

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abderrahmane MIRA-Bejaia

Faculté de sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

*Prospection de l'activité antimicrobienne des associations
d'huiles essentielles*

Essais sur le thym, le clou de girofle, la cannelle et l'origan.

Présenté par :

Mr. BOURABAH Saïd

Mr. OUSSAR Bouzid

Membre de jury :

Présidente : Mme BEDJOU F.

(M.C.A)

U.A.M.B

Promoteur : Mr. HARFI T.

(M.A.B)

U.A.M.B

Examinatrice : Mme ABDARRAHIM S.

(M.A.A)

U.A.M.B

Examineur : Mr. OUCHEMOUKH S.

(M.C.B)

U.A.M.B

Année : 2012/2013

Remerciements

Nous remercions **Mr HARFI** pour son orientation, son aide et le temps, qu'il nous a accordé pour notre encadrement.

Nous avons également, l'honneur et le plaisir de présenter nos profonds remerciements au **Dr. BEDJOU**, au **Dr. OUCHEMOUKH** et à **Mme ABDARRAHIM** pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner notre travail.

Nous tenons aussi à remercier tous le personnel du laboratoire biophysique du département de biologie physico-chimique de l'université Abderrahmane MIRA-Bejaia.

Nous remercions vivement, **Dr. TOUAT** du service infectieux, **Dr. HAOUCHINE**, **Dr. AZZAM**, **Dr. AMRANE** et toute l'équipe du service de Microbiologie et de Parasitologie du CHU de Tizi Ouzou pour leur précieuse aide.

Nous tenons à remercier, le service de Microbiologie et de parasitologie du CHU de Sétif pour leur soutien et leur aide si précieuse.

Nous remercions particulièrement, **Mme GALLOUL**, pour sa disponibilité et son soutien permanent.

Nous tenons à exprimer notre vive gratitude, à tous les enseignants du département de Biologie physico-chimique et du département de microbiologie, qui n'ont à aucun moment lésiné leurs efforts pour nous prêter main forte dans la réalisation de notre travail.



Dédicaces

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chères parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleurs conditions et qui m'ont appris à ne jamais baissé les bras.

A mes frères: Hakim, Mohamed ;

A mes chères sœurs Radia, Sarra, et Feriel que dieu les protèges ;

A mes amis (es) : Nawal, Assia, Sarra, Fahima, Fedha, Dalila, Mokrane, Massi, Dodo, Lamia, Rachida, kahina, Tata et laldja ;

A mes amis de mon village ;

A mes patrons de la pharmacie un grand merci du fond du cœur pour votre compréhension et votre soutien ;

A Tous les êtres chers à mes yeux que je n'ai pas évoqués et toute la promotion de Pharmacologie Moléculaire ;

A mon camarade Saïd et toute sa famille.

Bouزيد.





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui m'ont sans cesse soutenu, qui m'ont permis de continuer mes études dans de meilleures conditions et qui m'ont appris la persévérance au travail.

A mes chers, frère et sœur : Malik et Silina.

A la tendre Fatiha qui m'a été un soutien sans égale et sans répit.

A mes amis (es) : Toufik, Atmane, Azzedine, Madjid, Sarra, Kahina, Merbouha, Khelifa, Massi, Samy, Abdenour, ...

A Tous les êtres chers à mes yeux que je n'ai pas évoqués et à toute la promotion de Pharmacologie Moléculaire et de Biochimie appliquée.

A mon camarade Bouzid et à toute sa famille.

Saïd.



Liste des abréviations

HEs : Huiles Essentielles

PM : Poids Moléculaire

CYP 450 : Cytochrome P450

DL50 : Dose Létale à 50 %

LPS : Lipopolysaccharide

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

MHA : Mueller Hinton Agar

TC : Thym, Cannelle

CG : Cannelle, Girofle

TG : Thym, Girofle

E. cloacae : *Enterobacter cloacae*.

C. sp : *Citrobacter sp.*

E. coli : *Escherichia coli*.

P. mirabilis : *Proteus mirabilis*.

S. sp : *Streptococcus sp.*

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

S. marcescens : *Serratia marcescens*.

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*.

E. aerogenes : *Enterobacter aerogenes*.

C. albicans : *Candida albicans*.

Liste des figures

Figure 1 : Mode d'action des huiles essentielles.....	3
Figure 2 : Schéma de Biotransformation d'un Terpène.....	5
Figure 3 : <i>Thymus Vulgaris</i> . (Thym)	7
Figure 4 : <i>Cinnamomum Cassia</i> . (Cannelle)	9
Figure 5 : <i>Syzygium aromaticum</i> . (Girofle)	11
Figure 6 : solubilité de l'eugénol dans les différents milieux.....	12
Figure 7 : <i>Origanum vulgare L.</i> (Origan)	13
Figure 8 : Hydrodistillation par entraînement à la vapeur d'eau.....	17
Figure 9 : Détermination de l'activité antimicrobienne par diffusion par disque.....	20
Figure10 : Spectrophotomètre à balayage.....	23
Figure 11 : Représentation graphique des résultats des tests individuels de l'HE du thym....	25
Figure 12 : Représentation graphique des résultats des tests individuels de l'HE d'origan....	26
Figure 13 : Représentation graphique des résultats des tests individuels de l'HE du girofle..	27
Figure 14 : Représentation graphique des résultats des tests individuels de l'HE de la cannelle.....	27
Figure 15 : Représentation graphique des résultats des tests individuels sur milieu solide....	28
Figure 16 : Représentation graphique des résultats du test binaire Thym/Girofle.....	29
Figure 17 : Représentation graphique des résultats du test binaire Thym/Cannelle.....	30
Figure 18 : Représentation graphique des résultats du test binaire Girofle/Cannelle.....	31
Figure 19 : Représentation graphique des résultats des tests binaires sur milieu solide.....	31
Figure 20 : Représentation graphique des résultats du test ternaire des HES sur trois disques.....	32

Figure 21 : Représentation graphique des résultats du test ternaire des HES sur un seul disque.....	33
Figure 22 : Représentation graphique des résultats des tests ternaires sur milieu solide.....	33
Figure 23 : Spectre d'absorbance de l'HE de la cannelle issue de la première extraction.....	36
Figure 24 : Spectre d'absorbance de l'HE de la cannelle issue de la deuxième extraction.....	36
Figure 25 : Spectre d'absorbance de l'HE du girofle.....	37
Figure 26 : Spectre d'absorbance de l'HE du thym.....	37
Figure 27 : Résultats des tests individuels sur milieu solide	IV
Figure 28 : Résultats des tests Binaires	VII
Figure 29 : Résultats des tests ternaires sur milieu solide	X
Figure 30 : Résultats des tests en utilisant les antibiotiques de référence	XII
Figure 31 : Résultats de l'inhibition dynamique de la croissance bactérienne	XIII

Liste des tableaux

Tableau I : Les constituants principaux de l'huile essentielle du thym.....	7
Tableau II : Le constituant principal de l'huile essentielle de la cannelle.....	9
Tableau III : Les constituants principaux de l'huile essentielle de girofle.....	11
Tableau IV Les constituants principaux de l'huile essentielle de l'origan.....	13
Tableau V : Les antibiotiques de références.....	16
Tableau VI : Principe de l'inhibition dynamique.....	22
Tableau VII : Résultats des tests individuels sur milieu solide.....	24
Tableau VIII : Résultats des tests binaires sur milieu solide.....	29
Tableau IX : Résultats des tests ternaires sur milieu solide.....	32
Tableau X : Mesure de la densité optique en milieu liquide.....	34
Tableau XI : Résultats de l'inhibition dynamique de <i>P.aeruginosa</i> (S 2488) sur milieu solide.....	35
Tableau XII : Résultats de l'inhibition dynamique de <i>S.marcescens</i> (S 91) sur milieu solide.....	35
Tableau XIII : Composés majeurs de certaines huiles essentielles	I
Tableau XIV : Fiche technique des souches microbiennes utilisées	II

Table des matières

Remerciements	i
Dédicaces	ii
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vii
Introduction	1

Partie bibliographique

I. Les huiles essentielles.....	2
I.1 Définition	2
I.2 Classification des huiles essentielles	2
I.3 Mode d'action des huiles essentielles	3
I.4 Toxicocinétique des huiles essentielles	4
I.4.1 Absorption.....	4
I.4.2 Distribution	5
I.4.3 Biotransformation	5
I.4.4 Elimination.....	5
I.5 Toxicité des huiles essentielles.....	6
• Toxicité aigüe	6
• Toxicité chronique.....	6
• Toxicité cosméto-dermique	6
II. Monographie des plantes.....	7
II.1 Le Thym	7
II.1.1 Propriétés physicochimiques	7
II.1.2 Activité bactéricide du thymol et du carvacrol.....	8
II.1.3 Usage traditionnelle	8

II.2 La cannelle.....	9
II.2.1 Propriétés physicochimiques	9
II.2.2 Activité bactériostatique du cinnamaldéhyde.....	10
II.2. 3 Usage traditionnelle	10
II.3 Le girofle	11
II.3.1 Propriétés physicochimiques	11
II.3.2 Activité bactéricide d'eugénol.....	12
II.3.3 Usage médical.....	12
• Traitement buccodentaire	12
• Antispasmodique	12
• Stimulant physique et intellectuel	12
II.4 Origan	13
II.4.1 Propriétés physicochimiques	13
II.4.2 Activité bactéricide du thymol et du carvacrol.....	14
II.4.3 Usage traditionnelle	14

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes	15
I.1 Matériel.....	15
I.1.1 Matériel végétal	15
• Clous de girofle	15
• Cannelle.....	15
• Thym	15
• Origan.....	15
I.1.2 Matériel microbiologique.....	15
I.1.3 Les antibiotiques de références	16
I.2 Méthodes.....	17
I.2.1 Extraction des huiles essentielles.....	17
I.2.1.1 Entrainement à la vapeur d'eau.....	17
I.2.1.2 Extraction par hydro-distillation	18
I.2.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne en milieu solide.....	19

I.2.2.1 Protocole expérimental	19
• Préparation de milieu de culture (MHA).....	19
• Application des disques et incubation.....	19
• Lecture.....	20
I.2.3 Détermination de l'activité antimicrobienne en milieu liquide	20
I.2.3.1 Protocole expérimental	20
• préparation des échantillons	20
• préparation des témoins.....	21
• Lecture.....	21
I.2.4 Inhibition dynamique de la croissance bactérienne	21
I.2.4.1 Protocole expérimental	22
I.2.5 Caractéristiques spectrales des différentes huiles essentielles extraites	23
II. Résultats et discussion.....	24
II.1 Résultats.....	24
II.1.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne sur milieu solide	24
• Tests individuels	24
• Tests Binaires (disque/disque)	29
• Tests ternaires.....	32
II.1.2 Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide	34
II.1.3 Résultats de l'inhibition dynamique de la croissance bactérienne	35
II.1.4 Résultats de la caractérisation spectrale des différentes huiles essentielles	36
II.2 Discussion.....	38
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	
Annexes	I

Introduction

Introduction

Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, les maladies infectieuses étaient la principale cause de décès dans le monde. La baisse de la mortalité due aux maladies infectieuses au cours du siècle dernier a été attribuée principalement à la découverte d'agents antimicrobiens (**Huh et al., 2011**).

L'émergence de la résistance aux antibiotiques suite à l'utilisation massive et parfois abusive de ces derniers, est devenue un réel problème de santé publique. La principale stratégie utilisée pour contrecarrer ce problème a été l'utilisation des combinaisons d'antibiotiques mais l'antibio-résistance était toujours là (**Hemaiswarya et al., 2008**).

Ceci a poussé les recherches thérapeutiques vers des solutions alternatives, notamment la pharmacologie phytofilière et, en particulier, l'Aromathérapie, source importante de médicaments potentiels grâce à leur richesse en métabolites secondaires (huiles essentielles alcaloïdes, polyphénols, etc.) (**Girard, 2010**).

Les huiles essentielles sont des produits de composition complexe, renfermant des molécules volatiles contenues dans les végétaux (fleurs, feuilles, bois, racines, écorce et fruits) ; extraites généralement par entraînement à la vapeur d'eau. Elles se caractérisent par le fait qu'elles comprennent certains des antiseptiques les plus puissants du monde végétal (**Kone, 2001**).

En raison de la diversité de leurs caractéristiques et de leurs compositions chimiques, il est certain qu'il n'y a pas qu'un organe-cible ou un métabolisme-cible spécifiques impliqués dans le mécanisme d'action. Leur profil pharmacodynamique est probablement le résultat d'une synergie des diverses molécules présentes dans l'huile ou le reflet des molécules majeures présentes dans l'extrait (**Rosato et al., 2010**).

Le présent travail se fixe comme objectif une contribution à l'étude du potentiel antiseptique des huiles essentielles par :

- l'évaluation comparée du pouvoir antiseptique des quatre huiles essentielles étudiées (HE des clous de girofle, du thym, de la cannelle et de l'origan);
- l'opportunité d'utiliser les associations binaires et ternaires de ces mêmes huiles pour une meilleure stratégie de lutte contre les microorganismes pathogènes.

Partie Bibliographique

I. Les huiles essentielles

I.1 Définition

Les huiles essentielles désignent les composants liquides, odorants et hautement volatiles des plantes. Elles sont obtenues à partir de toutes les parties de la plante (feuilles, graines, bourgeons, fleurs, écorces, racine et fruits), mais aussi, à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres et parfois des troncs même (**Kone, 2001**).

Ce sont des métabolites secondaires composés d'environ 90 % de terpènes. Ces extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés peu complexes, contenant plusieurs familles biochimiques incluant les alcools, les phénols, les esters, les oxydes, les coumarines, les sesquiterpènes, les terpénols, les cétones, les aldéhydes,...etc. Mais ne contenant aucun acide gras, ni aucun autres corps gras (**Bastien, 2008**).

Les "huiles" essentielles ne sont pas des lipides et n'ont de commun avec les huiles fixes ou végétales que leur aspect physique et leur comportement apolaire. De plus, les huiles essentielles sont volatiles et solubles dans les solvants organiques polaires, à l'inverse des huiles fixes (**Bastien, 2008**).

Les huiles essentielles sont employées aussi bien pour leurs propriétés pharmacologiques qu'aromatique, mais elles jouent aussi le rôle de conservateurs alimentaires (**Burt, 2004**).

I.2 Classification des huiles essentielles

On distingue deux types de classification des huiles essentielles (**Bekhechi et al., 2010**) :

2.1 selon la composition chimique :

- les HEs hydrocarburées qui sont les plus nombreuses.
- les HEs oxygénées qui présentent toutes les HEs solides (HEs du camphre).
- les HEs sulfurées retrouvées chez les Liliaceae et les Brassiaceae.

2.2 selon la couleur de l'huile :

- les incolores qui sont dépourvues de résines et d'azulène.
- les jaunes qui renferment des résines.
- les bleues qui contiennent de l'azulène.
- les jaunes, vert et vert-brun qui contiennent de l'azulène mais aussi d'autres colorants.

Les composés majeurs de certaines huiles essentielles sont énumérés en **annexe 1**.

I.3 Mode d'action des huiles essentielles

Certaines huiles essentielles possèdent des effets antiseptiques (antibactériens et antifongiques) assez puissants. Elles agissent par lésions membranaires, par inhibition de la croissance cellulaire, par inhibition de la sporulation et inhibition de la toxinogénèse (**Gabriel et al., 2013**). Les modes d'actions sont multiples:

- altérations membranaires :
 - les HEs sont constituées de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, leur accumulation entre les phospholipides entraîne un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire, perturbant ainsi le transport membranaire des substances nutritives (**Burt, 2004**).
 - les HEs peuvent perturber le gradient ionique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, bloquant la production de l'énergie cellulaire et diminuant la stabilité membranaire (figure 1).
- inhibitions enzymatiques : les groupements fonctionnels des composés terpéniques (phénoliques et aldéhydiques) des HEs réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique (**Giordani et al., 2006**).

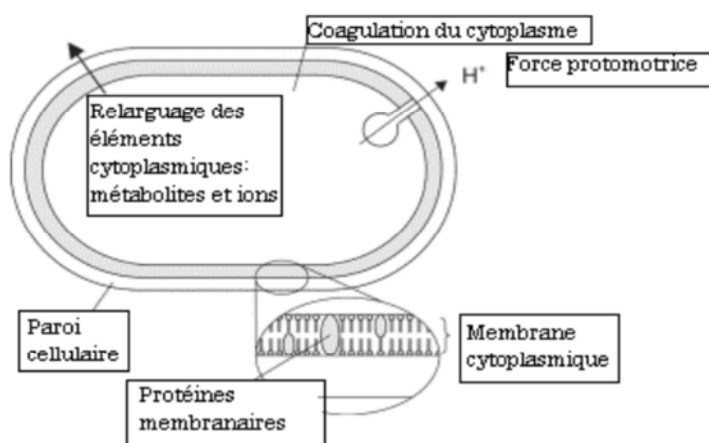


Figure 1 : Modes d'actions des huiles essentielles (**Burt, 2004**).

I.4 Toxicocinétique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont toujours sous forme de mélange de constituants : on parle de chimotype. Ainsi la toxicocinétique des huiles essentielles est impossible à établir, car on ne peut étudier ni décrire les effets biologiques et/ou pharmacologiques d'un monoterpène ou d'un sesquiterpène pur, au sein d'un mélange très hétérogène (**Couderc, 2001**).

L'action de l'huile essentielle est difficilement assimilable à l'effet d'un seul composant. Elle est souvent la résultante de l'activité de divers constituants et celles d'éventuels métabolites issus des biotransformations de ces composants (**Couderc, 2001**).

I.4.1 Absorption

L'absorption des huiles essentielles se fait par diffusion passive. La diffusion passive dépend des paramètres physiques (taille, épaisseur, surface d'échange,...) et chimiques (poids moléculaire, solubilité et lipophilie ou hydrophilie).

Les constituants des HEs sont de petites taille (PM = 150 à 200 g/mol), elles sont peu ou pas soluble dans l'eau, mais elles ont beaucoup d'affinité pour les solvants organiques. Leur faible hydrosolubilité peut être compensée par la nature de la surface d'échange.

L'absorption des HEs dans l'organisme peut se faire par trois voies :

- ✓ Voie orale

Les HEs sont bien absorbées à travers les muqueuses et rapidement absorbées par la peau et le tractus gastro-intestinal.

- ✓ Voie cutanée

L'absorption des HEs est également rapide. La biodisponibilité est quasi-totale, son acheminement est directe dans le sang sans passer par le premier passage hépatique.

- ✓ Voie respiratoire

Les HEs absorbées par inhalation, peuvent atteindre l'épithélium alvéolaire où les différents composés peuvent être absorbés et atteindre les différents organes.

Expérimentalement, après marquage isotopique, le D-limonène (essence du citron) a été détecté dans le tissu pulmonaire (**Couderc, 2001**).

I.4.2 Distribution

En fonction des structures moléculaires des huiles essentielles et de leurs propriétés physiques, on peut prévoir une distribution large au niveau cellulaire. Ces composés sont solubles dans les solvants organiques apolaires ; on peut donc prévoir leur passage voire leur accumulation dans les organes riches en lipides comme les globules rouges, le foie, les surrénales et surtout le système nerveux (Couderc, 2001).

I.4.3 Biotransformation

Les réactions de biotransformations les plus courantes sont les oxydations par le Cytochrome P450 (CYP 450), les glucuronoconjugaison et la conjugaison au glutathion.

Les réactions de biotransformations des terpènes par oxydation mettant en jeu le CYP 450, aboutissent à un métabolite inactif où plus actif (donc potentiellement plus toxique que la substance absorbée (figure 2) (Couderc, 2001).

La conjugaison au glutathion est très importante, car ce mécanisme permet d'inhiber l'action potentiellement toxique sur les tissus, des composés électrophiles, résultant de la biotransformation des terpènes (Couderc, 2001).

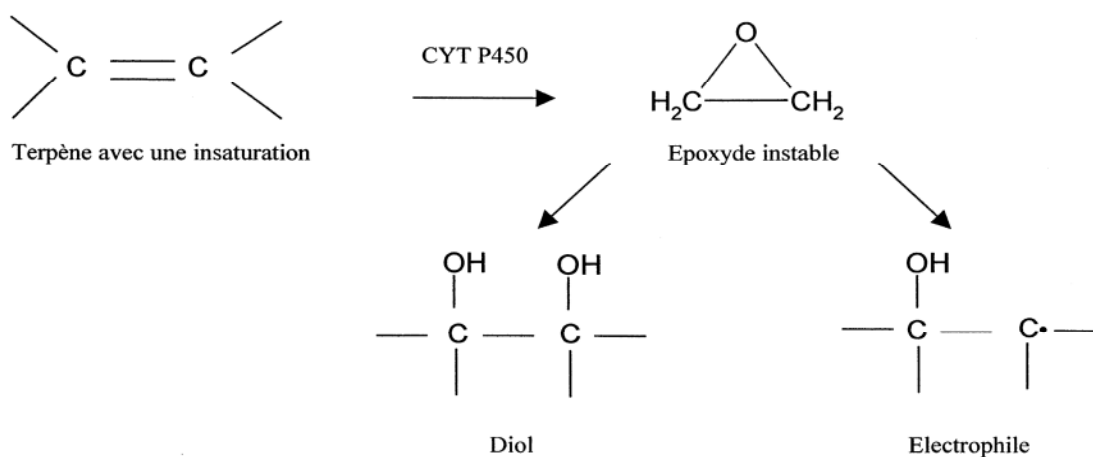


Figure 2 : Schéma de biotransformation d'un Terpène (Couderc, 2001).

I.4.4 Elimination : Il existe deux possibilités d'élimination des huiles essentielles :

- Soit, le composé est éliminé directement par des fonctions d'excrétion (rénale, biliaire).

- soit, il est éliminé après transformation en métabolites plus hydrosolubles éliminables par voie rénale.

Expérimentalement

L'élimination urinaire du métabolite du *p*-Cymène, chez le rat et le cochon d'inde, est complète au bout de 48 heures environ.

C'est une élimination rapide, sans bioaccumulation, malgré une forte affinité pour les tissus riches en lipides.

L'élimination est surtout urinaire, mais une faible partie peut être éliminée par voies respiratoire et cutanée (**Couderc, 2001**).

I.5 Toxicité des huiles essentielles

- Toxicité aigüe

Par voie orale les HEs ont une toxicité aigüe très faible. La DL50 de la cannelle, de l'eucalyptus, du thym et du girofle est comprise entre 2 et 5 g/kg.

La toxicité des huiles est souvent due aux produits phénoliques à l'origine d'atteintes nerveuses et de nécroses hépatiques (**Bruneton, 1999**).

- Toxicité chronique

Elle est rarement rencontrée, en raison même des protocoles phytothérapiques appliqués. Les doses journalières administrées sont très faibles, mais leurs accumulations hépatiques, rénales et pulmonaires peuvent provoquer une toxicité au niveau de ces organes (**Bruneton, 1999**).

- Toxicité cosméto-dermique

Le large usage que la parfumerie et l'industrie des cosmétiques font de ces huiles essentielles, a suscité de très nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité (aigüe, chronique) par application locale, leur pouvoir irritant (Cannelle, thym, etc.), sensibilisant (cinnamaldéhyde) ou phototoxique. Les résultats ont confirmé qu'elles sont irritantes pour la peau et les muqueuses (**Hilan et al., 2009**).

II. Monographie des plantes

II.1 Le Thym

Le thym appartient à la famille des lamiacées, environ 215 espèces sont cultivées dans le monde (Taherian et al., 2009). En Algérie, il est représenté par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination. Citons ainsi quelques espèces connues en Algérie : *Thymus vulgaris* (figure 3), *Thymus serpyllum*, *Thymus algériensis*, *Thymus hirtus*, *Thymus fontanésii*.

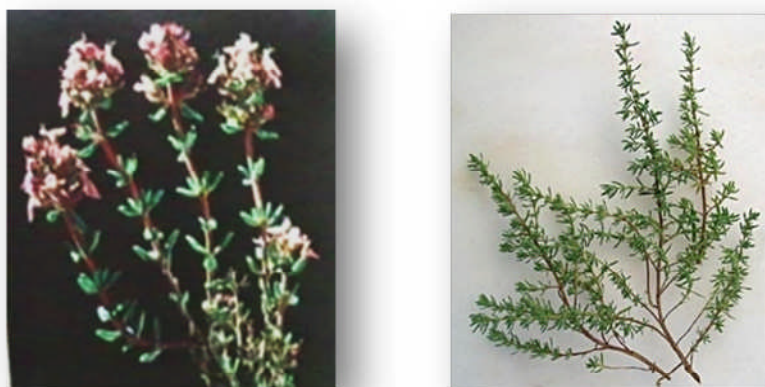


Figure 3 : *Thymus Vulgaris*. (Thym) (Vercauteren, 2006).

II.1.1 Propriétés physicochimiques

Les principales propriétés physiques de l'huile essentielles du thym sont :

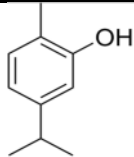
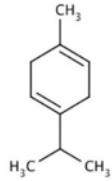
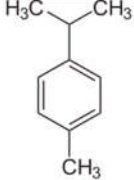
La solubilité : Soluble dans l'éthanol à 80% : 2 volumes ;

La couleur : brun à brun rouge ;

Les principales propriétés physicochimiques de l'huile essentielles du thym et ses constituants sont représentées dans le tableau I.

Tableau I : Les constituants principaux de l'huile essentielle du thym (Carson & al., 2006).

	Densité (g/ml)	PM (g/mol)	Solubilité	Structure chimique
Thymol ou acide thymique (C₁₀H₁₄O)	0.9 à 0.95	150.2	Très peu soluble dans l'eau (1/1000), très soluble dans l'alcool	

Carvacrol (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.9 à 0.95	150,2	/	
γ-terpinène (C ₁₀ H ₁₆)	0.85	136	/	
Cymène (C ₁₀ H ₁₄)	0.85	134	Insoluble dans l'eau et soluble dans l'alcool et l'éther	

II.1.2 Activité bactéricide du thymol et du carvacrol

- de par leur nature lipophile, ils pénètrent dans la bicouche lipidique et se positionnent entre les chaînes d'acides gras entraînant une augmentation de la fluidité membranaire et une modification de la perméabilité passive (**Lambert et al., 2001**).
- ils sont capables de désintégrer la membrane externe des bactéries Gram-, on libérant le Lipopolysaccharides (LPS) (**Hammer et al., 2010**).
- l'augmentation de la perméabilité membranaire, entraîne une fuite de protons H⁺ provoquant une chute de la force promotrice et de la synthèse d'ATP (**Ultee et al., 2002**).

II.1.3 Usage traditionnelle

Le thym est utilisé en cas d'encombrement des voies respiratoires supérieures et dans les symptômes de bronchite.

L'utilité du thym pour le traitement de l'inflammation a été confirmée, notamment pour le traitement de l'inflammation des muqueuses de la bouche et des gencives.

En raison de sa saveur aromatique, le thym provoque une stimulation réflexe des sécrétions salivaires, gastrique et biliaire. Il est ainsi utilisé pour ses propriétés régulatrices de l'appétit et comme stimulant digestif (**Teuscher et al., 2005**).

Expérimentalement :

- L'huile essentielle du thym, a des propriétés spasmolytiques, car elle s'oppose aux spasmes de l'iléon et de la trachée isolée de cobaye, après induction à la noradrénaline.
- L'huile essentielle administrée à des rats, stabilise la perte du potentiel antioxydant lié au vieillissement des cellules hépatiques, cardiaques et cérébrales (**Teuscher et al., 2005**).

II.2 La cannelle

La cannelle de Chine (*Cinnamomum Cassia*) est produite par un arbre tropical à feuillage persistant de la même famille que le laurier et du même genre que la cannelle de Ceylan, qui pousse à l'état sauvage dans le sud-est de l'Asie, de la Chine à la Birmanie et à l'Indonésie. On la cultive également en Amérique du Sud.

On utilise son écorce, grise et rugueuse à l'extérieur, brun rouge et lisse à l'intérieur, beaucoup plus épaisse que celle de la cannelle de Ceylan. L'écorce est récoltée au cours de la saison des pluies, quand elle se détache aisément. Au séchage, elle se replie sur elle-même en rouleaux (figure 4) (Shilei et al., 2011).



Figure 4 : *Cinnamomum Cassia*. (Cannelle).

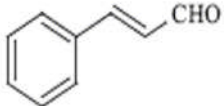
II.2.1 Propriétés physico-chimiques

Les principales propriétés physiques de l'huile essentielles de la cannelle sont :

La couleur : brun à brun-rouge.

Les principales propriétés physicochimiques de l'huile essentielles de la cannelle et ses constituants sont représentées dans le tableau II.

Tableau II : Le constituant principal de l'huile essentielle de la cannelle (Vercauteren, 2006).

	Densité (g/ml)	PM (g/mol)	Solubilité	Structure chimique
Cinnamaldéhyde	0.98 à 1.05	132	Insoluble dans l'eau et très soluble dans les alcools	

II.2.2 Activité bactériostatique du cinnamaldéhyde

- il inhibe les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire (**Gill et al., 2006**).
- le cinnamaldéhyde se fixe aux protéines intracytoplasmiques par une inactivation des aminoacides décarboxylases (**Guinoiseau, 2010**)
- le cinnamaldéhyde empêche la formation complète des *septa* de division et entraîne une modification de la morphologie de certaines cellules bactériennes (*Bacillus cereus*) (**Kwon et al., 2003**).
- il interfère avec les mécanismes de régulation du quorum-sensing (**Niu et al., 2006**).

II.2.3 Usage traditionnelle

En usage interne, la cannelle est employée contre la diarrhée, les inflammations de l'estomac et de l'intestin, la fièvre et la grippe. À signaler néanmoins qu'un usage médical de la cannelle est déconseillé pendant la grossesse (**St-Jean, 2006**).

Il ressort d'études récentes que la cannelle fait baisser le taux de glucose dans le sang. Des essais ont en outre montré que l'écorce de cannelle infusée peut prévenir la formation d'ulcères de l'estomac (**St-Jean, 2006**).

La cannelle est également utilisée dans la fabrication de stomachiques aromatiques qui stimulent l'appétit, elle est aussi utilisée dans la fabrication de boissons gazeuses et de liqueurs ainsi que pour l'hygiène buccale et dans l'industrie cosmétique (**Iserin et al., 2001**).

II.3 Le girofle

Appartenant à la famille des Myrtacées, le Clou de Girofle, originaire de l'archipel des Moluques (océan Indien), s'est acclimaté à Madagascar, Zanzibar, au Sri Lanka et en Indonésie. Son bouton floral est ce qu'on appelle le "clou" de girofle.

Il existe dans l'arsenal thérapeutique et dans la pharmacopée comme traitement principal de la carie dentaire (figure 5) (Lamendin et al., 2004)

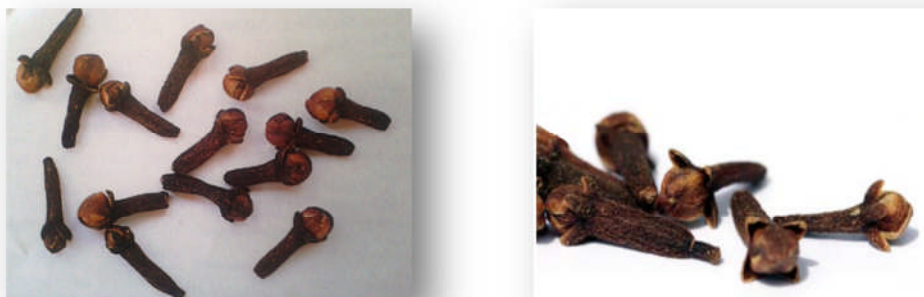


Figure 5 : *Syzygium aromaticum*. (Girofle) (Teuscher et al., 2005).

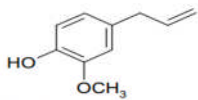
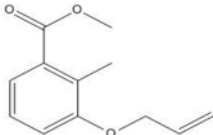
II.3.1 Propriétés physico-chimique

La principale propriété physique de l'huile essentielle du girofle est :

La solubilité : Insoluble dans l'eau et soluble dans le cyclohexane.

Les principales propriétés physicochimiques de l'huile essentielles du clou de girofle et ses constituants sont représentées dans le tableau III.

Tableau III : Les constituants principaux de l'huile essentielle du girofle (Vercauteren, 2006).

	Densité (g/ml)	PM (g/mol)	Solubilité	Structure chimique
Eugénol	1.06	164.2	Insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants apolaires.	 (4-allyl-2méthoxy-phénol)
L'acétate d'eugényle	1,075 à 1,085	206,24	/	

L'eugénol se comporte comme un acide. Sa forme basique, ionique est soluble dans l'eau. L'acétate d'eugényle (ester) reste sous forme moléculaire en milieu basique (figure 6).

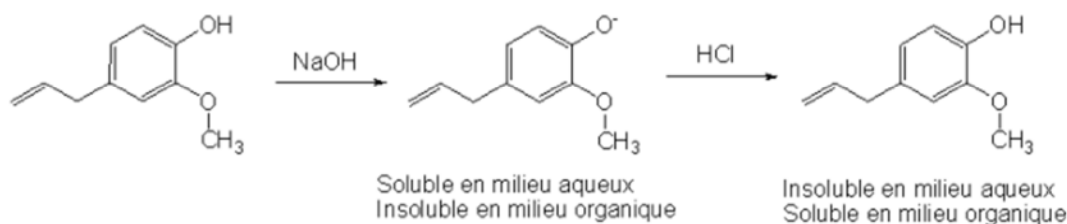


Figure 6 : Solubilité de l'eugénol dans les différents milieux.

II.3.2 Activité bactéricide de l'eugénol

- Le groupement hydroxyle de l'eugénol inhibe l'action des amylases et des protéases, induisant la détérioration de la membrane cellulaire.
- A forte concentration, l'eugénol provoque une lyse cellulaire (**Burt, 2004**).
- La dégradation de la paroi cellulaire entraîne une inhibition de l'activité des ATP synthétases membranaires (**Gill et al., 2006**).

II.3.3 Usage médical

- Traitement buccodentaire

L'eugénate composé d'eugénol ; présent dans les huiles essentielles du clou de girofle, et d'oxyde de zinc, est utilisé comme pâte pour la reconstitution des dents.

L'eugénol est aussi utilisé, comme anesthésiant et cautérisant pulpaire en cas d'alvéolite après extraction dentaire (**Lamendin et al., 2004**)

- Antispasmodique

Les clous de girofle soulagent les troubles digestifs, tels que flatulences et coliques, Ils apaisent aussi la toux, les spasmes musculaires lors de leur application locale (**Iserin et al., 2001**).

- Stimulant physique et intellectuel

Le clou de girofle a une action stimulante, aussi bien dans les cas d'asthénie intellectuelle (perte de mémoire) que corporelle, considéré comme aphrodisiaque, il stimule et augmente également les contractions de l'utérus lors de l'accouchement (**Iserin et al., 2001**).

II.4 L'origan

L'origan est connu sous le nom de marjolaine sauvage ou de grande marjolaine. C'est une espèce vivace, ses tiges sont souvent parcourues de rouge, portant à leur extrémité des panicules de fleurs rouge-violet ou rose pâle. Les feuilles permettent de distinguer entre les deux espèces *Origanum vulgare* L et *Origanum onites* L.

L'origan fournit une huile essentielle riche en thymol et/ou en carvacrol. La somme des teneurs en carvacrol et thymol est au minimum de 60%. Sa composition varie très largement en fonction du chimiotype. L'origan et ses produits n'ont fait l'objet d'aucune évaluation clinique (figure 7) (Bruneton, 2009).



Figure 7 : *Origanum vulgare* L (Origan). (Teuscher et al., 2005).

II.4.1 Propriétés physico-chimiques

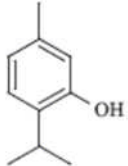
Les principales propriétés physiques de l'huile essentielle de l'origan sont :

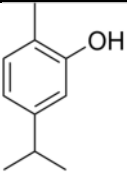
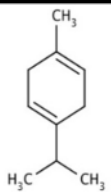
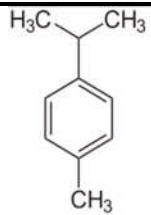
La solubilité : Soluble dans l'éthanol à 90% : (v/v) à 20 °C ;

La couleur : Jaune foncé à brun clair.

Les principales propriétés physicochimiques de l'huile essentielles de l'origan et ses constituants sont représentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Les constituants principaux de l'huile essentielle de l'origan (Carson & al., 2006).

	Densité (g/ml)	PM (g/mol)	Solubilité	Structure chimique
Thymol ou acide thymique (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.9 à 0.95	150.2	Très peu soluble dans l'eau (1/1000), très soluble dans l'alcool	

Carvacrol ($C_{10}H_{14}O$)	0.9 à 0.95	150,2	/	
γ-terpinène ($C_{10}H_{16}$)	0.85	136	/	
Cymène ($C_{10}H_{14}$)	0.85	134	Insoluble dans l'eau et soluble dans l'alcool et l'éther	

II.4.2 Activité bactéricide du thymol et du carvacrol

- Ils augmentent la fluidité membranaire et modifient la perméabilité passive en pénétrant dans la bicouche lipidique (**Lambert et al., 2001**).
- Ils entraînent la désintégration de la membrane externe des bactéries Gram-, en libérant le Lipopolysaccharides (LPS) (**Hammer et al., 2010**).
- Ils augmentent la perméabilité membranaire, entraînant une fuite de protons H^+ , provoquant la chute de la force promotrice et de la synthèse d'ATP (**Ultee et al., 2002**).

II.4.3 Usage traditionnelle

L'origan est traditionnellement employé en infusion pour ses propriétés apéritives, contre les troubles gastro-intestinaux, dans les infections urinaires, les dysménorrhées et les rhumatismes et il est également utilisé comme expectorant.

L'origan est aussi employé en cas d'inflammations bucco-pharyngées (**Teuscher et al., 2005**).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I.1 Matériel

I.1.1 Matériel végétal

- Clous de girofle

Les boutons floraux de l'espèce *Syzygium aromaticum* a été procuré chez un herboriste de la région de Bejaia.

- Cannelle

L'écorce de *Cinnamomum Cassia* a été rapportée chez un herboriste de la ville de Sétif.

- Thym

La poudre de l'espèce *Thymus vulgaris* a été procurée chez un herboriste de la ville de Sétif.

- Origan

Les feuilles de l'espèce *Origanum vulgare* L. ont été procurées chez un herboriste de la ville de Sétif.

I.1.2 Matériel microbiologique

- *Enterobacter cloacae* (S 2445) : isolée du pus.
- *Citrobacter sp* (S 2368) : isolée du pus.
- *Escherichia coli* (S 2429 Lactose⁺) : isolée du pus.
- *Proteus mirabilis* (S 2429 Lactose⁻) : isolée du pus sur pace maker.
- *Streptococcus sp* (S 2487) isolée du pus anal.
- *Pseudomonas aeruginosa* (S 2488) : isolée du pus de plaie opératoire.

Courtoisie du laboratoire de Microbiologie et de Parasitologie du CHU de Tizi Ouzou.

- *Serratia marcescens* (S 91) : isolée du pus.
- *Klebsiella pneumoniae* (S 912) : isolée du sang.
- *Enterobacter aerogenes* (S 903) : isolée du sang.
- *Pseudomonas aeruginosa* (S 97) : isolé du pus.
- *Candida albicans* (buccale).

Courtoisie du laboratoire de parasitologie du CHU de Sétif. (**Annexe 2**).

La croissance des souches est réalisée à 33° C dans du bouillon nutritif et sur gélose MHA (Mueller Hinton Agar) en milieu solide.

L'entretien des souches est réalisé par repiquage dans des tubes de gélose nutritif inclinée et conservé à 4°C.

I.1.3 Les Antibiotiques de références

Les souches microbiennes utilisées et leurs antibiotiques de références sont représentés dans le tableau V.

Tableau V : Les antibiotiques de références. (Aumeran & al., 2009).

Souches microbiennes	Antibiotiques de références
<i>Enterobacter cloacae</i> (S 2445)	Ampiline® (Ampicilline)
<i>Escherichia coli</i> L+ (S 2429)	
<i>Streptococcus sp</i> (S 2487)	
<i>Staphylococcus aureus</i> (S 2426)	
<i>Proteus mirabilis</i> L- (S 2429)	Clamoxypen® (Amoxicilline/acide clavulanique)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S 912)	
<i>Serratia marcescens</i> (S 91)	
<i>Citrobacter sp</i> (S 2368)	
<i>Enterobacter aerogene</i> (S 903)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (S 97, S 2488)	
<i>Candida albicans</i>	Metris® Métronidazole

La solubilisation des antibiotiques est effectuée dans du Diméthyle sulfoxyde (DMSO). L'activité antibactérienne de ce solvant a été préalablement testée : aux concentrations utilisées, il est sans effet sur la croissance bactérienne.

I.2 Méthodes

I.2.1 Extraction des huiles essentielles

L'extraction a été réalisée au laboratoire de « Microbiologie » de l'université de BEJAIA.

1. Huiles essentielles des clous de girofle, du thym et de l'Origan

Les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum*, de *Thymus vulgaris* et d'*Origanum vulgare* L. ont été extraites par hydrodistillation avec entrainement à la vapeur d'eau.

2. Huiles essentielles de la Cannelle

Les huiles essentielles de *Cinnamomum Cassia* ont été isolées, par le procédé d'hydrodistillation par chauffage direct.

I.2.1.1 Entrainement à la vapeur d'eau

L'extraction par entrainement à la vapeur d'eau, est réalisée selon le dispositif représenté dans la figure suivante :

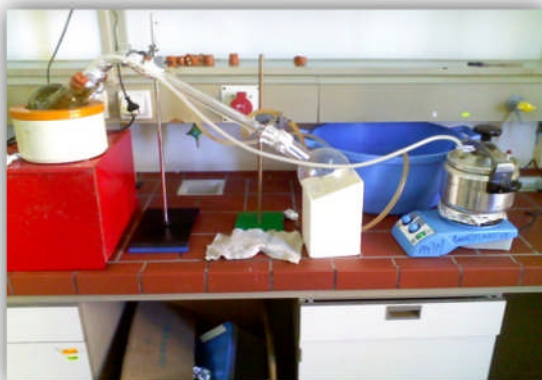


Figure 8 : Hydrodistillation par entrainement à la vapeur d'eau.

Trois extractions des huiles essentielles ont été effectuées par entrainement à la vapeur d'eau :

Première extraction

- Peser 100g de thym
- introduire 100g de poudre du thym dans un ballon de 1000 ml contenant 100 ml d'eau de source (eau non-traitée).
- un chauffage doux est apporté à la poudre par un chauffe ballon, tandis que, la vapeur est générée par un générateur de vapeur pendant 2 à 3 heures.
- la vapeur condensée coule dans une fiole.
- le contenu de la fiole est récupéré puis transféré dans une ampoule à décanner.

Deuxième extraction

- Peser 50g de clou de girofle.
- Broyer pour obtenir une poudre
- introduire 50g de poudre de girofle dans un ballon de 1000 ml contenant 100 ml d'eau de source.
- reproduire les mêmes étapes que la première extraction.

Troisième extraction

- peser 100g de feuilles d'Origan.
- introduire les 100g dans un ballon de 1000 ml contenant 100 ml d'eau de source non traitée.
- reproduire les mêmes étapes que les deux premières extractions.

Le contenu est laissé reposer pendant 24 heures à l'abri de la lumière, on distingue deux phases, l'huile essentielle du thym et de l'origan est moins dense est au-dessus de l'eau, alors que, l'huile essentielle du clou de girofle est plus dense, elle est au-dessous de l'eau. Il est possible, ainsi d'éliminer la quasi-totalité de l'eau et récupérer l'huile pure.

I.2.1.2 Extraction par hydrodistillation : (Senhadji et al., 2006).

L'extraction de l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia* a été effectuée par la méthode d'hydrodistillation directe:

- peser 100g d'écorce de cannelle.
- broyer pour obtenir une poudre.
- introduite la poudre dans un ballon de 1000 ml.
- imprégner le contenu du ballon avec 500 ml d'eau de source non traitée.
- porter le tout à ébullition pendant 2 à 3 heures.
- la vapeur condensée coule dans une fiole.
- transférer le contenu de la fiole dans une ampoule à décanter.
- laisser reposer pendant 24 heures à l'abri de la lumière.
- récupérer l'huile essentielle en suspension (HE moins dense que l'eau).
- ajouter du diéthyl éther (3v/v) pour récupérer les HEs accolée aux parois de l'ampoule à décanter.
- récupérer le mélange diéthyle éther/HEs dans un bécher.
- placer le bécher sous une haute expulsive pour éliminer le diéthyle éther et récupérer les HEs pures.

I.2.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne en milieu solide

La méthode de l'aromatogramme analogue à la méthode de l'antibiogramme est utilisée pour tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles *in vitro*. A partir de disques imprégnés de 20µl d'huile essentielle diluée dans 10% de DMSO (10%, v/v) nous avons procédé à l'évaluation de la sensibilité des souches microbiennes aux différents extraits. En parallèle, nous avons utilisé des disques témoins imprégnés d'eau distillée diluée dans 10 % de DMSO. (Guinoiseau, 2010).

I.2.2.1 Protocole expérimentale

- émulsionner dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif, 2 à 3 colonies bien isolées des souches à étudier puis incubé pendant 24 heures à 33° C.

- **Préparation du milieu de culture**

- faire fondre la gélose MHA et Sabouraud au bain marie ;
- couler la gélose sur boîtes de Pétri stérile, et laisser solidifier à température ambiante ;
- déposer un inoculum de 0,1 ml de la suspension microbienne au milieu de la boîte de Pétri ;
- étaler l'inoculum sur le milieu de culture à l'aide d'un râteau, en tournant la boîte à chaque fois ;
- laisser les boîtes séchées pendant 5 min.

- **Application des disques et incubation**

- préparer des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre.
- mettre les disques dans un tube, et stériliser dans un four Pasteur à 160°C pendant 60 mn ;
- prendre les disques par une pince stérile, et les imbiber de différents extraits obtenues ;
- déposer un disque d'une HE (20µl de thym, cannelle, girofle ou d'origan) ou de trois HES (20µl Thym/girofle/cannelle), deux disques ou trois disques suivant les tests (individuels, binaires, ternaires) sur la gélose préalablementensemencée ;
- incubé pendant 18 à 24 heures à 33 °C.

- **Lecture**

Après avoir déposé le disque imbibé d'huile essentielle, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et laissé incubé pendant 18 à 24 heures, on mesure la zone d'inhibitions à l'aide d'un pied à coulisse (figure 9).

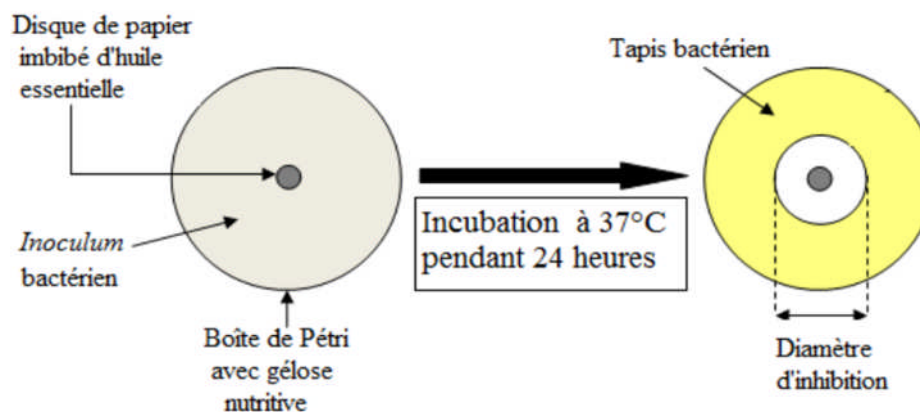


Figure 9 : Détermination de l'activité antimicrobienne par diffusion par disque.

I.2.3 Détermination de l'activité antimicrobienne en milieu liquide

La mesure de la densité optique décrite par **Bosio et al., (2000)** est le procédé le plus simple et le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne.

I.2.3.1 Protocole expérimental

- **Préparation des échantillons**

- émulsionner 2 à 3 colonies isolées des souches à étudier dans une série de tubes à essai (selon le nombre de souches) contenant 10 ml de bouillon nutritif chacun ;
- transférer 1 ml d'inoculum dans 9ml de bouillon stérile (le nombre de tubes est défini selon le nombre de tests sur une souche) ;
- prélever les disques stériles, saturés de 20µl de l'huile à tester étendue avec 10% de DMSO, puis les plonger dans chacun des tubes ensemencés ;
- laisser incubé pendant 48 heures à 33°C ;
- diluer le contenu des tubes à 10% dans de l'eau distillée.

- **Préparation des témoins**

- L'antibiotique, sous forme de lyophilisat est régénéré avec 5ml d'eau physiologique en environnement stérile étendue avec (10%) de DMSO.
- prendre un disque imbibé de 20µl d'antibiotique (amoxicilline/acide clavulanique) pour les bactéries, et 20µl d'antifongique (Métronidazole) pour *Candida albicans*, les plonger dans des tubes contenant 1 ml d'inoculum et 9 ml de bouillon stérile, servant de témoins positifs ;
- des tubes contenant 1ml d'inoculum et 9ml de bouillon stérile, vont servir de témoins négatifs ;
- incubé pendant 48 heures à 33° C ;
- diluer le contenu des tubes à 10% dans de l'eau distillée.

- **La lecture**

Après avoir dilué, on procède à la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 650 nm.

I.2.4 Test d'inhibition dynamique de la croissance bactérienne

Des pré-tests ont montré des activités inhibitrices quantitativement intéressantes (bons diamètres d'inhibition) mais qualitativement limitées (bactériostatique) avec reprise de la croissance au bout de quelques heures. Nous avons exploré la possibilité d'inhiber efficacement les microorganismes résistants, notamment *P.aeruginosa* (S 2488), par leurs expositions successives, aux 3 huiles testées. Nous avons nommé cela *une inhibition dynamique*.

Les bactéries sont soumises aux mêmes concentrations, par alternance pendant une période déterminée. Cette période est fixée selon le temps au cours duquel la souche bactérienne parvient à développer une résistance.

I.2.4.1 Protocole expérimental

- couler la gélose sur les boîtes de Pétri (6 boîtes) ;
- verser un inoculum de 0,1 ml de la souche résistante préalablement sélectionné (S 2488 : *P. aeruginosa*, S 91 : *S. marcescens*), au milieu des boîtes de Pétri ;
- étaler l'inoculum sur le milieu de culture à l'aide d'un râteau ;
- laisser les boîtes séchées pendant 5mn.
- le dépôt des disques s'effectue après chaque 7 heures en déposant un autre disque imbibé d'un autre extrait d'HE, après élimination du disque précédent, l'opération est dirigée comme suit :

Tableau VI : Principe de l'inhibition dynamique.

Temps	Boîte 1	Boîte 2	Boîte 3	Boîte 4	Boîte 5	Boîte 6
7 heures	Cannelle (C)	Cannelle (C)	Thym (T)	Thym (T)	Girofle (G)	Girofle (G)
14 heures	Remplacé C(1) par T(2)	Remplacé C(1) par G(2)	Remplacé T(1) par C(2)	Remplacé T(1) par G(2)	Remplacé G(1) par C(2)	Remplacé G(1) par T(2)
21 heures	Remplacé T(2) par G(3)	Remplacé G(2) par T(3)	Remplacé C(2) par G(3)	Remplacé G(2) par C(3)	Remplacé C(2) par T(3)	Remplacé T(2) par C(3)

- mesure des diamètres d'inhibition pour chaque boîte à l'aide d'un pied à coulisse, avec un intervalle de 7 heures.

I.2.5 Caractéristiques spectrales des différentes huiles essentielles extraites

A l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (Analytik/Jena, specord 50), on procède à l'évaluation des rapports absorbances/longueurs d'onde de chaque extrait, dans le but de comparer la composition des différents HEs, ainsi que leur teneur (figure 10).



Figure 10: Spectrophotomètre UV/Visible.

Résultats et discussion

II.1 Résultats

II.1.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne sur milieu solide

- Tests individuels

Les diamètres d'inhibition de différentes huiles essentielles utilisées, obtenues sur les souches microbiennes étudiées, sont indiqués dans le tableau VII.

Tableau VII : Résultats des tests individuels sur milieu solide.

	Tests individuels						
Souches	Tém (Eau/ DMSO)	4mg Antibiotique	2.4mg de Thym	2.4mg d'Origan	2.4mg de Girofle	2.4mg Cannelle 1ère	2.4 mg Cannelle 2ème
<i>S. marcescens</i> (S 91)	-	21.3 mm	16 mm (ap 7h)	-	13 mm (ap 7h)	-	6 mm (ap 7h)
<i>C. albicans</i>	-	16.3 mm	27 mm	43.3 mm	19.6 mm	-	34.9 mm
<i>P. mirabilis</i> (S 2429) L-	-	27.7 mm	25 mm	23.5 mm	10 mm	-	19 mm
<i>E. coli</i> (S 2429) L+	-	11.3 mm	25 mm	27.8 mm	9.2 mm	-	20 mm
<i>Streptococcus sp</i> (S 2487)	-	39.9 mm	23 mm	23.1 mm	11.2 mm	-	27.5 mm
<i>K. Pneumoniae</i> (S 912)	-	19.7 mm	25 mm	23.6 mm	11.1 mm	-	22 mm
<i>Citrobacter sp</i> (S 2368)	-	24.7 mm	15 mm	26.9 mm	9 mm	-	28 mm
<i>E. Cloacae</i> (S 2445)	-	14.7 mm	20 mm	22.9 mm	12.1 mm	-	20 mm
<i>S. aureus</i> (S 2426)	-	13 mm	23 mm	27.3 mm	10.2 mm	-	21.6 mm
<i>E. aerogene</i> (S 903)	-	25 mm	24 mm	27.1 mm	10.7 mm	-	21.1 mm
<i>P. aeruginosa</i> (S 97)	-	23.2 mm	25 mm	-	10.5 mm	-	24 mm
<i>P. aeruginosa</i> (S 2488)	-	23 mm	-	-	-	-	13.1 mm

Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité : résistant (diamètre < 6 mm), intermédiaire (13 mm ≥ diamètre ≥ 6 mm) et sensible (diamètre > 13 mm) (**Billerbeck, 2007**).

Les résultats laissent voir des activités hétérogènes par rapport aux huiles et par rapport aux souches testées. (**Annexe 4**)

On note aussi :

- une activité inhibitrice importante du thym et de l'origan, dans l'ensemble supérieur à celle de l'antibiotique.
- une inhibition pas toujours efficace pour les antibiotiques de référence.
- une très grande sensibilité de *C. albicans*.
- une des souches de *P. aeruginosa* utilisées se montre particulièrement résistante.
- l'absence d'activité inhibitrice de l'une des deux cannelles utilisées.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs du thym sont exprimés dans la figure 11.

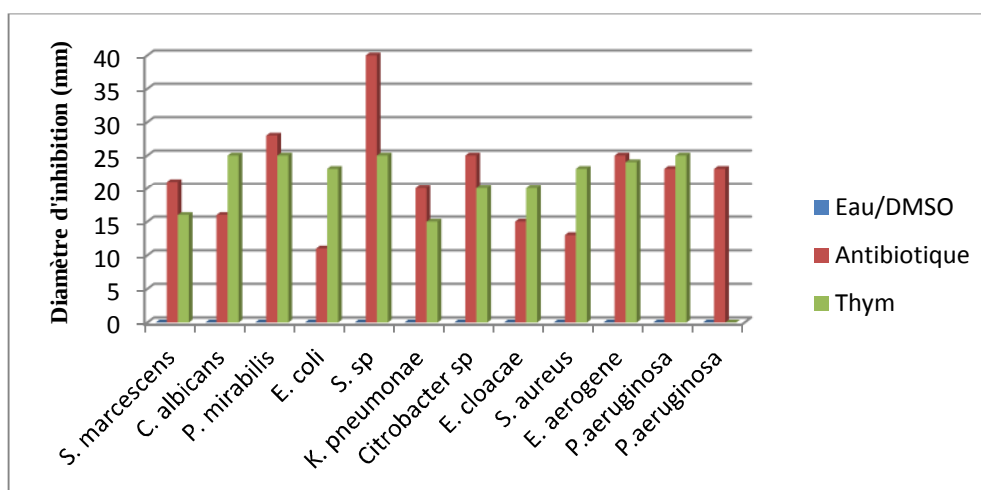


Figure 11 : Représentation graphique des résultats des tests individuels de l'HE du thym.

On constate que :

- *C. albicans*, *E. cloacae*, *E. coli* et *S. aureus* présentent une grande sensibilité à l'huile du thym, supérieur à celle de l'antibiotique.
- *Sterptococcus sp*, plus sensible à l'antibiotique, présente comme même une bonne sensibilité à l'huile du thym.
- l'une des deux souches de *P. aeruginosa* présente une grande sensibilité à l'huile du thym (S 97) tandis que l'autre (S 2488) est totalement résistante, ainsi dans l'ensemble excepté pour *P. aeruginosa* (S 2488), les autres souches se montrent sensibles à l'action de cette huile.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs de l'origan sont exprimés dans la figure 12.

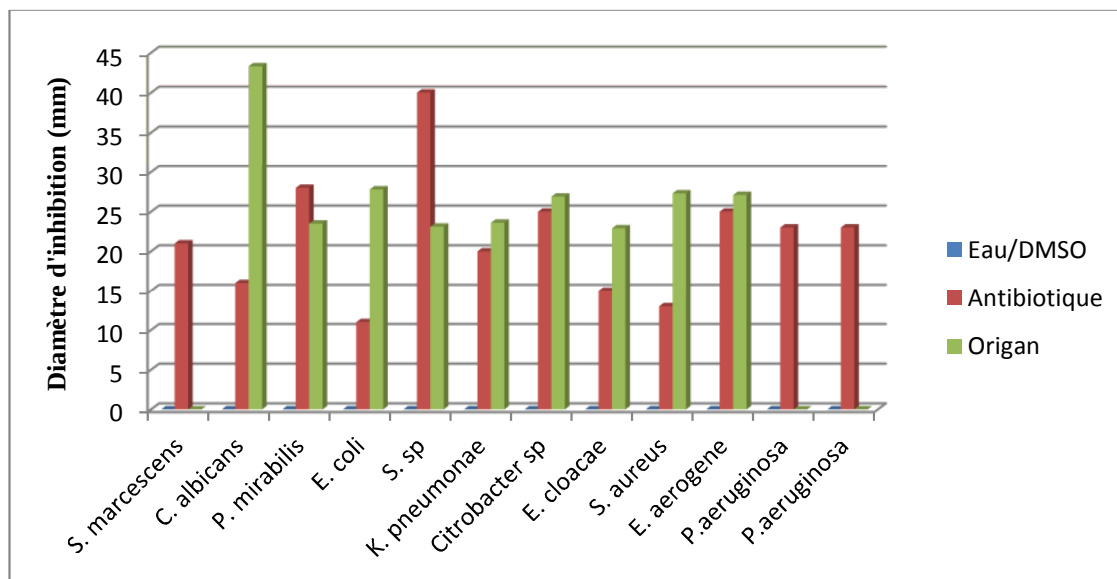


Figure 12 : Représentation graphique des résultats des tests sur l'HE de l'origan.

On observe que :

- *C. albicans* est le germe le plus sensible. C'est la plus grande sensibilité dans ce test avec une zone d'inhibition de 43.5 mm.
- on note une résistance totale pour *S. marcescens* et les deux souches de *P. aeruginosa*.
- les autres souches laissent voir une sensibilité équivalente parfois supérieur à celle obtenue avec l'antibiotique de référence.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs du clou de girofle sont exprimés dans la figure 13.

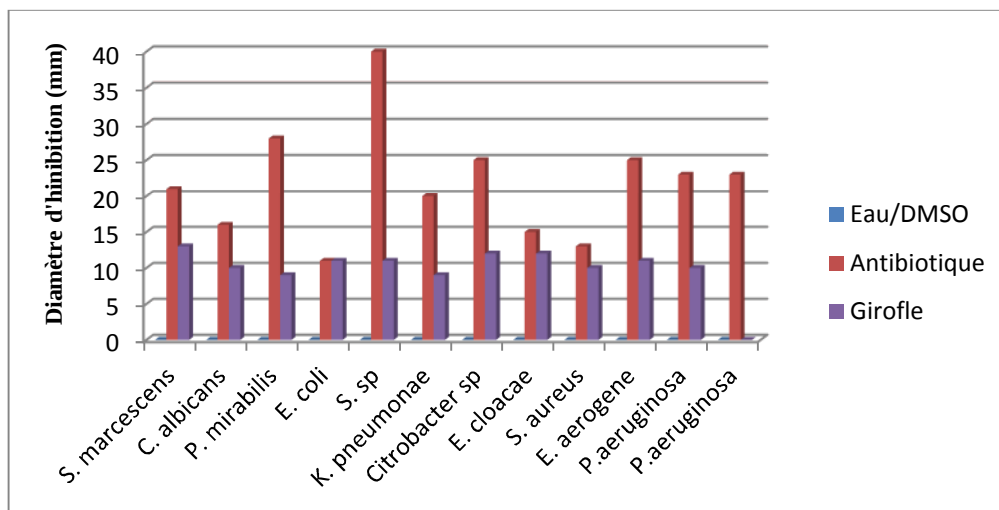


Figure 13 : Représentation graphique des résultats des tests individuels de l'HE de girofle.

On constate que :

- pour l'ensemble des souches et encore plus pour *P.aeruginosa* (S 2488), le pouvoir inhibiteur de l'HE du girofle est négligeable par rapport aux antibiotiques de références.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs de la cannelle sont exprimés dans la figure 14.

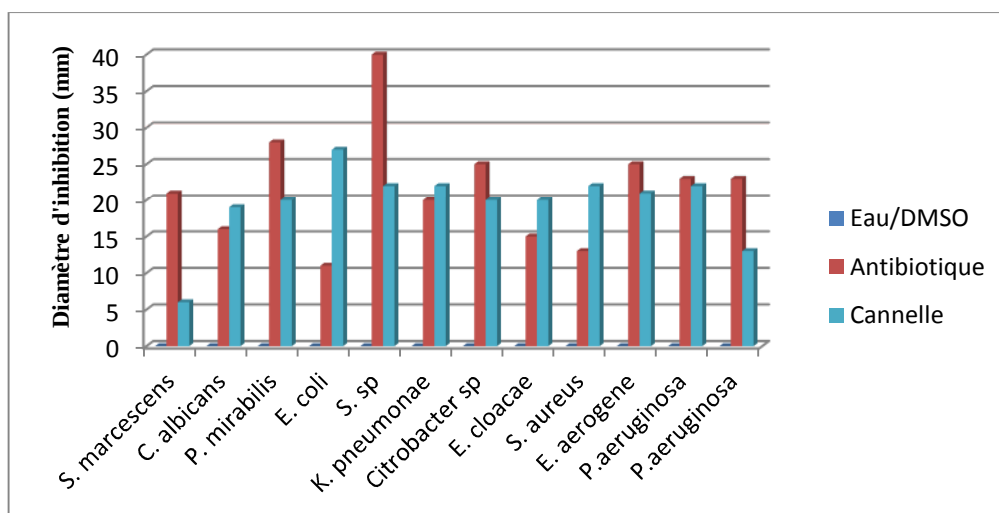


Figure 14 : Représentation graphique des résultats des tests individuels de l'HE de la cannelle.

On constate que :

- *E.coli*, *S.aureus* et *E.cloacae* sont plus sensibles à l'huile essentielle de la cannelle, surtout *E.coli*, qu'à l'antibiotique.

- les deux souches de *P. aeruginosa* présentent une sensibilité particulière à cette huile, alors que *S. marcescens* reste toujours résistante.
- excepté pour *S. marcescens* toutes les souches sont sensibles à l'huile de cannelle qui se montre néanmoins variable suivant les souches.

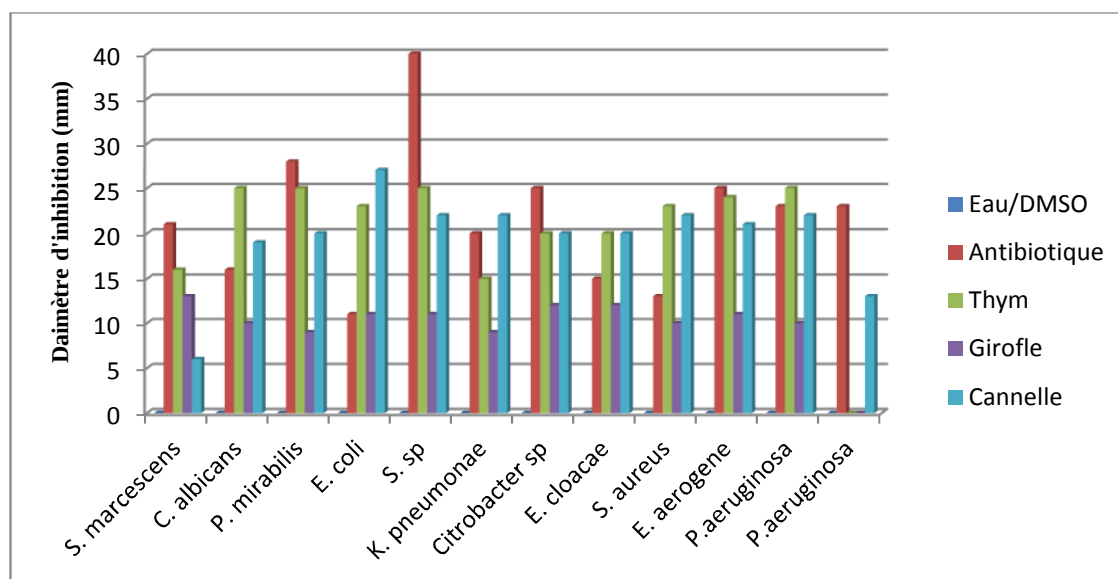


Figure 15 : Représentation graphique des résultats des tests individuels sur milieu solide.

Les images montrant l'activité inhibitrice des antibiotiques, figurent en **annexe 4**.

- **Tests Binaires (disque/disque)**

Les zones d'inhibition des tests binaires effectués sur toutes les souches, sont représentées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats des tests binaires sur milieu solide.

Souches	TG (mm)	TC (mm)	GC (mm)
<i>S.marcescens</i> (S 91)	35	20	15,00
<i>C.albicans</i>	50	42.3	46.7
<i>P.mirabilis</i> (S 2429) L-	22.6	23.2	21.2
<i>E.coli</i> (S 2426) L+	20.5	22.4	22.7
<i>Streptococcus sp</i> (S 2487)	21.6	25.4	20
<i>K.pneumoniae</i> (S 912)	24.8	23	19.7
<i>Citrobacter sp</i> (S 2368)	26.7	27.4	22.2
<i>E.cloacae</i> (S 2445)	22	30.2	22
<i>S.aureus</i> (S 2426)	23.8	42.4	24.3
<i>E.aerogene</i> (S 903)	23.3	25	23
<i>P.aeruginosa</i> (S 97)	20	20	15
<i>P.aeruginosa</i> (S 2488)	0	11 (C seule)	13 côté C

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'association des HEs du thym et du clou de girofle sont exprimés dans la figure 16.

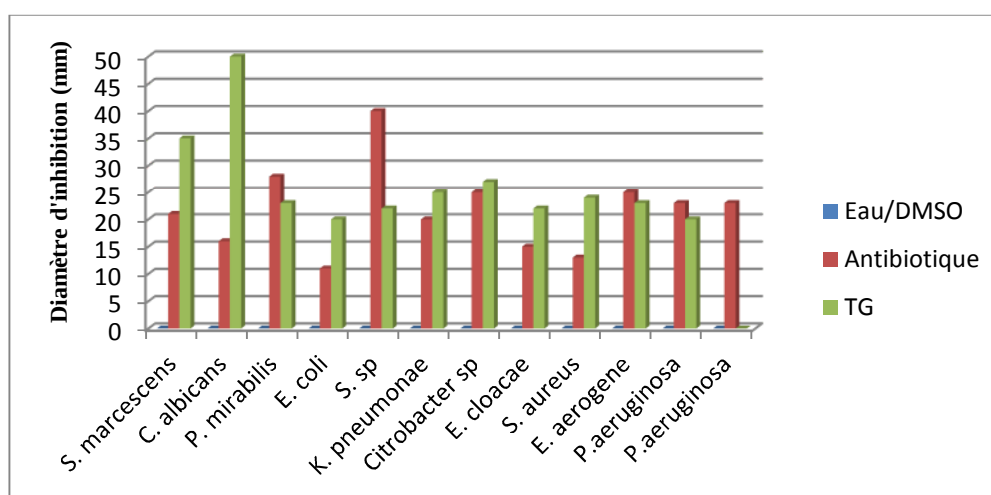


Figure 16 : Représentation graphique des résultats du test binaire Thym/Girofle.

On constate que :

Les résultats de ce test laissent voir des combinaisons comparables. (**Annexe 5**).

- *C.albicans* laisse voir une très grande sensibilité. Par comparaison l'antibiotique de référence paraît inefficace.
- il en est de même pour *S.aureus*, *E.coli* et *E.cloacae*.
- si pour *P.aeruginosa* (S97) la combinaison TG exerce une inhibition notable, elle reste sans effet sur *P.aeruginosa* (S2488).
- on constate pour cette combinaison que *S.marcescens* présente enfin une sensibilité importante.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'association des HEs du thym et de la cannelle sont exprimés dans la figure 17.

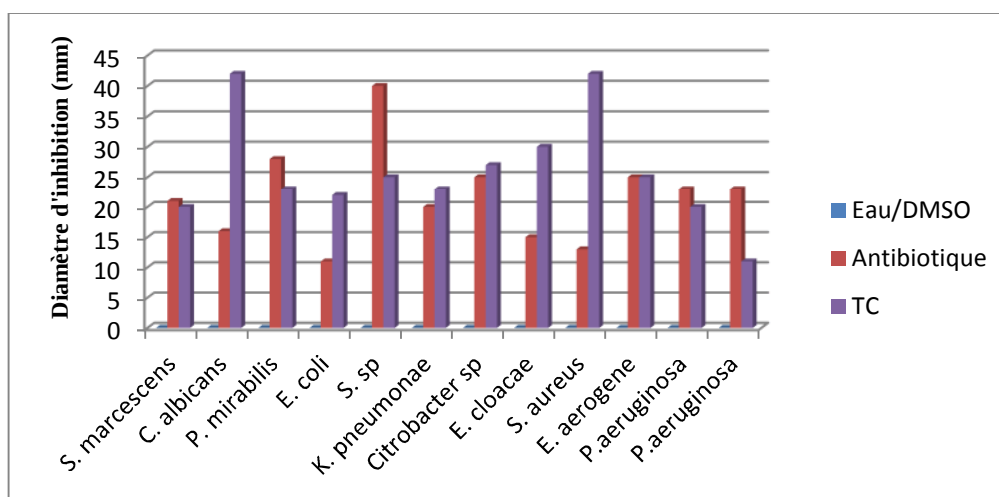


Figure 17 : Représentation des résultats du test binaire Thym/cannelle.

Une très grande sensibilité pour *C. albicans* et *S. aureus* avec la combinaison thym/cannelle. *E. cloacae* et *E. coli* présentent une sensibilité importante comparée à celle de l'antibiotique. Pour les souches *P. aeruginosa* (S 97) et surtout pour *S. marcescens* on note une sensibilité comparable à celle obtenue avec l'antibiotique de référence.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'association des HEs du clou de girofle et de la cannelle sont représentés dans la figure 18.

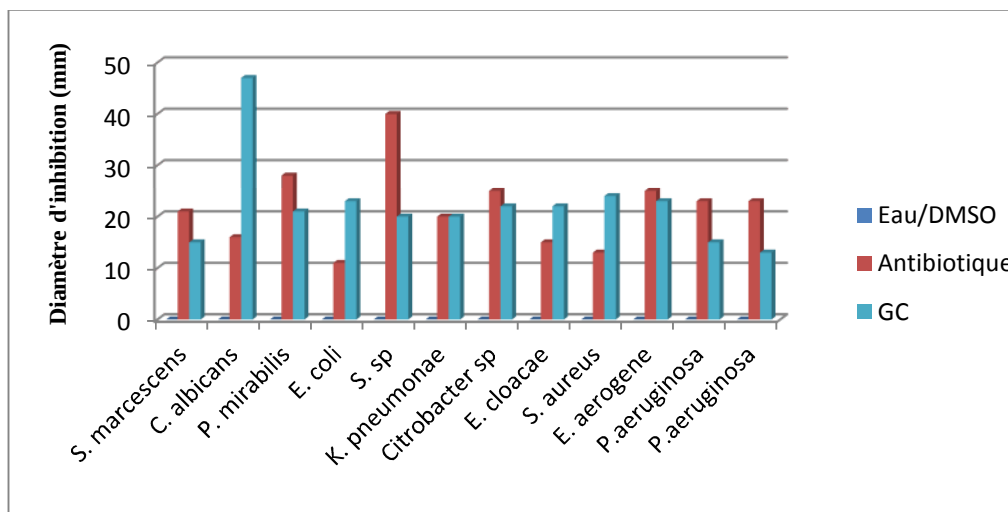


Figure 18 : Représentation des résultats du test binaire du girofle/cannelle.

C. albicans se caractérise toujours par une remarquable sensibilité par combinaison des HEs du Girofle/cannelle.

Pour *S. marcescens* et les deux *P. aeruginosa*, on constate une sensibilité limite, alors que le reste des souches on note une sensibilité comparable ou supérieur à celle obtenue avec l'antibiotique de référence.

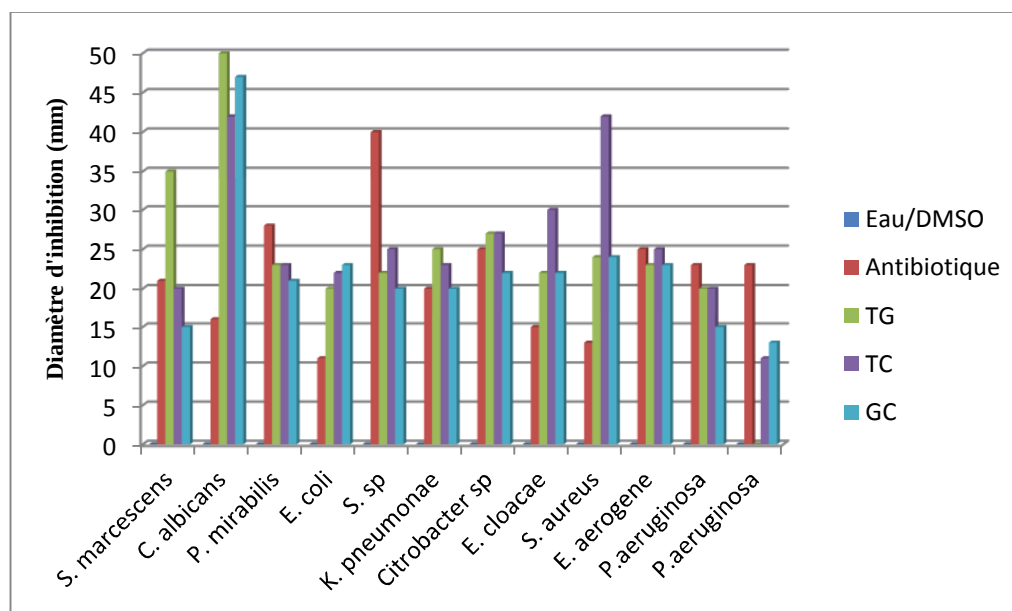


Figure 19 : Représentation graphique des résultats des tests binaires sur milieu solide.

- Tests Ternaires

Les différents diamètres d'inhibition obtenus des tests ternaires sur milieu solides figurent dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats des tests ternaires sur milieu solide.

Souches	TGC (3 disques)	TGC (1 disque)
<i>S.marcescens</i> (S 91)	18 mm	10 mm
<i>C.albicans</i>	37 mm	20.9 mm
<i>P.mirabilis</i> (S 2429) L-	23 mm	10.7 mm
<i>E.coli</i> (S 2429) L+	24.4 mm	10 mm
<i>Streptococcus sp</i> (S 2487)	25.6 mm	15.2 mm
<i>K.pneumoniae</i> (S 912)	27.8 mm	11.1 mm
<i>Citrobacter sp</i> (S 2368)	20 mm	24.1 mm
<i>E.cloacae</i> (S 2445)	21.2 mm côté T	11.9 mm
<i>S.aureus</i> (S 2426)	31.7 mm	14.1 mm
<i>E.aerogene</i> (S 903)	30 mm	15.2 mm
<i>P.aeruginosa</i> (S 97)	28.6 mm	-
<i>P.aeruginosa</i> (S 2488)	19.8 mm	-

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'association des HEs appliquées sur trois disques distincts sont exprimés dans la figure 20.

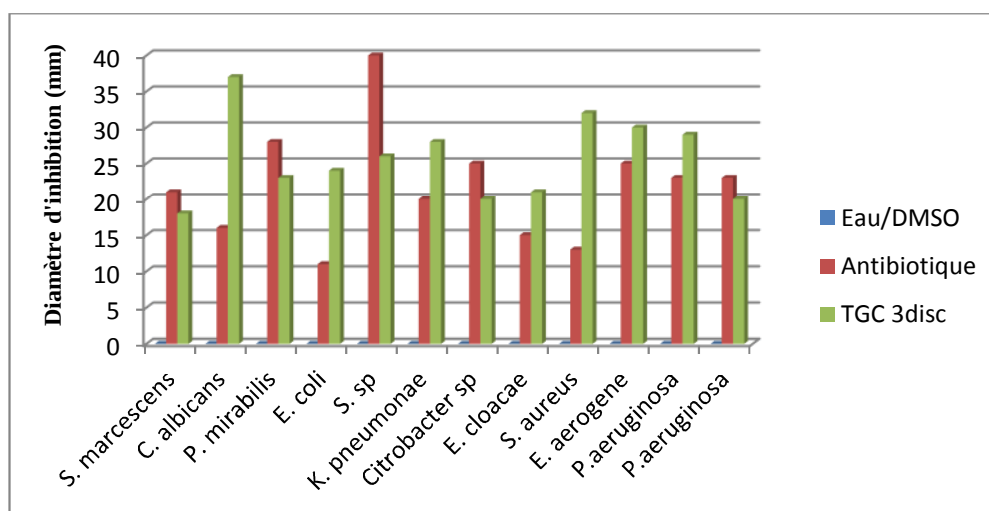


Figure 20 : Représentation graphique des résultats du test ternaire des HEs sur trois disques.

L'application des trois huiles essentielles en parallèle laisse voir une variation des résultats :

- une plus grande sensibilité pour *K. pneumoniae* et les deux *P. aeruginosa*.
- une sensibilité toujours constante pour *C. albicans*, *S. aureus* et *E. coli*.
- toutes les souches ce sont montrées résistantes pour la combinaison des trois huiles essentielles.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'association des HES appliquées sur un seul disque sont représentés dans la figure 21.

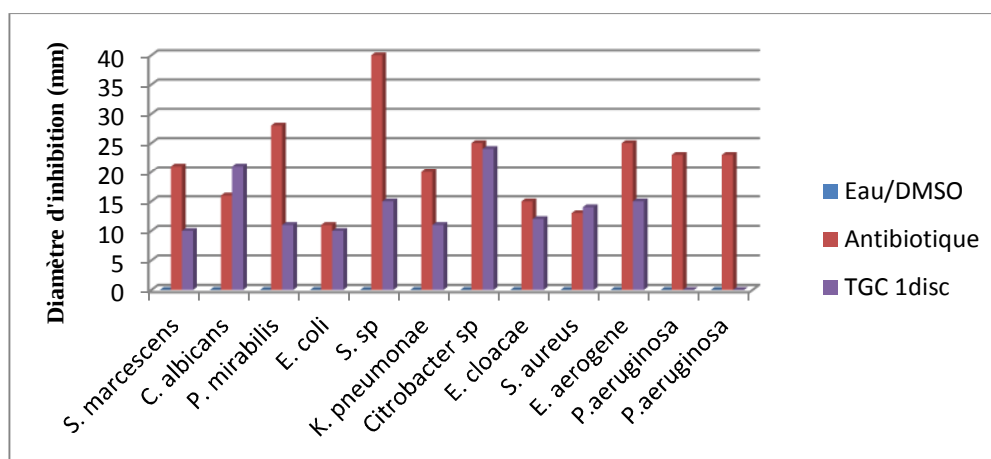


Figure 21 : Représentation graphique des résultats du test ternaire des HES sur un seul disque.

L'application simultanée de trois huiles essentielles sur un même disque laisse voir une baisse générale des zones d'inhibition même avec des souches sensibles comme ci *C. albicans* et *S. aureus*.

Les deux souches de *P. aeruginosa* montrent totalement résistantes et dans une moindre mesure *S. marcescens*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae*.

Les images montrant les diamètres d'inhibition des tests ternaires, figurent en **annexe 6**.

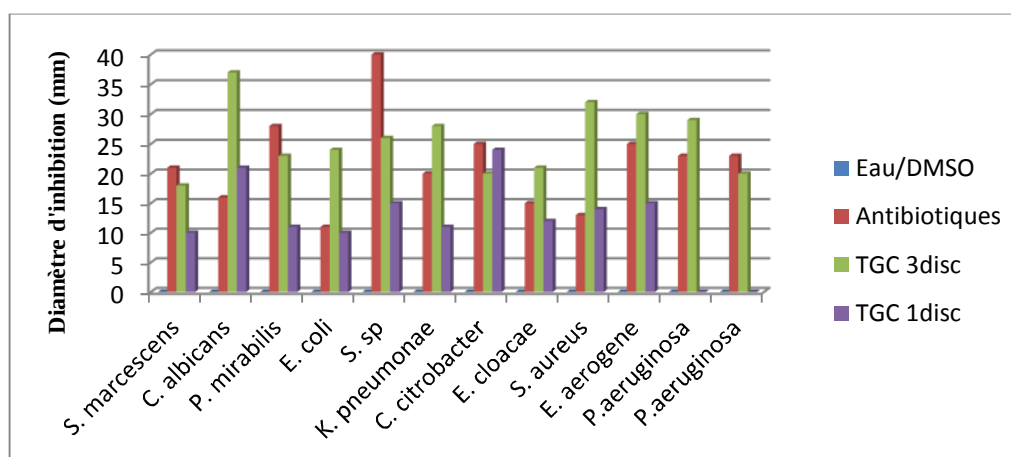


Figure 22 : Représentation graphique des résultats des tests ternaires sur milieu solide.

II.1.2 Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide

Les résultats de l'activité antimicrobienne par mesure de la densité optique sont représentés dans le tableau X.

Tableau X : Mesure de la densité optique en milieu liquide.

Absorbances (nm)	Huiles essentielles (nm)			Témoins (nm)	
Souches	2.4mg du Thym	2.4mg du Girofle	2.4mg de la Cannelle	Témoin (+) 4mg Antibiotiques	Témoin (-)
<i>S. marcescens</i> (S 91)	0.014	0.068	0.246	0.112	0.537
<i>P. aeruginosa</i> (S 2488)	0.012	0.168	0.214	0.194	0.408
<i>E. aerogene</i> (S 903)	0.014	0.101	0.227	0.056	0.329
<i>K. pneumoniae</i> (S 912)	0.023	0.023	0.221	0.201	0.437
<i>C. albicans</i>	0.025	0.012	0.006	0.097	1.150
<i>E. cloacae</i> (S 2445)	0.026	0.069	0.127	0.103	0.223
<i>Streptococcus sp</i> (S 2487)	0.013	0.030	0.108	0.043	0.184
<i>Citrobacter sp</i> (S 2368)	0.016	0.086	0.153	0.078	0.151
<i>S. aureus</i> (S 2426)	0.017	0.021	0.021	0.097	0.393
<i>E. coli</i> (S 2429) L+	0.017	0.059	0.187	0.250	0.468
<i>P. mirabilis</i> (S 2429) L-	0.015	0.050	0.009	0.059	0.025

D'après nos résultats :

- la première remarque qui s'impose est que le thym exerce l'activité la plus inhibitrice sur l'ensemble des souches, excepté pour *C. albicans* et *P. mirabilis*, qui se montre beaucoup plus sensible à la cannelle.
- le thym se montre même plus efficace que les antibiotiques de références.
- on constate une remarquable réduction de la biomasse par rapport aux témoins négatifs.
- le résultat obtenu pour *P. mirabilis* par rapport à l'antibiotique, reste difficile à interpréter.

II.1.3 Résultats de l'inhibition dynamique de la croissance bactérienne

Les résultats du test d'inhibition dynamique de la croissance bactérienne de *P. aeruginosa*, sont représentés dans le tableau XI.

Tableau XI : Résultats de l'inhibition dynamique de *P. aeruginosa* (S 2488) sur milieu solide.

Temps	Boite 1 (mm)	Boite 2 (mm)	Boite 3 (mm)	Boite 4 (mm)	Boite 5 (mm)	Boite 6 (mm)
7 heures	20.7	19.0	10.4	11.0	11.5	12.8
14 heures	21.0	22.7	10.9	10.7	13.3	10.9
21 heures	21.2	21.7	11.2	10.3	13.3	19.9

L'application successive des trois HEs, ne montre aucune amélioration notable de l'activité inhibitrice.

On remarque, que la cannelle seule appliquée en premier lieu, suffit pour exercer l'essentielle de l'activité inhibitrice (**Annexe 8**).

Les résultats du test d'inhibition dynamique de la croissance bactérienne de *S. marcescens*, sont représentés dans le tableau XII.

Tableau XII : Résultats de l'inhibition dynamique de *S. marcescens* (S 91) sur milieu solide.

Temps	Boite 1 (mm)	Boite 2 (mm)	Boite 3 (mm)	Boite 4 (mm)	Boite 5 (mm)	Boite 6 (mm)
7 heures	11.0	15.5	12.2	13.2	7.8	-
14 heures	12.8	10.3	12.9	10	9.3	-
21 heures	0	0	0	0	0	-

La résistance de *S. marcescens*, se confirme de ce test, quel que soit l'ordre d'application des HEs, on constate toujours une inhibition négligeable.

Après 21heures d'incubation, on constate une absence totale de zones d'inhibition, car les cellules ont ré-envahie la faible zone d'inhibition observée.

II.1.4 Résultats de la caractérisation spectrale des différentes huiles essentielles

Les résultats des deux extractions des HEs de la cannelle, nous ont poussés à effectuer une caractérisation spectrale et comparer les spectres d'absorbance des différentes HEs.

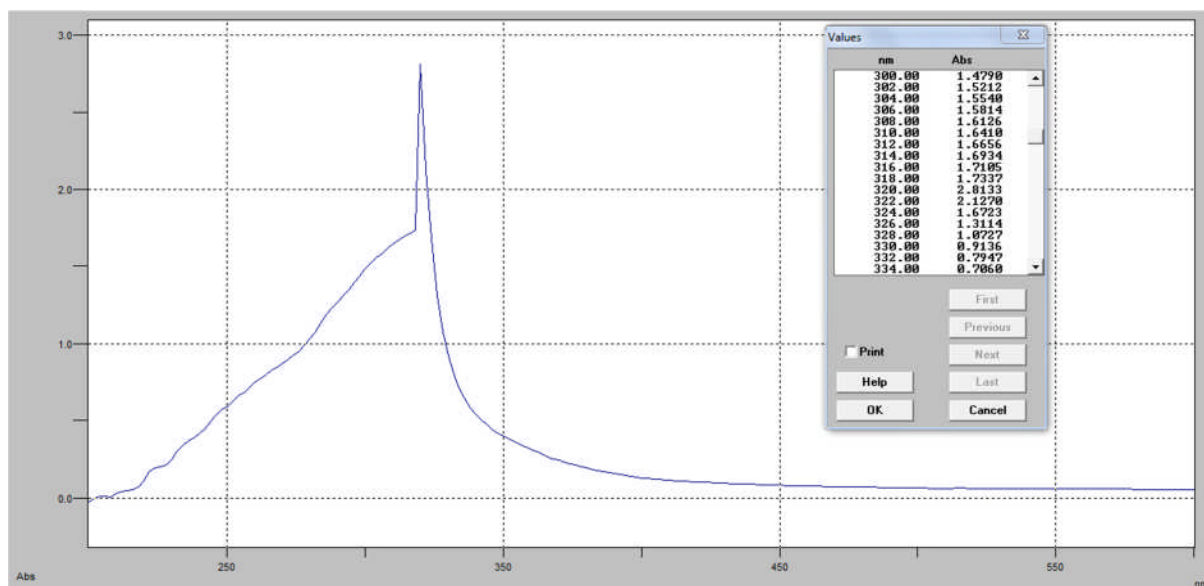


Figure 23 : Spectre d'absorbance de l'HE de la **cannelle** issue de la **première** extraction.

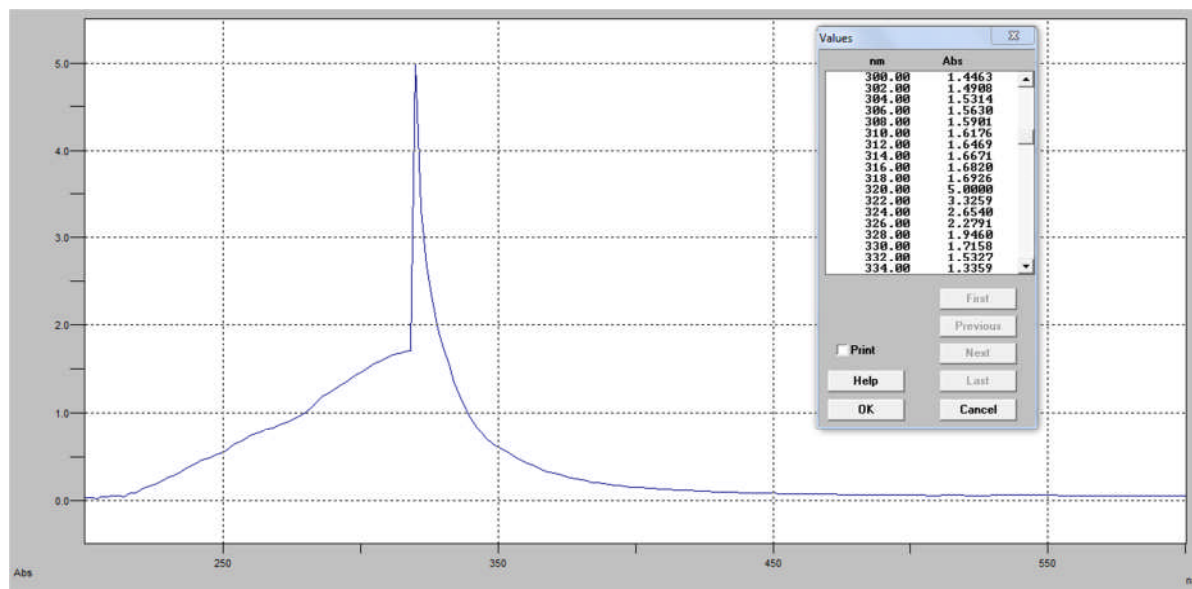


Figure 24 : Spectre d'absorbance de l'HE de la **cannelle** issue de la **deuxième** extraction.

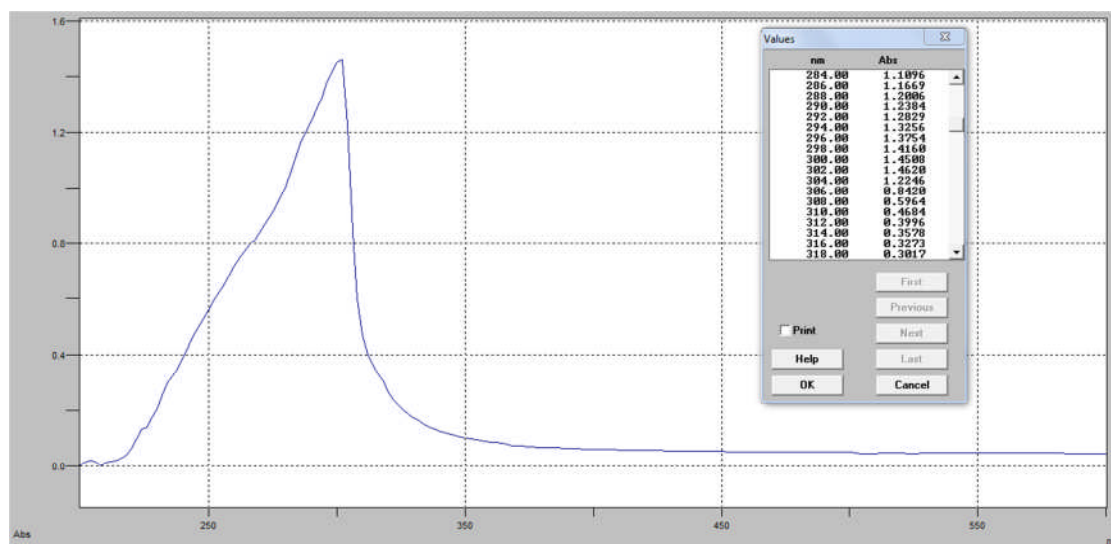


Figure 25 : Spectre d'absorbance de l'HE du clou de girofle.

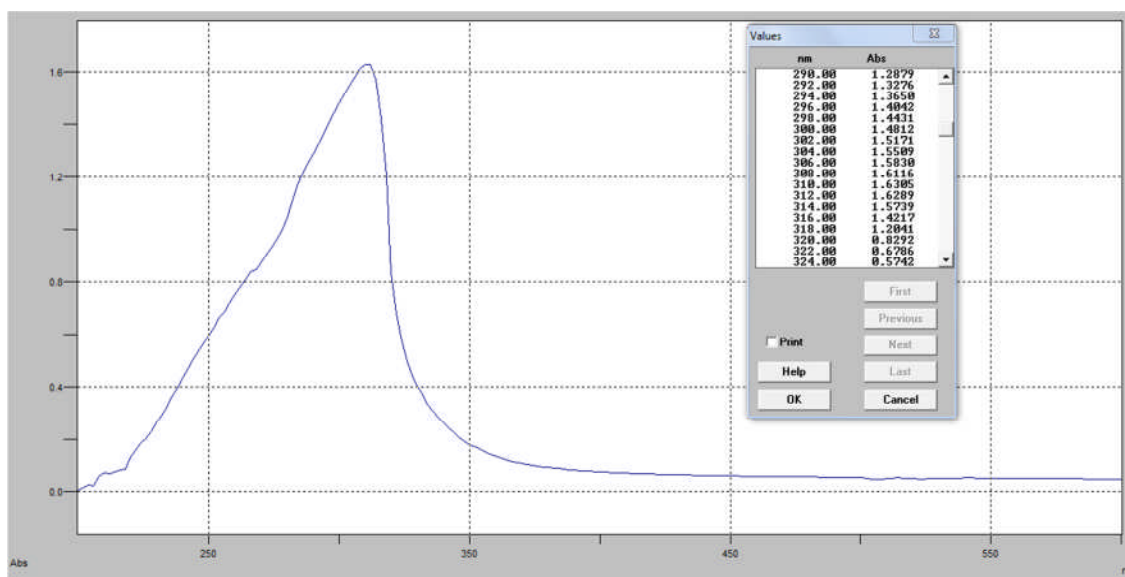


Figure 26 : Spectre d'absorbance de l'HE du thym.

Cette spectrophotométrie nous laisse voir :

- les huiles essentielles testées présentent toutes des ondes d'absorbances maximales caractéristiques dans l'UV.
- le caractère ponctuel du pic maximum qui est le signe que l'HE de la cannelle, des deux extractions, est un composé majoritairement mono-moléculaire (aldéhyde cinnamique). Ce qui les distingue par contre c'est la concentration. On remarque que l'absorbance de l'extrait de la cannelle (2) est pratiquement double de l'extrait de la cannelle (1). Ce dernier point signifie que dans la cannelle (1) est plus pauvre en principes actifs, ce qui explique les différences de résultats obtenus avec les deux cannelles.
- les HEs du thym et du clou de girofle, présentent aussi une composition majoritairement mono-moléculaire.

II.2 Discussion

Les huiles essentielles présentent, un profil de sensibilité important, vis-à-vis des agents oxydants. Elles peuvent être démunies de leurs activités par contact prolongé à l'air ambiant et à la lumière. Elles doivent impérativement être conservées dans des conditions strictes à l'abri de l'air et de la lumière.

L'activité antiseptique des huiles essentielles sur les microorganismes s'exercent de manière variable, selon les souches, selon les huiles essentielles et selon les modes d'administration.

Selon les souches on constate, d'un côté une très grande sensibilité pour *C. albicans*, *E. coli* et *S. aureus*, et de l'autre côté une grande résistance de la part de *S. marcescens* et surtout *P.aeruginosa* (S 2488).

Pour des souches comme *Streptococcus sp*, *Citrobacter sp* et *E. aerogene*, on constate que l'antibiotique de référence est généralement plus inhibiteur que les HEs testées, mais ces dernières exercent toujours une inhibition notable.

L'activité inhibitrice des huiles essentielles s'exercent d'une manière différente suivant le milieu solide ou liquide, ce qui facilement peut s'expliquer en termes de diffusion, de volatilité mais aussi d'oxydation. En effet en milieu solide le principe actif se volatilise facilement vers l'extérieur de la boîte de Pétri, facilité par la température de l'étuve. En milieu liquide par contre le principe actif est maintenu dans un milieu hermétique, ce qui limite aussi les phénomènes d'oxydation.

En termes de biomasse la croissance en milieu liquide paraît négligeable devant la croissance en milieu solide pour les mêmes raisons citées ci-dessus.

Par comparaison avec les antibiotiques de références, les huiles essentielles s'imposent comme de sérieuses concurrentes dans les limites que posent leurs pharmacotoxicologies.

L'analyse individuelle des souches montre que chacune des huiles utilisées présente un très bon pouvoir antiseptique avec des microorganismes-cibles différents. Mais dans certains cas, notamment pour les souches résistantes, les associations d'huiles représentent la meilleure alternative. Ainsi :

- pour *P. mirabilis* l'huile du thym et d'origan seules suffisent.
- le thym et la cannelle en usage individuel suffisent pour inhiber *P. aeruginosa* (S 97), réputé comme germe multi-résistant (**Bekhechi et al., 2008**).

- le pouvoir inhibiteur des trois huiles essentielles thym, origan et la cannelle montrent une efficacité remarquable contre *E. coli* suivie de *Streptococcus sp* par rapport aux autres tests (binaires et ternaires).
- pour *C. albicans*, les tests binaires sont les plus inhibiteurs suivis de l'origan appliqué seul ;
- avec *S. marcescens* les associations binaires sont les plus inhibitrices.
- l'association binaire (TC), s'est montré la formule la plus efficace contre *E. cloacae* et *S. aureus*.
- l'association des trois huiles représente la meilleure alternative pour inhiber *K.pneumoniae* et *E. aerogene*.

La variation des résultats obtenus avec l'inhibition dynamique montre que, dans les conditions expérimentales retenus, ces techniques n'apporte aucun plus. En effet elle présente des limites qui ne nous permettent pas de mettre en évidence tout son potentiel (saturation du disque, limite de diffusion, évaporation, ...etc.).

Conclusion

Conclusion

Les activités antimicrobiennes de 4 huiles essentielles ont été testées sur 12 souches microbiennes (*S. marcescens*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Streptococcus sp*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter sp*, *S. aureus*, *E. aerogene* et deux souche de *P. aeruginosa*) et une souche de levure (*C. albicans*).

Il est à noter que toutes les souches utilisées pour ces tests proviennent de milieux hospitaliers, c'est-à-dire des souches qui pratiquent la survie en milieu hostile. Il est même permis de dire que contre certaines d'entre elles l'aromathérapie représente l'arme de la dernière chance. C'est ainsi le cas pour les *Pseudomonas* et la *Serratia* testés.

Les tests montrent que les huiles présentent des similitudes mais aussi des différences qualitatives (souches-cibles) et quantitatives (diamètres d'inhibition).

On peut affirmer, au vu des résultats, que certaines huiles montrent un profil d'efficacité global meilleur que d'autres. C'est le cas pour les huiles de thym et d'origan.

Mais ce constat doit être pris avec beaucoup de précaution quand on sait que la nature de l'huile essentielle dépend beaucoup de la nature du végétal-source : variété, origine, durée et condition de stockage, qualité,...etc. Ceci est confirmé par les deux échantillons de cannelles extraits : la spectrophotométrie montre une identité totale des deux huiles, mais une concentration différente en principe actif...pour une même quantité d'hydro-distillat.

Les microorganismes montrent des profils de sensibilité différents : les deux souches de *Pseudomonas* se comportent comme deux espèces différentes. Il est impossible d'extrapoler un résultat général à partir d'un test isolé. C'est là que les associations binaires et ternaire, voire quaternaire peuvent se montrer comme une alternative très intéressante pour compenser les insensibilités à une seule huile. C'est le cas pour la résistance de *S. marcescens* et *P.aeruginosa*.

Les limites de la technique utilisée, nature des disques utilisés, degré de saturation par l'huile, volatilité,... font que certains des tests n'ont pas pu être poussés à bout. C'est le cas de l'inhibition dite dynamique qui a été difficile à réaliser *in vitro* et qui peut être facilement réalisée *in vivo*, avec certainement de meilleurs résultats.

La comparaison de l'efficacité des huiles essentielles avec celle des antibiotiques, montre que si, parfois, les antibiotiques se sont montrés supérieurs, les huiles essentielles se sont montrées dans l'ensemble efficaces. Des considérations écologiques, toxicologiques et même parfois technologiques peuvent rendre ces huiles très attractives. Par exemple on peut désinfecter un bloc opératoire de ses *Pseudomonas* par vaporisation d'une huile essentielle, chose impossible à faire avec la pénicilline !

Une chose est certaine : le potentiel antiseptique qui se dégage de ces résultats souligne le fait que l'Aromathérapie est une concurrente très sérieuse pour l'antibiothérapie. Mais on se rend compte à la lumière de ce travail qu'il est nécessaire de mettre au point des outils d'analyses autre que l'antibiogramme. Ce dernier se montre insuffisant pour une appréciation sérieuse de tout le potentiel que peuvent représenter les huiles essentielles antiseptiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aumeran C, Dubost J.J et Guelon D. (2009). *Antibioguide du CHU de Clermont-Ferrand et des établissements de santé de la région auvergne*. Clermont-Ferrand. P : 14-114.

Bastien F. (2008). Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* a la réunion. Thèse doctorat. Université Paul-Sabatier. Toulouse. P : 25-26.

Bekhechi C et Abdelouahid D. (2010). *Les huiles essentielles. Offices des publications Universitaires*. ALGER. P : 55 - 56.

Bekhechi C, Atik-bekkara F et Abdelouahid D.E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*. **6** : 153 - 159.

Billerbeck V.G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, **5**: 249– 253.

Bosio K, Avanzini C, D'avolio A, Ozimo O et Savoia D. (2000). *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. **31**: 174-177.

Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales*. Lavoisier, 3^{ème} Edition: tech & doc, Paris. P: 507-509.

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

Carson C.F, Hammer K.A, Riley T.V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical microbiology reviews*. **19** (1) : 50 – 62.

Couderc V.L. (2001). Toxicité des huiles essentielles. Thèse de doctorat Ecole nationale vétérinaire Toulouse III. P : 14-22.

Gabriel I, Alleman F, Dufourcq V, Perrin F et Gabarrou J.F. (2013). Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Productions Animales*. **26** (1) : 13 - 24.

Gill A.O et Holley R.A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*. **111** : 170 - 174.

Giordani R et Kaloustian J. (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques, *Phytopharmacologie*, **3** : 121-124.

Girard G. (2010). Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaires d'hier à aujourd'hui. Thèse de Doctorat. Nancy I. P : 6-8.

Guinoiseau E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse doctorat. Université Pasquale Paoli. Corse. P : 56-61.

Hammer M.U, Brauser A.M, Olak C, Brezesinski G, Goldmann T, Gutschmann T et Andrä J. (2010). Lipopolysaccharide interaction is decisive for the activity of the antimicrobial peptide NK-2 against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Biochem*. **427** : 477-488.

Hemaiswarya S, Kruthiventi A.K et Doble M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. **15** : 639-652.

Hilan C, Bouaoun D, Aoun J, Sfeir R et Garabeth F. (2009). Propriétés antimicrobiennes et toxicité par détermination de la DL50 de l'huile essentielle de *Prangos asperula* Boissier. *Phytothérapie*. **7** : 8 -14.

Huh A.J, Kwon Y.J. (2011). Nanoantibiotics : A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. **156** : 128–145.

Iserin P, Masson M et Restellini J. (2001). *LAROUSSE. Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparations, soins.* 2^{ème} édition. Hong Kong. P : 99-143.

Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M et Abou L. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*. **6** : 160 – 164.

Kone S. (2001). Extraction des huiles essentielles par distillation. *Gate Information Service*. Eschbom. P: 1-2.

Kwon J.A, Yu C.B et Park H.D. (2003). Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*. **37** : 61–65.

Lambert R.J, Skandamis P.N, Coote P.J et Nychas G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. **91** (3) : 453-62.

Lamendin H. Toscano G et Requirand P. (2004). Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires. *EMC-Dentisterie*, **1** : 179–192.

Nauciel C et Vildi J.L. (2005). *Bactériologie médicale : connaissance et pratique*, Masson, 2^{ème} édition. Paris. P: 15-18.

Niu C, Afre S et Gilbert E.S. (2006). Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology*. **43** : 489 - 494.

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

Senhaji O, Faid M et Kalalou I. (2006). Étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle. *Phytothérapie expérimentale*. **1** : 24-30.

Shilei G, Zhaoxue C, Xinchao H, Yufen C, Di X et Ping X. (2011). Variations in essential oil yield and composition during *Cinnamomum cassia* bark growth. *Industrial Crops and Products*. **33** : 248 - 252.

St-Jean R. (2006). La cannelle est efficace contre le diabète. *Dossier Santé/Médicaments*. P : 1-2.

Taherian A.A, Babaei M, Vafaei A.A, Jarrahi M, Jadidi M et Sadeghi H. (2009). Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of thymus vulgaris. *Physiology Research Center, Semnan University of Medical Sciences. Pak. J. Pharm. Sci.* **22** (1) : 83-89.

Teuscher E, Antor R et Lobstein A. (2005). *Plantes aromatiques. (Epices, aromates, condiments et huiles essentielles)*. Tec & doc, Paris. P: 266-477.

Ultee A, Bennik M.H.J et 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** (4) : 1561 – 1568.

Vercauteren J. (2006). *Schémas, formules du cours de pharmacognosie*. Université Montpellier, laboratoire de pharmacognosie. P: 113 - 122.

Annexes

Annexes

Annexe 1

Les principaux composés majeurs de certaines huiles essentielles sont représentés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Composés majeurs de certaines huiles essentielles. (Kaloustian J & al., 2008).

Nom commun des plantes	Nom Latin des plantes	Compositions majoritaires des HEs	Composition (%)
Cannelle	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Trans</i> -cinnamaldéhyde	85%
Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugénol Acétate d'eugényle	75 à 85% 8 à 15 %
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol Carvacrol γ -Terpinène <i>p</i> -Cymène	10 à 64% 2 à 11% 2 à 31% 10 à 56%
Thym (chémotype thymol)	<i>Thymus zygis</i>	Thymol Linalol γ -Terpinène <i>p</i> -Cymène	85 % 1 % 2 % 10 %
Origan	<i>Origanum vulgare L</i>	Carvacrol Thymol γ -Terpinène <i>p</i> -Cymène	Traces à 80% Traces à 64% 2 à 52 % Traces à 52%
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α - Pinène Camphène 1,8 - Cinéole Camphre	21 % 5 % 37 % 34 %
Lavande	<i>Lavandula angustifolia</i>	Linalol Acétate de Linalyle	50 % 47 %
Lavande	<i>Lavandula latifolia</i>	1,8 - Cinéole Linalol Camphre	19 % 71 % 9 %
Sauge	<i>Salvia officinalis</i>	Camphre α - Pinène β – Pinène 1,8 – Cinéole α – Thujone	6 à 15 % 4 à 5 % 2 à 10 % 6 à 14 % 20 à 42 %

Annexe 2

Les caractéristiques générales des souches microbiennes utilisées sont indiquées dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Fiche technique des souches microbiennes utilisées. (Nauciel C & al., 2005).

Microorganismes	Caractères généraux	Infections
<i>Escherichia coli</i> (S 2429)	Bacille à Gram négatif, Aérobie, Mobile, lactose (+)	Pneumonie et infections de plaies chirurgicales.
<i>Serratia marcescens</i> (S 91)	Bacille à Gram négatif, Aérobie, Mobile	Urinaires, nosocomiales et septicémie, oculaires,
<i>Enterobacter cloacae</i> (S 2445)	Bacille à Gram négatif, aéro-anaérobie, Mobile	Urinaire, pulmonaire
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S 912)	Bacille à Gram négatif, Aérobie, immobile	Pneumonie et infections de plaies chirurgicales.
<i>Proteus mirabilis</i> (S 2429)	Bacille à Gram négatif, Aérobie, Mobile, lactose (-)	Infections des voies urinaires, plaie, surinfections et voies respiratoires
<i>Staphylococcus aureus</i> (S 2426)	Cocci à Gram positif, anaérobie facultatif, immobile, regroupement en amas	Infections de plaies chirurgicales, pneumonie, septicémie et infections des voies urinaires
<i>Streptococcus sp</i> (S 2487)	Cocci à Gram positif, anaérobie facultatif, immobile. Regroupement en paire chênnette ou tétrade.	Nosocomiales de plaies chirurgicales.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (S 2488)	Bacille à Gram négatif, mobile, aérobie stricte	Pneumonie et infections de plaies chirurgicales.
<i>Citrobacter sp</i> (S 2368)	Bacille à Gram négatif,	Infections des voies urinaires et plaies chirurgicales.
<i>Enterobacter aerogene</i> (S 903)	Bacille à Gram négatif, mobile	Infections des voies urinaires et nosocomiales, respiratoires.
<i>Candida albicans</i>		Infections des voies urinaires et septicémies. Infections fongiques essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique.

Annexe 3

Equipements :

- ✓ Balance ;
(BRAINWEIGH™ B 1500 D) ;
- ✓ Broyeur (INKA® basic) ;
- ✓ Générateur de vapeur ;
- ✓ Dispositif d'hydrodistillation ;
- ✓ Ballon ;
- ✓ Fiole jaugée ;
- ✓ Ampoule à décanter ;
- ✓ Diéthyle éther ;
- ✓ Diméthyle sulfoxyde (DMSO) ;
- ✓ Boite de pétri ;
- ✓ Disque de papier Wattman ;
- ✓ Micropipettes (200 µl, 1000 µl) ;
- ✓ Gélose Mueller Hinton ;
- ✓ Gélose Sabouraud ;
- ✓ Bouillon nutritif ;
- ✓ Pied à coulisse ;
- ✓ Spectrophotomètre UV/visible (UNICO® 1100) ;
- ✓ Spectrophotomètre UV/visible (Analytik/jena, specord 50)

Annexes 4



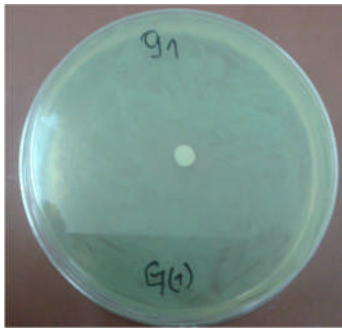




Figure 27 : Résultats des tests individuels sur milieu solide.

Annexe 5





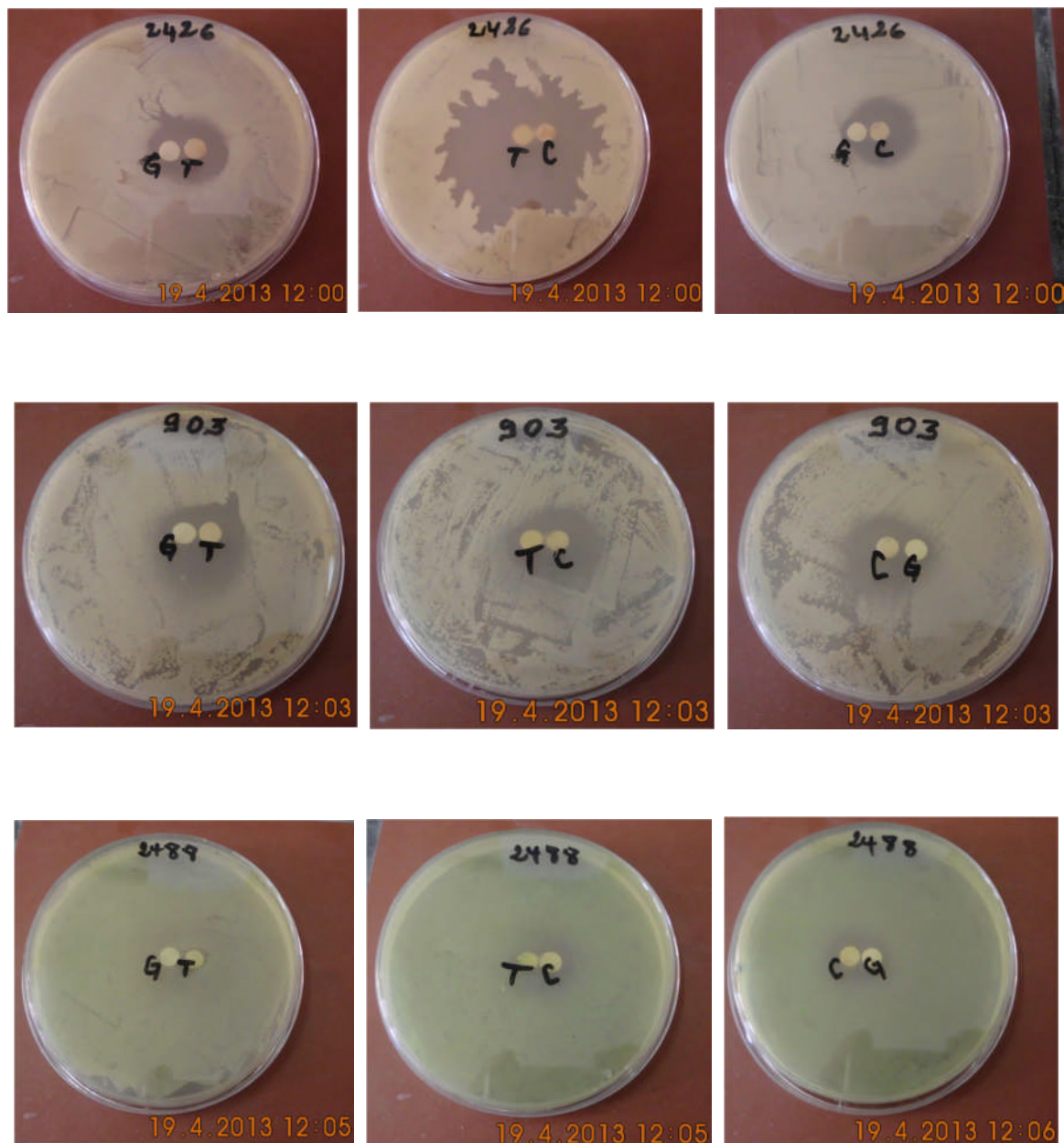
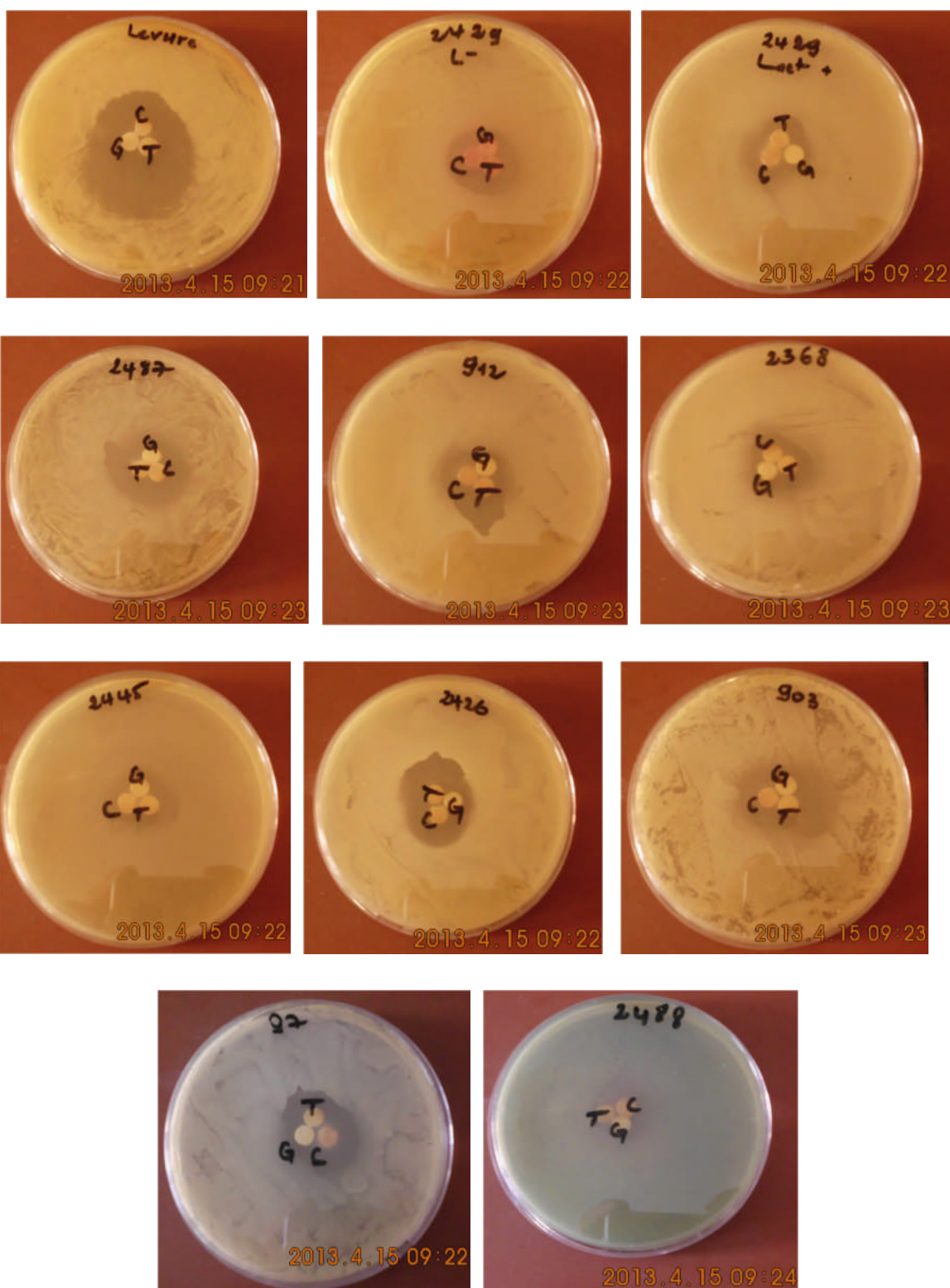


Figure 28 : Résultats des tests Binaires.

Annexe 6

1. Tests ternaires en utilisant trois disques :



2. Résultats des tests ternaires en utilisant un seul disque :

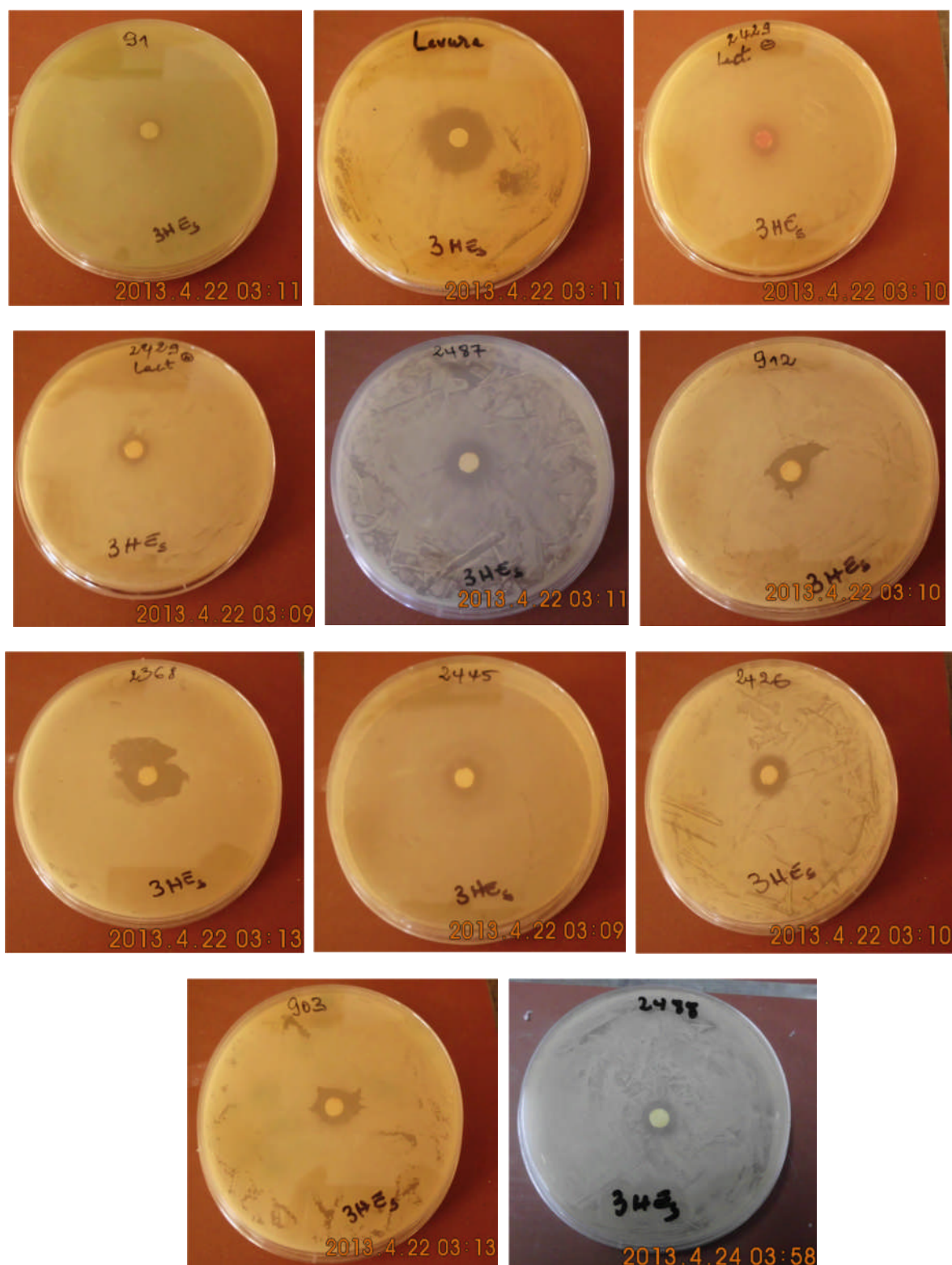


Figure 29: Résultats des tests ternaires sur milieu solide.

Annexe 7

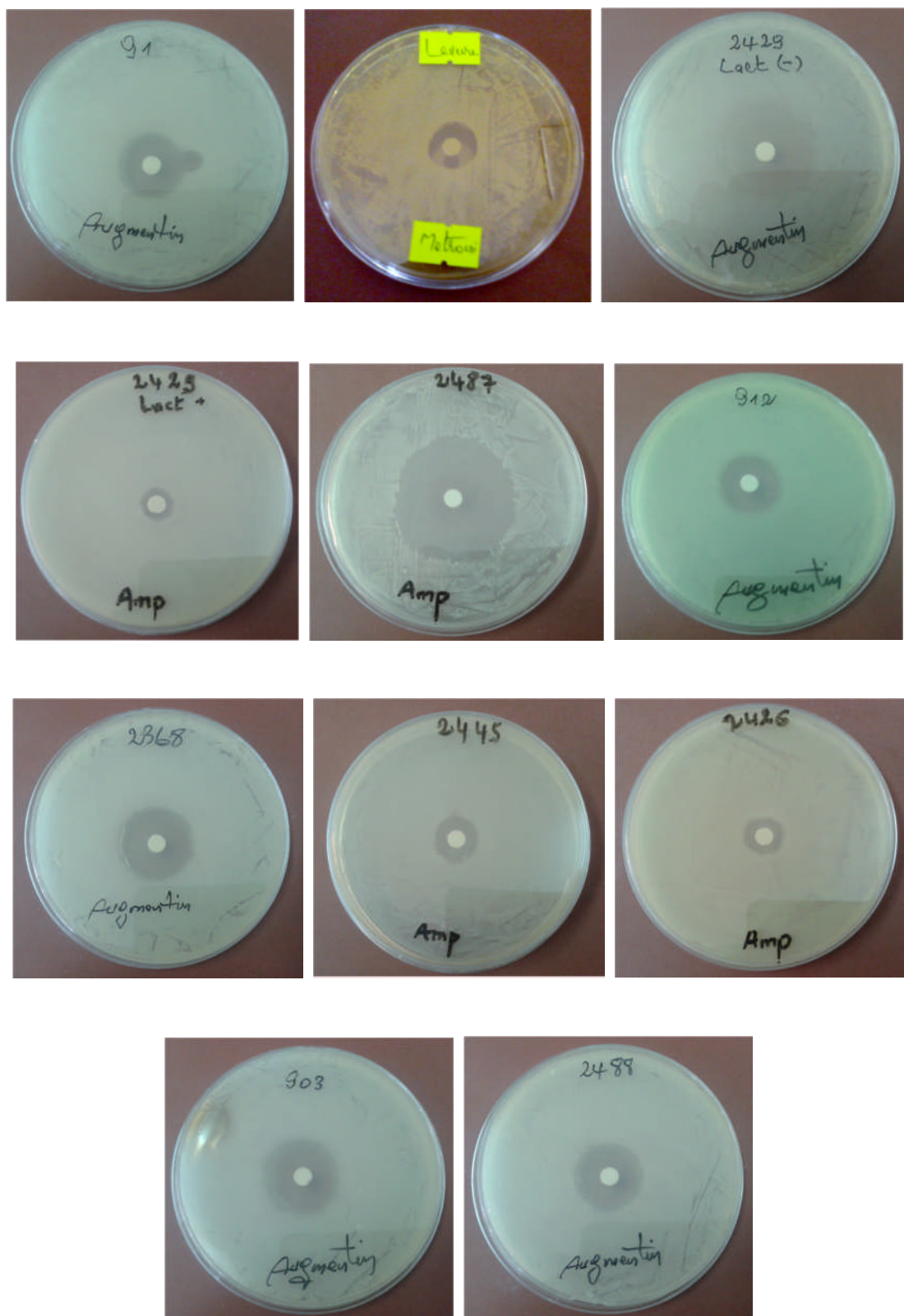
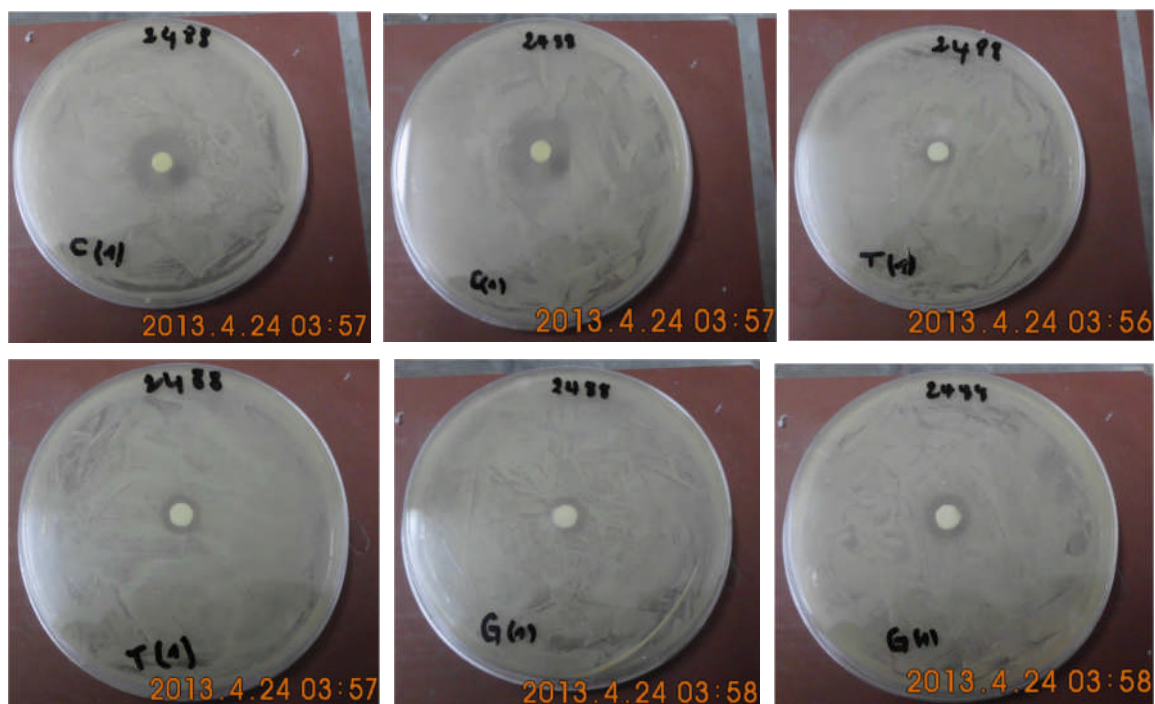


Figure 30 : résultats des tests en utilisant les antibiotiques de référence.

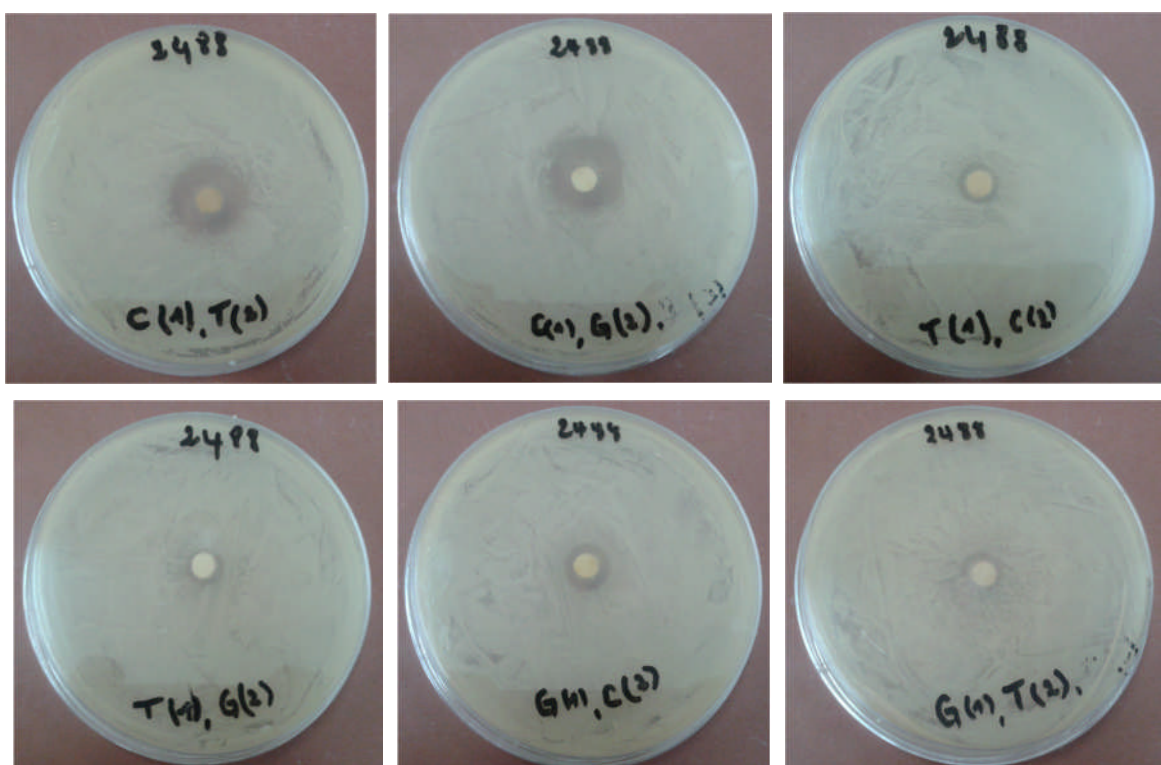
Annexes 8

1. Résultats de l'inhibition dynamique de *P.aeruginosa* (S 2488) sur milieu solide :

Après 7 heures :



Après 14 heures :



Après 21 heures :

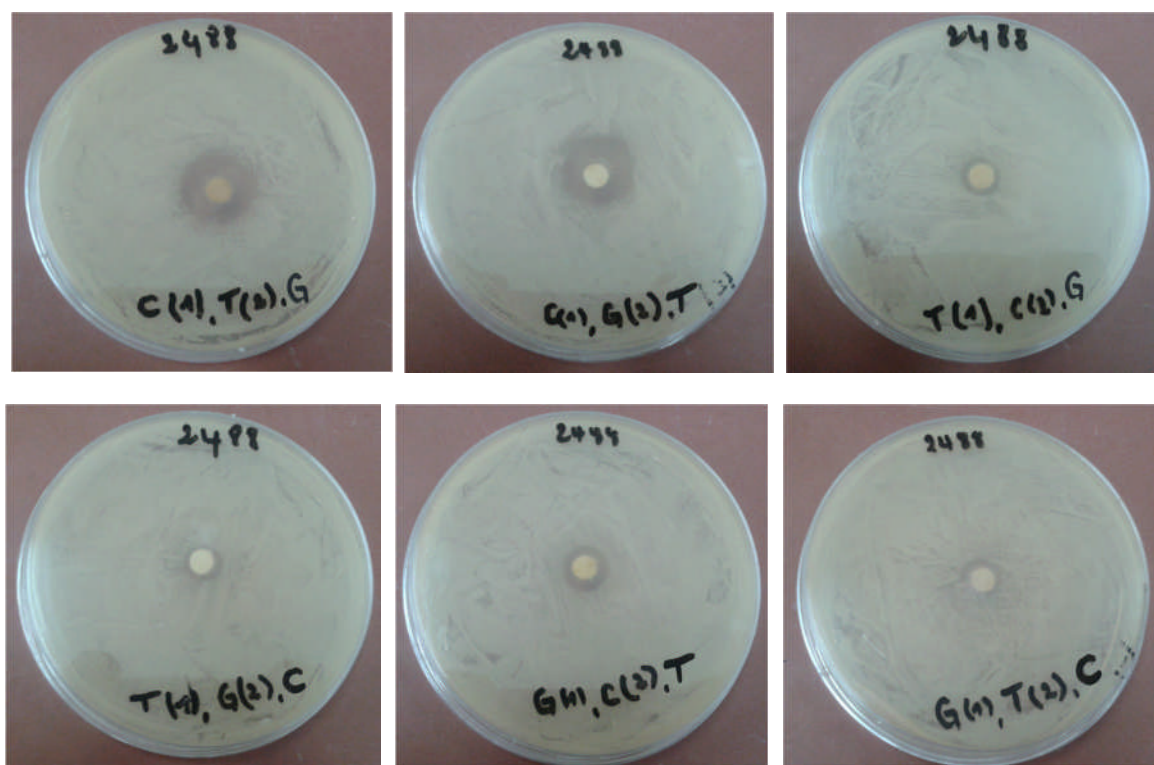


Figure 31 : Résultats de l'inhibition dynamique de la croissance bactérienne.

Résumé

Le but de cette étude est la prospection de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de quatre plantes aromatique réputées antiseptiques et l'effet de leurs associations sur des souches microbiennes. Les huiles essentielles sont extraites par hydro-distillation

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles s'est faite par la méthode de diffusion sur milieu solide (méthode des disques) et en milieu liquide.

Les huiles essentielles ont montré des activités antimicrobiennes manifestes et persistantes sur plusieurs jours. Cependant, pour deux souches bactériennes, *P. aeruginosa* et *S. marcescens*, on a observé une forte résistance. Sur ces deux souches, l'activité de ces huiles persiste sur une période de 7 heures avant de laisser place à une reprise de leur croissance.

L'association des huiles essentielles (deux et trois disques séparés), laisse voir une activité très marquée, généralement supérieure à celle de l'antibiotique. Par ailleurs, la méthode de l'*inhibition dynamique*, a montré son efficacité contre *P. aeruginosa*, mais elle a montré ces limites sur *S.marcescens*.

Mots clés : Extraction, huiles essentielles, activité antimicrobienne, aromatogramme, thym, clou de girofle, cannelle et origan.

Abstract

The aim of this study is to prospect the antimicrobial activity of essential oils from four aromatic plants well known as antiseptics. We studied single compounds and associations effects on several microbial strains. The essential oils are extracted mainly by hydro-distillation.

Diffusion method on solid and liquid medium (disk method) was performed to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils extracted.

The essential oils showed significant antimicrobial activity against the strains studied. However, two bacterial strains *P. aeruginosa* and *S. marcescens*, displayed strong resistance, with sensibility period not exceeding seven hours, but strong inhibitory activity persists, for several days, on the rest of the strains tested .

The combination of essential oils, (two and three separate discs), showed an important activity, which turns out better than the antibiotic. Furthermore, the method of dynamic inhibition has shown some efficiency against *P. aeruginosa*, but it has shown there limits concerning *S. marcescens*.

Keywords: extraction, essential oils, antimicrobial activity, aromatogramme, thyme, clove, cinnamon and oregano.