

Samples B8 (95.8% linalool) from Tsaramandroso and B143 (71.6% 1,8-cineole) from Mariarano containing the highest proportions of the two main components identified, were selected to determine antimicrobial activities against 10 microbial strains. *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* were the most sensitive strains to both oils. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were lower for B143 against all tested Gram-negative strains than pure 1,8-cineole. B8 showed higher MIC values than pure linalool against *Salmonella typhimurium* and *Vibrio alginolyticus*, and similar MIC values to linalool towards the other Gram-negative strains. Both essential oils exhibited higher MIC values towards *Fusarium oxysporum* than their respective pure major component. These results suggested the occurrence of synergism or antagonism effects between the different oil constituents.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Cinnamosma fragrans* Baillon (local names: *Motrobeatiniana*, *Mandravasarotra*), is a tree endemic to Madagascar of the family of Cannelaceae. It is distributed extensively in the North-east of Madagascar (Canonica et al., 1969). It grows in the tropophytic forests but often near the coast. Leaves and fruits are very aromatic and have a spiced flavour (Perrier de la Bâthie, 1954). To our knowledge, little literature describes the chemical composition of this species' extracts and the information given is contradictory. For example, Schulte, Rücker, and Lewé (1972) assumed that linalool is the main compound of the essential oil of *C. fragrans* isolated from leaves, while a recent study (Tucker, Maciarelo, Brown, & Griffith, 2008) showed that 1,8-cineole and sabinene dominate.

*C. fragrans* is used traditionally against respiratory, parasitic and gastrointestinal infections, syphilis (Pernet & Meyer, 1957; Schulte et al., 1972), and malaria (Milijaona et al., 2003). Several essential oil components have been reported as efficient antibacterial or

antifungal agents, such as linalool (Knobloch, Iberl, Weigand, & Weis, 1989), 1,8-cineole (Sökmen et al., 2004),  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -phellandrene, *p*-cymene (Dorman & Deans, 2000). *In vitro* studies have demonstrated antibacterial activity of essential oils; *Chaenomeles speciosa* for instance, was active against several pathogens, such as *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Fusarium* sp., (Burt, 2004; Xianfei, Xiaoqi, Shunying, & Guolin, 2007).

*Vibrio* sp. includes many strains pathogenic or opportunistic to humans, through the consumption of contaminated seafood (Sung, Li, Tsai, Ting, & Chao, 1999). *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *Micrococcus luteus* have been implicated in human diseases (Matasyoh, Kiplimo, Karubiu, & Hailstorks, 2007). *F. oxysporum*, which is an abundant and active saprophyte in soil and organic matter, is a plant pathogen (Nelson, 1981).

The aim of the present study was, as a first step, to determine the chemical composition of different samples of the essential oil of *C. fragrans* collected from two sites within the distribution area of the species in Madagascar. In a second step, we examined the *in vitro* antimicrobial activity of two selected samples, which

\* Corresponding author. Tel.: +261 33 14 33 295; fax: +261 20 22 40 821.

E-mail address: [randrianariveloroger@yahoo.fr](mailto:randrianariveloroger@yahoo.fr) (R. Randrianarivelo).



possessed high contents of linalool or 1,8-cineole, against a large selection of Gram-negative (*S. typhimurium*, *Vibrio* sp., *E. coli*), Gram-positive bacteria (*M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*) and one fungus (*F. oxysporum*). We compared their activities with the activity of the major component of each essential oil sample (namely pure linalool and 1,8-cineole).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and extraction procedure

For each tree, a sample of leaves (approximately 400 g) was collected during the rainy season, in February 2005: 30 trees were harvested in Mariarano (15°41'S; 46°43'E, altitude from sea level to 7 m) and 38 in Tsaramandroso (16°18' S; 47°02'E, altitude: 600 m) for a total of 68 samples. A voucher specimen was deposited in the herbarium of FOFIFA, Antananarivo, Madagascar. The leaves were steam distilled for 4 h in a Clevenger-type apparatus. Distillations were performed less than 24 h after sampling. The essential oils were dried over anhydrous sodium sulphate until the last traces of water were removed and then stored in dark glass bottles at 4 °C.

### 2.2. Chemical analysis

The 68 samples of essential oils were analysed by gas chromatography (GC) and gas chromatography combined with mass spectrometry (GC/MS).

A Varian 3400 gas chromatograph (Varian Inc., Palo Alto, CA) was used with a flame ionisation detector (FID), an on-column injector, a DB-Wax (A, J&W Scientific, Folsom, CA) fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 µm film). Oven temperature was increased from 50 °C to 200 °C at a rate of 5 °C/min and held at 200 °C for 20 min. Injector and detector temperature was 230 °C. Helium was the carrier gas at a flow rate of 2.0 ml per min. Response factors were taken as 1.0 for all compounds, except for limonene (1.3), with reference to *n*-hexanol as internal standard. Linear retention indices were calculated with reference to *n*-alkanes (C<sub>5</sub>–C<sub>22</sub>). Concentrations are given as the average of triplicate analyses.

GC-MS analyses were performed under the same conditions as GC-FID using an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with an Agilent 5973 mass selective detector. Injector and transfer line temperatures were 220 °C and 240 °C, respectively; oven temperature programmed from 50 °C to 200 °C at 5 °C/min. Carrier gas was helium at 1 ml/min; injection volume was 0.1 µl (10% hexane solution) at a split ratio of 1:50.

The identifications of the components were based on the comparison of their mass spectra with those of Wiley and NIST (National Institute of Standards and Technology) libraries and literature data (Adams, 2001), as well as by comparison of their retention indices with literature values and co-injections.

Pure linalool and 1,8-cineole were purchased from Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France).

### 2.3. Antimicrobial activity

#### 2.3.1. Microbial strains

The activity of the essential oils samples was tested towards 10 different microorganisms. Gram-negative bacteria were *E. coli* 363, *V. anguillarum* ATCC 19264, *V. harveyi* ATCC 14126, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. fischeri* ATCC 49387, *S. typhimurium* ATCC 14028. Three Gram-positive strains were *M. luteus* ATCC 10240, *B. subtilis* ATCC 6633 and *S. aureus* ATCC 6538. *F. oxysporum* ATCC 695 was the one fungus studied.

*V. fischeri*, *V. harveyi*, *S. aureus* and *B. subtilis* were purchased from the Collection of Institute Pasteur (Paris, France). The other strains were gifts from Ifremer (Montpellier, France). These strains were maintained on solid agar using marine agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) for vibrios; Trypticase soy broth (Difco Laboratories) for *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* and *M. luteus*; Sabouraud dextrose agar (BBL, Beckton Dickinson Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ) for *F. oxysporum*.

#### 2.3.2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

MIC and MBC were determined for samples B8 from Tsaramandroso, B143 from Mariarano, and pure linalool and 1,8-cineole as well.

A broth dilution method was used to determine the MIC and the MBC (Destoumieux, Bulet, Strub, van Dorsselaer, & Bachère, 1999). Stock solutions of essential oils were prepared in sterile distilled water. These suspensions were further diluted from 0.04 mg/ml to 23.5 mg/ml in test tubes. About 30 °C-overnight cultures were inoculated in 900 µl of Zobell (Maes & Paillard, 1992) for *Vibrio* strains or Poor broth (Destoumieux et al., 1999) for the other strains. The optical density of the inoculum was measured at  $D_{600} = 0.1$  and then diluted to reach a final optical density of  $D_{600} = 0.001$  in the assay. One hundred microlitres of the essential oil dilution were then added to these cultures to reach a final volume of 1 ml. The tests were carried out in triplicate. A positive control containing the bacterial culture without the essential oil and a negative control containing only the medium were analysed as well. Tubes were incubated for 24 h at 25 °C for *Vibrio* sp., 30 °C for *M. luteus*, 37 °C for *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* and *F. oxysporum* (48 h incubation for the fungi).

The MIC was defined as the lowest concentration of the essential oil at which the microorganism does not demonstrate visible growth. Cell suspensions (0.1 ml) from the tubes showing no growth were subcultured on Zobell and Poor broth agar plates to determine if the inhibition was reversible or permanent. MBC was determined as the highest dilution (lowest concentration) at which no growth occurred on the agar plates (Gachkar et al., 2007).

### 2.4. Statistical analysis

Mean composition of essential oil was given ±SD. For comparison of MIC and MBC values, tests were made in triplicate. Analysis of variance was performed. Significant differences between means were determined by Fisher's test at the threshold of ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical composition

The essential oils isolated from the leaves of *C. fragrans* collected in Mariarano and Tsaramandroso were characterised by their high content in 1,8-cineole and linalool, respectively (Table 1).

The samples collected in Tsaramandroso afforded essential oils with a large amount of linalool (72.5 ± 23.3%) and its oxides (1.9%); only two other oxygenated monoterpenoids accounting for more than 1% (terpinen-4-ol and 1-terpineol). The monoterpene hydrocarbons, which represented less than 10% of the mixture, were mainly represented by *p*-menthane structures  $\alpha$ -phellandrene,  $\beta$ -phellandrene, *p*-cymene and terpinolene. Finally,  $\beta$ -cubebene,  $\beta$ -caryophyllene, germacrene- $\alpha$ ,  $\delta$ -cadinene and caryophyllene oxide are the main sesquiterpenoid components.

In the Mariarano plants, the oxygenated monoterpenes also represented the major chemical class. They were dominated by 1,8-cineole (47.3 ± 10.2%), the four other main components in this

**Table 1**Composition of the essential oils of 68 samples (% peak area) of *C. fragrans* harvested in Tsaramandroso (*n* = 30) and Mariarano (*n* = 38).

		RI	Tsaramandroso		Mariarano		Identification method
			Mean value <sup>A</sup>	B8	Mean value <sup>A</sup>	B143	
Monoterpene hydrocarbons							
1	$\alpha$ -Pinene	1012	1.0 $\pm$ 1.3	0.1	3.5 $\pm$ 1.5	1.1	a; b ; c
2	Camphene	1056	1.1 $\pm$ 1.6	0.1	4.8 $\pm$ 2.2	1.2	a; b
3	$\beta$ -Pinene	1097	0.9 $\pm$ 1.0	0.1	8.0 $\pm$ 3.8	2.1	a; b ; c
4	Sabinene	1113	0.9 $\pm$ 1.0	0.2	1.8 $\pm$ 0.9	3.2	a; b
5	$\delta$ -3-Carene	1142	0.5 $\pm$ 0.7	0.1	1.7 $\pm$ 1.1	0.5	a; b
6	$\alpha$ -Phellandrene	1157	0.2 $\pm$ 0.2	tr	0.4 $\pm$ 0.7	2.1	a; b
7	Myrcene	1160	0.2 $\pm$ 0.4	0.2	0.6 $\pm$ 1.0	1.2	a; b
8	Pseudolimonene	1167	0.3 $\pm$ 0.4	–	0.7 $\pm$ 1.3	0.2	a; b
9	$\alpha$ -Terpinene	1174	1.4 $\pm$ 3.7	0.2	0.9 $\pm$ 1.5	0.1	a; b
10	Limonene	1191	0.7 $\pm$ 2.3	0.2	1.3 $\pm$ 1.9	0.6	a; b
11	$\beta$ -Phellandrene	1201	0.4 $\pm$ 0.6	tr	0.4 $\pm$ 0.9	0.4	a; b
12	(Z)- $\beta$ -Ocimene	1232	0.7 $\pm$ 0.8	–	1.1 $\pm$ 1.3	0.2	a; b
13	(E)- $\beta$ -Ocimene	1248	0.2 $\pm$ 0.3	–	0.3 $\pm$ 0.3	0.1	a; b
14	p-Cymene	1263	0.4 $\pm$ 1.1	0.2	0.8 $\pm$ 1.1	0.5	a; b
15	Terpinolene	1278	0.8 $\pm$ 1.4	0.1	0.6 $\pm$ 0.8	0.1	a; b
16	allo-Ocimene	1284	0.0 $\pm$ 0.0	tr	0.1 $\pm$ 0.3	0.1	a; b
	Total			1.5		13.7	
Oxygenated monoterpenes							
17	1,8-Cineole	1207	0.5 $\pm$ 0.9	0.4	47.3 $\pm$ 10.2	71.6	a; b ; c
18	Perillene	1294	tr	0.1	0.1 $\pm$ 0.2	tr	a; b
19	Cis-linalool oxide (furanoid)	1439	0.7 $\pm$ 0.9	0.1	0.5 $\pm$ 0.9	0.1	a; b
20	Trans-linalool oxide (furanoid)	1468	1.2 $\pm$ 2.7	0.2	0.0 $\pm$ 0.1	0.1	a; b
21	Citronellal	1472	0.1 $\pm$ 0.1	tr	0.2 $\pm$ 0.4	0.2	a; b
22	Linalool	1549	72.5 $\pm$ 23.3	95.8	1.1 $\pm$ 1.5	2.9	a; b ; c
23	Camphor	1505	0.2 $\pm$ 0.7	tr	0.2 $\pm$ 0.2	0.4	a; b
24	Bornyl acetate	1575	0.2 $\pm$ 0.4	–	0.7 $\pm$ 0.8	0.3	a; b
25	Myrtenal	1600	0.2 $\pm$ 0.4	tr	0.1 $\pm$ 0.2	0.2	a; b
26	Terpinen-4-ol	1606	1.5 $\pm$ 2.3	0.3	2.2 $\pm$ 2.0	2.5	a; b ; c
27	(E)-2,6 Dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol	1669	0.3 $\pm$ 0.6	0.1	0.5 $\pm$ 1.3	–	a; b
28	$\alpha$ -terpinyl acetate	1687	0.1 $\pm$ 0.2	0.1	0.3 $\pm$ 0.5	0.4	a; b
29	(Z)-2,6 Dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol	1696	0.0 $\pm$ 0.1	tr	0.1 $\pm$ 0.2	–	a; b
30	1-Terpineol	1700	1.2 $\pm$ 1.4	0.2	4.2 $\pm$ 3.0	2.1	a; b ; c
31	Neryl acetate	1720	0.0 $\pm$ 0.1	tr	0.2 $\pm$ 0.5	0.2	a; b
32	Geranial	1735	0.0 $\pm$ 0.1	tr	0.2 $\pm$ 0.2	0.1	a; b
33	Citronellol	1751	0.0 $\pm$ 0.1	–	0.1 $\pm$ 0.2	0.1	a; b
34	Nerol	1795	0.8 $\pm$ 1.8	–	0.5 $\pm$ 0.9	0.1	a; b
35	Isogeraniol	1811	0.1 $\pm$ 0.1	–	0.0 $\pm$ 0.1	tr	a; b
36	Geraniol	1845	0.8 $\pm$ 1.5	tr	1.2 $\pm$ 2.1	0.4	a; b
	Total			97.5		81.1	
Sesquiterpene hydrocarbons							
37	$\alpha$ -Cubebene	1455	0.1 $\pm$ 0.2	tr	0.2 $\pm$ 0.4	0.2	a; b
38	$\alpha$ -Copaene	1480	0.4 $\pm$ 1.2	–	1.4 $\pm$ 1.8	0.2	a; b
39	$\beta$ -Cubebene	1535	0.9 $\pm$ 1.9	tr	0.5 $\pm$ 1.0	0.2	a; b
40	$\beta$ -Caryophyllene	1654	0.7 $\pm$ 1.3	0.1	1.1 $\pm$ 1.8	0.5	a; b
41	$\alpha$ -Humulene	1667	0.2 $\pm$ 0.3	–	0.9 $\pm$ 1.9	0.3	a; b
42	Germacrene-D	1713	0.5 $\pm$ 0.7	–	0.7 $\pm$ 1.3	0.2	a; b
43	Epi-bicyclosesquiphellandrene	1730	0.0 $\pm$ 0.1	tr	0.1 $\pm$ 0.2	0.1	a; b
44	$\delta$ -Cadinene	1760	0.6 $\pm$ 1.7	–	0.5 $\pm$ 0.9	0.1	a; b
45	Cadina-1,4-diene	1783	0.6 $\pm$ 1.4	–	0.0 $\pm$ 0.2	0.2	a; b
46	Cis-calamenene	1853	0.3 $\pm$ 1.3	tr	0.4 $\pm$ 1.0	0.2	a; b
	Total			0.2		2.9	
Oxygenated sesquiterpenes							
47	Caryophyllene oxide	1987	0.4 $\pm$ 1.1	0.1	0.4 $\pm$ 1.1	0.4	a; b
48	Elemol	2083	0.0 $\pm$ 0.1	tr	0.0 $\pm$ 0.1	0.1	a; b
49	Nerolidol	2089	0.1 $\pm$ 0.1	tr	0.0 $\pm$ 0.1	0.1	a; b
50	$\gamma$ -Eudesmol	2166	0.1 $\pm$ 0.1	tr	0.1 $\pm$ 0.1	0.2	a; b
51	Torreyol	2147	0.0 $\pm$ 0.1	tr	0.0 $\pm$ 0.0	0.1	a; b
52	Levomenol	2197	0.0 $\pm$ 0.1	0.1	0.1 $\pm$ 0.2	0.1	a; b
53	$\alpha$ -Eudesmol	2205	0.0 $\pm$ 0.1	tr	0.0 $\pm$ 0.1	0.1	a; b
54	$\beta$ -Eudesmol	2213	0.1 $\pm$ 0.2	tr	0.1 $\pm$ 0.1	0.4	a; b
55	Driminol	2287	0.0 $\pm$ 0.1	–	0.0 $\pm$ 0.1	0.1	a; b
	Total			0.2		1.7	
Others							
56	6-Methyl-5-hepten-2-one	1279	0.4 $\pm$ 0.5	0.2	0.3 $\pm$ 0.8	tr	a; b
57	2-Hexen-1-ol	1288	0.1 $\pm$ 0.4	0.1	0.2 $\pm$ 1.0	0.1	a; b
	Total			0.3		0.1	

a: Retention index: DB-Wax.

b: GC-MS: NIST and Wiley libraries.

c: Co-injection.

tr: Trace (between 0.02% and 0.1%), compounds present below trace amounts (&lt;0.01%) were not registered.

<sup>A</sup> Values are mean  $\pm$  SD of 30 samples of *C. fragrans* essential oils in Tsaramandroso and 38 in Mariarano.



sults from a complex interaction between its different constituents, which may produce additive, synergistic or antagonistic effects, even for those present at low concentrations (Xianfei et al., 2007). Sibanda et al. (2004), who tested the antimicrobial activity of *Heteropyxis dehniae* leaf oil (58.3% linalool as the major component) against different bacteria and fungi, found either higher, lower or similar activities to pure linalool depending on the tested microorganism. Faleiro et al. (2003) have shown that *E. coli*, which was susceptible to pure linalool, became highly resistant to a mixture containing linalool plus 1,8-cineole (1:1). Savelev, Okello, Perry, Wilkins, and Perry (2003) investigated the *in vitro* anticholinesterase activities of eight commercially available terpenoid constituents of *Salvia lavandulifolia* (1,8-cineole, camphor,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, borneol, caryophyllene oxide, linalool and bornyl acetate). They found a minor synergy in 1,8-cineole/ $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole/caryophyllene oxide combinations at higher concentrations, and an antagonistic effect in 1,8-cineole/camphor combinations with an interaction index of two.

Both essential oils exhibited higher MIC values towards the fungus *F. oxysporum* than their respective pure major component. Fraternali, Giamperi, and Ricci (2003) tested the antifungal activity of the oil of *Thymus mastichina* L, which is rich in both 1,8-cineole (55.5%) and linalool (24.5%) against different species of *Fusarium*. The MIC values varied over a range from 0.8 mg/ml to 3.2 mg/ml amongst the eight tested strains. *F. oxysporum* was not included in those selected strains, but the MIC value we found (5.88 mg/ml) was higher. However, these results might be in the same range, because our results also showed higher MIC values for pure 1,8-cineole and linalool, due probably to the different testing methods.

In conclusion, our results demonstrated that 1,8-cineole and linalool were the main constituents of essential oil samples of *C. fragrans* originating from two geographical regions in Madagascar. Both samples exhibited strong antimicrobial activity. Possible synergistic and antagonistic effects may occur in these oil samples against Gram-negative bacteria and *F. oxysporum*. On the basis of these results, essential oil of *C. fragrans* may prove to be a potentially useful antibacterial or antifungal agent.

## Acknowledgements

Financial assistance was gratefully received from the French Ministry of Foreign Affairs (SCAC Madagascar) and the "Centre de Cooperation International en Recherches Agronomiques pour le Développement" (CIRAD "Appui aux Doctorants du Sud"). The authors wish to thank VOI (Vondron'Olona Ifotony) Mariarano and VOI Tsaramandroso.

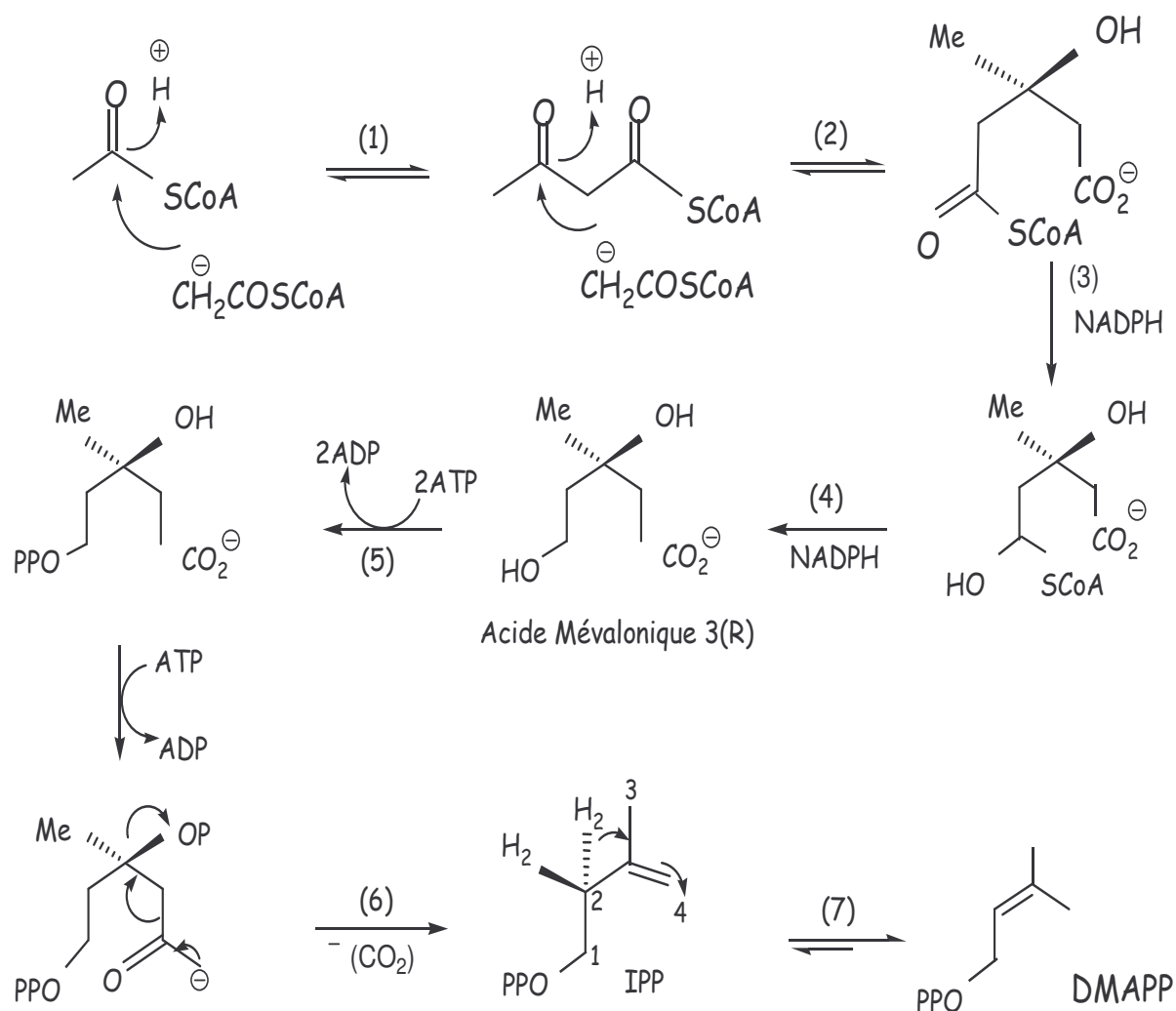
## References

- Adams, R. P. (2001). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Andrianolisoa, H. S., Menut, C., Chatelperron, P. C. D., Sarraco, J., Ramanoelina, P., & Danthu, P. (2006). Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oil from *Ravensara aromatica* Sonnerat, a tree endemic to Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 102–106.
- Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. (2001). *Common fragrance and flavor materials: Preparation, properties and uses*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Canonica, L., Corbella, A., Gariboldi, P., Jommi, G., Krepinisky, J., Ferrari, G., et al. (1969). Sesquiterpenoids of *Cinnamosma fragrans* Baillon, structure of cinnamolide, cinnamosmolide and cinnamodial. *Tetrahedron*, 25, 3895–3902.
- Chang, C.-W., Chang, W.-L., Chang, S.-T., & Cheng, S.-S. (2008). Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Research*, 42(1–2), 278–286.
- Daferera, Dimitra J., Ziogas, Basil N., & Polissiou, Moschos G. (2000). GC-MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2576–2581.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1–2), 101–109.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.-M., van Dorsselaer, A., & Bachère, E. (1999). Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 266, 335–346.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.
- Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., et al. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(1–5).
- Fraternali, D., Giamperi, L., & Ricci, D. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from *in vitro* plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of Essential Oil Research*, 15(4), 278–281.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astanah, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), 898–904.
- Knobloch, K., Iberl, A. P. B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1, 119–128.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462.
- Maes, P., & Paillard, C. (1992). Effet du vibrio p1, pathogene de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves. In *Les mollusques marins, biologie et aquaculture* (Vol. 14, pp. 141–148). Société française de malacologie: Ifremer.
- Matasyoh, J. C., Kiplimo, J. J., Karubiu, N. M., & Hailstorks, T. P. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphoratus*. *Food Chemistry*, 101(3), 1183–1187.
- Milijaona, R., Rasidimanana, V., Rabarison, H., Cheplogoi, P. K., Ratsimbason, M., Mulholland, D. A., et al. (2003). Plant traditionally prescribed to treat tazo (malaria) region of Madagascar. *Malaria Journal*, 2, 25.
- Nelson, P. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In M. E. Mace, A. A. Bell, & C. H. Beckman (Eds.), *Fungal wilt diseases of plants* (pp. 51–80). New York, USA: Academic Press.
- Pernet, R., & Meyer, G. (1957). In P. André (Ed.), *Pharmacopée de Madagascar. Institut de Recherche Scientifique Tananarive* (pp. 26–41). Boulevard Raspail, Paris.
- Perrier de la Bâthie, H. (1954). Canellacées. In H. Humbert (Ed.), *Flore de Madagascar et des Comores* (Vol. 138, pp. 1–9). Paris.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N. S. L., Wilkins, R. M., & Perry, E. K. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 661–668.
- Schulte, V. K. E., Rücker, G., & Lewe, W. A. (1972). Über die Inhaltsstoffe von *Cinnamosma fragrans* Baillon-einer arzneipflanze aus Madagaskar. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 41, 1578–1579.
- Sibanda, S., Chigwada, G., Poole, M., Gwebu, E. T., Noletto, J. A., Schmidt, J. M., et al. (2004). Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 107–111.
- Sivropoulou, A., Nikobu, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3197–3201.
- Sökmen, A., Gulluce, M., Askin Akpulat, H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., et al. (2004). The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15(8), 627–634.
- Sung, H.-H., Li, H.-C., Tsai, F.-M., Ting, Y.-Y., & Chao, W.-L. (1999). Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(2), 261–271.
- Tucker, A. O., Maciarelo, M. J., Brown, R., & Griffith, M. (2008). A commercial essential oil of *Mandravasarotia* (*Cinnamosma fragrans* Baill., Canelaceae) from Madagascar. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 259–260.
- Viljoen, A., van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Baser, H., et al. (2003). *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2–3), 137–143.
- Xianfei, X., Xiaoqiang, C., Shunying, Z., & Guolin, Z. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. *Food Chemistry*, 100(4), 1312–1315.





## ANNEXE 3



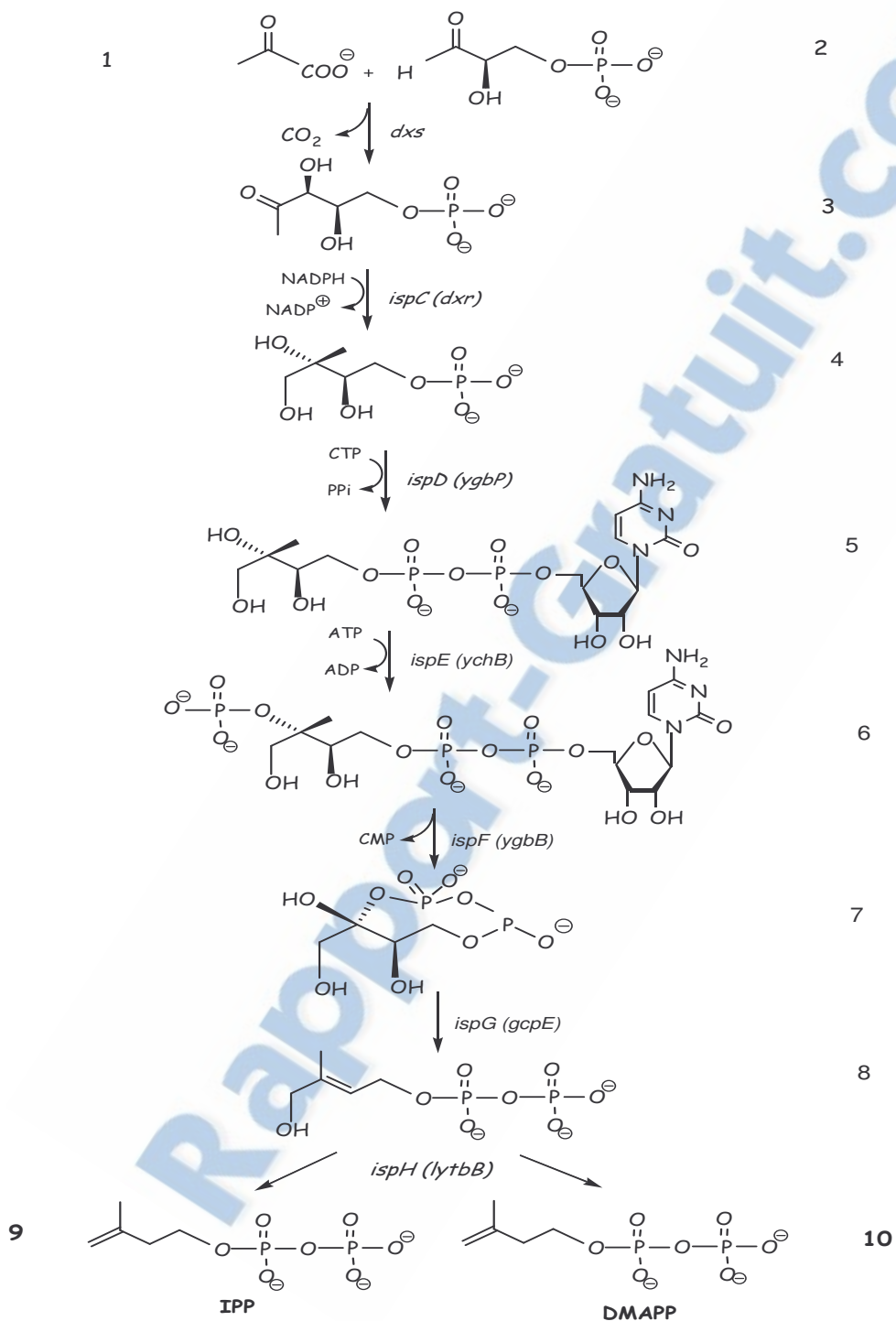
1: Acétoacétyl-coenzyme A thiolase  
 2: Hydroxyméthylglutary-coenzyme A synthétase  
 3: Hydroxyméthylglutary-coenzyme A réductase  
 4: Mévalonate kinase

5: Phosphomévalonate kinase  
 6: Mévalonate-5-diphosphate décarboxylase  
 7: Isopentényl diphosphate-A-isomérise

### Annexe 3 : Formation des motifs isopréniques

Mann J., (1987) secondary metabolism, 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press

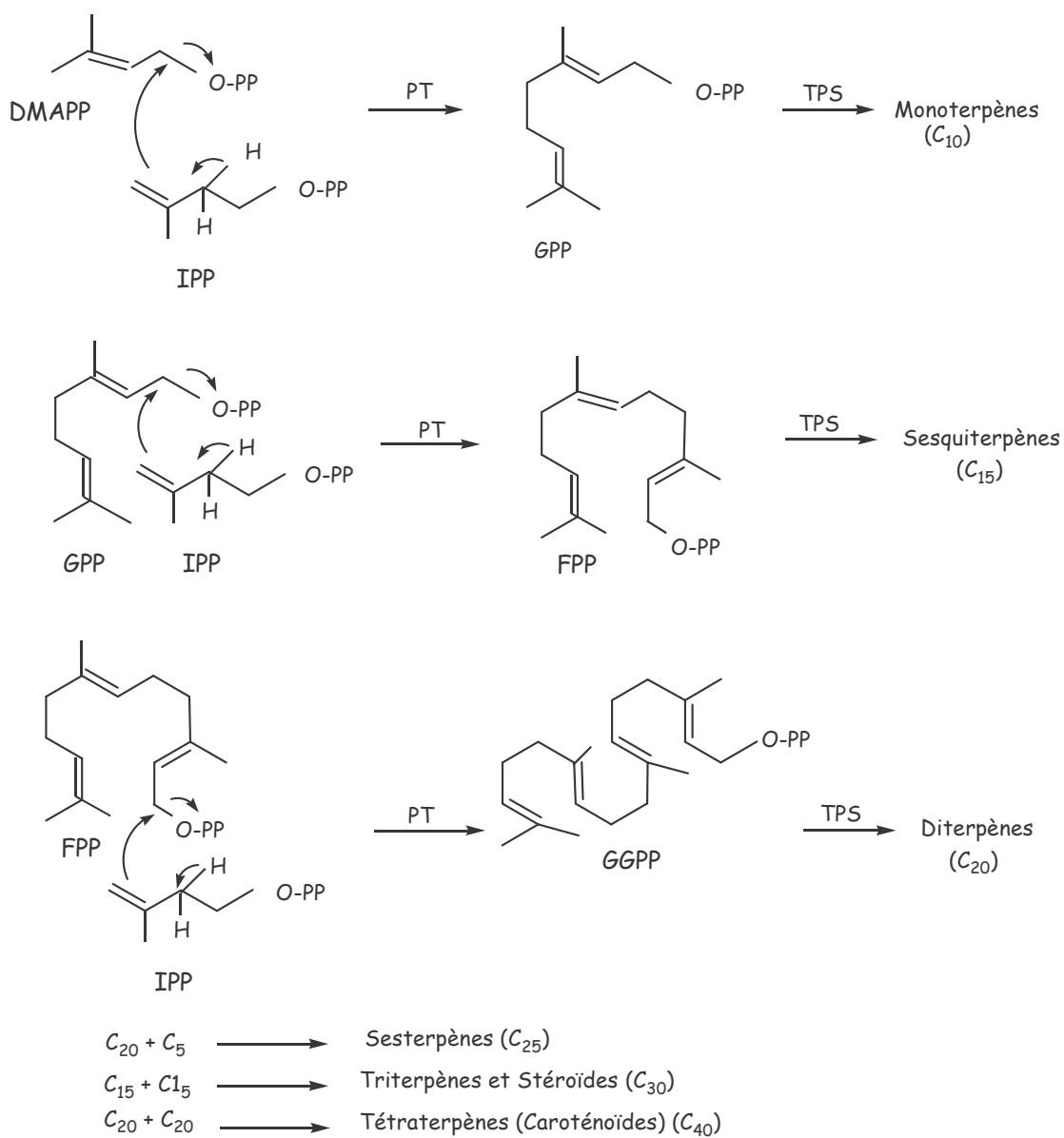
# ANNEXE 4



**Annexe 4:** Nouvelle voie de biosynthèse des terpènes (voie au phosphate de désoxyxylulose)

Mann J., (1987) secondary metabolism, 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press

## ANNEXE 5



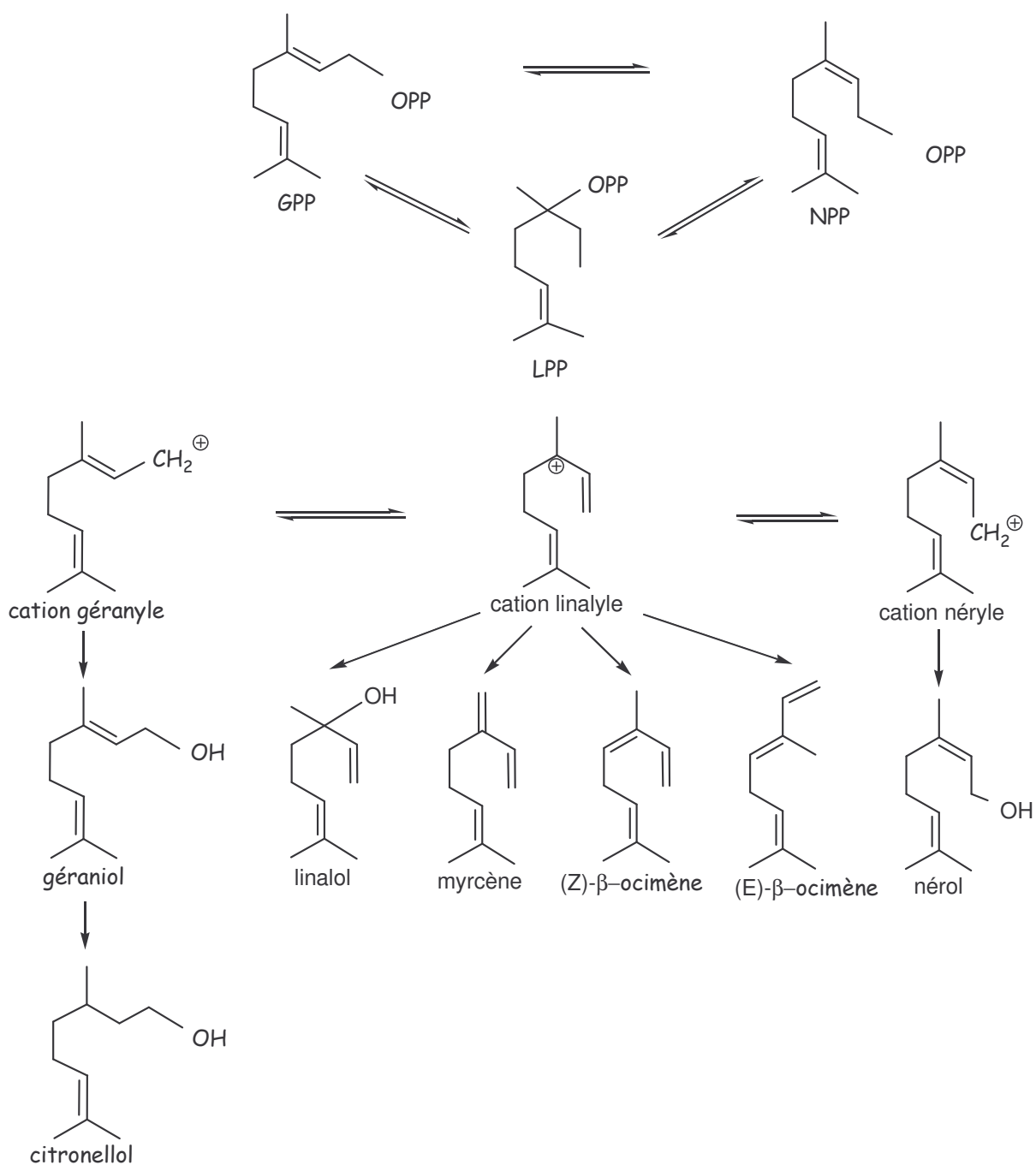
PT : Prényl transférase

TPS : Terpène synthases

### Annexe 5 : Condensation des motifs isopréniques

(Eisenreich *et al.*, 2004)

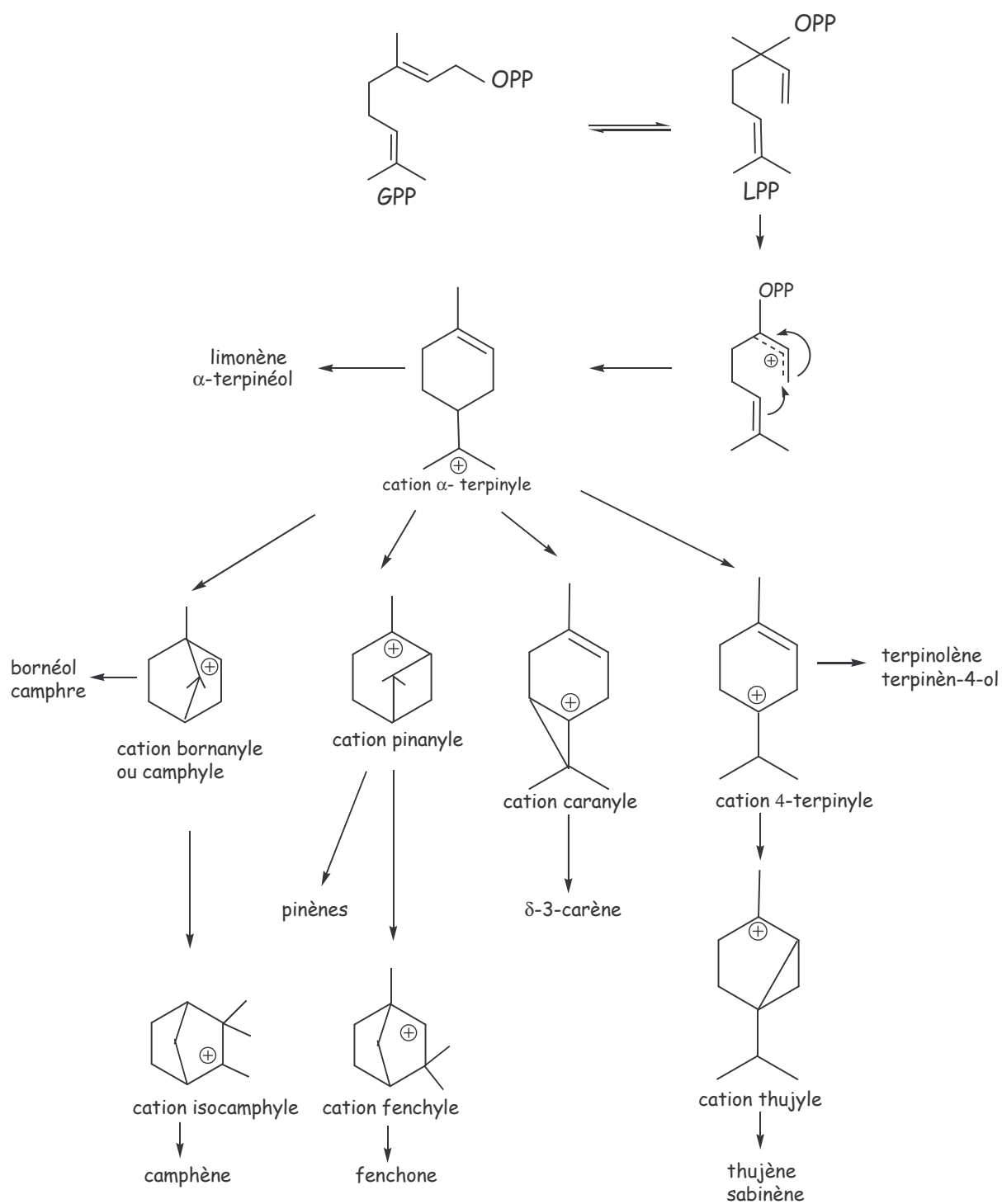
## ANNEXE 6



### Annexe 6 : Voies biosynthétiques des principaux monoterpènes acycliques

(Mann J., (1987) Secondary metabolism, 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press)

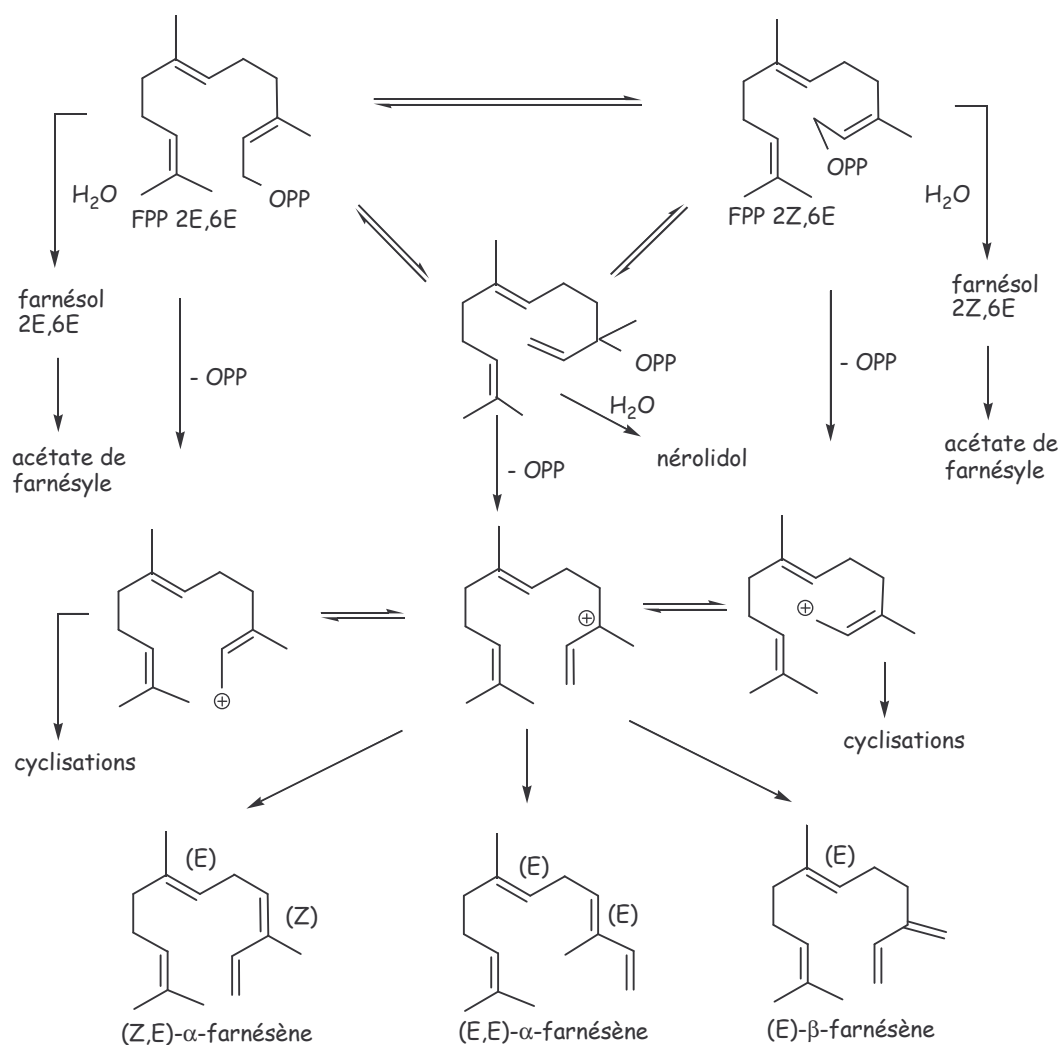
## ANNEXE 7



Annexe 7 : Voies biosynthétiques des principaux monoterpènes cycliques.

(Mann J., (1987) Secondary metabolism, 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press)

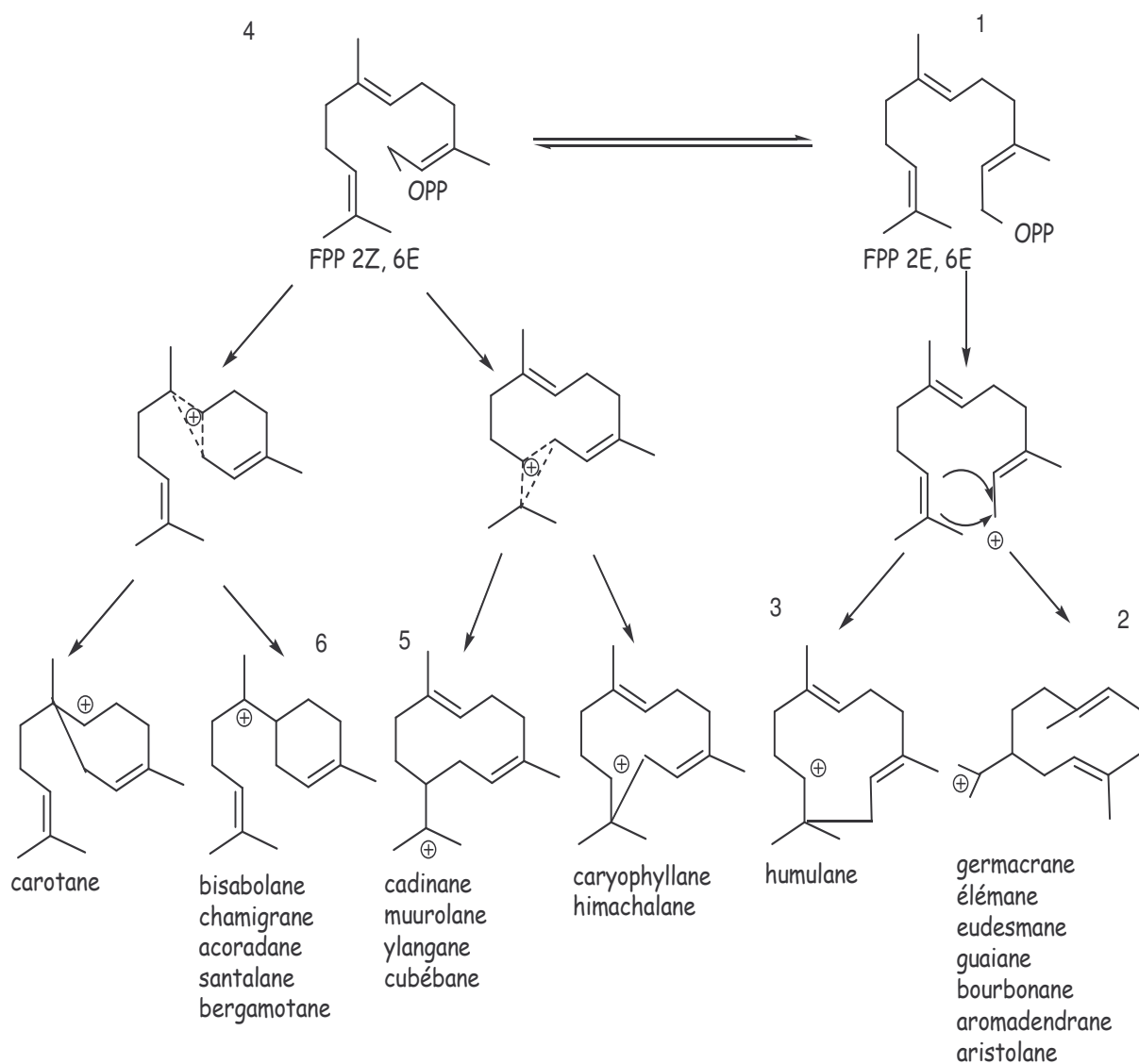
## ANNEXE 8



### Annexe 8 : Biosynthèse des sesquiterpènes acycliques

Mann J., (1987) Secondary metabolism, 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press

## ANNEXE 9

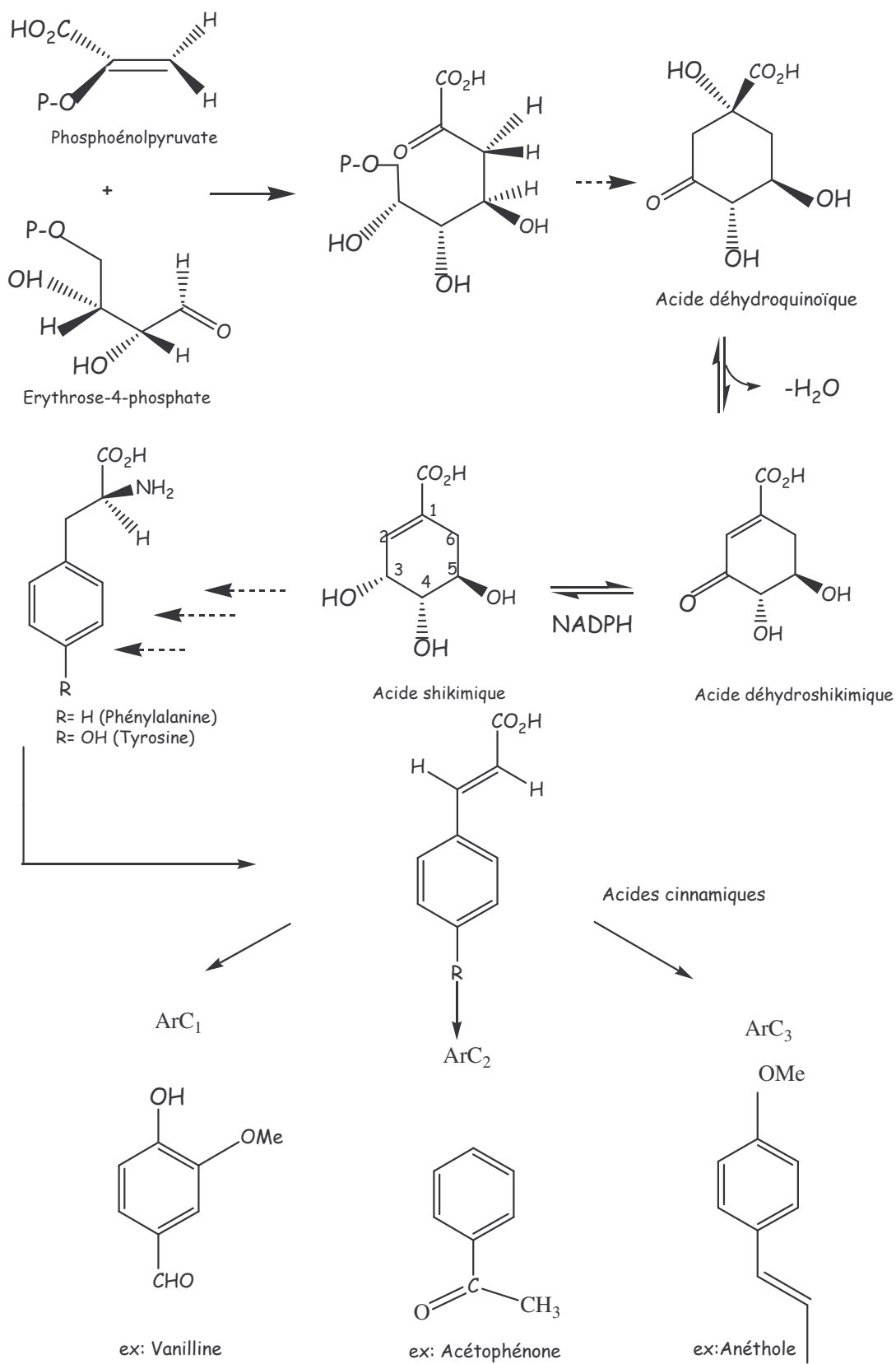


### Annexe 9 : Biosynthèse des sesquiterpènes cycliques

Mann J., (1987), Secondary metabolism, 2<sup>nd</sup> Ed., Oxford, Clarendon Press

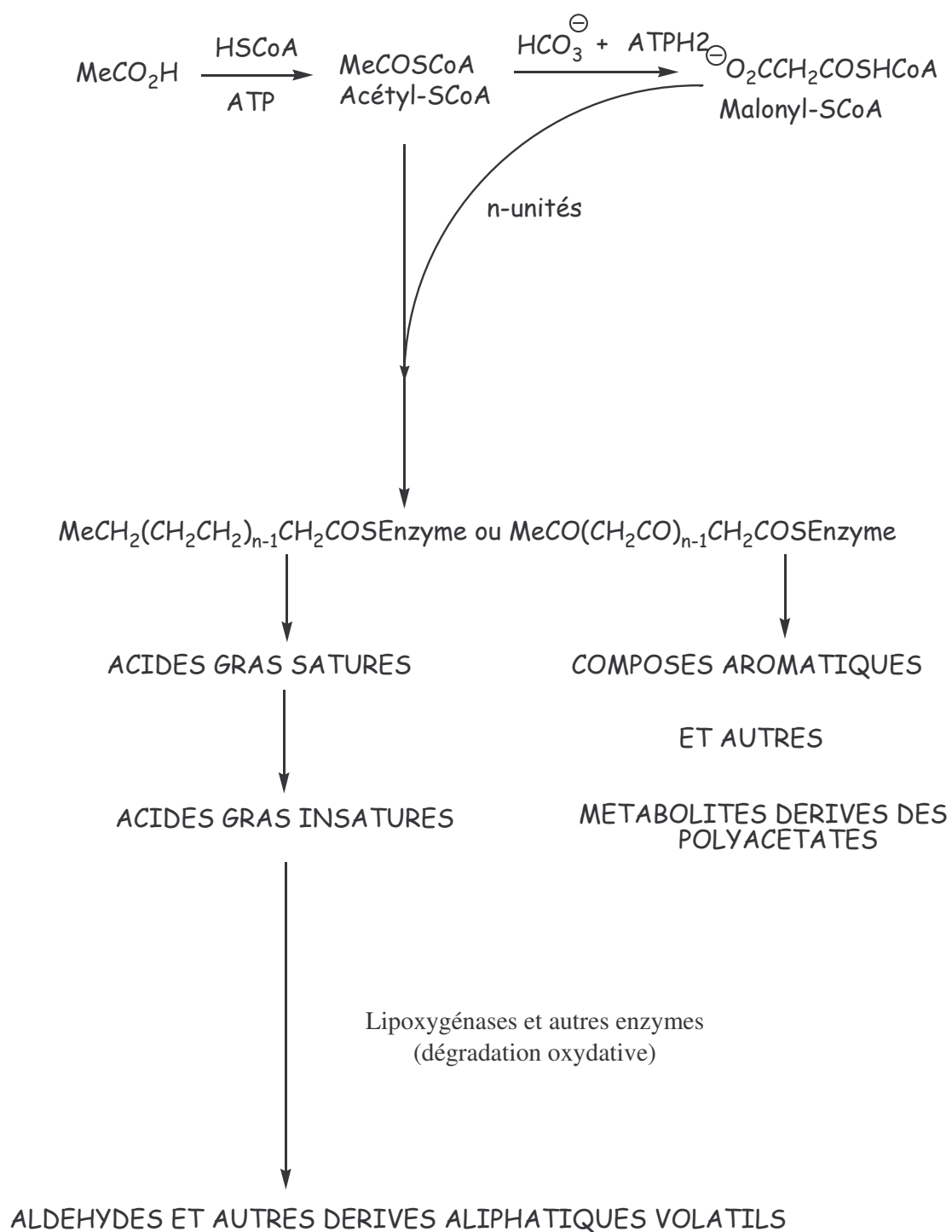


## ANNEXE 10



**Annexe 10 : Biosynthèse des dérivés du phénylpropane (Bruneton, 1999)**

# ANNEXE 11



Annexe 11 : Biosynthèse des dérivés aliphatiques (Bruneton, 1999)

ANNEXE 12 : Changements théoriques d'eau pendant l'élevage de 18 jours.

<b>Jour</b>	<b>Stade</b>	<b>Niveau d'eau (%)</b>	<b>Changement d'eau (%)</b>	<b>Maille (μ)</b>	<b>Durée du changement</b>
<b>J0</b>	N 1	60	-		
<b>J1</b>	N 6	65	-		
<b>J2</b>	Z 1	70	-		
<b>J3</b>	Z 1/Z2	75	-		
<b>J4</b>	Z 2	80	-		
<b>J5</b>	Z 3	85	-		
<b>J6</b>	Z 3-M1	90	-		
<b>J7</b>	M1	95	-		
<b>J8</b>	M2	100	-		
<b>J9</b>	M3	100	-		
<b>J10</b>	M3/PL	100			
<b>J11</b>	PL1	100	25	200	1 h 00
<b>J12</b>	PL2	100	50	300	2 h 30
<b>J13</b>	PL3	100	-		
<b>J14</b>	PL4	100	50	300	2 h 30
<b>J15</b>	PL5	100			
<b>J16</b>	PL6	100	50	300	2 h 30
<b>J17</b>	PL7	100			
<b>J18</b>	PL8	100	100		

**ANNEXE 13 .: Séquence alimentaire: algues**

<b>Jour</b>	<b>Stade larvaire</b>	<b><u><i>Chaetoceros gracilis</i></u> 10<sup>3</sup> cellules/ml</b>
J0	N 1	
J1	N 6	8
J2	Z 1	15-20
J3	Z 1/Z2	15-20
J4	Z 2	15-20
J5	Z 3	15-20
J6	Z 3-M1	15-20
J7	M1	10-15
J8	M2	10-15
J9	M3	10-15
J10	M3/PL	10-15
J11	PL1	10-15
J12	PL2	10-15
J13	PL3	10-15
J14	PL4	10-15

Titre : **ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE**  
**D'UNE PLANTE ENDEMIQUE DE MADAGASCAR**  
« *Cinnamosma fragrans* »,  
**ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES EN CREVETTICULTURE**

Auteur : RANDRIANARIVELO Roger

Mail : [randrianar.roger@yahoo.fr](mailto:randrianar.roger@yahoo.fr)

Tél : (261) 33 14 332 95

Résumé

La composition chimique de l'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans* a été déterminée. 68 échantillons d'huiles essentielles de *C. fragrans* provenant de deux régions de Nord Ouest de Madagascar dont 38 de Tsaramandroso et 30 de Mariarano ont été analysés par CPG/SM. La composition de l'huile essentielle que nous avons analysée varie de 88,3 à 99,4%. 57 composants ont été identifiés. Les constituants majeurs sont le linalol pour Tsaramandroso (72,5  $\pm$  23,3%) et le 1,8 cinéole pour Mariarano (47,3  $\pm$  10,2%). Deux échantillons contenant la teneur la plus élevée: B8 (95,8% linalol) provient de Tsaramandroso et B143 (71,6% 1,8-cinéole) provient de Mariarano, ont été sélectionnés pour déterminer leurs activités antimicrobiennes contre 12 souches de référence et 10 souches isolées de la ferme. Les effets des deux huiles (B8 et B143) sur la survie et les concentrations bactériennes des larves et l'eau d'élevage de *Penaeus monodon* ont été déterminés. *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumulus* et *Staphylococcus aureus* sont les souches les plus sensibles aux deux huiles. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de B143 est faible (0,73 à 2,93 mg/ml) contre toutes les bactéries gram négatives testées par rapport au 1,8-cinéole pure (1,47 à 11,75 mg/ml), B8 montre une CMI élevée par rapport au linalol pur contre *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus sp*, *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio vulnificus* qui sont respectivement 11,75 ; 5,88 ; 2,93 et 5,88 mg/ml, alors qu'il présente la même valeur de CMI au linalol pure pour les autres gram négatives. Les deux huiles ont des CMI élevée (5,88 mg/ml) contre *Fusarium oxysporum*. Des essais avec deux huiles (B8 et B143) ont été effectués à l'écloserie de l'OSO farming Madagascar et nous ont permis d'évaluer la concentration bactérienne des larves et de l'eau d'élevage de *P. monodon* sur Agar marine et TCBS. L'huile essentielle est ajoutée dans l'eau d'élevage. La survie obtenue avec des essais à quatre répétitions sur B8, B143, antibiotique érythromycine(E) et le témoin montre que l'huile B8 a un effet similaire à l'érythromycine (E) ( $P > 0.05$ ) et plus active que B143 ( $P < 0.05$ ). Une corrélation négative est observée entre la concentration bactérienne et la survie des larves pour tous les essais. Ces résultats suggèrent en l'occurrence l'effet synergique ou antagonisme entre les différents constituants de l'huile essentielle. L'huile essentielle de *C. fragrans* et l'antibiotique montrent un taux de survie élevé et une faible concentration bactérienne par rapport au témoin. L'huile essentielle de *C. fragrans* a un potentiel de contrôler la charge bactérienne dans les conditions *in vivo* et aussi permet d'améliorer le taux de survie des larves de *P. monodon*. Ainsi, l'huile de *C. fragrans* s'est avérée être une alternative aux antibiotiques conventionnelles dans l'écloserie crevette.

Mots clés : Huiles essentielles, *Cinnamosma fragrans*, *Penaeus monodon*, activité antimicrobienne, aquaculture

**Title : STUDY OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY  
OF AN ENDEMIC PLANT OF MADAGASCAR  
" *Cinnamosma fragrans* ",  
ALTERNATIVE TO ANTIBIOTICS IN CREVETTING CULTURE**

Author: RANDRIANARIVELO Roger

Mail : [randrianar.roger@yahoo.fr](mailto:randrianar.roger@yahoo.fr)

Tél : (261) 33 14 33295

**Abstract**

Essential oil samples of *Cinnamosma fragrans* from two regions in Madagascar, Tsaramandroso (38 samples) and Mariarano (30 samples), were analysed by GC/MS. Fifty-seven components were identified, accounting from 88.3% to 99.4% of the oils' composition analysed. The major components were linalool ( $72.5 \pm 23.3\%$ ) in Tsaramandroso and 1,8-cineole ( $47.3 \pm 10.2\%$ ) in Mariarano. Samples B8 (95.8% linalool) from Tsaramandroso and B143 (71.6% 1,8-cineole) from Mariarano containing the highest proportions of the two main components identified, were selected to determine antimicrobial activities against 12 microbial strains and 10 bacterial isolates from the *P. monodon* hatchery of OSO Farming. *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* were the most sensitive strains to both oils. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were lower for B143 (0,73 à 2,93 mg/ml) against all tested Gram-negative strains than pure 1,8-cineole (1,47 à 11,75 mg/ml). B8 showed higher MIC values than pure linalool against *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus sp*, and *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio vulnificus* respectively 11,75 ; 5,88 ; 2,93 and 5,88 mg/ml, and similar MIC values to linalool towards the other Gram-negative strains. Both essential oils exhibited higher MIC values towards *Fusarium oxysporum* than their respective pure major component. The effects of both essential oil (B8, B143) on the survival and bacterial concentration of larvae were determined. The bacterial concentrations of both larvae and water tank were assessed on Marine agar and Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar. The assays took place in OSO Farming's shrimp hatchery in Madagascar. EOs were directly added to the water tank. Regarding the survival, the assays in larval culture (four replicates each of B8, B143, E and control) showed that B8 oil had a similar effect ( $P > 0,05$ ) as the antibiotic (Erythromycin) and was more active than B143 ( $P < 0,05$ ). A negative correlation was observed between the bacterial concentration and the survival of larvae for all assays. Both *C. fragrans* essential oils, as antibiotic, exhibited significantly higher survival rates and lower bacterial concentrations of the larvae than the control (oil and antibiotic free). The potential of *C. fragrans* essential oil to control the bacterial load in *in vivo* conditions, thereby enhancing survival rate of *P. monodon* larvae, makes it a relevant option for developing a novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery culture.

**Keywords :** essential oil, *Cinnamosma fragrans*, *Penaeus monodon*, antimicrobial activity, aquaculture