

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté par :

ADDA Halima

ROUANE Fatima

Thème

**Etude de l'effet synergétique d'une mixture de deux huiles
essentielles (*Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare*)
à l'égard des isolats cliniques à partir des infections
vaginales**

Soutenu publiquement le 30/06/2024

Jury :

Président : M^{me} BOUMEZRAG Assia

Encadrant : M^r SELLES Sidi Mohammed Ammar

Co-encadrant : M^{me} SMAIL Leila

Examineur 1: M^r BELHAMITI Belkacem Tahar

Grade

MCA

MCA

Ingénieur de laboratoire

MCA

Année universitaire 2023-2024

Remerciements

*Nous remercions **DIEU** le tout puissant de nous avoir données la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Notre plus grande gratitude va à notre encadreur Monsieur **SELLES Sidi Mohammed Ammar** pour ses conseils, et son aide ainsi que pour sa grande disponibilité et pour la confiance qu'il nous a accordées tout au long de la réalisation de ce mémoire. Nous le remercions pour ses connaissances dont il nous a fait bénéficier.*

*Nous prenons aussi un réel plaisir à remercier chaleureusement madame **SMAIL Leïla**, qui nous a co-encadrées, guidées et patiemment conseillées pour la réalisation de la grande partie de notre travail au sein de laboratoire pédagogique de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.*

Nous remercions également

*Madame **BOUMEZRAG Assia** qui a bien voulu honorer ce travail en acceptant de présider le jury.*

*Monsieur **BELHAMITI Belkacem Tahar** pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail et d'attribuer des remarques très intéressantes.*

Dédicace

*Avant tout, je remercie le **Dieu** le tout puissant de m'avoir donnée le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

Ce mémoire est le fruit de cinq années d'étude et de travail laborieux durant lesquelles j'ai trouvé aide et assistance de la part de plusieurs personnes, à qui je dédie ce travail ;

Je crois au dicton : où que vous soyez, vous vous tenez sur les doigts de quelqu'un. Alors je vous écris à tous :

A mes très chers parents

*Ma chère mère **Badra**, pour l'affection et l'amour qu'elle m'a donnée le courage et la force dans les moments les plus difficiles. Mon père **Abdelkader**, pour son soutien moral et ses conseils les plus précieux qui m'ont servi dans ma vie et son encouragement sans limite.*

A mon cher frère

Cheikh

Mes adorables sœurs

Meriem, Fatima, Zahra, Soria

Pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

*Mon meilleur et plus proche amis qui est trouvé au moment
Difficile de ma vie **Habib**.*

*A mon binôme **fatima** pour tous les moments et les souvenirs inoubliables pendant les années d'études, ensemble nous avons pu surmonter pleins d'obstacles, je tiens à te remercier pour toutes ces belles années d'amitié en or qui ont enrichi ma vie.*

A mes chers amis

À notre belle amitié, les jours et les nuits blanches, nos fous rires et nos éclats de joie, à tous les moments qu'on a passés ensemble. que Dieu vous comble de bonheur, de santé, de succès et de prospérité dans votre vie et vous protège.

Halima

Dédicace

Avec l'aide de Dieu le tout puissant est enfin achevé ce travail, lequel je dédie à toutes les personnes qui me sont chers :

A mon père Boudali

Mon exemple éternel, ma source de joie et de bonheur. Je tiens à honorer l'homme que tu es, grâce à toi papa j'ai appris le sens de la responsabilité, je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu m'as apporté depuis toujours.

A ma mère Menaoura

la lumière de ma vie, la source de mes efforts. Tu représentes pour moi le symbole de la femme forte et courageuse, tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je voudrais te remercier pour ton amour, et surtout pour tous les sacrifices que tu as consentis pour moi.

A mes chers frères

Abdelkader et Youcef, Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de santé.

A mes grands-parents maternels que Dieu les protège pour moi.

A mes grands-parents paternels que Dieu les accueille dans son vaste paradis.

A mon binôme Halima pour tous les moments et les souvenirs inoubliables pendant les années d'études, ensemble nous avons pu surmonter pleins d'obstacles, je tiens à te remercier pour toutes ces belles années d'amitié en or qui ont enrichi ma vie.

A mes chers amis

Je dédie ce travail à notre belle amitié, les jours et les nuits blanches, nos fous rires et nos éclats de joie, à tous les moments qu'on a passé ensemble. que Dieu vous comble de bonheur, de santé, de succès et de prospérité dans votre vie et vous protège.

A tous mes enseignants et toutes mes enseignantes du primaire à l'université.

Et enfin, à tous ceux qui ont aimé Fatima et lui ont souhaité le succès.

Fatima

Table des matières

Table des matières	I
Liste des illustrations	V
Liste des abréviations	VII
Résumé	IX
ملخص	X
Abstract	XI
Introduction	1

1^{ère} Partie : Partie bibliographique

Chapitre I : Les germes associés aux infections vaginales

1- Introduction	5
2- Flore vaginale normale	5
3- Les principales infections vaginales	6
3-1- Vaginites bactériennes	6
3-2- Vaginose bactérienne	7
4- Les infections génitales basses	7
4-1- Définition	7
4-2- Les facteurs favorisant le déséquilibre de la flore vaginale	7
5-Complications des infections génitales basses	8
6- Traitement et perspectives thérapeutiques	8
6-1- Traitement anti-infectieux	8
6-2- Traitement par les œstrogènes	8
6-3- Prébiotiques et probiotiques	8
6-3-1-Traitement par les prébiotiques	9
6-3-2- Traitement par les probiotiques	9

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

1-Définition	11
2- Composition chimique	11
3- Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	12

3-1- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	12
3-2- Extraction par hydrodistillation	13
3-3- Extraction par expression à froid	14
3-4- Extraction par solvants organiques	14
3-5- Extraction par micro-ondes	14
3-6- Extraction par CO ₂ supercritique	15
4-Activité des huiles essentielles	15
4-1- Activité antibactérienne	15
4-2- Activité antivirale	16
4-3- Activité antifongique	17
4-4- Activité antiparasitaire	17
4-5- Activité antioxydante	17
4-6- Activité anti-inflammatoire	18
5- Mode d'administration des huiles essentielles	18
5-1- Par voie orale	18
5-2- Par voie cutanée	18
5-3- Par voie vaginale.....	18
5-4- Par voie respiratoire	18
5-5- Par voie rectale	18
6- Utilisation des huiles essentielles	19
7- Toxicité des huiles essentielles	19

Chapitre III : Matière végétale

1- Clou de girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	21
2- Origan (<i>Origanum vulgare</i>)	23

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

Matériel& Méthodes

Première partie

1- Les isolats cliniques	27
2- Enrichissement des bactéries	27
3- Purification et identification des souches bactériennes	27
3-1- Milieu chromogénique (Chromagar Orientation)	27

3-2- Examen microscopique des cultures	28
3-2-1- Examen à l'état frais.....	28
3-2-2 Coloration de Gram	28
3-3- Tests biochimiques	29
3-3-1- Test de catalase.....	29
3-3-2- Test d'oxydase.....	29
3-4- La galerie biochimique API 20 ^E	30

Deuxième partie

1- Antibiotogramme	32
1-1- Préparation d'une pré culture	32
1-2- Préparation de l'inoculum	32
1-3- Ensemencement	32
1-4- Application des disques d'antibiotiques	32
1-5- Incubation et lecture	33
2- Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	33
2-1- Préparation de l'inoculum	33
2-2- Test préliminaire « in-vitro »	34
3- Détermination des CMI et des CMB par la méthode de micro-dilution	35
4. Etude de la synergie.....	36

Résultats & Discussion

Première partie

1- Enrichissement	39
2- Purification et identification des souches bactériennes	39
2-1- Milieu chromogénique (Chromagar Orientation)	39
2-2- Observation microscopique	39
2-2-1- Examen à l'état frais.....	39
2-2-2 Coloration de Gram	40
2-3- Tests biochimiques	41
2-3-1- Test de catalase.....	41
2-3-2- Test d'oxydase.....	41

Deuxième partie

1- Résultats antibiogramme.....	42
2- Activité antibactérienne	43
2-1- Détermination de la sensibilité	43
2-2-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)	45
2-3- Etude de la synergie	48
Conclusion	50
Références bibliographiques	52

Liste des illustrations

Liste des figures

Partie Bibliographique

Figure 1 : Flore Lactobacillaire normale : Coloration de Gram : Grossissement X1000	5
Figure 2 : Principe schématisé de l'extraction par entraînement à la vapeur	13
Figure 3 : Principe schématisé de l'hydro – distillation	13
Figure 4 : Schéma de l'extracteur soxhlet	14
Figure 5 : Extraction assistée par micro-ondes	15
Figure 6 : Mode d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne.....	16
Figure 7 : Structure du giroflier	21
Figure 8 : Caractéristiques botaniques d' <i>Origanum vulgare</i>	23

Partie Expérimentale

Figure 9 : Galerie API20 ^E	30
Figure 10 : Aspect macroscopique d' <i>E. coli</i> sur milieu Chromagar Orientation	39
Figure 11 : Aspect macroscopique de <i>Proteus</i> sp. sur milieu Chromagar Orientation	39
Figure 12 : Frottis frais d' <i>E. coli</i> sous microscope optique GX1000.....	40
Figure 13 : Frottis frais de <i>Proteus</i> sp. sous microscope optique GX1000.....	40
Figure 14 : Coloration de Gram d' <i>E. coli</i> sous microscope optique GX1000	40
Figure 15 : Coloration de Gram de <i>Proteus</i> sp. sous microscope optique GX1000	40
Figure 16 : Test de catalase d' <i>E. coli</i>	41
Figure 17 : Test de catalase de <i>Proteus</i> sp.	41
Figure 18 : Résultats d'antibiogramme pour la souche d' <i>E. coli</i>	42
Figure 19 : Résultats d'antibiogramme pour la souche de <i>Proteus</i>	42
Figure 20 : Effet de l'HE de <i>Syzygium aromaticum</i> vis-à-vis des deux souches testées A : <i>E. coli</i> et B : <i>Proteus</i> sp	44
Figure 21 : Effet de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis des deux souches testées A : <i>E. coli</i> et B : <i>Proteus</i> sp.	44
Figure 22 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i> et <i>Proteus</i> sp.	46

Figure 23 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i> et <i>Proteus</i> sp.	48
--	----

Liste des tableaux

Partie Bibliographique

Tableau 1 : Classification de <i>S. aromaticum</i>	21
Tableau 2 : Classification botanique de l'origan	24

Partie Expérimentale

Tableau 3 : Identification des bactéries sur la gélose Chromagar Orientation	28
Tableau 4 : La liste des antibiotiques testés	33
Tableau 5 : Halos d'inhibition* en (mm) provoques par les antibiotiques testes.....	42
Tableau 6 : Halos d'inhibition* en (mm) (moyenne $\pm$ écart type) provoques par les huiles essentielles testées	43
Tableau 7 : CMI et CMB des deux huiles essentielles testées, nécessaires pour l'inhibition totale de la croissance bactérienne in vitro, exprimée en solution $\mu\text{l/ml}$ (n =3)	45
Tableau 8 : Indice de concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) d'huiles essentielles de <i>Syzygium aromaticum</i> et <i>Origanum vulgare</i>	48

ADH : Arginine dihydrolase

API 20^E : Application programming interface ou « interface de programmation d'application »
pour l'identification des *Enterobacteriaceae*

ATP : Adénosine-Triphosphate.

ATPase : Enzymes adénosine triphosphatases.

BHI: Brain Heart Infusion.

CFI: Indice de concentration fractionnelle inhibitrice.

CIT: Citrate de sodium.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CPG-FID : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme.

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

CVV : Candidoses vulvo-vaginales.

DPPH : 2, 2-diphényl 1-picrylhydrazyle.

DO : Densité optique.

E. coli : *Escherichia coli*.

GEL : Gélatine.

GLU : Glucose.

H⁺: Hydrogène.

HE : Huile essentielle.

H₂S : Sulfure d'hydrogène, ou hydrogène sulfuré

ICFI : Indice de concentration fractionnelle inhibitrice.

IGB : Infections génitales basses.

K⁺ : Potassium.

LDC : Lysine Décarboxylase

MH : Mueller Hinton.

NaCl : Chlorure de sodium.

NR1 : Nitrite 1

NR2 : Nitrite 2.

ODC : Ornithine Décarboxylase.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

TDA : Tryptophane désaminase.

TTC : Chlorure de 2, 3, 5- triphényl-tétrazolium.

URE : Urée.

VB : Vaginose bactérienne.

VHC : Virus de l'hépatite C.

VIH : Virus de l'immuno déficience humaine.

VP : Voges-Proskauer

Les objectifs du présent travail étaient l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites des *Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare* (Seul et en combinaison) vis-à-vis de deux isolats cliniques multirésistants associés aux infections vaginales chez la femme (*E. coli* et *Proteus* sp.). Les huiles essentielles ainsi que les souches ont été obtenues respectivement auprès du laboratoire de Pharmacologie de l'Institut des Sciences Vétérinaires et du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret. Le pouvoir antibactérien a été déterminé par le test d'aromatogramme et la méthode de microdilution dans le but de déterminer les CMI et les CMB. L'étude de l'association de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles a été réalisée par la méthode du damier. Les zones d'inhibition de l'aromatogramme ont été de 10.67mm et 9mm pour l'huile essentielle de *S. aromaticum* vis-à-vis d'*E. coli* et *Proteus* sp, respectivement et de 27.67mm et 22.67mm pour celle d'*Origanum vulgare*. Les CMI des deux huiles essentielles vis-à-vis des deux souches ont été de 1.25 µl/ml. Alors que les CMB ont été de l'ordre de 1.25µl/ml et 2.5µl/ml pour l'HE de *S. aromaticum* à l'égard d'*E. coli* et *Proteus* sp, respectivement et de 20µl/ml pour celle de d'*Origanum vulgare* vis-à-vis des deux bactéries. L'association des deux huiles essentielles a révélé un effet indifférent à l'égard d'*E. coli* avec un indice de concentration fractionnelle inhibitrice de 1.1248. Cette étude permet de déduire que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et d'*Origanum vulgare* possédant un potentiel antibactérien prometteur surtout en utilisation seule ce qui pourrait contribuer au développement de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections vaginales bactériennes.

Mots clés : Activité antibactérienne, huiles essentielles, CMI, CMB, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, aromatogramme, méthode de microdilution, méthode de damier, synergie.

كانت أهداف الدراسة الحالية هي دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية المستخرجة من نبات *Syzyguim aromaticum* و *Origanum vulgare* (لوحدها أو مجتمعة) ضد عزلتين سريريتين متعددة المقاومة للمضادات الحيوية معزولتين من التهابات المهبلية لدى النساء (*E. coli* و *Proteus sp.*). تم الحصول على الزيوت الأساسية والسلالات على التوالي من مختبر الصيدلة التابع لمعهد العلوم البيطرية ومختبر الأحياء الدقيقة التابع لكلية علوم الطبيعة والحياة لجامعة ابن خلدون تيارت. تم تحديد القوة المضادة للبكتيريا عن طريق اختبار التصوير العطري وتقنية التخفيف الدقيق من أجل تحديد قيمة التركيز الأدنى المثبط والحد الأدنى من تركيز مبيد للجراثيم. تم إجراء دراسة الارتباط بين النشاط المضاد للبكتيريا للزيتين الأساسيين باستخدام طريقة رقعة الشطرنج. كانت مناطق التثبيط في اختبار التصوير العطري 10.67 ملم و 9 ملم للزيت العطري لـ *S. aromaticum* فيما يتعلق بـ *E. coli* و *Proteus sp.*، على التوالي، و 27.67 ملم و 22.67 ملم للزيت الأساسي لنبات *Origanum vulgare*. كانت قيمة التركيز الأدنى المثبط للزيتين الأساسيين ضد السلالتين 1.25 ميكرو لتر / مل. بينما كانت القيمة الحد الأدنى من تركيز مبيد للجراثيم في حدود 1.25 ميكرو لتر / مل و 2.5 ميكرو لتر / مل بالنسبة لزيوت الأساسيين لـ *S. aromaticum* ضد *E. coli* و *Proteus sp.* على التوالي و 20 ميكرو لتر / مل من الزيت الأساسي لنبات *Origanum vulgare* ضد العزلتين. كشف الجمع بين الزيتين الأساسيين بطريقة رقعة الشطرنج عن تأثير غير مبال ضد *E. coli* مع مؤشر تركيز مثبط كسري قدره 1.1248. تسمح لنا هذه الدراسة باستنتاج أن الزيت الأساسي لنبات *Syzyguim aromaticum* و *Origanum vulgare* يتمتعان بإمكانيات واعدة مضادة للبكتيريا، خاصة عند استخدامهما كل على حدى، مما قد يساهم في تطوير استراتيجيات جديدة لمكافحة الالتهابات المهبلية البكتيرية.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للبكتيريا، الزيوت العطرية، التركيز الأدنى المثبط، الحد الأدنى من تركيز مبيد للجراثيم، *Origanum vulgare*، *Syzygium aromaticum*، اختبار التصوير العطري، تقنية التخفيف الدقيق، طريقة الشطرنج، التضافر.

The aims of the current work were the study of the antibacterial activity of essential oils extracted from *Syzygium aromaticum* and *Origanum vulgare* (alone and in combination) against two multi-resistant clinical isolates associated with vaginal infections in women (*E. coli* and *Proteus* sp.). The essential oils, as well as the strains, were obtained respectively from the Pharmacology laboratory of the Veterinary Sciences Institute and the Microbiology laboratory of the Faculty of Life and Nature Sciences, Ibn Khaldoun University of Tiaret. The antibacterial activity was determined by the aromatogram test and the microdilution method to determine the MICs and MBCs. The study of the association of the antibacterial activity of the two essential oils was carried out using the checkerboard method. The inhibition zones of the aromatogram were 10.67mm and 9mm for *S. aromaticum* essential oil against *E. coli* and *Proteus* sp, respectively, and 27.67mm and 22.67mm for *Origanum vulgare* essential oil. The MICs of the two essential oils against the two strains were 1.25µl/ml. While the MBCs were of the order in 1.25µl/ml and 2.5µl/ml for the EO of *S. aromaticum* essential oil against *E. coli* and *Proteus* sp, respectively and 20µl/ml for that of *Origanum vulgare* essential oil with against two bacteria. The combination of two essential oils revealed an indifferent effect against *E. coli* with a fractional inhibitory concentration index of 1.1248. This study allows us to deduce that *Syzygium aromaticum* and *Origanum vulgare* essential oils have promising antibacterial potential, especially when used alone, which could contribute to the development of new strategies to fight against bacterial vaginal infections.

Keywords: Antibacterial activity, essential oils, CMI, CMB, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, aromatogram, microdilution method, checkerboard method, synergy.

Introduction

Le tractus génital féminin est envahi par une multitude de microorganismes. Parmi ces germes les *Lactobacillus* considérés comme des germes commensaux. Ils assurent la production d'un biofilm protecteur sur la muqueuse vaginale pour empêcher la formation soit d'autres germes commensaux et/ou la multiplication des germes pathogènes (**Dong-hui et al., 2009**). Toutefois, la présence de ces bactéries permet à de nombreux microorganismes de s'y établir et de causer des infections génitales (**Hyman et al., 2005 ; Vitali et al., 2007**). Les infections génitales sont divisées en deux catégories en fonction de la localisation du germe causal : les infections basses qui affectent la vulve, le vagin et le col de l'utérus, tandis que les infections hautes se localisent dans les trompes et les ovaires (**Pellati et al., 2008**).

Les infections microbiennes du vagin chez les femmes constituent un problème de santé qui entraînent des complications graves et des conséquences néfastes. Le vagin peut être infecté par différents agents pathogènes, tels que les bactéries, les champignons et les parasites (**Abd alaziz et al., 2014**). Les bactéries sont à l'origine de diverses affections. Elles présentent une résistance de plus en plus marquée aux antibiotiques. Afin de mettre fin à ce processus de résistance, la recherche d'autre alternative pour réduire ou éliminer les germes responsables de ces infections sans l'emploi des médicaments conventionnels est devenue une nécessité. Les molécules bioactives à base de plantes peuvent être l'une des solutions (**Vanden Berghe et Vlietinck, 1991**).

Depuis des milliers d'années, l'humanité a exploité différentes plantes provenant de son environnement pour traiter et soigner différentes infections. Ces plantes constituent un immense réservoir de composés potentiels liés aux métabolites secondaires qui présentent l'avantage d'être d'une grande variété de composition chimique et d'avoir une très grande variété d'activités biologiques (**Alessandra Moro Buronzo, 2008**).

L'usage des huiles essentielles dans les soins de santé et dans d'autres secteurs d'intérêt économique sont de plus en plus recherchées sur les marchés internationaux (**Alessandra Moro Buronzo, 2008**). Ces huiles essentielles sont largement utilisées par la population en raison de leurs propriétés médicinales (activités antiinflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides, tonifiantes, stimulantes et calmantes) (**Franchomme et al., 1990**).

L'objectif du présent travail consiste à évaluer l'activité antibactérienne de deux huiles essentielles (*Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare*) seul et en association vis-à-vis de deux isolats cliniques associés aux infections vaginales chez la femme (*Escherichia coli* et *Proteus*).

Partie *Bibliographique*

Chapitre I :
Les germes
associés aux
infections
vaginales

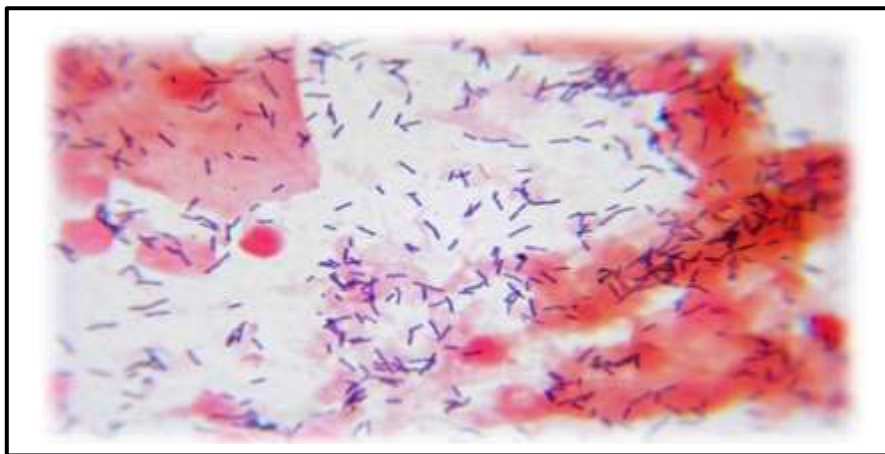
1- Introduction

Les infections vaginales constituent un problème fréquent en médecine clinique et sont le principal motif de consultation médicale chez les femmes (**Eschenbach et Hillier, 1989**). La majorité des femmes auront au moins une infection vaginale au cours de leur vie. On estime que 80% des femmes souffrent d'une infection génitale à travers le monde (**Hounkpozounkour et Laleye, 2011**). Engendrant des graves conséquences telles que les grossesses extra-utérines et la stérilité, les infections vaginales sont souvent considérées comme bénignes chez la femme non-enceinte, mais leur gravité se manifeste pendant la grossesse. Elles contribuent en effet à la prématurité, aux chorioamniotites, aux avortements spontanés et aux petits poids à la naissance (**Bohbot, 2008 ; Cravello, 2001**).

2- Flore vaginale normale

La flore vaginale est composée principalement du bacille de Doderlein (108 à 112 bactéries/ml) associée à de nombreuses autres espèces. Ces bactéries sont étroitement liées et forment un véritable écosystème. Les lactobacilles sont introduits dans l'anus et se multiplient dès la puberté, à l'époque de la sécrétion oestrogénique, elle est responsable de la teneur en glycogène de l'épithélium vaginal, ce qui est nécessaire pour le développement du bacille de Doderlein (**Cravello, 2001**).

Les germes aérobies et anaérobies sont également présents dans le vagin normal, mais en quantité plus ou moins importante, mais toujours en minorité. La flore vaginale est influencée par divers facteurs tels que l'âge, le stade du cycle menstruel, la grossesse, la contraception et l'infection (**Cravello, 2001**).



**Figure 1 : Flore Lactobacillaire normale : Coloration de Gram :
Grossissement X1000 (Cravello, 2001)**

3- Les principales infections vaginales

À l'origine, le mot vaginite a été employé pour désigner toute inflammation du vagin qui se manifeste par des leucorrhées, qu'elles soient malodorantes ou non, un prurit, des brûlures vulvo-vaginales et/ou une dyspareunie. Par la suite, on a élargi le groupe des vaginites aux infections avec leucorrhées anormales, même en absence de réaction inflammatoire vaginale (Dyck et al., 2000).

Les vaginites sont le diagnostic le plus courant chez les femmes qui consultent en vénérologie, et représentent plus du tiers des raisons de consulter en gynécologie. (Dyck et al., 2000).

3-1- Vaginites bactériennes

Dans certaines situations, il est possible que des bactéries commensales du tube digestif se fixent de manière exceptionnelle sur les cellules vaginales et entraînent des vaginites. Ce ne sont que rarement des vulvo-vaginites, mais elles se distinguent par la présence d'un écoulement polynucléaire. Ces symptômes peuvent être accompagnés ou non d'une odeur désagréable (Houngpozoukour et Lalef, 2011).

➤ Vaginites dues aux entérobactéries

Les bactéries les plus fréquemment identifiées dans le contexte de vaginite sont les entérobactéries, notamment *Escherichia coli* et *Proteus*, ainsi que les *Enterobacter cloacae* (Avanont et Chitouc, 2012 ; Houngpozoukour et Lalef, 2011).

➤ Vaginites dues aux cocci à Gram positif

C'est particulièrement le cas des vaginites causées par les staphylocoques et les streptocoques. Il est possible que ces germes provoquent des ruptures prématurées des membranes, des accouchements prématurés, des méningites et des septicémies néonatales (Avanont et Chitouc, 2012).

- **Vaginites dues aux staphylocoques :** il est rare de trouver *Staphylococcus aureus* dans le vagin. Il est fréquemment lié à un corps inconnu.
- **Vaginites dues aux streptocoques :** principalement causées par le *Streptococcus agalactiae* et les entérocoques des groupes B et D. La réaction inflammatoire associée à ces troubles bactériens varie d'intensité et dépend davantage du statut hormonal de l'hôte (Catalan et al., 2000 ; Houngpozoukour et Lalef, 2011).

3-2- Vaginose bactérienne

La vaginose bactérienne (VB) est l'une des maladies qui affectent les femmes. Son origine est un déséquilibre profond de l'écosystème vaginal (**Bergagne-Bérézin, 2007 ; Keane et al., 1997**).

La cavité vaginale est occupée par des lactobacilles. Cependant, lorsque ces lactobacilles disparaissent, une flore multipliée de microorganismes, principalement des anaérobies, mais également d'autres microorganismes tels que *Gardnerella vaginalis* et *Mycoplasma hominis* qui entraînent une vaginose bactérienne (**Emile, 2009 ; Keane et al., 1997 ; Lepargneur et al., 2002 ; Menard et al., 2012**).

La VB est une maladie courante qui pourrait même être la première cause de vaginite, avant les infections vaginales à *Candida* spp. Si l'écoulement vaginal et l'odeur sont les symptômes les plus couramment associés au diagnostic de VB, la plupart des femmes ayant une vaginite blanche ne présentent pas de symptômes. Plus de la moitié des VB sont asymptomatiques (**Allsworth et al., 2008**).

4- Les infections génitales basses**4-1- Définition**

Les infections génitales basses (IGB) ou infections vaginales sont souvent une source de détresse et d'inconfort chez les femmes (**Tchelougou, 2012**). Ces infections sont causées par une altération de l'écosystème vaginal, avec le remplacement de la flore normale (dominée par les lactobacilles) par d'autres espèces microbiennes qui se multiplient de manière anormale, ce qui entraîne un écoulement vaginal anormal, un prurit, une odeur ou une douleur (**Koanga-Mogtomo et al., 2016**).

4-2- Les facteurs favorisant le déséquilibre de la flore vaginale

La composition de la flore vaginale varie en fonction de facteurs externes et internes (**Linhares et al., 2010**). Ces facteurs détruisent les lactobacilles probiotiques et favorisent la propagation et la persistance des infections et des lésions génitales (**Lefèvre, 2002 ; Koanga Mogtomo et al., 2016**).

Il existe de nombreux facteurs qui peuvent perturber l'équilibre de la flore vaginale :

- Douche vaginale, bain moussant, antiseptiques locaux ;
- Port de vêtements serrés (pantalons, collants) et de sous-vêtements synthétiques, qui entravent l'aération et augmentent la température locale ;
- Traitement antibiotique ;

- Modifications hormonales (cycle menstruel, grossesse, contraceptifs oraux, stress...) ;
- Facteurs pathologiques (états d'immunodéficience, diabète...).
- Les rapports sexuels ;
- Corps étrangers : dispositifs intra-utérins (**Lefèvre, 2002**).

5- Complications des infections génitales basses

Les infections génitales basses ont un impact important sur la santé, notamment chez les mères et leurs futurs bébés, avec des complications graves telles que les infections ascendantes, le cancer du col de l'utérus et l'infertilité chez les femmes en âge de procréer (**Koanga-Mogtomo et al., 2016**). La majorité de ces infections sont associées à de graves complications obstétricales, la VB est notamment responsable (dans 16 à 29 % des cas) de prématurité, de chorioamniotites, d'avortements spontanés et de petits poids à la naissance (**CNGOF, 2006**).

Les IGB ont également la capacité d'accroître le risque d'une femme de contracter des maladies sexuellement transmissibles, comme les candidoses vulvo-vaginales (CVV) (**Ane-Anyangwe et al., 2015**). La trichomonose et l'herpès génital augmentent le risque d'infection par le virus de l'immunodéficience humaine en particulier (**Laurent, 2005 ; Dupont et al., 2017**).

6- Traitement et perspectives thérapeutiques

6-1- Traitement anti-infectieux

Dans la plupart des cas de manifestations génitales infectieuses, il n'est pas recommandé de prendre des traitements anti-infectieux systémiques, mais certaines infections nécessitent un traitement antibiotique en fonction des risques de transmission materno-foetale ou d'altération des voies génitales hautes (**Bergogne-Bérézin, 2007**).

6-2- Traitement par les œstrogènes

La flore lactobacillaire dépend grandement de la présence d'hormones oestrogéniques dans le vagin. Ainsi, il est intéressant d'utiliser des œstrogènes locaux pour prévenir les récides des infections vaginales. Chez les femmes souffrant d'une hypo-œstrogénie, les traitements oestrogéniques locaux pendant plusieurs semaines ont la capacité de rétablir l'équilibre de la flore vaginale (**Bohbot et Lepargneur, 2012**). Malheureusement, les effets positifs des œstrogènes locaux prennent du temps à se manifester (**CNGOF, 2006**).

6-3- Prébiotiques et probiotiques

En raison des effets indésirables des antibiotiques et des nombreuses résistances à leur utilisation, il est devenu essentiel d'utiliser des probiotiques et des prébiotiques (**Brabant, 2016**).

6-3-1- Traitement par les prébiotiques

Les prébiotiques sont des composés oligosaccharidiques qui favorisent sélectivement un nombre restreint de bactéries, en particulier les lactobacilles. Ces bactéries sont connues pour leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte en créant un "environnement" favorable (**Bohbot et Lepargneur, 2012 ; Benaoumer et al., 2016**). Ces produits acidifient l'environnement vaginal, ce qui diminue la prolifération des germes anaérobies et réduit le risque de récurrence après un diagnostic antibiotique (**CNGOF, 2006**).

6-3-2- Traitement par les probiotiques

Selon l'OMS, les probiotiques sont des microorganismes vivants qui apportent des avantages à l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates. Certaines souches de *Lactobacillus* peuvent jouer le rôle de probiotiques dans le vagin, ce qui empêche la prolifération des germes liés aux infections vaginales (**Echakour, 2018**).

Chapitre II :
Généralités sur les
huiles essentielles

1- Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés lipophiles volatiles et odorants, généralement liquides (**Bruneton, 2009**). Ces composés sont synthétisés et stockés dans des tissus végétaux : les feuilles, les écorces, le bois, les racines, les rhizomes des fruits et les graines (**Bruneton, 1999**). Le terme « huile » est lié à leur caractère hydrophobe et à leur aptitude à se solubiliser dans les graisses, tandis que le terme « essentielle » est associé à l'odeur émise par la plante d'origine. Ces huiles sont biosynthétisées en tant que métabolites secondaires par des plantes aromatiques (**Bruneton, 1993**).

2- Composition chimique

La composition des huiles essentielles dépend du stade de développement de la plante, de l'organe récolté (feuille, tige, racine), de la période et de la région de récolte. De plus, la composition peut aussi être modifiée par le procédé d'extraction ou par les méthodes de la conservation de la plante (**Merghache et al., 2009 ; Boukhatem et al., 2010 ; Sui et al., 2012 ; Karamanos et Sotiropoulou, 2013 ; Zaouali et al., 2013 ; Wu et al., 2013**). Le temps du séchage varie en fonction de la quantité d'eau et de l'épaisseur des différentes parties de la plante. La conservation de la plante sera influencée par la qualité du séchage (**Kothe, 2007**).

La détermination des composants chimiques d'huile essentielle peut être réalisée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). D'autres techniques telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID) ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) afin de déterminer les composants des huiles essentielles sont d'importance capitale (**Boukhebt et al., 2011 ; Darriet-Giudicelli, 2011**).

L'huile essentielle est un composé complexe regroupant entre 20 à 60 éléments et parfois plus, et à des concentrations variées. Toutefois, on peut distinguer parmi ces composants la présence de 2 à 3 composés majoritaires à des concentrations élevées, variant de 20 à 70% par rapport aux autres composants, ces derniers sont présents sous forme de traces et qui confèrent à l'huile essentielle ces propriétés thérapeutiques (**Bakkali et al., 2008**).

La majorité des composants des HEs sont classés en deux groupes en fonction de la voie métabolique utilisée :

Les composés terpéniques (hydrocarbures) dérivés de la voie secondaire métabolique de l'acide mévalonique (**Amlan, 2011 ; Djilani et Dicko, 2012**).

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (composés oxygénés) résultant de la voie métabolique de l'acide shikimique (**Amlan, 2011 ; Djilani et Dicko, 2012**).

- Terpénoïdes

Ils constituent le groupe le plus vaste de métabolites secondaires provenant des végétaux, avec plus de 15000 composés différents décrits dans la littérature. Ils proviennent d'une base à cinq carbones (C_5H_8), communément connue sous le nom d'isoprène (Calsamiglia et al., 2007). Les terpénoïdes sont classés en monoterpénoïdes (C_{10}), sesquiterpénoïdes (C_{15}) et diterpénoïdes (C_{20}) en fonction du nombre répétitif de cette unité (Karray-Bouraoni et al., 2009).

La majorité des huiles essentielles sont composées de monoterpénoïdes C_{10} et de sesquiterpénoïdes C_{15} , qui peuvent être extraites par distillation. La vapeur d'eau ne provoque pas l'action des autres terpènes (diterpènes C_{20} et triterpènes C_{30}) (Calsamiglia et al., 2007 ; Amlan, 2011 ; Couic-Marinier et Lobstein, 2013a, b). Ils sont classés selon :

- Leurs fonctions : alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole).
- Leurs structures : linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulol, viridiflorol).

- Phénylpropanoïdes

Ils sont moins couramment utilisés que les terpénoïdes. Cependant, certaines plantes contiennent ces composés en proportions importantes. La plupart des phénylpropanoïdes proviennent de la phénylalanine, ils sont composés d'une chaîne carbonée associée à un noyau aromatique à six carbones (Calsamiglia et al., 2007 ; Bakkali et al., 2008).

3- Techniques d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes d'extraction des essences végétales sont utilisées en raison de la diversité des matières premières et de la sensibilité de leurs constituants (Legrand, 1993).

3-1- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Appelé aussi la distillation à la vapeur (figure 2), dans cette technique il n'y pas un contact direct entre l'eau et la matière végétale. La vapeur d'eau est générée par une chaudière, traverse la matière végétale, provoquant l'éclatement des cellules et libérant l'huile essentielle. Le mélange résultant est conduit vers le condenseur et l'essencier, puis séparé en une phase aqueuse et une phase organique, L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Perfumer et al., 1984).

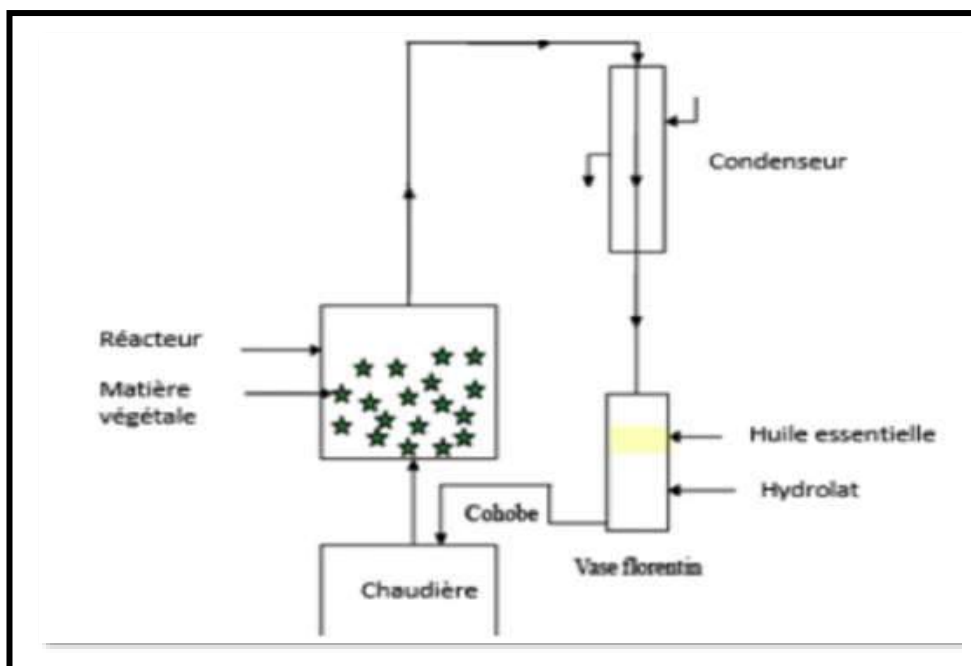


Figure 2 : Principe schématisé de l'extraction par entraînement à la vapeur (Farhat, 2010).

3-2- Extraction par hydrodistillation

L'extraction par hydrodistillation (figure 3), proposée par Garnier en 1891, repose sur la distillation hétérogène. La matière végétale est immergée dans un bain d'eau, porté à ébullition, provoquant l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes. Les vapeurs se condensent sur une surface froide, permettant la séparation de l'huile essentielle par différence de densité (Bruneton, 1993).

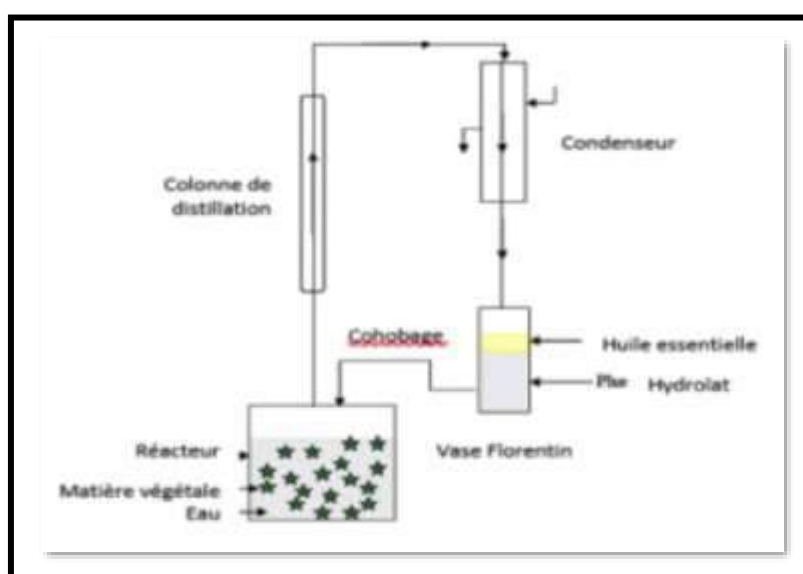


Figure 3 : Principe schématisé de l'hydro – distillation (Farhat, 2010).

3-3- Extraction par expression à froid

Cette technique est utilisée pour l'extraction des huiles essentielles d'agrumes, joue un rôle crucial en cosmétique et parfumerie. Elle est basée sur la rupture ou la dilacération des parois et la pression du contenu des sacs oléifères présent dans l'écorce des fruits (**Dugo et DiGiacomo, 2002**), un traitement mécanique permet de déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices (**Basil et al., 1998**).

3-4- Extraction par solvants organiques

L'extraction par solvants organiques (figure 4) implique la séparation des constituants d'un mélange à l'aide d'un solvant qui s'évapore facilement et ne se mélange pas avec l'eau. Les solvants les plus couramment utilisés sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le dichlorométhane et l'acétone (**Legrand, 1993**). En fonction de la technique et du solvant utilisé, on peut obtenir des hydrolysats par extraction en présence d'eau ou des alcoolats par utilisation d'éthanol dilué, traitement à l'éthanol, ou des mélanges éthanol/eau (**AFNOR, 2000**).

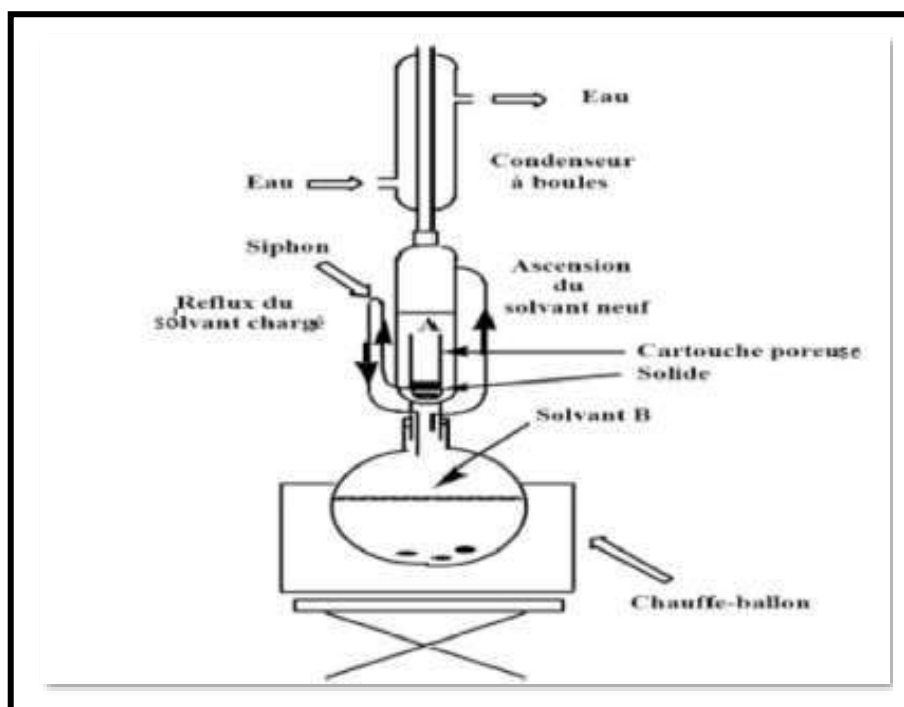
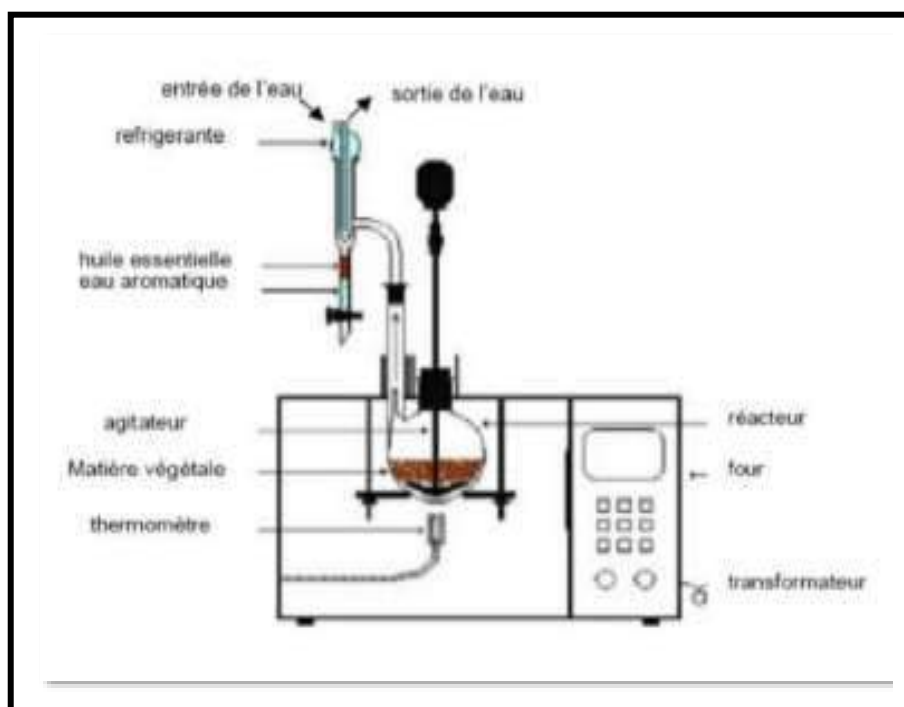


Figure 4 : Schéma de l'extracteur soxhlet (**Ben Amor, 2008**).

3-5- Extraction par micro-ondes

Dans les années 1990, une nouvelle méthode l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide, est apparue (figure 5). Dans cette méthode, la matrice végétale est chauffée à l'aide de micro-ondes dans une enceinte fermée où la pression est réduite de manière progressive. La vapeur d'eau produite par l'eau propre à la plante est responsable de l'émission des composés

volatils. Ils sont ensuite récupérés en utilisant les méthodes traditionnelles de condensation, de refroidissement et de décantation (Zenasni, 2014).



**Figure 5 : Extraction assistée par micro – ondes
(Hameurlaine, 2009).**

3-6- Extraction par CO₂ supercritique

L'extraction à l'aide de CO₂ supercritique est une technique unique en raison du solvant utilisé : le CO₂ en phase supercritique. Le processus d'extraction implique la compression du dioxyde de carbone à des pressions et à des températures supérieures à son point critique (P=72,8 bars et T= 31,1°C). En état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide ni gazeux, ce qui lui confère un pouvoir d'extraction exceptionnel, qui peut être ajusté en fonction de la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques tels que le CO₂ sont des solvants efficaces à l'état supercritique, tandis qu'ils sont des solvants nocifs à l'état gazeux (Bouras, 2018).

4- Activité des huiles essentielles

4-1- Activité antibactérienne

La découverte initiale de l'action antibactérienne des huiles essentielles remonte à 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été identifiées comme ayant des propriétés antibactériennes (Burt, 2004). Les huiles essentielles ont la capacité de limiter la multiplication des bactéries, leur sporulation, ainsi que la synthèse des toxines. Elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances

aux antibiotiques. Cependant, l'efficacité varie d'une huile essentielle à une autre et d'une souche bactérienne à une autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Les huiles essentielles agissent sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, mais les bactéries à Gram négatif semblent moins sensibles en raison de la structure de leur paroi cellulaire (**figure 6**) (**Burt, 2004**).

Trois mécanismes d'action peuvent être constatés (**Goetz et Ghedira, 2012**)

- Une action sur la paroi bactérienne entraînant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Une acidification du contenu de cellulaire entraînant une coagulation des constituants cellulaires par dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Une destruction du matériel génétique conduisant à la mort de la bactérie.

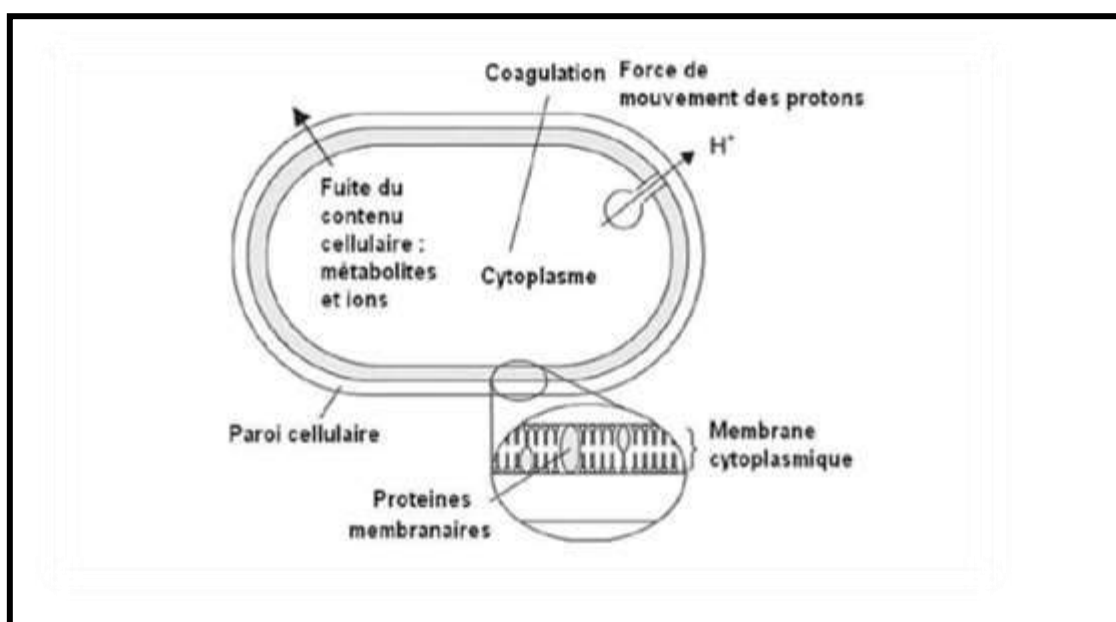


Figure 6 : Mode d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (**Burt, 2004**).

4.2. Activité antivirale

La plupart des études de recherche sur l'activité antivirale des HEs ont été menées contre des virus enveloppés. Pourtant, peu de travaux ont été réalisés sur les virus non enveloppés (**Gilling et al., 2014 ; Bellik et al., 2020**).

Les HEs pourraient agir en déstabilisant les virions, en protégeant la cellule hôte ou en inhibant la réplication une fois que le virus envahit la cellule hôte (**Astani et Schnitzler, 2014 ; Bellik et al., 2020**). Cinq mécanismes d'action induits par l'activité antivirale des huiles essentielles ont été décrits : actions directes sur les virus libres, inhibition des étapes

impliquées dans l'attachement du virus, la pénétration, la répllication intracellulaire et la libération des cellules hôtes, et inhibition des enzymes vitales (**Schnitzler et al., 2010 ; Asif et al., 2020 ; Ma et Yao, 2020 ; Bellik et al., 2020**).

Cependant, les huiles essentielles riches en phénols et en monoterpénols sont actives contre les virus en empêchant leur adsorption aux cellules hôtes (**Girard, 2010 ; Mayer, 2012**).

4-3- Activité antifongique

Les huiles essentielles et leurs composés actifs peuvent être utilisés dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire pour protéger contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**Lis-Balchin, 2002**). De nombreux composés volatils ont été testés contre divers champignons tels que *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*) et *Penicillium chrysogenum* (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Les huiles essentielles agissent sur les champignons en perturbant la membrane cellulaire ce qui entraînera une fuite du cytoplasme (**Chao et al., 2005 ; Hu et al., 2019**), ou par augmentation de la perméabilité membranaire et une interférence sur l'activité de la chaîne respiratoire entraînant la mort des cellules de *Candida albicans* (**Carson et al., 2006**). En outre, un épaissement et un détachement de la paroi cellulaire fongique, une augmentation du nombre de vésicules osmiophiles, une prolifération lamellaire dans le cytoplasme, et une destruction mitochondriale ont été observés sous microscope électronique en transmission à balayage des échantillons de *Phytophthora infestans* traités avec des HES (**Soylu et al., 2006**).

4-4- Activité antiparasitaire

Le groupe des phénols est doté d'un effet puissant contre les parasites. Les oxyures, ascaris et ténias sont sensibles aux huiles essentielles du *Thymus vulgaris* (**Carillon, 1987**). De plus, les alcools monoterpéniques et certains oxydes comme l'ascaridol ont une activité antiparasitaire. Enfin les cétones ont une activité antiparasitaire bien établie, mais leur utilisation doit se faire avec précautions car ils présentent une certaine neurotoxicité (**Laurent et al., 2017**).

4-5- Activité antioxydante

Il semble que les huiles essentielles possèdent un pouvoir antioxydant intéressant, ce qui en fait un substitut dans la conservation alimentaire. Ce pouvoir est principalement attribué aux polyphénols présents dans ces huiles (**Richard, 1992**). L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants, qu'ils soient de synthèse ou d'origine naturelle, possèdent des groupes

hydroxyphénoliques dans leur structure. Les propriétés antioxydantes de ces composés sont en partie dues à leur capacité à neutraliser les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}^\cdot$) et les superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (**Barus, 2008**).

4-6- Activité anti-inflammatoire

Les huiles essentielles possèdent également une activité anti-inflammatoire ce qui permet de les utiliser dans certaines pathologies telles que les rhumatismes, les allergies ou les arthrites (**Mebarki, 2010**).

Cette activité est due aux aldéhydes qui assurent l'efficacité anti-inflammatoire. Les HEs qui les renferment sont couramment utilisées en interne ou en topique comme l'HE de géranium, de gingembre, de giroflier ou de citronnier (**Girard, 2010**).

5- Mode d'administration des huiles essentielles

5-1- Par voie orale

Cette voie ne doit être utilisée que sur conseil d'un médecin aromathérapeute (**Scimeca, 2006**). Car cette voie est la plus toxique (**Chahmi et al., 2015 ; Nawres et al., 2019**).

5-2- Par voie cutanée

La voie cutanée semble être la voie idéale, et la plus efficace qui ne comporte aucun risque. C'est généralement en massage ou en application que les huiles essentielles sont employées diluées selon la partie affectée (**Scimeca, 2006**). Cependant les huiles essentielles traversent la peau pour passer dans le sang (**Festy, 2011**).

5-3- Par voie vaginale

Du fait de la perméabilité de la muqueuse vaginale, les HEs sont administrées soit par irrigation soit sous forme d'ovules ou des crèmes gynécologiques, sur prescription médicale, dans le cadre des infections bactériennes ou mycosiques nécessitant la tenue prolongée des HEs sur la muqueuse (**Roux, 2011 ; Casau-Beyret, 2013**).

5-4- Par voie respiratoire

Les huiles essentielles sont rapidement absorbées par toutes les petites cellules ciliaires qui tapissent notre arbre respiratoire, depuis les fosses nasales jusqu'au bout de nos alvéoles pulmonaires (**Scimeca, 2005**).

5-5- Par voie rectale

Cette voie peut être utilisée chez les adultes et enfants de plus de 30 mois car la muqueuse rectale est très perméable et permet une absorption efficace et rapide des HEs (dans les 30 minutes qui suivent l'administration). Vu que la muqueuse rectale étant très sensible, il convient de ne pas administrer les HEs pures, mais de les ajouter à un excipient ou de les utiliser sous autres formes galéniques (sous forme de suppositoire ou de micro-lavement).

Cette voie peut être choisie à la place de la voie orale si le goût des HEs est désagréable **(Roux, 2011)**.

6- Utilisation des huiles essentielles

Traditionnellement, les huiles essentielles sont utilisées dans la production de nombreux produits finis destinés aux consommateurs. Elles sont donc employées dans le domaine de l'agroalimentaire (gâteaux, biscuits, soupe, sauce, chewing-gum, chocolats, bonbons...), afin d'aromatiser la nourriture. On les retrouve aussi dans le domaine de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. Les adhésifs (colle, scotch...) et la nourriture pour animaux, l'industrie automobile, la préparation des sprays insecticides sont également utilisés. L'utilisation d'huiles essentielles en médecine douce est fréquente dans l'homéopathie et l'aromathérapie, et leur popularité a considérablement augmenté ces dernières années **(Bakkali, 2007)**.

7- Toxicité des huiles essentielles

Comme tout produit naturel, les huiles essentielles peuvent avoir un effet toxique lors de leur utilisation qui varie selon le mode d'utilisation de ces huiles. C'est la voie orale qui est la plus toxique, suivie par la voie anale, la voie vaginale, la voie percutanée et enfin la voie aérienne **(Chahmi et al., 2015 ; Nawres et al., 2019)**. C'est l'auto médication fréquente et abusive qui est préjudiciable sur la santé des populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques) en entraînant des comas, des allergies, des épilepsies, etc. **(Degrys, 2008)**. Toutefois, l'accumulation de ces huiles essentielles dans l'organisme suite à l'utilisation des doses faibles et répétées aboutit à des nausées, des céphalées, etc. Cependant, l'ingestion de plus de 10 ml d'huile essentielle s'est avérée neurotoxique et épileptogène par diminution de l'apport d'oxygène au niveau des tissus encéphaliques **(Baudoux, 1997)**.

Chapitre III :
Matières
végétales

1- Clou de girofle (*Syzygium aromaticum*)

Syzygium aromaticum (*Eugenia aromaticum* ou *Eugenia caryophyllata*), également connu sous le nom de giroflier est un arbre tropical (Danthu et al., 2014). Ce sont des bourgeons de fleurs séchées d'un arbre aromatique (figure 7) (Singh et al., 2015). Originaire de l'île des Moluques (Indonésie). Il a été introduit au début du XVIII^e siècle dans différentes parties du monde : le Zanzibar, l'Inde, le Madagascar (Gaylor et al., 2014), le Sri Lanka, la Chine, l'Indonésie, la Malaisie, le Brésil, la République Malgache, la Jamaïque et la Guinée (Singh et al., 2012).

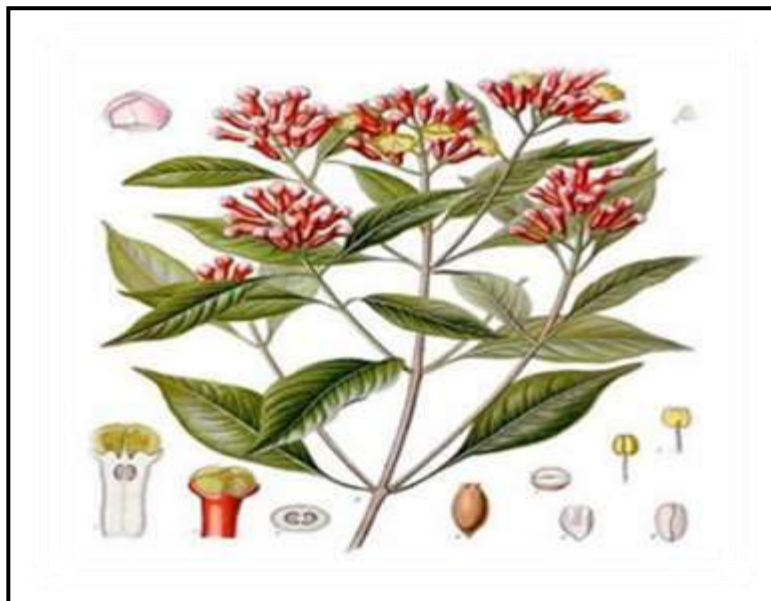


Figure 7 : Structure du giroflier (Köhler, 1887).

Il appartient au genre *Eugenia*, l'un des 75 genres (~ 3000 espèces), famille des *Myrtaceae* (Singh et al., 2012). Il est communément connu sous le nom de clou de girofle. Le tableau 1 récapitule la classification botanique de *S. aromaticum*.

Tableau 1 : Classification de *S. aromaticum* (Barbelet, 2015).

Règne	Plantae
Sous- règne	<i>Trachéobionta</i>
Embranchement	<i>Phanérogames</i>
Sous-embranchement	<i>Angiosperme</i>
Classe	<i>Dicotylédone</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Myrtaceae</i>
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>aromaticum</i>

Cette plante est caractérisée par un rendement en huile essentielle de plus de 15%. Sa composition chimique est dominée par l'eugénol (70-90%). De même l'acétate d'eugénol représente un taux de 9 à 15% de sa composition chimique. Ces deux composés chimiques confèrent à cette huile essentielle sont ces propriétés antibactériennes (**Rakotoatimanana et al., 1999**). De plus, cette huile essentielle possède une forte activité antifongique contre des pathogènes fongiques opportunistes tels que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformés* et *Aspergillus fumigatus* (**Goetz et al., 2012**).

Goetz et al. (2012) ont rapporté que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a un effet inhibiteur sur le virus de l'herpès simplex et que ces huiles essentielles agissant sur la fusion des cellules virales, la protéase anti-VHC dans le traitement de l'hépatite virale, et l'inhibition de la synthèse de l'ADN viral. Ces mêmes auteurs ont montré que l'huile essentielle du clou de girofle présente des propriétés anti inflammatoires en inhibant les prostaglandines, les leucotriènes, le chimiotactisme des leucocytes, et la synthèse des radicaux libres par les leucocytes. Egalemeant, L'huile essentielle de clou de girofle possède un potentiel anti-cancérigène (**Zheng et al., 1992**).

2- Origan (*Origanum vulgare*)

Le genre *Origanum* est originaire du Sud-Est méditerranéen et de l'Asie occidentale (Vokou et al., 1993). Mais il est également largement présent dans les îles de Canaries, les Açores, l'Europe du Nord et jusqu'à l'Est de l'Asie. On le trouve également en culture à Cuba et dans l'île de la Réunion, bien que sa région méditerranéenne reste son aire de distribution principale. On trouve environ 75 % des espèces dans l'Est de la Méditerranée. La région occidentale de la Méditerranée est peu riche en espèces (Kokkini, 1996 ; Skoula et al., 1999 ; Baser, 2002).

C'est un herbacé vivace de 30 à 60 cm de hauteur, au feuillage et aux fleurs très odorants quand on les froisse. Elle est ainsi reconnaissable à son odeur et à sa saveur phénolée, épicée et chaude (figure 8) (Arvy et Gallouin, 2003 ; Teuscher et al., 2005). Il fait partie de la famille des Lamiacées (appelée aussi *Labiatae*) qui comprend environ 258 genres et 6900 espèces dont la plupart se concentre dans le bassin méditerranéen (Botineau, 2010).



Figure 8: Caractéristiques botaniques d'*Origanum vulgare* (Bouhaddouda, 2016).

Le tableau ci-dessous résume la systématique d'*Origanum vulgare* (Guignard 1996)

Tableau 2 : Classification botanique de l'origan (**Guignard, 1996**).

Règne	Plantae
Embranchement	<i>Phanérogames ou Spermaphytes</i>
Sous-embranchement	<i>Angiosperme</i>
Classe	<i>Dicotylédone</i>
Sous-classe	<i>Gamopétales</i>
Ordre	<i>Tubiflorales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Origanum</i>
Espèce	<i>vulgare L.</i>

L'huile essentielle de cette plante est riche en hydrocarbures cycliques et aux phénols, comme le thymol et le carvacrol. L'activité antibactérienne de cette huile essentielle est attribuée aux groupements hydroxyle et ses électrons qui interagissent avec l'eau en créant des ponts hydrogènes. De plus, ces groupements hydroxyles des phénols jouent le rôle de porteur transmembranaire des cations monovalents et des protons (**Calsamiglia et al., 2007**). De même, **Busatta et al. (2008)** ont montré que l'huile essentielle de l'origan possède une activité antimicrobienne intéressante contre les bactéries et les champignons d'origine alimentaire.

Jukić et Miloš (2005) ont démontré que les chémotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* L. ont la capacité de diminuer le radical de DPPH, avec un effet plus efficace observé pour les chémotypes phénoliques.

Partie Expérimentale

Matériel
&
Méthodes

Première partie**1- Les isolats cliniques**

Les deux isolats cliniques utilisés dans cette étude ont été fournis gracieusement par le laboratoire pédagogique de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

2- Enrichissement des bactéries

Dans notre étude, cette étape a été réalisée par un ensemencement direct dans un bouillon BHI (Brain Heart Infusion) des isolats cliniques associés aux infections vaginales chez la femme. Ces isolats ont été conservés préalablement à -20°C dans l'eau physiologique mélangé au glycérol à une concentration de 50% (v/v). Les suspensions ont été ensuite incubées à la température optimale de croissance, 37°C pendant 24 h.

3- Purification et identification des souches bactériennes**3-1- Milieu chromogénique (Chromagar Orientation)**

Milieu sélectif servant à l'isolement, l'identification et la différenciation des agents pathogènes. Ce milieu composé des substances chromogènes qui libèrent des composés de différentes couleurs lors de leur dégradation par des enzymes bactériennes spécifiques.

- **Technique**

Après l'enrichissement, des écouvillons stériles ont été imbibés dans le bouillon BHI, ensuite ensemencés sur la gélose Chromagar Orientation (Realab, Algérie) puis l'incubation a été faite à 37°C pendant 24 h. La purification des souches a été effectuée par des cultures répétées, toujours sur le milieu Chromagar Orientation, jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

- **Lecture**

La lecture se fait dans un premier temps en fonction de la couleur des colonies sur la gélose Chromagar Orientation, en se référant au tableau suivant :

Tableau 3 : Identification des bactéries sur la gélose Chromagar Orientation (Hassaine et Boulanoir, 2019).

Microorganisme	Aspects typiques des colonies
<i>E. coli</i>	Roses foncées à rougeâtres
<i>Enterococcus</i>	Petites colonies bleu turquoise
<i>Klebsiella, Enterobacter, Citobacter</i>	Bleues métalliques
<i>Proteus</i>	Halo brun
<i>Pseudomonas</i>	Crèmes, Translucides
<i>Staphylococcus aureus</i>	Dorées, opaques, petites, blanches à jaunâtres
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Roses, opaques, petites

3-2- Examen microscopique des cultures bactériennes

3-2-1- Examen à l'état frais

- **Technique**

Pour observer la mobilité, il faut que la culture soit jeune (culture liquide incubée 18-20 h).

- Déposer la suspension bactérienne jeune au centre d'une lame propre.
- Recouvrir d'une lamelle d'une manière inclinée pour éviter la formation des bulles d'air.

- Déposer la lame avec lamelle sur la platine porte objet et sous l'objectif X100.
- Observer en faible luminosité (car les cellules sont transparentes).

- **Lecture**

A l'issue de cet examen microscopique, on peut observer la mobilité des souches (Labiod, 2016).

3-2-2- Coloration de Gram

Le principe de la coloration de Gram repose sur les différences de composition chimique de la paroi des bactéries (1 à 2.5 % des lipides chez les bactéries à Gram positif, 10 à 22% chez les bactéries à Gram négatif) (Paul, 2004).

- **Technique**

- Déposer sur une lame propre une goutte d'une suspension bactérienne.
- Faire sécher la lame par passage sur la flamme du bec Bunsen.
- Fixer le frottis sur la flamme jaune.

- Couvrir le frottis avec le colorant violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute, puis rincer la lame parfaitement par l'eau distillée.
- Recouvrir la lame une autre fois par le lugol et laisser agir une minute puis rincer à l'eau distillée.
- Tenir la lame inclinée et faire couler pendant 30 secondes de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore, rincer immédiatement à l'eau distillée.
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 1 min ; rincer à l'eau distillée et égoutter.
- Égoutter entre 2 morceaux de papier buvard et laisser sécher.
- Observez avec une goutte d'huile à immersion à l'objectif X100.
- **Observation sous microscope**
 - Couleur rose représente les bactéries à Gram négatif.
 - Couleur violette représente les bactéries à Gram positif.
 - On observe aussi la forme des cellules bactériennes (bacille, coccobacille, cocci, diplocoques,...).

3-3- Tests biochimiques

3-3-1- Test de catalase

- **Technique**

Déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée puis ajouter une colonie à l'aide d'une anse de platine, bien étaler.

- **Lecture**

- L'apparition de dégagement des bulles de gaz traduit la présence de l'enzyme catalase. La bactérie est dite : catalase (+).
- Par contre l'absence du dégagement gazeux signifie l'absence de l'enzyme. Elle est dite : catalase (-) (Joffin et Leyral, 2006).

3-3-2- Test d'oxydase

- **Technique**

- Prélever une colonie bien isolée à l'aide d'une pipette Pasteur puis la déposer dans un tube contenant 5ml d'eau stérile.
- A l'aide d'une pince, mettre le disque d'oxydase dans la suspension bactérienne.

- **Lecture**

- L'apparition d'une couleur violette signifie que la bactérie possède une oxydase : le test est positif.

- Si la solution reste incolore, la bactérie ne possède pas de l'oxydase : le test est négatif.

3-4- La galerie biochimique API 20^E

Dans certains cas, il existe des difficultés d'identification des bactéries par les tests classiques, ce qui nous oblige à utiliser le système d'identification par micro-méthode API 20^E de Biomérieux (**Zoutat et Saad, 2019**).

- **Principe**

API 20^E est un système d'identification qui permet d'identifier les entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif qui se développent facilement. Les substrats déshydratés sont stockés dans une galerie de 20 micro-tubes. Les micro-tubes sont remplis d'une suspension bactérienne (**Koumba, 2007**).



Figure 09: Galerie API 20^E

- **Technique**

- **Préparation de la suspension bactérienne**

La préparation de l'inoculum est réalisée à partir d'une culture pure : 2 à 3 colonies identiques sont prélevées d'un milieu gélosé à l'aide d'une anse de platine, puis déposées sur les parois d'un tube contenant de l'eau physiologique afin de dissocier les colonies. Ensuite, la suspension est agitée sur un vortex (IKA Vibrofix VF1) (**Derafa, 2012**).

- **Inoculation de la galerie**

- Mettre de l'eau distillée dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.

- Remplir les tubes et les cupules des tests : |CIT |, |VP |, |GEL|, avec la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur (ou bien une seringue).

- Pour les tests nécessitant l'anaérobiose : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S on ajoute une goutte d'huile de paraffine.

- Remplir uniquement les tubes des tests restant (et non les cupules).

- Refermer la boîte, incuber à 37 °C pendant 18 à 24h.

- **La lecture**

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs :

- Pour le test TDA, ajouter une goutte du réactif TDA.

- Pour le test indole, ajouter une goutte de réactif de Kovacs.

- Pour le test VP, ajouter une goutte des réactifs VP1 et VP2. (Une réaction positive peut prendre jusqu'à 10 minutes).

- Pour le test GLU et après la lecture du résultat on peut déduire la présence du nitrate réductase en ajoutant une goutte des réactifs NR1 et NR2 (**Larpen, 1997**).

La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou grâce à un logiciel d'identification Api Web.

Deuxième partie**1- Antibiogramme**

La sensibilité aux antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Médecine Humaine et Vétérinaire, 6^{ème} édition, 2011).

1-1- Préparation d'une pré culture

L'activité antibactérienne a été réalisée sur des cultures jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des cultures a été effectuée par repiquage sur un milieu Mueller Hinton (MH) dans des boîtes de Pétri, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24h.

1-2- Préparation de l'inoculum

A partir des cultures pures de 18 à 24 h, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont repiquées à l'aide d'une anse de platine et déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis homogénéisées et ajustées à une opacité à 0.5 Mc Farland ou à une densité optique D.O. de 0.08 à 0.13 lue à une longueur d'onde de 625 nm.

1-3- Ensemencement

Pour l'ensemencement, un écouvillon stérile a été trempé dans l'inoculum et essoré en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Ensuite, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée (des boîtes de Pétri pré coulées par le milieu de culture gélosé MH), de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. A la fin de l'ensemencement l'écouvillon est passé sur la périphérie de la gélose.

1-4- Application des disques d'antibiotiques

Chaque disque d'antibiotique est déposé sur la gélose MH, puis pressé à l'aide d'une pince bactériologique stérile en prenant soin de ne pas déplacer les disques après application.

Le tableau ci-dessous résume les antibiotiques et leurs charges utilisés pour chaque souche étudiée.

Tableau 4 : La liste des antibiotiques testés

Souche	Famille	Antibiotique	Charge
<i>E. coli</i>	BETA - LACTAMINE	Oxacilline (OX)	1µg
	QUINOLONES	Ofloxacin (OFX)	5µg
	AMINOSIDES	Gentamycine(CN)	10µg
	MACROLIDES	Erythromycine (E)	15µg
	CYCLINES	Tetracycline (TE)	30µg
<i>Proteus sp.</i>	BETA - LACTAMINE	Amoxicilline (AML)	30µg
	AMINOSIDES	Gentamycine (CN)	10µg
	PHÉNICOLS	Chloramphénicol (C)	30µg
	QUINOLONES	Acide nalidixique (NA)	30µg
	SULFAMIDES	Sulfaméthoxazole (SXT)	25µg

1-5- Incubation et lecture

Les boîtes de MH ensemencées sont incubées pendant 18 à 20 heures à 37 °C. Après incubation on procède à la lecture des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un double décimètre. Le diamètre des zones d'inhibition est interprété sensible, intermédiaire ou résistant conformément aux recommandations de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Médecine Humaine et Vétérinaire, 6^{ème} édition, 2011).

2- Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

La détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare* a été réalisée vis-à-vis de deux bactéries multi résistantes (*E. coli* et *Proteus sp.*) isolées des femmes souffrant de vaginite à l'aide de la méthode de micro-dilution.

Remarque

Les huiles essentielles utilisées dans la présente étude ont été récupérées du laboratoire de Pharmacologie, Institut des Sciences Vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

2-1- Préparation de l'inoculum

Les suspensions d'inoculum ont été obtenues en prélevant cinq colonies à partir des cultures de 24 h. Les colonies ont été mises en suspension dans 5 ml de solution d'eau physiologique stérile en agitant pendant 15 secondes. La densité a été ajustée à la turbidité du standard Mc Farland 0,5 (ce qui équivaut à 1.5×10^8 UFC/ml). La densité optique de chaque suspension a été confirmée sur un spectrophotomètre (JENWAY 7205) (NCCLS, 2001).

2.2. Test préliminaire « *in-vitro* »

La technique d'aromatogramme a été effectuée afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des HEs. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (**Benjelali et al., 1986**) vis-à-vis des deux bactéries multi-résistantes.

- **Principe**

Cette méthode qualitative teste la sensibilité ou la résistance des microorganismes par contact direct avec l'huile essentielle. C'est une méthode qui est généralement utilisée pour la présélection de l'activité antimicrobienne de l'HE, car le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité d'HE mais une indication qualitative de la sensibilité ou de la résistance des bactéries.

Il repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (**Ponce et al., 2003**).

- **Protocole expérimental**

Des disques de celluloses stériles (diamètre 6 mm/Watman n° 40) préalablement imprégnés de 5 µl pour chaque huile essentielle ou d'eau physiologique stérile pour les boîtes de contrôle ont été déposés à la surface de la gélose Müeller Hinton préalablement coulées et ensemencées sur des boîtes de Pétri par les inocula déjà préparés (ne dépassant pas les 15 min). Les boîtes sont laissées 30 min à température ambiante puis retournées et incubées à 37 °C pendant 18-24 h. L'expérience a été répétée trois fois pour chaque bactérie.

- **Lecture**

La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un double décimètre. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'HE (**Ponce et al., 2003**).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

3- Détermination des CMI et des CMB par la méthode de micro-dilution

La méthode de micro-dilution a été utilisée pour la détermination des activités antimicrobiennes des huiles essentielles étudiée vis-à-vis des deux souches bactériennes multi-résistantes.

La détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée par la méthode de dilution en série sur des microplaques en matière plastique comportant 96 puits à fond « U » (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12) dans un bouillon Müeller Hinton pour les bactéries selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2006 ; NCCLS, 1999).

La concentration de départ des solutions des huiles essentielles à tester étaient de 20 µl/ml pour chaque huile essentielle testée.

La solution mère a été préparée dans un émulsifiant à 10 % (1/9 v/v) puis une double dilution en série a été faite. L'inoculum a été ajouté à tous les puits de façon à obtenir une concentration finale de bactéries d'environ 1.5×10^5 UFC / ml, les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.

Pour chaque expérience, un contrôle positif (milieu inoculé) et un contrôle négatif (milieu seul) ont été préparés. La croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant de la solution aqueuse à 0,5 % de chlorure de 2, 3, 5- triphényl-tétrazolium (TTC) (Radulovic et al., 2011).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la concentration la plus faible des huiles qui a inhibé la croissance visible (La formation de pastille de couleur rouge au fond du puits après l'addition de TTC), tandis que la concentration minimale bactéricide (CMB) a été définie comme étant la plus faible concentration de l'huile qui tue 99,9% des cellules bactériennes.

Pour déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB), 10 µl de bouillon a été prise de chaque puits sans croissance visible et inoculée sur une gélose nutritive pendant 24 h à 37 °C. La croissance des souches bactériennes testées correspondant à l'activité bactériostatique, tandis que l'effet bactéricide est révélé par une gélose claire après incubation (Dramane, 2010). Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

Le rapport CMB/CMI a permis de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide des huiles essentielles testées. Une huile essentielle est dite bactériostatique lorsque ce rapport est supérieur ou égal à 4, et bactéricide lorsque ce rapport est inférieur à 4 (Nokam et al., 2020).

4- Etude de la synergie

La méthode du damier a été utilisée pour évaluer la synergie entre les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare* à l'égard de deux isolats multi résistant à savoir *E. coli* et *Proteus* sp. selon la méthode décrite par **Verman (2007)** et **Fadwa et al. (2021)** légèrement modifiée.

- **Principe**

Cette technique consiste à réaliser des titrages en damier bidimensionnel en utilisant la méthode de micro-dilution en bouillon. Chaque puits contenant le milieu inoculé et les huiles essentielles avec un volume final de 200 µl, avec des concentrations décroissantes d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (HE_A) dans la direction horizontale, et celle d'huiles essentielle d'*Origanum vulgare* (HE_B) ayant une concentration décroissante dans la direction verticale. La plage de concentrations testées pour chaque huile essentielle est de trois dilutions inférieure et supérieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Verman, 2007**). Les colonnes dix et douze ont été utilisées respectivement comme contrôles positif et négatif. Un contrôle positif (milieu inoculé) et un contrôle négatif (milieu seul) ont été préparés (**Fadwa et al., 2021**). La plaque a été incubée pendant 24h à 37 °C. La croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant de la solution aqueuse à 0,5 % de chlorure de 2, 3, 5- triphényl-tétrazolium (TTC) (**Radulovic et al., 2011**).

- **Lecture**

La lecture de la plaque a été réalisé en combinant deux méthodes

La 1^{ère} méthode décrite par **Den Hollander et al. (1998)** où l'indice de concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) a été calculé à partir de la concentration dans le premier puits non trouble (clair) trouvé dans chaque ligne et colonne le long de la turbidité/non-turbidité interface, puis moyennés.

La 2^{ème} méthode décrite par **Anon (1992)** dans le Manuel de Procédures de Microbiologie Clinique où l'indice de concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) le plus bas de tous les non troubles des puits le long de l'interface turbidité/non-turbidité ont été utilisés.

- **Interprétation**

Les résultats du test en damier sont interprétés selon la formule décrite par **Bhattacharya et al. (2021)**. L'indice de concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) pour les deux huiles essentielles et l'indice CFI d'une combinaison de deux huiles essentielles (A et B) ont été calculés comme suit :

$$\text{Indice } CFI_{\text{Combinaison}} = CFI_{HE_A} + CFI_{HE_B}$$

Où

$$CFI_{HE_A} = \frac{\text{CMI } HE_A \text{ en combinaison avec } HE_B}{\text{CMI } HE_A \text{ seul}}$$

$$CFI_{HE_B} = \frac{\text{CMI } HE_B \text{ en combinaison avec } HE_A}{\text{CMI } HE_B \text{ seul}}$$

Ensuite, la valeur ICFI a été interprétée en suivant les plages d'interprétation décrit par **Gutierrez et al. (2010)** et **Fadwa et al. (2021)** : $CFI \leq 0.5$: synergie ; $0.50 < CFI < 1$: additif ; $1 < CFI \leq 4$: indifférent ou aucun effet interactif ; $CFI > 4.0$: antagonisme.

Résultats
&
Discussion

Première partie

1- Enrichissement

Après incubation pendant 24 dans un bouillon BHI, les deux souches ont donné un milieu trouble. Ceci indique que ces souches ont poussé sur ce milieu.

2-Purification et identification des souches bactériennes

2-1- Milieu chromogénique (Chromagar Orientation)

Après un ensemencement des deux souches étudiées sur milieu Chromagar Orientation et incubation pendant 24h, les colonies roses foncées à rougeâtres sont spécifiques d'*E. coli* (figure 10) alors que les colonies qui ont un halo brun sont spécifiques de *Proteus* sp. (figure 11).

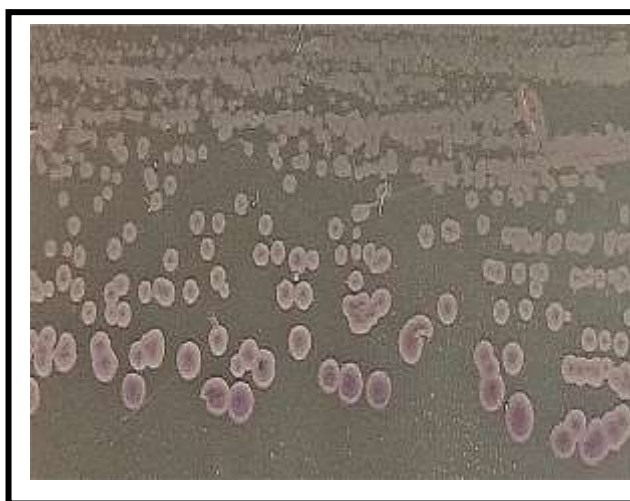


Figure 10 : Aspect macroscopique d'*E. coli* sur Milieu Chromagar Orientation



Figure 11 : Aspect macroscopique de *Proteus* sp. sur Milieu Chromagar Orientation

2-2- Observation microscopique

2-2-1- Examen à l'état frais

- *E. coli*

Cette technique nous a permis d'observer des bacilles mobiles (figure 12).

- *Proteus* sp.

Il s'agit des bâtonnets droits fins 0,5 μ et protéiformes (d'où leur nom), à extrémité arrondie, le plus souvent mobile (figure 13).



Figure 12 : Frottis frais d'*E. coli* sous microscope optique GX1000.



Figure 13 : Frottis frais de *Proteus* sp. sous microscope optique GX1000.

2-2-2- Colorations de Gram

La coloration de Gram nous a permis d'observer sous microscope des bacilles à Gram négatif colorés en rose.

- *E. coli*

Des bacilles regroupés en amas ou isolées ou bien en petite chaînettes (figure 14).

- *Proteus* sp.

Des bacilles plus longs et plus minces (figure 15).

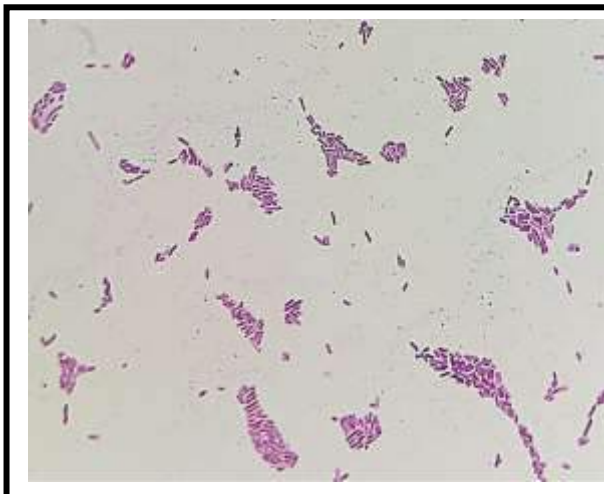


Figure 14 : Coloration de Gram d'*E. coli* sous microscope optique GX1000.

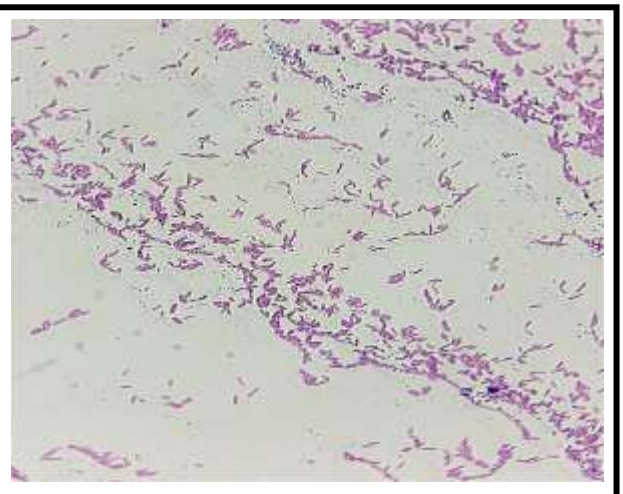


Figure 15 : Coloration de Gram de *Proteus* sp. sous microscope optique GX1000.

2-3- Tests biochimiques

2-3-1- Test de catalase

Les deux souches étudiées ont montré un dégagement des bulles d'air ce qui signifie que le test de catalase est positif (+) (figures 16 et 17).

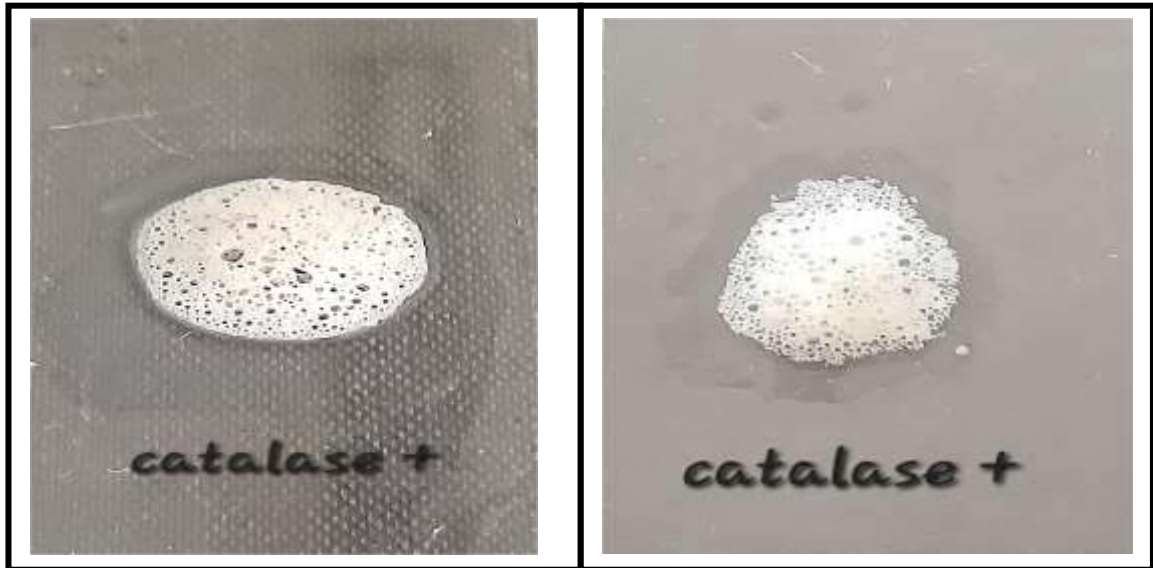


Figure 16 : Test de catalase d'*E. coli*.

Figure 17 : Test de catalase de *Proteus* s
sp.

2-3-2- Test d'oxydase

Une couleur claire témoignant d'un test négatif (-) a été observée suite à l'exposition des deux souches à N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride.

Deuxième partie

1- Résultats de l'antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de cinq classes d'antibiotique par la méthode standard des disques.

Le tableau 5 résume les résultats de l'antibiogramme pour les deux souches étudiées ainsi que leur appréciation.

Tableau 5 : Halos d'inhibition* en (mm) provoqués par les antibiotiques testés.

Souches Antibiogramme	<i>E. coli</i>		<i>Proteus sp.</i>	
	<i>Halos d'inhibition</i>	<i>Interprétation</i>	<i>Halos d'inhibition</i>	<i>Interprétation</i>
Oxacycline (OX)	6	Résistante		
Ofloxacin (OFX)	20	Sensible		
Gentamycine (CN)	19	Sensible	20	Sensible
Erythromycine (E)	6	Résistante		
Tetracycline (TE)	7	Résistante		
Amoxicilline (AML)			6	Résistante
Chloramphénicol (C)			13	Sensible
Acide nalidixique(NA)			10	Résistante
Sulfaméthoxazole(SXT)			8	Résistante
Appréciation	Multirésistantes		Multirésistantes	

Les figures 18 et 19 représentent les résultats de l'antibiogramme des deux souches effectuées sur le milieu de culture Mueller Hinton.

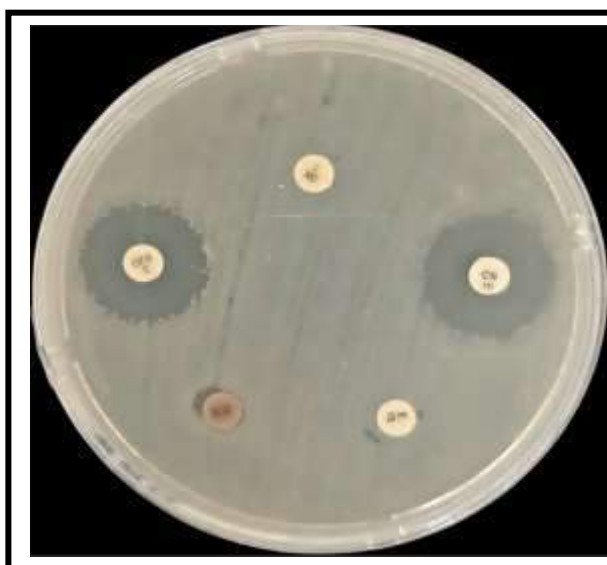


Figure 18 : Résultats d'antibiogramme pour la souche d'*E. coli*.

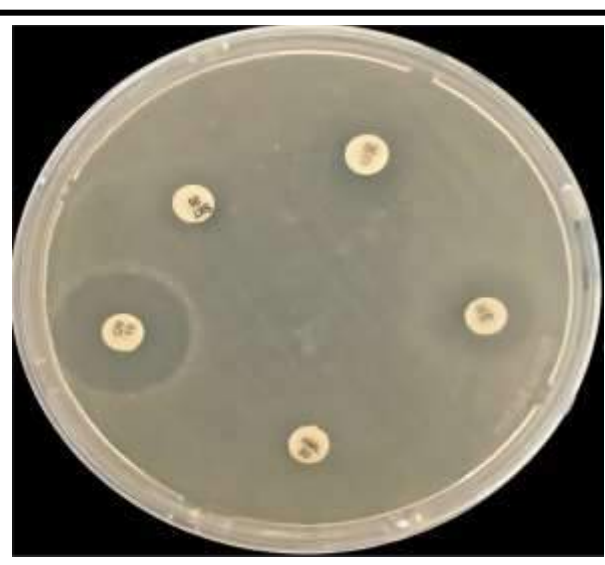


Figure 19 : Résultats d'antibiogramme pour la souche de *Proteus sp.*

La multirésistance bactérienne est définie comme étant «la résistance à plus d'un antibiotique ». Cependant, la définition la plus fréquemment utilisée pour les bactéries à Gram positif et à Gram-négatif est « la résistance à trois classes d'antibiotique ou plus » (**Magiorakos et al., 2012**).

En se basant sur la définition citée ci-dessus, les souches testées ont manifesté une résistance à 3 classes d'antibiotiques.

2- Activité antibactérienne

2-1 Détermination de la sensibilité

Les observations effectuées sur l'effet des HEs de *Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare* sur la croissance des bactéries à testées sont représentées dans le tableau 6 et les figures 20 et 21.

Tableau 6 : Halos d'inhibition* en (mm) (moyenne $\pm$ écart type) provoqués par les huiles essentielles testées.

Huile essentielle	<i>S. aromaticum</i>	<i>Origanum vulgare</i> .
Isolats		
<i>E. coli</i>	10.67 $\pm$ 0.58	27.67 $\pm$ 0.58
<i>Proteus sp.</i>	9 $\pm$ 1	22.67 $\pm$ 0.58
Appréciation	Sensible	Extrêmement sensible

*Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

Les résultats obtenus indiquent que l'huile essentielle *Syzygium aromaticum* a exercé un effet inhibiteur vis-à-vis d'*E. coli* et *Proteus sp.* avec des zones d'inhibition de 10.67 mm et 9 mm, respectivement. En se basant sur les données de **Ponce et al. (2003)**, les résultats de la présente étude nous ont permis d'apporter un jugement sur la sensibilité des souches testées vis-à-vis de cette huile essentielle. *E. coli* et *Proteus sp* ont été classés comme sensibles à l'HE de *Syzygium aromaticum* (tableau 6).

Des zones d'inhibition allant de 16.3mm et 22.64 mm ont été enregistrées par l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* à l'égard de *E. coli* et *E. coli* ATCC 25922 respectivement (**Fu et al., 2007 ; El Alama, 2019**).

Fu et al. (2007) ont mentionné une zone d'inhibition de 18.2 mm d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* vis-à-vis de *Proteus vulgaris*.

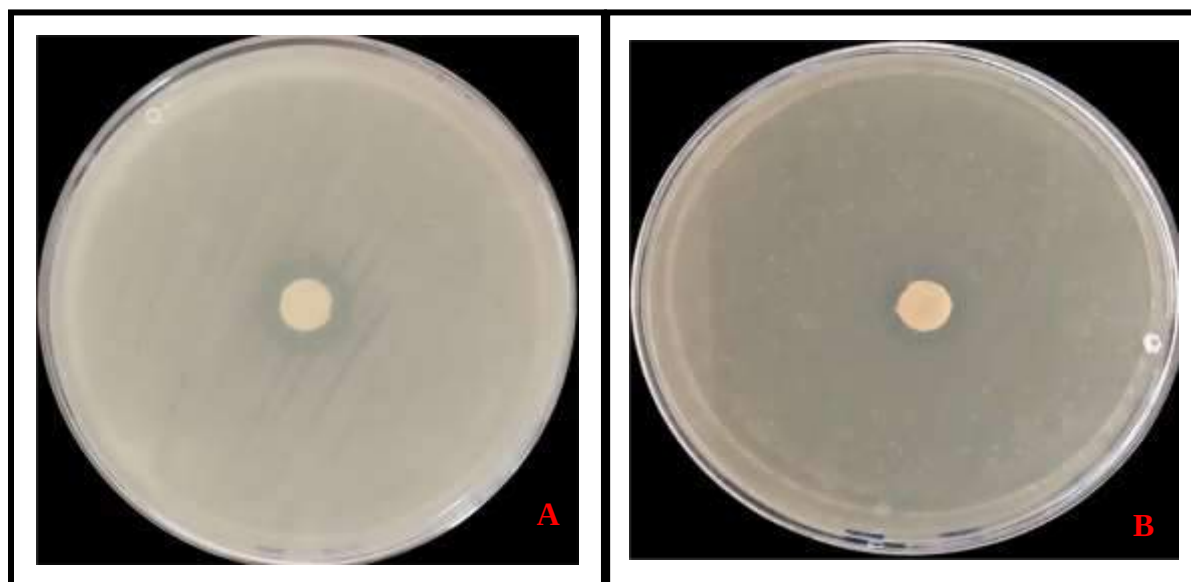


Figure 20 : Effet de l'HE de *Syzygium aromaticum* vis-à-vis des deux souches testées **A :** *E. coli* et **B :** *Proteus* sp.

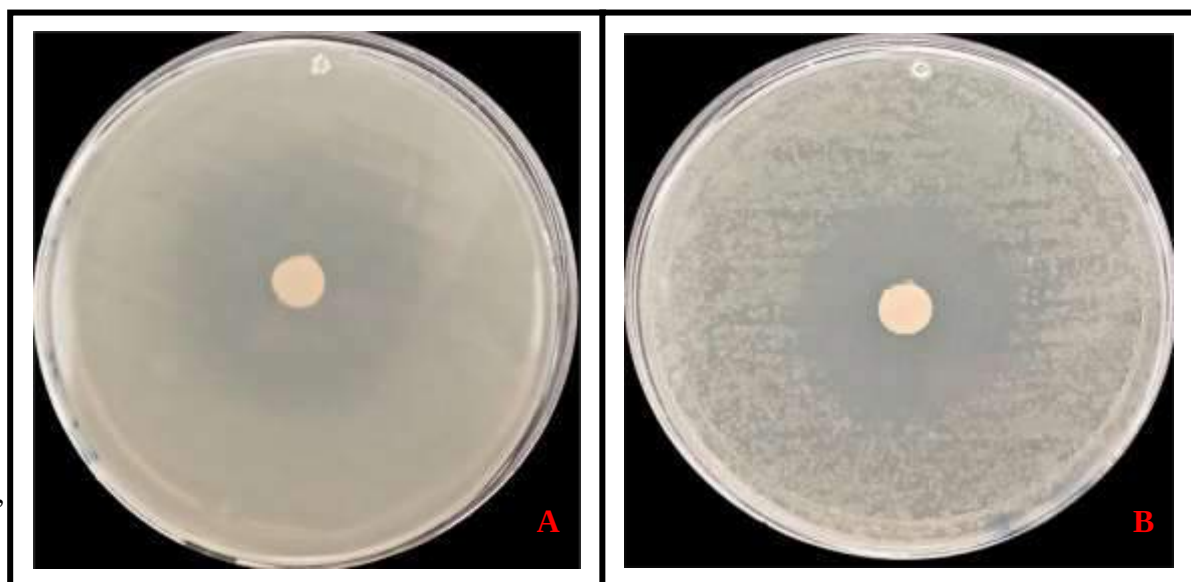


Figure 21 : Effet de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis des deux souches testées **A :** *E. coli* et **B :** *Proteus* sp.

L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* a montré une activité antibactérienne plus élevée à l'égard des deux souches testées, avec un diamètre d'inhibition de 27.67 mm vis-à-vis d'*E. coli* et 22.67 mm vis-à-vis de *Proteus* sp. Ces souches ont été classés comme extrêmement sensible à huile essentielle d'*Origanum vulgare* selon la classification de **Ponce et al. (2003)** (tableau 6).

Un zone d'inhibition proche à celle obtenu dans la présente étude à été noté par **El Alama (2019)** pour l'HE d'*Origanum vulgare* à l'égard *E. coli* ATCC 25922 avec une valeur de l'ordre de 22.42mm.

2-2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Les deux huiles essentielles ont été testées par la méthode de dilution en milieu liquide (microdilution) sur deux bactéries associées aux infections vaginales chez les femmes. Les CMI et les CMB des deux huiles essentielles étudiées sont présentées dans le tableau 7 et les figure 22 et 23.

Tableau 7 : CMI et CMB des deux huiles essentielles testées, nécessaires pour l'inhibition totale de la croissance bactérienne in vitro, exprimée en solution $\mu\text{l/ml}$ ($n=3$)

Isolats	HE de <i>S. aromaticum</i>			HE d' <i>Origanum vulgare</i>		
	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>E. coli</i>	1.25	1.25	1	1.25	20	> 4
<i>Proteus sp.</i>	1.25	2.5	2	1.25	20	> 4

▪ *S. aromaticum*

Les résultats obtenus ont montré que l'HE de *Syzygium aromaticum* était efficace contre *E. coli* et *Proteus sp.* avec une CMI de l'ordre de $1.25\mu\text{l/ml}$ et CMB de l'ordre de $1.25\mu\text{l/ml}$ à l'égard de *E. coli* et $2.5\mu\text{l/ml}$ vis-à-vis de *Proteus sp.*

Un résultat similaire à celui obtenu dans la présente étude concernant la CMI et CMB a été rapporté par **Fu et al. (2007)** à l'égard d'*E. coli*. Ces mêmes auteurs ont noté une CMI de $1.25\mu\text{l/ml}$ (0.125% v/v) vis à vis de *Proteus vulgaris* et une CMB de $2.5\mu\text{l/ml}$ (0.25% v/v).

Cependant, **El Alama (2019)** a enregistré une CMI et une CMB plus basse de l'ordre de $0.25\mu\text{l/ml}$ et $0.5\mu\text{l/ml}$ respectivement à l'égard d'*E. coli* ATCC 25922.

Toutefois, **Hussein et al. (2014)** ont signalé une CMI plus élevée à celle obtenue dans la présente étude avec une valeur de $7.81\mu\text{l/ml}$.

D'après nos résultats, le rapport CMB/CMI pour l'HE de *Syzygium aromaticum* a été de 1 pour *E. coli* et de 2 pour *Proteus sp.* En se référant à **Nokam et al. (2020)**, l'HE de *Syzygium aromaticum* possède un pouvoir bactéricide vis-à-vis des deux souches bactériennes testées.

L'activité antibactérienne de cette huile essentielle peut être liée à sa richesse en *Eugénol*. L'*Eugénol* étant le composé majoritaire de l'huile essentielle du clou de girofle avec un taux de 85.3% de la composition globale (**Pinto et al., 2009**). Ce composé altère la membrane cellulaire, affecte le transport des ions et de l'ATP et modifie le profil des acides gras des différentes bactéries. Il agit également contre différentes enzymes bactériennes, y compris l'ATPase, l'histidine carboxylase, l'amylase et la protéase (**Nazzaro et al., 2013**). De

plus, l'*Eugénol* a démontré la capacité de désintégration de la membrane et par conséquence il augmente encore sa perméabilité, ce qui entraîne ensuite la mort de l'organisme (Devi et al., 2010).

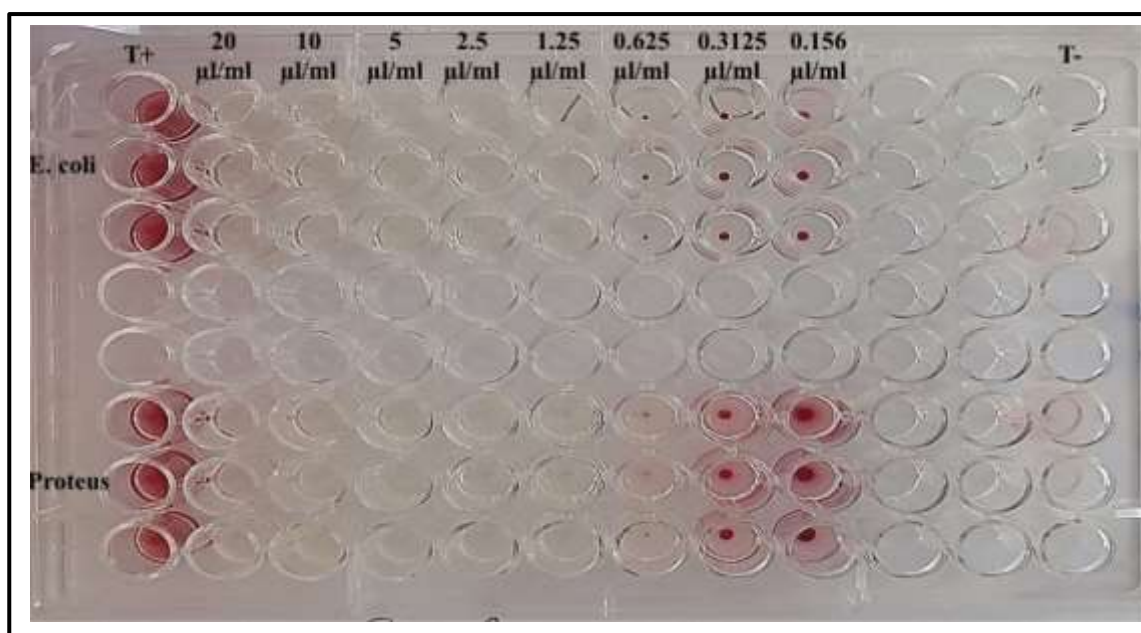


Figure 22 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* vis-à-vis d'*E. coli* et *Proteus* sp.

▪ *Origanum vulgare*

Les résultats obtenus ont montré que l'HE d'*Origanum vulgare* a été efficace vis-à-vis *E. coli* et *Proteus* sp. avec une CMI de 1.25µl/ml. Tandis que la CMB a été de l'ordre de 20µl/ml à l'égard de ces deux souches.

Une CMI et une CMB plus basse de l'ordre de 0.25 µl/ml et 0.5 µl/ml respectivement à l'égard d'*E. coli* ATCC 25922 a été signalé par **El Alama (2019)**.

Toutefois, **Fournomiti et al. (2015)** ont enregistré une CMI plus élevée à celle obtenue dans la présente étude avec une valeur de 8 mg/ml pour deux variétés d'huiles essentielles d'*Origanum vulgare* l'une irriguée et l'autre non irriguée vis-à-vis de 27 souches d'*E. coli*.

Notre résultat a été presque similaire à celui obtenue dans l'étude de **Da Costa et al. (2009)** qui ont enregistré une valeur de 1.25mg/ml pour l'HE d'*Origanum vulgare* d'origine brésilienne sur quatre souches multi-résistantes d'*E. coli* isolées chez des patients ayant une infection nosocomiale. Ces mêmes auteurs ont signalé une CMB de 5mg/ml, ce qui inférieur à celle obtenue au cours de la présente étude.

D'après nos résultats, le rapport CMB/CMI pour l'HE d'*Origanum vulgare* a été supérieur à 4 pour les deux souches bactériennes testées. En se référant à **Nokam et al. (2020)**,

l'HE d'*Origanum vulgare* a un pouvoir bactériostatique vis-à-vis des deux souches bactériennes testées.

L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* d'origine Algérienne peut avoir un chémotype thymol et/ou carvacrol (**Boughendjioua et Seridi, 2017**). **Leyva-López et al. (2017)** ont montré que le composant majeur d'huile essentielle extraite d'*Origanum sp.* récolté de l'Algérie était le thymol (34.2%) et le carvacrol (30.5%). D'après **Nazzaro et al. (2013)**, le carvacrol est un monoterpénoïde phénolique que l'on trouve principalement dans l'HE de l'origan.

Ces mêmes auteurs ont rapporté que le thymol et le carvacrol ont des effets antimicrobiens similaires mais ont des mécanismes d'action différents contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Nazzaro et al., 2013**).

Le thymol entraîne un endommagement de la membrane externe et interne suite à une altération structurelle et fonctionnelle de la membrane cytoplasmique, interagir avec des protéines membranaires et des cibles intracellulaires. L'interaction du thymol avec la membrane affecte la perméabilité de celle-ci et entraîne la libération d'ions K^+ et d'ATP. Dans certains cas, le thymol peut induire la libération de lipopolysaccharides, mais il n'affecte pas les cations chélateurs. De même, Le carvacrol agit sur les cellules microbiennes et provoque des dommages structurels et fonctionnels à leurs membranes qui entraînent une perméabilité accrue. Le carvacrol est l'un des rares composants des huiles essentielles à avoir un effet désintégrant sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il provoque la libération de lipopolysaccharides et agit également sur la membrane cytoplasmique pour modifier le transport des ions. L'activité du carvacrol semble être liée à la présence d'un groupe hydroxyle qui peut fonctionner comme transporteur transmembranaire de cations monovalents en transportant H^+ dans le cytoplasme cellulaire et en transportant K^+ vers l'extérieur (**Nazzaro et al., 2013**).

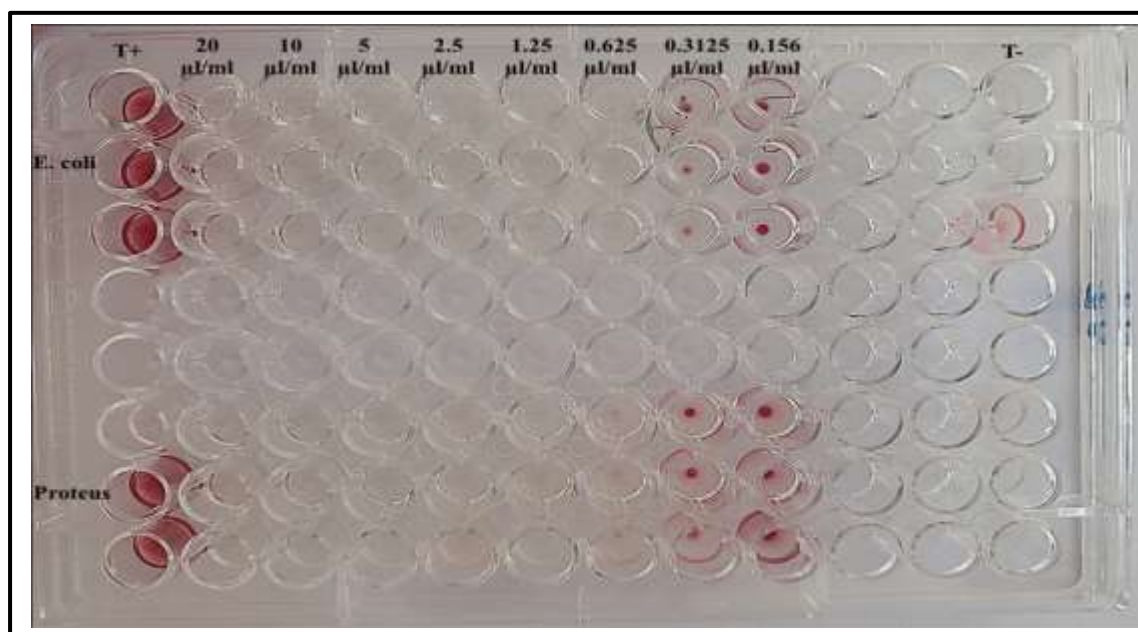


Figure 23 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis-à-vis d'*E. coli* et *Proteus* sp.

2-3- Etude de la synergie

Le tableau ci-dessous montre l'indices de concentration fractionnelle inhibitrice d'huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et d'*Origanum vulgare* à l'égard d'*E. coli* un effet indifférent de cette association a été constaté avec un ICFI > 1 et inférieure à 4 selon la méthode de lecture décrite par Anon (1992).

Tableau 8 : Indice de concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) d'huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare*

Bactéries	Huile essentielle µl/ml							Indice	Appréciation
	Syzygium aromaticum			Origanum vulgare					
	CMI seule	CMI comb	CFI	CMI seule	CMI comb	CFI	CFI		
E. coli	1.25	0.156	0.1248	1.25	1.25	1	1.1248	Indifférent	
Proteus sp.	1.25	ND	ND	1.25	ND	ND	ND	ND	

ND : non déterminé

D'après les résultats enregistrés dans le tableau 8, la combinaison double d'HE avec l'indice de concentration fractionnelle inhibitrice le plus bas (1.1248), la CMI du clou de girofle a été réduite à 1/8 par rapport à la valeur initiale. Toutefois aucune réduction de la CMI de l'huile essentielle de l'origan n'a été observée.

Si on se base sur la lecture décrite par **Den Hollander et al. (1998)**, l'indice de concentration fractionnelle inhibitrice de cette combinaison de ces deux huiles essentielles testées a été de 4.14984 ce qui donne une appréciation d'un effet antagoniste de cette association.

Conclusion

A la lumière de ce modeste travail nous pouvons conclure ce qui suit :

L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et d'*Origanum vulgare* possède une bonne activité antibactérienne. Ces deux huiles ont une concentration minimale inhibitrice de 1.25 µl/ml à l'égard de deux souches multirésistants associées aux infections vaginales chez la femme à savoir *E. coli* et *Proteus* sp.

Cependant, la concentration minimale bactéricide a été beaucoup plus faible pour l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (1.25 µl/ml) vis-à-vis d'*E. coli* en comparaison avec celle de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* (20 µl/ml). En ce qui concerne *Proteus* sp. la concentration minimale bactéricide a été de 2.5µl/ml pour l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et 20 µl/ml pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

Le rapport CMB/CMI nous a permis de déduire que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* exerce une activité bactéricide tandis que celle d'*Origanum vulgare* possède une activité bactériostatique.

L'étude de la combinaison de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* avec l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* a montré que ces deux huiles ont un effet indifférent à l'égard d'*Escherichia coli* avec un indice de concentration fractionnaire inhibitrice de 1.1248 selon la méthode d'interprétation d'**Anon (1992)** et un effet antagoniste selon la méthode de **Den Hollander et al. (1998)** avec un indice de concentration fractionnaire inhibitrice de 4.14984.

L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et d'*Origanum vulgare* possède un potentiel antibactérien prometteur surtout en utilisation seule ce qui pourrait contribuer au développement de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections vaginales bactériennes. Des études complémentaires et plus élargies afin de déterminer la composition chimique de ces deux huiles essentielles et de faire un screening d'un nombre assez important de bactéries associées aux infections vaginales sont nécessaires.

Références Bibliographiques

A

1. Abdelaziz ZA, Mutasim IE, Naser B, el Hamid M. 2014. Vaginal infections among pregnant women at Omdurman Maternity Hospital in Khartoum, Sudan. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 8(04): 490-497
2. AFNOR. 2000. Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6^{ème} édition, AFNOR, Paris
3. Alessandra Moro Buronzo .2008. Grande guide des huiles essentielles santé beauté Marocaine, moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires.
4. Allsworth JE, Lewis VA, Peipert JF. 2008. Viral sexually transmitted infections and bacterial vaginosis ,2001–2004. National health and Nutrition examination survey data. Sexually transmitted diseases. PP 791–796.
5. Amlan KP. 2011. Effets of Essentiel oils on Rumen Fermentation, Microbial Ecology and Ruminant Production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6 (5): 416-428.
6. Ane-Anyangwe L, Meriki HD, Silum SP, Nsongomanyi RR, Zofou D. 2015. « Antifungal susceptibility profiles and risk factors of vaginal candidiasis amongst female university students in southwest region, Cameroon ». *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 16 (2): 67-72.
7. Anon.1992. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: H.D. Isenberg (Ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. (pp. 5.18.1– 5.18.28). American Society for Microbiology, Washington, DC.
8. Arvy M P, Gallouin F. 2003. Epices, aromates et condiments. Ed. Belin, Paris. 412 p.
9. Asif M, Saleem M, Saadullah M, Yaseen H S, Al Zarzour R. 2020. COVID-19 and therapywith essential oilshaving antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatoryproperties. *Inflammopharmacology*. 28(5) :1153-1161. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00744-0>.
10. Astani A, Schnitzler P. 2014. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus *in vitro*. *Iran J Microbiol*. 6(3) :149-155.
11. Avanon T, Chitou C. 2012. Bilan des quatre dernières années des germes isolés des échantillons de sécrétions cervico-vaginales chez les femmes enceintes à l’HOMEL. Rapport de fin de formation, Ecole Polytechnique d’Abomey Calavi, Université d’Abomey Calavi. PP46.

B

12. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et Idaomar M .2008. Biological effects of essential oils-A review. Food and Chemical Toxicology. 46,446- 475.
13. Bakkali F. 2007. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol. 46 (2) : 446-475
14. Barbelet S. Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. Sciences pharmaceutiques 2015.
15. Barus C. 2008. Etude électrochimique de molécules antioxydants et de leur association en milieux homogène et diphasique - Application aux produits cosmétiques, Thèse de Doctorat, université de Toulouse.
16. Baser KHC. 2002. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. Pure Appl Chem. 74: 527–545.
17. Basil A, Jimenez-carmonna MM, Clifford AA.1998. Extraction of rosemary by superheated water. Journal of food chemistry. 46: 5205-5209.
18. Baudoux D. 1997. «Aroma News», Lettre d'information de N.A.R.D.: Natural Aromatherapy Research and Development, Belgique.
19. Ben Amor B. 2008. Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs texturation par détente instantanée contrôlée (DIC). Génie des procédés. Université de La Rochelle. Français.
20. Benaoumer SN, Addou S, Kharroubi A, Mezma F et Kherroua O. 2016. « Prébiotiques et leurs effets sur le métabolisme des lipides chez les souris Balb/c nouveau-nés ». Nutrition Clinique et Métabolisme. 30 (3) : 266.
21. Benjelali B, Tantaoui-Elaraki, A, Ismaili-Alaoui M, Ayadi A. 1986. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélifié. Plant. med. Phytother. 20 :155-167.
22. Bergogne-Berezin E. 2007. Flores vaginales normales, vaginites et vaginoses bactériennes : diagnostic et thérapeutique. Antibiotiques. 9 (2) :139-144.
23. Bhattacharya R, Rolta R, Dev K, Sourirajan A. 2021. Synergistic potential of essential oils with antibiotics to combat fungal pathogens: Present status and future perspectives. Phytotherapy research. 35(11) : 6089–6100. <https://doi.org/10.1002/ptr.7218>.
24. Bohbot J.M et Lepargneur J.P. 2012. « La vaginose en (2011): encore beaucoup d'interrogations ». Gynécologie Obstétrique & Fertilité. 40 (1) : 31-36.

25. Bohbot JM .2008. Les sécrétions vaginales. Pelvi-périnéologie. PP 19-24.
26. Botineau M. 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp: 1021-1043.
27. Boughendjioua H, Seridi R. 2017. Antimicrobial Efficacy of the Essential Oil of *Origanum Vulgare* from Algeria. J Pharm Pharmacol Res. 1 (1) : 019-027.
28. Bouhaddouda N. 2016. Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*. Diplôme de Doctorat, Univ Badji Mokhtar, Annaba, p 25.
29. Boukhatem MN, Hamaidi M S, Saidi F, Hakim Y. 2010. Extraction, composition e tproprietes physico-chimiques de l'huile essentielle du Geranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultive dans la plaine de Mitidja (Algerie). Revue << Nature et Technologie>>. N° 03. Pp 37- 45.
30. Boukhebt H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H, Harzallah D. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. Der Pharmacia Lettre. 3 (4), 267-275.
31. Bouras M. 2018. Thèse de Doctorat : Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de certaines plantes de l'est algérien sur des souches résistantes aux antibiotiques. Université Badji Mokhtar- Annaba. Algérie.
32. Boyle W. 1995. Spices and essential oils as preservatives. The American Perfumer and Essential Oil Review. 66: 25-28.
33. Brabant G. 2016. « Vaginose bactérienne et prématurité spontanée ». Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction. 45 (10) : 1247-60.
34. Bruneton J. 1993. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Paris : Tec & Doc, Lavoisier. Paris.
35. Bruneton J. 1999. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. p. 1120.
36. Bruneton J. 2009. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier. Paris.
37. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. Int. J. Food Microbio. 94: 223-253.
38. Busatta C, Vidal R S, Popiolski A S, Mossi A J, Dariva C, Rodrigues M R A, Corazza F C, Corazza M L, Oliveira J V, Cansian R L. 2008. Application of *Origanum majorana* L.

essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiol. 25: 207–211.

C

39. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo P W, Castillejos L, Ferret A. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. Journal of Dairy Science. 90 (6): 2580–2595.
40. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. 2007. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science. 90: 2580-259.
41. Carillon A. 1987. Pour un bon usage des plantes, phytothérapie, aromathérapie ... comprendre et agir: des médecines familiales efficaces au service de votre santé. Edition Vie et Santé, Dammarie les Lys.
42. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. 2006. Melaleuca alternifolia (teatree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinicalmicrobiologyreviews.19(1): 50-62.
43. Catalan F, Milovanovic A, Minz M, Petavy-Maynier M. 2000.Vaginites et Vaginose, Cahier de formation Biologie Médicale.
44. Cazau-Beyret N. 2013. Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse d'exercice. Université Toulouse III Paul Sabatier. Faculté des sciences pharmaceutiques. 195 p.
45. Chahmi N, Anissi J, Jennan S, Farah A, Sendide K, Hassouni M E. 2015. Antioxidant activities and total phenol content of Inula viscosa extracts selected from three regions of Morocco. Asian Pac J Trop Biomed. 5 (3): 228-233.
46. Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Liu JY, Chang ST. 2005. Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*, Journal of agricultural and food chemistry. 53(18): 7274-7278.
47. CLSI. 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard, 7th Ed.
48. CNGOF. 2006. Collège national des gynécologues et obstétriciens français. Extrait des Mises à jour en Gynécologie et obstétrique. Paris : 5-18.
49. Couic-Marinier F, Lobstein A. 2013a. Composition chimique des huiles essentielles, Actualités pharmaceutiques. 525 : 1.

50. Couic-Marinier F, Lobstein A. 2013b. Composition chimique des huiles essentielles, Elsevier Masson SAS. 525 : 22-25.
51. Cravello L. 2001. Infections génitales de la femme. Leucorrhées, La revue du praticien. PP 2255-2261.

D

52. Da Costa AC, Dos Santos B H C, Filho LS, Lima EDO. 2009. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multi-resistant strains isolated from nosocomial patients, Braz J Pharmacog. 19: 236-241.
53. Danthu P, Penot E, Ranoarisoa KM, Rakotondravelo JC, Michel I, Tiollier M, Michels T, Normand F, Razafimamonjison G, Fawbush F, Jahiel M. 2014. The clove tree of Madagascar: a success story with an unpredictable future, Bois et Forêts des Tropique. 35p.
54. Darriet-Giudicelli F. 2011. Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum Corse-Sardaigne: *Chamaemelum mixtum*, *Anthemis maritima* et *Eryngium maritimum* , Thèse de Doctorat de chimie organique et analytique. Université de Corse-Pascal Paoli. Ecole doctorale environnement et société. 234 p.
55. Degryse AC, Delpla I, Voinier MA. 2008. « Atelier Santé Environnement, risques et bénéfices des huiles essentielles », IGS. EHESP.
56. Den Hollander J G, Mouton J W, & Verbrugh, H A. (1998). Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics. Antimicrob Agents Chemother. 42: 744.
57. Derafa L. 2012. Super twisting control algorithm for the attitude tracking of four rotors, UAV. Journal of the Franklin Institute. 349(2): 685-699.
58. Devi K P, Nisha S A, Sakthivel R, Pandian S K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane, Journal of Ethnopharmacology. 130 :107–115.
59. Djilani A, Dicko A. 2012. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. Nutrition, Well Being and Health, Dr. Jaouad Bouayed (Ed.), ISBN: 978-953-51-0125-3, In Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the-therapeutic-benefits-of-essential-oils>.

60. Dong-Hui Y, Zhi L, Su Jian-Rong. 2009. Comparison of main *Lactobacillus* species between healthy women and women with bacterial vaginosis, Chin Med J. 22(22): 2748-2751.
61. Dramane S, Witabouna K M, Kagoyire K. 2010. Evaluation des activités antimicrobiennes et anti-radicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire. Eur J Sci Res. 40(2) : 307-317.
62. Dugo G, Di Giacomo A. 2002. The genus Citrus, London: Taylor & Francis Publishing, 656p.
63. Dupont D, Dupieux C, Gaucherand P, Wallon M. 2017. « Diagnostic fortuit de *Trichomonas vaginalis* par PCR panfongique ». Journal de Mycologie Médicale. 27 (3) : e40.
64. Dyck EV, Mehens AZ, Piot P. 2000. Diagnostic au laboratoire des MST. OMS, Genève 2000.

E

65. Echakour B. 2018. « Vaginose bactérienne : facteurs de risque et prise en charge ». Thèse doctorat en pharmacie, Faculté de Médecine et de pharmacie de l'université Mohammed V – Rabat.
66. El Alama H. 2019. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de six plantes médicinales : Concept de synergie. Thèse du doctorat, Université Mohamed V Rabat.
67. Emile C. 2009. Examens bactériologiques des prélèvements vaginaux à visée diagnostique. Option Biologie. PP 19-2.
68. Eschenbach D A, Hillier S L. 1989. Advances in diagnostic testing for vaginitis and cervicitis. J Reprod Med. 34(8 Suppl), 555–565.

F

69. Fadwa A O, Alkoblan D K, Mateen A, Albarag A M. 2021. Synergistic effects of zinc oxide nanoparticles and various antibiotics combination against *Pseudomonas aeruginosa* clinically isolated bacterial strains. Saudi journal of biological sciences. 28(1): 928–935. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.064>.

70. Farhat A. 2010. Vapo - diffusion assistée par micro - ondes : conception, optimisation et application. Thèse de Doctorat en Sciences (option Sciences des Procédés, Sciences des Aliments), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France), Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).
71. Farhat A. 2010. Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application. Thèse de Doctorat en Sciences (option: Sciences des Procédés, Sciences des Aliments), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).
72. Festy D. 2011. Les huiles essentielles ça marche! Avec 78 formules à commander en pharmacie, LEDUC.S EDITION, p. 22-26, ISBN: 978-2-84899- 316-4.
73. Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, Plessas S, Theodoridou I, Papaemmanouil V. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health & Disease*. 26(1) : 23289.
74. Franchomme P, Pénoël D, Jollois R. 1990. L'aromathérapie exactement- Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Editions Jollois, 445p.
75. Fu Y, Zu Y G, Chen L, Shi X G, Wang Z, Sun S. 2007. Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. *Phytother Res*. 21 : 989-994.

G

76. Gaylor R, Jahiel M, Duclos T, PanjaRamanoelina P, Fawbush F, Danthu P. 2014. Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. *International Journal of Basic and Applied Sciences*. 3 (3): 224-233.
77. Gilling DH, Kitajima M, Torrey J R, Bright K R. 2014. Mechanisms of antiviral action of plant antimicrobials against murine norovirus. *Appl Environ Microbiol*. 80(16) : 4898-910. doi: 10.1128/AEM.00402-14.
78. Girard G. 2010. Les propriétés des huiles Essentielles dans les soins bucco - Dentaires d'hier à aujourd'hui. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincare - Nancy 1. P 116.
79. Goetz P, le Jeune R. 2010. *Syzygium Aromaticum* L, Merr and Perry (Myrtaceae) giroflier, phytothérapie, p 37-43.

80. Goetz, P, Ghedira K. 2012. Phytothérapie anti-infectieuse. Paris: Springer-Verlag, Pp 4-194.
81. Guignard J L.1996. Abrégés en botanique. 10^{ème} éd. Ed. Masson, Paris. 278 p.
82. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiology. 26: 142–150.

H

83. Hameurlaine S. 2009. Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaïa, Mémoire de Magister, Université de Kasdi Merbah - Ouargla. P 86.
84. Hassaine H, Boulanoir M. 2019. Résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolées des infections urinaires au niveau de l'hôpital de Tizi Ouzou. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme master. Université Akli Mohand Oulhadj – Bouira
85. Hounkpozoukou R, Laleye F. 2011. Nécessité d'un antibiogramme dans la prise en charge des infections génitales chez les femmes à l'HOMEL. Rapport de fin de cycle, Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi, Université d'Abomey Calavi. PP57.
86. Hussein H, Abaas S I, Hussain Ali R. 2014. Antibacterial activities of Cinnamon zelanicum and Syzygium aromaticum essential oil. Int J Pharm Pharm Sci. 6(5):165-168.
87. Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. 2005. Microbes on the human vaginal epithelium. PNAS. 102: 7952–7957. DOI: <http://doi:10.1073/pnas.05030236102>.

J

88. Joffin J N and Layeral G. 2006. Microbiologie technique. Tom 1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux, France : Centre Régional De Documentation Pédagogique, 368.
89. Jukić M, M Miloš. 2005. "Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.)." Croatica chemica acta. 78(1): 105-110.

K

90. Kalembe D, Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 10: 813-829.
91. Kalembe D, Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 10(10), 813–829.
92. Karamanos AJ, Sotiropoulou DEK. 2013. Field studies of nitrogen application on Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) Ietswaart) essential oil during two cultivation seasons. Industrial Crops and Products. 46: 246–252.
93. Karray-Bouraoui N, Rachhi M, Neffati M, Baldan B, Ranieri A, Marzouk B, Lachaâl M, Smaoui, A. 2009. Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. Industrial Crops and Products. 30(3): 338-343.
94. Keane FEA, Ison CA, Taylor-Robinson D. 1997. A longitudinal study of vaginal flora over a menstrual cycle. pp 489 – 94.
95. Koanga Mogtomo M.L, Ngo Njiki A, Longang A M, Kojom Foko L P, Embolo E, Kom B, Wandja PV, Tchamdjeu F et NgonoNgane AR. 201. « Prévalence des germes impliqués dans les infections vaginales chez les femmes camerounaises et facteurs de risque ». International Journal of Biological and Chemical Sciences. 10 (1): 255-68.
96. Köhler FE, Pabst G, éd. Köhler's Medizinal Pflanzen. Hannover: Schäfer; 1887. 110 p.
97. Kokkini S. 1996. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In Padulosi S. [Ed.], Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano. CIHEAM Publication 12, Italy., 389.
98. Koth HW. 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Éd, Naumaun et Crobel. Colonge. pp.35-336.
99. Koumba k. 2010. Fréquence d'isolement des *Klebsiella* au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel tour de 2002 à 2007. these de pharmacie université de Bamako, Mali, p53.

L

100. Labiod R. 2016. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité

- fongicide. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar. Faculté des sciences. Annaba. P (40-41-42-45).
101. Larpent, J P. 1997. *Mémento Technique de Microbiologie* (3 éd). Lavoisier : Londres, New York, Paris.
102. Laurent J. 2017. *Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine* Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Paul Sabatier Toulouse III. Faculté des Sciences Pharmaceutiques.
103. Laurent R. 2005. « Herpès ». *EMC - Médecine 2* (3) : 265-75.
104. Lefèvre J C. 2002. « La vaginose bactérienne et ses conséquences en santé publique ». *La lettre du Gynécologue*. 268 : 35-44.
105. Legrand G. 1993. *Manuel de préparateur en Pharmacie*. Paris : Masson. 89 : 65-77.
106. Lepargneur JP, Rousseau V. 2002. Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 485- 494.
107. Leyva-López N, Erick P. Gutiérrez-Grijalva, Vazquez-Olivo G, Basilio Heredia J. 2017. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. 22(6) : 989. Doi :10.3390/molecules22060989.
108. Linhares I M, Giraldo PC et Baracat E C. 2010. « New Findings about Vaginal Bacterial Flora ». *Revista Da Associação Médica Brasileira*. 56 (3) : 370-74.
109. Lis-Balchin M. 2002. *Lavender: the genus Lavandula*. London: Taylor and Francis. 37: 40-44.

M

110. Ma L, Yao L. 2020. Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: an updated review. *Molecules*. 25:2627. doi: 10.3390/molecules25112627.
111. Magiorakos, A-P, Srinivasan, A, Carey RB, Carmeli, Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth, S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice L B, Stelling, J, Struelens, MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. (2012). Multidrug resistant, extensively drug resistant and pan drug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18:268–281.
112. Mayer F. 2012. *Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

113. Mebarki N. 2010. Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne, Mémoire de Magister, Université M'hamed Bougara Boumerdes. P185.
114. Menard JP, Bretelle F. 2012. Vaginose bactérienne et accouchement prématuré. Gynécologie Obstétrique et fertilité. 48-54.
115. Merghache S, Hamza M, Tabti B. 2009. Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. Afrique Science. 05 (1) :67 – 81.

N

116. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2001. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standard, Pennsylvania, NCCLS, Fifth Edition, M11-A5, 2001.
117. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test, 9th International Supplement. M100-S9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
118. Nawres G, Amal D, Danilo F, Saoussen H, Alessandra P, Sonia D. 2019. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from flowers, leaves and aerial parts of Tunisian *Dittrichia viscosa*. Journal of Essential Oil Research. 31 (6): 582 – 589
119. Nazzaro F, Fratianni F, de Martino L, Coppola R et de Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals. 6 : 1451-1474.
120. Nokam AME, Soppo LV, Gonsu KH, Nnanga NE, Ngono MR, Messina NCF, Fokunang C. 2020. Activité Antibactérienne In Vitro d'*Azadirachta Indica* (Neem) Utilisé pour le Traitement de l'Alvéolite. Health Sci Dis. 21(11) : 32-38.

P

121. Paul S .2004. « Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie » paris.
122. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. 2008. Genital tract infections and infertility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 140(1): 3-11. DOI:<http://doi:10.1016/j.ejogrb.2008.03.009>.

123. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C et Salgueiro L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*. 58(11): 1454–1462. doi:10.1099/jmm.0.010538-0.
124. Ponce A G, Fritz R, Del Valle C, Roura S I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*. 36(7): 679-684.

R

125. Radulovic N, Dekic M, Stojanovic-Radic, ZO R I C A, Palic R. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium columbinum* L. And *G. lucidum* L. (Geraniaceae). *Turkish Journal of Chemistry*. 35(3) : 499-512.
126. Rakotoatimanana BV. 1999. « Contribution à l'optimisation d'une unité de production d'huiles essentielles », mémoire de fin d'études, Département Génie Chimique, Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo ESPA, Université d'Antananarivo.
127. Richard F. 1992. Manuel des corps gras, Paris : Lavoisier, Tec& Doc. 1228 : 65 69.
128. Roux D. 2011. Conseil en aromathérapie, 2ème éd. Pays-Bas: Pro-Officina.

S

129. Schnitzler P, Astani A, Reichling J. 2011. Antiviral effects of plant-derived essential oils and pure oil components, In Halldor Thormar. *Lipids Essential Oils Antimicrobial Agents*. 1st Ed, John Wiley & Sons, Ltd. Pp 239-254. <https://doi.org/10.1002/9780470976623.ch10>.
130. Scimeca D. 2006. Les Plantes du Bonheur, Ed: ALPEN, p: 10-17.
131. Singh J, Baghotia A, Goel S P. 2012. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae), A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 3 (4): 1469-1475.
132. Singh R, Lawrence R, Lawrence K, Agarwal B, Gupta R K et Dar S. 2015. Antioxidant and Antibacterial Activity of *Syzygium Aromaticum*, *Zingiber Officinale* and *Cinnamomum Zeylanicum* Essential Oils, *Chemical Science Transactions*. 4(1) :239-245.

133. Skoula M, Gotsiou, P, Naxakis G, Johnson CB. 1999. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae), *Phytochemistry.*, 52, 649–657.
134. Soylu E M, Soylu S, Kurt S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomatolateb light disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia.* 161: 119-128.
135. Sui X, Liu T, Ma C, Yang L, Zu Y, Zhang L et Wang H. 2012. Microwave irradiation to pretreat rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) for maintaining antioxidant content during storage and to extract essential oils imultaneously, *Food Chemistry.* 131: 1399–1405.

T

136. Tchelougou D. 2012. « Contribution à l'amélioration de la santé maternelle et néonatale au Togo : cas des infections vaginales chez les femmes enceintes venues consulter au CHR de Sokodé, Mémoire de fin d'étude d'ingénieur des travaux en analyses médicales et biologiques, École Supérieur des Techniques biologique et Alimentaire de l'Université Lomé– Togo.
137. Teusher E, Anton R, Lobstein A. 2005. Plantes aromatiques Eplices aromates condiments et huiles essentielles, Tec & Doc, Paris.

V

138. Vanden Berghe DA, Vlietinck, A J. 1991. Screening for antibacterial and antiviralagents, In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6, Assays for Bioactivity. London, Academic Press, 47-59.
139. Verman P. 2007. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergytesting, time-kill curves, and population analysis In *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. (Eds). CRC Press, Boca Raton, 275-298.
140. Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turrone S, Bellen G, Donders GG, Brigidi P. 2007. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel

electrophoresis and real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 73:5731–5741. DOI: <http://doi:10.1128/AEM.01251-07>.

141. Vokou D, Kokkini S, Bessiere J M. 1993. Geographic variation of Greek Oregano (*O. vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. Biochem System Ecol. 21: 287-295.

W

142. Wu Z, Li H, Yang Y, Zhan Y, Tu D. 2013. Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. Industrial Crops and Products. (46): 311– 316.

Z

143. Zaouali Y, Chograni H, Trimech R, Boussaid M. 2013. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *Typicus* Batt.organs during growth and incidence on the antioxidant activity, Industrial corps and Products. 43,412-419.
144. Zenasni Leila. 2014. Thèse de doctorat : Etude du polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benthgu genre *Nepta* et évaluation de leur propriété antibactérienne, Univérisité Mohammed-Agdal, Rebat. Maroc.
145. Zheng GQ. Kenny PM, Lam KT. 1992. Sesquiterpens from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potentiel anticarcinogenic agent, J NatProd. 55 : 999-1003.
146. Zoutat, O, Saad C. 2019. Etude comparative de l'infection urinaire entre communautaire et nosocomiale au niveau du CHU de Hussein Dey, Alger.