

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 :

M^{lle} AMMAR Yasmine
M^{lle} BOUZA Widad Amira
M^{lle} KOUIDRI Nour El Houda

Thème

Effet antibactérien et synergique des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Cinnamomum aromaticum*

Soutenu publiquement le 16/06/2025

Jury :

Grade

Président : M^r YEZLI Wassim

MCA

Encadrant: M^r SELLES Sidi Mohammed Ammar

Professeur

Co-encadrant : M^{me} SMAIL Leila

Ingénieur de laboratoire

Examineur 1: M^r BELHAMITI Belkacem Tahar

MCA

Année universitaire 2024-2025



Remerciements

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

Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude à Monsieur **SELLES Sidi Mohammed Ammar**, notre encadrant, pour son accompagnement exemplaire tout au long de ce travail. Sa rigueur scientifique, sa patience, sa disponibilité constante et la clarté de ses conseils ont été des piliers fondamentaux dans la réalisation de ce mémoire. Il a su nous encadrer avec bienveillance et exigence, en nous apportant non seulement un encadrement académique de qualité, mais aussi un véritable soutien moral. Travailler sous sa direction a été pour nous un réel honneur et une expérience particulièrement enrichissante, tant sur le plan intellectuel qu'humain.

Nous prenons aussi un réel plaisir à remercier chaleureusement madame **SMAIL Leila**, 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

Monsieur **YEZLI Wassim** 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.

Je dédie ce travail à Ma famille **Ammar**

Vous êtes les plus chers à mon cœur

A ma chère Mère

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver d'acconfer santé, longue vie et bonheur.

A mon cher père MOHAMMED

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices qu'il a consenti pour mon éducation et ma formation.

À mes frères et sur tout ma sœur **SAMIHA**, pour son soutien moral constant et ses encouragements puissants.

À tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce mémoire, je vous exprime ma plus profonde gratitude.

Sans oublier mes chères amies **WIDAD** et **NOUR ELHOUDA** qui ont partagé avec moi les moments difficiles, pour leur soutien moral et leur patience tout au long de ce travail.

Yasmine



Avant tout, je remercie le Dieu le tout puissant de m'avoir donnée 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 :

À mes chers papa **HADJ MOHAMED** maman **AICHA** , la lumière de mes yeux et mon soutien dans cette vie.

Il m'est difficile d'exprimer par des mots l'étendue de ma gratitude et de mon amour pour vous deux. Vous êtes la base sur laquelle j'ai construit ma vie et la flamme qui a éclairé mon chemin.

Merci, maman, pour ta tendresse et ta compassion inégalées qui m'ont enveloppée dès le premier instant. Merci, mon père, pour ta force et ton soutien, et pour ta sagesse qui m'a guidé dans toutes mes décisions.

Merci à vous deux pour l'amour avec lequel vous avez recueilli mon cœur et pour les sacrifices que vous avez faits pour moi. Vous m'avez appris le sens de la vraie famille et du soutien sans faille.

Vous êtes mon modèle en tout. Je demande à Dieu de vous préserver pour moi, de prolonger votre vie et de vous donner la meilleure récompense.

Je vous aime de tout mon cœur.

Cher oncle **MHAMED**

Je tenais à t'envoyer un mot de remerciement sincère pour t'exprimer ma reconnaissance et mon amour pour ta présence dans ma vie. Tu as toujours été comme un deuxième père pour moi, avec tes conseils avisés, ton soutien constant et ta tendresse inépuisable.

Merci pour chaque mot gentil, chaque attitude noble et chaque fois que tu as été là pour moi. Nos beaux souvenirs avec toi sont gravés dans mon cœur, et je chéris chaque moment passé en ta compagnie.

Je demande à Dieu de bénir ta vie et ta santé, et de te garder comme un trésor et un soutien pour nous.

À mes très chères sœurs, mes très chers frères et ma très chers oncles et tantes et mes chers cousins

Les mots de remerciement ne peuvent exprimer la gratitude et l'appréciation que je ressens pour votre présence dans ma vie. Nous demandons à Dieu de vous bénir dans votre vie, de vous protéger et de vous accorder bonheur, santé, succès et réussite.

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.

Widad Amira



Avant tout, je remercie le Dieu le tout puissant de m'avoir donnée te 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 mon père **NACER**

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 ma apporté depuis toujours.

A ma mère **RABIA**

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 mois.

A mon adorable sœur

MAHDJOUBA pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A mes chers frères

ABDELAZIZ et **ABDELHAMID**, Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de santé.

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

NOUR El Houda



Sommaire

Sommaire	I
Liste des illustrations	V
Liste des abréviations	VII
Résumé	VIII
ملخص	IX
Abstract	X

Introduction	1
--------------------	---

1^{ère} Partie : Partie bibliographique

Chapitre I : Les souches bactériennes

I- <i>Escherichia coli</i>	6
1- Historique	6
2- Description et habitat	6
3- Classification taxonomique	7
4- Caractéristiques biochimiques	8
II- <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1- Historique	9
2- Description et habitat	9
3- Classification taxonomique	10
4- Caractéristiques biochimiques	11
III- <i>Bacillus subtilis</i>	12
1- Historique.....	12
2- Description et habitat	12
3- Classification taxonomique.....	13
4- Caractéristiques biochimiques	14
IV- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1- Historique.....	15
2- Description et habitat	15
3- Classification taxonomique.....	16
4- Caractéristiques biochimiques	17

Chapitre II : Antibiorésistance

1- Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques	19
1-1 Définition microbiologique	19
1-2 Définition clinique	19
1-3 Définition génétique	19
2- Origine de l'Antibiorésistance	19
2-1 La résistance naturelle	20
2-2 La résistance acquise	20
2-2-1 L'acquisition verticale	20
2-2-2 L'acquisition horizontale	21
2-2-2-1 La transformation	21
2-2-2-2 La transduction	21
2-2-2-3 La conjugaison	22
3- Les causes	22
4- Type de mécanismes d'antibiorésistance	22
4-1 Inactivation enzymatique de l'antibiotique	23
4-2 Modifications ou remplacement des cibles cellulaires des antibiotiques	24
4-3 Pompes à efflux	25
4-4 Perméabilité réduite	25
4-5 Protection de la cible de l'antibiotique	26
4-6 Piégeages de l'antibiotique	26

Chapitre III : Les huiles essentielles

1- Définition	28
2- Modes d'extraction des huiles essentiels	28
2-1 Hydrodistillation	28
2-2 Extraction par fluide supercritique (SFE)	28
2-3 Extraction par micro-ondes	29
2-4 Extraction par ultrasons (UE).....	30
2-5 Extraction par solvant	31
2-6 Enfleurage	31
2-7 Extraction par pression à froid	31
3- Localisation de l'huile essentielle	32
4- Propriétés physiques et chimiques	32

5- Propriétés pharmacologiques	33
5-1 Activité antibactérienne	33
5-2 Activité antifongique	33
5-3 Activité antioxydant	34
5-4 Activité antivirale.....	34
6- Effet toxique.....	35

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

Matériel& Méthodes

Première partie

1- Matériel végétal	39
1-1 <i>Syzygium aromaticum</i>	39
1-2 <i>Cinnamomum aromaticum</i>	40
2- Extraction des huiles essentielles	41
2-1 Mode opératoire	41
2-2 Traitement de l'extrait.....	41
2-3 Calcul du rendement d'extraction	42

Deuxième partie

1-Confirmation des souches bactériennes référenciées à testées	43
1-1 Les souche bactérienne référenciées	43
1-2 Coloration de Gram	43
2-Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	44
2-1 Préparation de l'inoculum.....	44
2-2 Méthode de diffusion sur gélose (Aromatogramme)	44
2-3 Détermination des CMI et des CMB par la méthode de micro-dilution	45
2-4 Etude de la synergie	46

Résultats &Discussion

Première partie

1- Rendement en huile essentielle	49
2- Evaluation de l'activité antibactérienne.....	51
2-1 Activité antibactérienne	52

2-1-1 Méthode de diffusion sur gélose (Aromatogramme)	52
2-1-2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)	55
3- Etude de la synergie	60
Conclusion	61
Références bibliographiques	63

Liste des illustrations

Liste des figures

Partie Bibliographique

Figure 1.1 : Schéma structural d' <i>E. coli</i>	7
Figure 1.2 : Schéma structural de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Figure 1.3 : Schéma structural et cycle de sporulation de <i>Bacillus subtilis</i>	13
Figure 1.4 : Schéma structural de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
Figure 1.5 : Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques.	21
Figure 1.6 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques d'une bactérie Gram négative.	23
Figure 1.7 : Schéma d'extraction par hydrodistillation.	29
Figure 1.8 : Schéma d'extraction par fluide supercritique (ESF)	29
Figure 1.9 : Schéma d'extraction par micro-onde.....	30
Figure 1.10 : Extraction par Ultrasons (UA) : bac et sonde.....	30
Figure 1.11 : Extraction par pression à froid.....	32

Partie Expérimentale

Figure 2.1 : Les Boutons de <i>S. aromaticum</i>	39
Figure 2.2 : Tuyaux de <i>C. aromaticum</i>	41
Figure 2.3 : Dispositif d'hydro-distillation lors d'extraction des huiles essentielles.	42
Figure 2.4 : Huile essentielle avant décantation.....	42
Figure 2.5 : Rendement en huiles essentielle de <i>Cinnamomum aromaticum</i> et <i>Syzygium aromaticum</i>	49
Figure 2.6 : Aromatogramme des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Cinnamomum aromaticum</i>	53
Figure 2.7 : Aromatogramme des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	54
Figure 2.8 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Cinnamomum aromaticum</i> vis-à-vis de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 et <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	57

Figure 2.9 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i> ATCC 8739 et <i>S. aureus</i> ATCC 6528.	59
---	----

Liste des tableaux

Partie Bibliographique

Tableau 1.1 : Classification taxonomique d' <i>E. coli</i>	7
Tableau 1.2 : Caractéristiques biochimiques d' <i>E. coli</i>	8
Tableau 1.3 : Classification taxonomique de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Tableau 1.4 : Caractéristiques biochimiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Tableau 1.5 : Classification taxonomique de <i>Bacillus subtilis</i>	13
Tableau 1.6 : Caractéristiques biochimiques de <i>Bacillus subtilis</i>	14
Tableau 1.7 : Classification taxonomique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
Tableau 1.8 : Caractéristiques biochimique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17

Partie Expérimentale

Tableau 2.1 : Observation microscopique des souches bactériennes	51
Tableau 2.2 : Halos d'inhibition* en (mm) (moyenne $\pm$ écart type) provoqués par les huiles essentielles testées	52
Tableau 2.3 : CMI et CMB des deux huiles essentielles testées, nécessaires pour l'inhibition totale de la croissance bactérienne in vitro, exprimée en solution $\mu\text{l/ml}$ ($n = 3$).....	55
Tableau 2.4 : Indices de concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) d'huiles essentielles de <i>Cinnamomum aromaticum</i> et <i>Syzygium aromaticum</i>	60

‰: Pourcentage

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosine-Triphosphate.

ATPase: Enzymes adénosine triphosphatases

ADP: Adénosine Diphosphate

B.: *Bacillus*

C. aromaticum: *Cinnamomum aromaticum*

C. albicans: *Candida albicans*

CMB : Concentration minimale bactericide

CFI : Concentration minimale inhibitrice

CMV : CytomégaloVirus

CLSI: The Clinical and Laboratory Standards Institute

CFI : L'indice de concentration fractionnelle inhibitrice

DL50 : Doses létale 50

E. coli : *Escherichia coli*

ESF : Extraction par fluide supercritique

H : Heure

HEs : Huiles essentielles

H₂S : Sulfure d'hydrogène, ou hydrogène sulfuré

MR : Rouge de méthyle

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

Na₂SO₄ : Le sulfate de sodium

NaCl: Chlorure de sodium.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

OF : Oxyatif / Fermentatif

P. : *Pseudomonace*

P/P : poids/poids

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. aromaticum: *Syzygium aromaticum*

SARV : *Staphylococcus aureus* résistantes a vancomycine

SARM : *Staphylococcus aureus* résistants a méthicilline

THG : Transfer horizontal de gènes

UE : Extraction par Ultrasons

UFC : Unité Formant Colonie

VP : Vogus proskur

La présente étude a investigué l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de *Cinnamomum aromaticum* et *Syzygium aromaticum* (seules et en combinaison) contre quatre souches bactériennes de référence (*E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6528, *Bacillus subtilus* ATCC6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027). Les souches ont été obtenues auprès du laboratoire de microbiologie de la Faculté des sciences de la vie et de la nature de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret. L'hydrodistillation a été utilisée pour extraire les huiles essentielles. La méthode de diffusion sur gélose (disque de papier) a été utilisée pour établir rapidement la sensibilité des souches bactériennes de référence à tester aux huiles essentielles étudiées. Cependant, l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été testée par 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 obtenues par la méthode de diffusion sur gélose ont varié de 31mm à 36.33 mm pour l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* et de 14 mm à 17mm pour celle de *Syzygium aromaticum*. Les CMI d'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* vis-à-vis des souches bactériennes testées ont été de 1.25 µl/ml avec une CMB de 5µl/ml vis-à-vis d'*E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6528 et de plus de 10 µl/ml à l'égard des deux autres souches bactériennes testées. Alors que l'HE de *S. aromaticum* a affiché des CMI de 10µl/ml vis-à-vis de *Bacillus subtilus* ATCC6633 et de 20µl/ml à l'égard des autres souches testées. En revanche des CMB de plus de 40µl/ml ont été affichés pour cette huile essentielle. L'association des deux huiles essentielles a révélé un effet indifférent à l'égard des quatre souches testées avec un indice de concentration fractionnelle inhibitrice allant de 1.125 à 2.25. Cette étude permet de déduire que l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* présente un potentiel antimicrobien supérieur par rapport à celle de l'huile essentielle *Syzygium aromaticum* et que la combinaison de ces deux huiles essentielles à indiquer un effet indifférent à l'égard des quatre souches testées. Ces résultats pourraient contribuer au développement de nouvelles stratégies pour lutter contre les résistances bactériennes.

Mots clés : Activité antibactérienne, huiles essentielles, CMI, CMB, *Cinnamomum aromaticum*, *Syzygium aromaticum*, méthode de diffusion sur gélose, méthode de microdilution, méthode de damier.

هدفت الدراسة الى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية المستخرجة من نبات القرفة والقرنفل (بشكل منفردة ومشتراك) ضد أربع سلالات بكتيريا مرجعية (*E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC6528, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC9027). تم الحصول على سلالات من مخبر الأحياء الدقيقة التابع لكلية علوم الطبيعة والحياة لجامعة ابن خلدون تيارت. تم استخدام التقطير المائي لاستخراج الزيوت الأساسية. اما اختبار الحساسية الأولية للزيوت الأساسية المدروسة فقد بطريقة الانتشار على القرص الورقي (القرص الورقي) وطريقة التخفيف الجزئي لتحديد قيمة التركيز الأدنى المثبط والحد الأدنى من تركيز المبيد للجراثيم. تم تقييم تأثير الجمع بين الزيتين الأساسيين باستخدام طريقة رقعة الشطرنج.

تراوحت مناطق التنشيط من خلال طريقة الانتشار على القرص الورقي من 31 مم إلى 36.33 مم للزيت الأساسي للقرفة ومن 14 مم إلى 17 مم للزيت الأساسي للقرنفل. سجل الزيت الأساسي للقرفة تركيز الأدنى المثبط قيمة قدرها 1.25 ميكرو لتر/مل ضد كل سلالات البكتيريا المختبرة، كما وصلت قيمة الحد الأدنى من تركيز مبيد للجراثيم 5 ميكرو لتر/مل اتجاه *Staphylococcus* ATCC 6528 و *E. coli* ATCC 7839 وتجاوز 10 ميكرو لتر/مل ضد باقي السلالات المرجعية التركيز. بينما كانت القيمة التركيز الأدنى المثبط للزيت الأساسي للقرنفل ب 10 ميكرو لتر/مل تجاه *Bacillus subtilis* ATCC6633 وبأكثر من 20 ميكرو لتر/مل ضد السلالات الأخرى. في حين بلغت قيمة الحد الأدنى من تركيز المبيد للجراثيم أكبر من 40 ميكرو لتر/مل.

اما بالنسبة لتأثير المزج بين الزيتين، فقد اظهر نتائج غير تأزري (تأثير غير متفاعل) اتجاه جميع السلالات البكتيريا المدروسة مع مؤشر تركيز مثبط كسري تراوح قدره ما بين 1.125 و 2.25. يستخلص من هذه الدراسة بان الزيت الأساسي لنبات القرفة يتمتع بقوة مضادة للميكروبات أعلى مقارنة بالزيت الأساسي للقرنفل. كما تظهر هذه الدراسة تأثيرا غير تفاعلي ضد أربع سلالات بكتيريا مرجعية.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للبكتيريا، الزيوت العطرية، التركيز الأدنى المثبط، الحد الأدنى من تركيز المبيد للجراثيم، القرفة، القرنفل، طريقة الانتشار على القرص الورقي، طريقة التخفيف الجزئي، طريقة الشطرنج.

The present study investigated the antibacterial activity of essential oils extracted from *Cinnamomum aromaticum* and *Syzygium aromaticum* (alone and in combination) against four reference bacterial strains (*E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6528, *Bacillus subtilis* ATCC6633, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027). Strains were obtained from the laboratory of Microbiology - the Faculty of Life and Nature Sciences, Ibn Khaldoun University of Tiaret. Hydrodistillation was used to extract essential oils. The agar diffusion method (paper disc) was used to establish, in a rapid manner, the sensitivity of the reference bacterial strains to be tested, which was then determined using the micro-dilution method to identify the essential oils studied. However, the antibacterial activity of essential oils was determined using the micro-dilution method to identify 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 obtained by agar diffusion method varied from 31 mm to 36.33 mm for *Cinnamomum aromaticum* essential oil and from 14 mm to 17 mm for *Syzygium aromaticum* essential oil. The MICs of *Cinnamomum aromaticum* essential oil against all tested strains were 1.25 µl/ml with a CMB of 5µl/ml against *E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6528 and more than 10 µl/ml against the other two bacterial strains tested. The EO of *S. aromaticum* displayed MICs of 10 µl/ml against *Bacillus subtilis* ATCC6633 and 20 µl/ml against the other strains tested. On the other hand, CMBs of more than 40 µl/ml were displayed for this essential oil. The checkerboard method revealed an indifferent effect on four strains tested, with a fractional inhibitory concentration index ranging from 1.125 to 2.25. This study allows us to deduce that *Cinnamomum aromaticum* essential oil has a superior antimicrobial potential compared to *Syzygium aromaticum* essential oil and that the combination of these two essential oils indicated an indifferent effect with regard to the four strains tested. These results could contribute to the development of new strategies to combat bacterial resistance.

Keywords: Antibacterial activity, essential oils, CMI, CMB, *Cinnamomum aromaticum*, *Syzygium aromaticum*, agar diffusion method, microdilution method, checkerboard method.

Introduction

De nos jours, l'un des problèmes sanitaires majeur émergeant et grave est la résistance aux antibiotiques. Cette résistance a rendu le traitement des infections bactériennes de plus en plus difficile en raison du transfert possible de gènes de résistance entre les souches animales et humaines (**Afema et al., 2019**). La recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens sont devenus une nécessité urgente pour le clinicien (**Vasconcelos et al., 2018**).

Les produits naturels et leurs composés constituent la source la plus productive pour le développement de nouveaux médicaments (**Rocha et al., 2005**). Ces produits naturels possèdent diverses propriétés thérapeutiques, telles que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne et antifongique...etc (**Dziri et al., 2014**).

Les huiles essentielles constituent des sources potentielles de composés naturels. Ils exercent une activité antimicrobienne, antiseptique, anti-inflammatoire et antioxydante. Ces composés aromatiques sont décrits comme une combinaison de constituants volatils produits comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques (**Ferreira et al., 2021**).

Des études antérieures ont montré l'activité antimicrobienne des extraits de ces plantes à l'égard des bactéries pathogènes Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) et Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) (**Prabuseenivasan et al., 2006**).

Cependant, des travaux restreints sur l'activité synergétique de ces extraits ont été réalisés. Toutefois, des études approfondies de ces interactions pourraient offrir des stratégies pour réduire les concentrations efficaces des agents antimicrobiens et potentiellement atténuer le développement de mécanismes de résistance bactérienne (**Zengin et al., 2014**).

Syzygium aromaticum (clou de girofle) et *Cinnamomum aromaticum* (cannelle) sont parmi les plantes médicinales les plus utilisées dans le monde, en raison de leur richesse en composés bioactifs et de leurs potentiels effets thérapeutiques. Elles sont traditionnellement exploitées pour leurs propriétés organoleptiques et leurs effets pharmacologiques, incluant des activités antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire (**Purkait et al., 2020**).

Ces activités sont liées principalement aux métabolites secondaires spécifiques, le cinnamaldehyde et l'eugénol, principaux constituant des huiles essentielles de *Cinnamomum aromaticum* et de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, respectivement (**Marchese et al., 2017**).

Le cinnamaldehyde et l'eugénol impliquent dans leurs mécanismes d'action pharmacologique : la perturbation de la perméabilité et de la fonctionnalité des membranes cellulaires, l'inhibition de l'activité d'enzymes clés, ainsi que l'altération de la structure tridimensionnelle et de la fonction des protéines bactériennes (**Marchese et al., 2017**).

Le présent travail a été réalisé dans le but de valoriser les huiles essentielles de deux plantes médicinales à savoir le *Cinnamomum aromaticum* (cannelle) et *Syzygium aromaticum* (clou de girofle). Il avait tracé les objectifs suivants :

- Déterminer le rendement des huiles essentielles *Cinnamomun aromaticum* et *Syzygium aromaticum* extraites par hydrodistillation ;
- Déterminer la sensibilité de quatre souches référenciées à savoir (*E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6528, *Bacillus subtilis* ATCC6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027) aux huiles essentielles de *Cinnamomum aromaticum* et *Syzygium aromaticum*;
- Déterminer la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide des huiles essentielles étudiées ;
- Déterminer l'activité bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles étudiées ;
- Evaluer l'activité synergique de ces deux huiles essentielles vis-à-vis de quatre souches référenciées à savoir ; *E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6528, *Bacillus subtilis* ATCC6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027.

Partie *Bibliographique*

Chapitre I :
Les souches
bactériennes

I- *Escherichia coli*

1- Historique

En 1885, le pédiatre allemand Theodor Escherich a initialement identifié la bactérie coli commune, une bactérie commensale Gram négatif de la flore intestinale. Renommée ultérieurement *Escherichia coli* (*E. coli*) en son honneur, cette bactérie a été reconnue comme pathogène en 1935 lors d'une épidémie de gastro-entérite infantile sévère. Depuis, *E. coli* a fait l'objet d'intenses recherches dans de multiples domaines : sérologie, résistance aux antibiotiques, biologie moléculaire, etc (**Mare et al., 2021**).

2- Description et habitat

E. coli est l'organisme modèle de procaryote le plus étudié. Il peut survivre longtemps dans les matières fécales, le sol et l'eau, et est fréquemment utilisé comme organisme indicateur de contamination de l'eau. Pendant 2 à 3 jours, la bactérie se multiplie rapidement dans les matières fécales fraîches en conditions aérobies, mais son nombre diminue progressivement par la suite.

E. coli est une bactérie Gram négative, droite, non sporulée, non acido-résistante. C'est un bacille qui existe seul ou par paire. Les cellules sont généralement en forme de bâtonnet, avec une taille de 1 à 3 μm (**Basavaraju et Gunashree, 2022**).

C'est une bactérie mobile grâce à la disposition des flagelles péritriches (figure1.1). Cependant, très peu de souches sont immobiles. La croissance optimale d'*E. coli* se produit à 37 °C, mais certaines souches de laboratoire peuvent se multiplier à des températures allant jusqu'à 49 °C. Il ne faut que 20 minutes pour qu'il se reproduise dans des conditions favorables (**Basavaraju et Gunashree, 2022**).

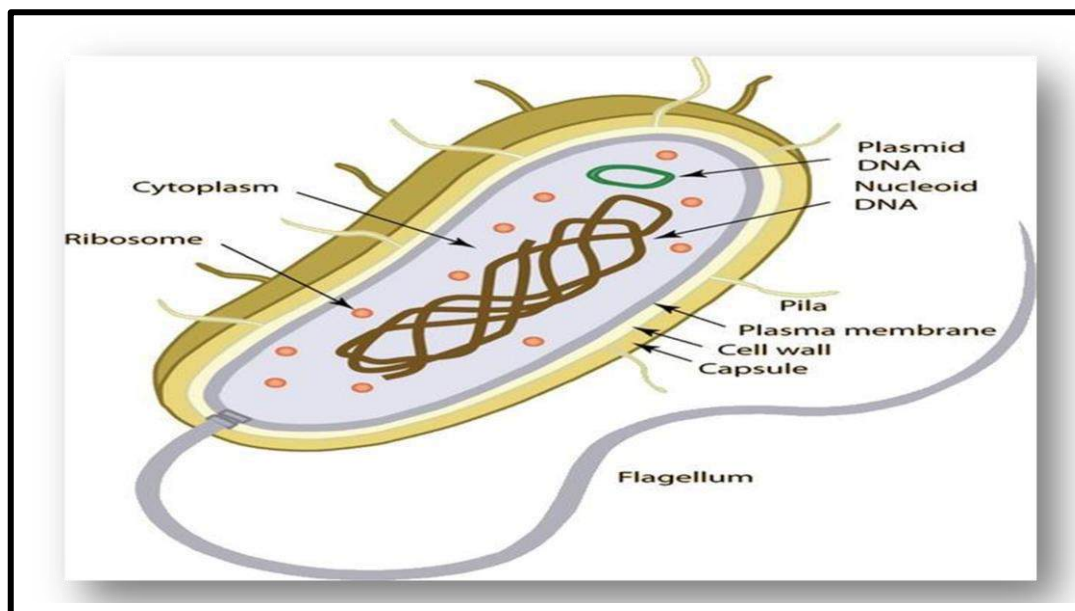


Figure 1.1 : Schéma structural d'*E. coli* (Basavaraju et Gunashree, 2022).

3- Classification taxonomique

Le tableau 1.1 résume la classification taxonomie d'*E. coli*

Tableau 1.1 : Classification taxonomique d'*E. coli* (Gupta *et al.*, 2022).

Domaine	Bactéries
Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Enterobacterales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)

4- Caractéristiques biochimiques

Le tableau ci-dessous regroupe les caractéristiques biochimiques d'*E. coli*.

Tableau 1.2 : Caractéristiques biochimiques d'*E. coli* (Gupta *et al.*, 2022).

Coloration de Gram	Négatif
Mobilité	Mobile
Forme	Bâtonnets
Capsule (Capsulée/Non capsulée)	Variable
Flagelles	Flagellés
Catalase	+
Oxydase	-
MR (rouge de méthyle)	+
VP (Vogus proskur)	-
OF (oxydatif/fermentatif)	Fermentatif
Indole	+
Citrate de Simmon	-
Uréase	-
Réduction du nitrate	+
Glucose	+
Lactose	+
Mannitol	+
Sorbitol	+
Saccharose	Variable

« + », réaction positive ; « - », réaction négative

II- *Staphylococcus aureus*

1- Historique

C'est à Aberdeen, en Écosse, que *Staphylococcus aureus* a été identifié pour la première fois en 1880. Le chirurgien Sir Alexander Ogston, examinant au microscope le pus d'abcès humains, remarqua des amas bactériens évoquant des grappes de raisin et les nomma *Staphylococcus* (du grec signifiant <<< grappe de raisin >>). En 1884, Rosenbach réussit à isoler et cultiver ces bactéries, les baptisant *Staphylococcus aureus* en référence à la couleur jaune-orangé, ou « dorée » (du latin aureus), de leurs colonies (**Melles, 2008**).

2- Description et habitat

Les staphylocoques sont des bactéries commensales que l'on retrouve sur la peau et les muqueuses des mammifères et des oiseaux. Le site de prédilection de *Staphylococcus aureus* chez l'être humain est la muqueuse nasale, où il est présent chez 10 à 40% des personnes (un portage intermittent est estimé à 60%) (<https://www.ctcb.com>).

Les staphylocoques se distinguent par leur morphologie de cocci Gram positif et leur réaction positive à la catalase. D'une taille comprise entre 0.5 et 1.5 μm (figure 1.2), ces bactéries sont non mobiles et incapables de former des spores. La plupart ne possèdent pas de capsule. Leur mode de division particulier, s'effectuant dans trois plans perpendiculaires, conduit à une diversité d'arrangements cellulaires : on peut les observer isolées, par paires, en courtes chaînes ou regroupées de manière désordonnée, formant des amas qui évoquent visuellement des grappes de raisin. La culture de *Staphylococcus aureus* est aisée sur des milieux standards (bouillon ou gélose simple) à pH 7 et à une température de 37°C, donnant naissance, après 18 à 24 heures d'incubation, à des colonies aux caractéristiques bien définies : rondes, lisses et brillantes (**Santos et al., 2007**).

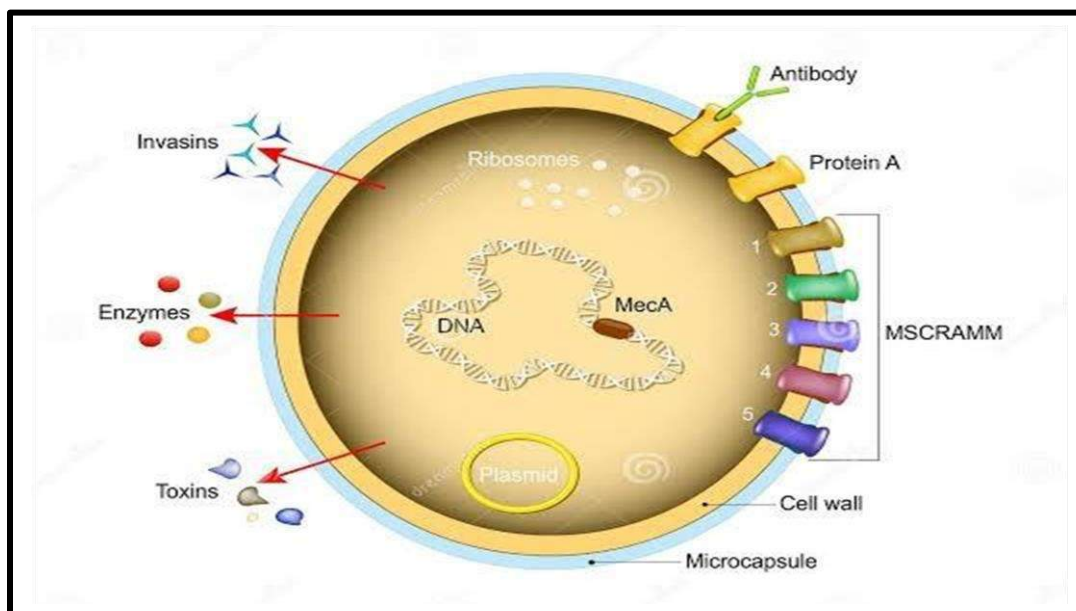


Figure 1.2 : Schéma structurel de *Staphylococcus aureus*
(Nappi et Avtaar Singh., 2023).

3- Classification taxonomique

La classification taxonomie de *S. aureus* selon Delarras (2007) est représenté dans le tableau 1.3

Tableau1.3 : Classification taxonomique de *Staphylococcus aureus*.

Règne	Bactérie
Division	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilles</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

4- Classification biochimique

Les caractéristiques biochimiques de *Staphylococcus aureus* sont regroupé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1.4 : Caractéristiques biochimiques de *Staphylococcus aureus* (Chowdhury *et al.*, 2013).

Tests	Caractéristiques
Coloration de Gram	+
Motilité	-
Croissance aérobie	+
Croissance anaérobie	+
Test O-F	Fermentatif
Utilisation des sucres :	
Glucose	+
Lactose	+
Saccharose	+
Mannitol	+
Test d'oxydase	-
Test de catalase	+
Test MR	+
Test VP	+
Test d'indole	-
Production de H₂S	+
Test de citrate	+
Test d'uréase	+

« + », réaction positive ; « - », réaction négative

III- *Bacillus subtilis*

1- Historique

Cette bactérie a été nommée pour la première fois par *Vibrio subtilis* par Christian Gottfried Ehrenberg en 1835 en référence à la mobilité de ses cellules. Ce n'est qu'en 1872 que Ferdinand Julius Cohn, microbiologiste et botaniste, la reclassée et renommée *Bacillus subtilis* tout en découvrant sa capacité à produire des spores résistantes à la chaleur (Stülke *et al.*, 2023).

2- Description et habitat :

C'est une bactérie ubiquiste des milieux terrestres et aquatiques, *Bacillus subtilis* se dissémine aisément grâce à ses spores résistantes formées en conditions de stress, rendant difficile la localisation de ses sites de croissance primaires. Bien que souvent associée au sol, elle prolifère principalement à proximité de matière organique en décomposition et peut former des biofilms bénéfiques sur les racines des plantes, favorisant leur croissance et les protégeant. Sa présence dans le système digestif animal résulte probablement de l'ingestion de végétaux (Earl *et al.*, 2008).

Afin de survivre dans des conditions difficiles, cette bactérie Gram positif se transforme en une spore résistante via un processus appelé sporulation (figure 1.3), généralement induit par une carence nutritionnelle. Ces spores ellipsoïdales, d'une taille de 0.8 à 1.2 μm et aisément putréfiables, présentent une organisation structurale sophistiquée, incluant une enveloppe externe protectrice, un double peptidoglycane (cortex et paroi germinale), et un centre (noyau) faiblement hydraté renfermant le matériel génétique et les machineries métabolique et biosynthétique spécifiques à la spore (Zhang *et al.*, 2020).

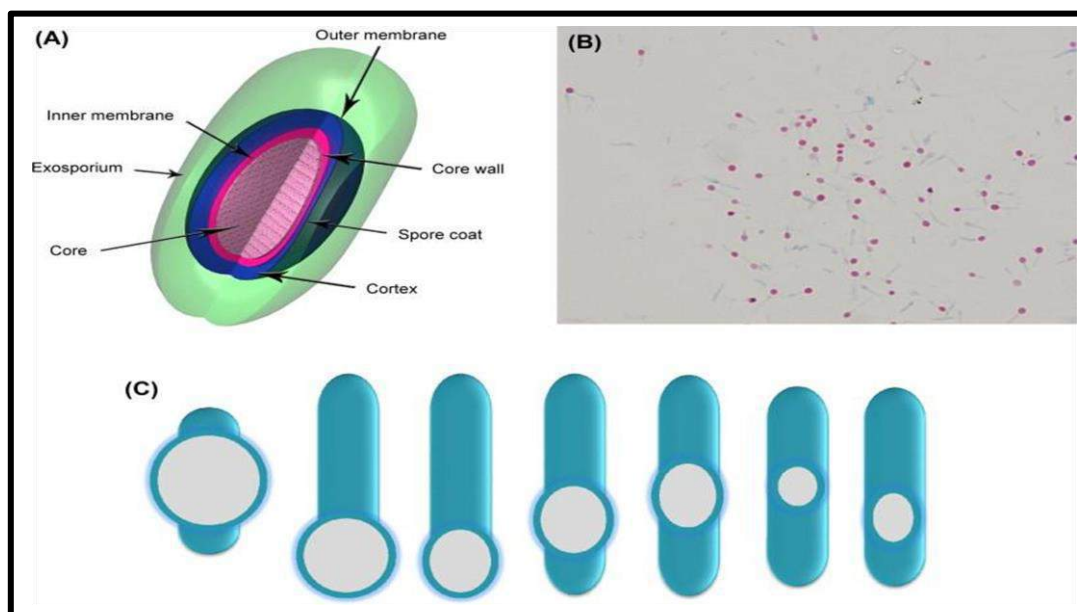


Figure 1.3 : Schéma structural et cycle de sporulation de *Bacillus subtilis* (Zhou et Li, 2015).

3- Classification taxonomique

Le tableau 1.5 résume la taxonomie de *Bacillus subtilis* selon Errington et Aart (2020).

Tableau1.5 : Classification taxonomique de *Bacillus subtilis*.

Règne	Bactérie
Division	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>
Espèce	<i>Subtilis</i>

4- Classification biochimique

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques biochimiques de *Bacillus subtilis*.

Tableau 1.6 : Caractéristiques biochimiques de *Bacillus subtilis* (Jha *et al.*, 2016).

Tests	Résultats
Coloration de Gram	Gram+
Forme de la cellule	Bâtonnets courts
Formation de spores	+
Motilité	+
Croissance anaérobie	-
Catalase	+
Tests VP	+
NO, réduction	+
Utilisation de citrate	+
Production d'indole	+
Hémolyse	+
Fermentation des glucides (production d'acide)	
Glucose	+
Arabinose	-
Xylose	-
Mannose	+
Production d'enzymes	
Protéinase	+
Gélatinase	+
Amylase	+
Chitinase	-

« + », réaction positive ; « - », réaction négative

IV- *Pseudomonas aeruginosa***1- Historique**

Elle a été identifiée pour la première fois en 1882 par Carle Gessard sur des plaies infectées de soldats dont les pansements étaient colorés en bleu et vert. Ce n'est qu'en 1894 que Walter Migula a formalisé la classification de ces bactéries Gram-négatives en proposant le genre *Pseudomonas* (Moore et Flaws, 2011).

2- Description et habitat

Pseudomonas aeruginosa, également appelée bacille pyocyanique, est une bactérie Gram négative aérobique stricte, mobile grâce à un flagelle polaire et de petite taille (1 à 3 µm de long et 0.5 à 1 µm de large) (figure 1.4). Caractérisée par sa production de pigments (typiquement vert fluorescent via la pyoverdine et la pyocyanine, mais existant aussi en rouge ou noir), elle possède un vaste génome complexe et une forte capacité d'évolution et d'acquisition de résistance aux antibiotiques par mutations et transferts génétiques. Ubiquitaire dans les milieux humides (piscines, douches, etc.) et les environnements hospitaliers (humidificateurs, circuits d'eau, antiseptiques, etc.), sa transmission nosocomiale se fait principalement par manuportage et matériel contaminé (Morand et Morand, 2017).

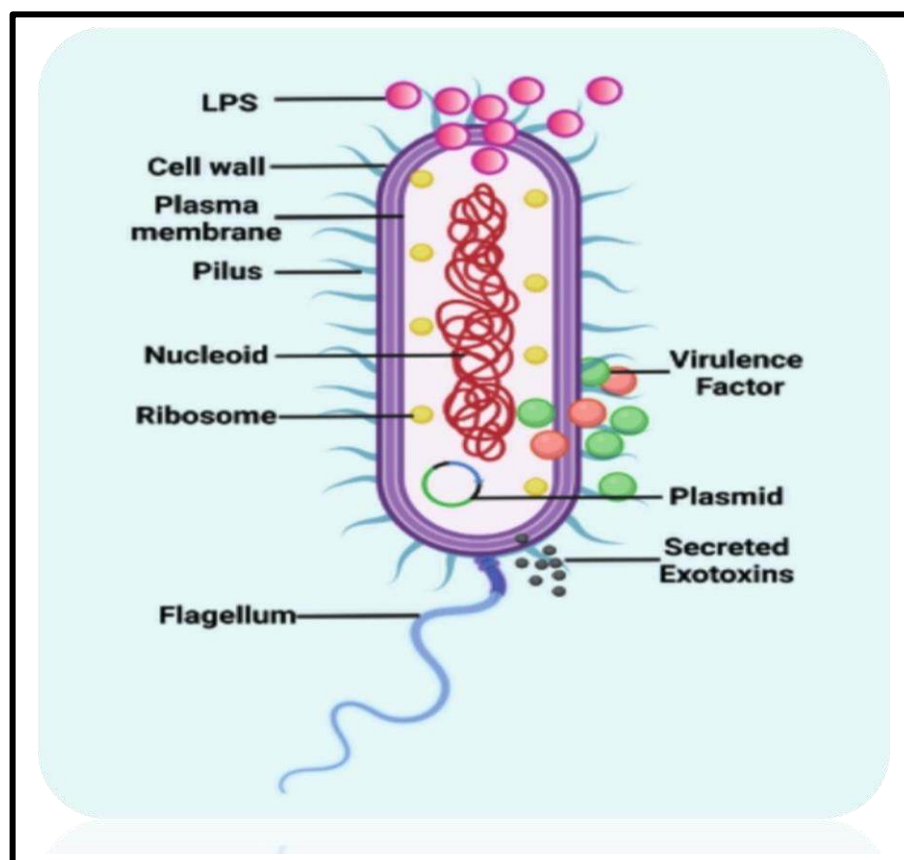


Figure 1.4 : Schéma structural de *Pseudomonas aeruginosa* (Anjum *et al.*, 2023).

3- Classification taxonomique

Le tableau ci-dessous résume la classification taxonomique de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 1.7 : Classification taxonomique de *Pseudomonas aeruginosa* (Diggle et Whiteley, 2020).

Règne	Monera
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Sous-division gamma</i>
Ordre	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

4- Classification biochimique

Le tableau 1.8 résume les caractéristiques biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* (Magdy *et al.*, 2014).

Tableau 1.8 : Caractéristiques biochimique de *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactérie	<i>P. aeruginosa</i>
Coloration de Gram	-
Pigment	+
Motilité	+
Oxydase	+
Catalase	+
Production de H ₂ S	-
Uréase	-
Citrate	+
TSI	K/K
Production d'indole	-
Voges Proskauer	-
Rouge de méthyle	-
Liquéfaction de la gélatine	<i>V</i>
Test O/F glucose	<i>0</i>
Test O/F lactose	-
Glucose	+
Saccharose	-
Mannitol	-
Lactose	-

« + », réaction positive ; « - », réaction négative ; K/K alcalin/alcalin ***V* variable

Chapitre II :
Antibiorésistance

1- Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance aux antimicrobiens est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se recoupent pas forcément. Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*) (**Muylaert et Mainil, 2012**).

1-1 Définition microbiologique

Une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice (**Bonnet, 2014**). Autrement ; une souche est dite résistante lorsqu'elle se développe en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées (**Muylaert et Mainil, 2012**).

1-2 Définition clinique

Une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place (**Muylaert et Mainil, 2012 ; Bonnet, 2014**).

Il est important de noter que la résistance clinique peut être influencée par d'autres facteurs tels que la localisation de l'infection, la posologie et le mode d'administration de l'antibiotique, ainsi que l'état du système immunitaire du patient (**Muylaert et Mainil, 2012**).

Dans certaines situations, l'antibiotique peut ne pas atteindre le site infectieux en concentration suffisante pour être efficace, ce qui peut donner l'impression d'une résistance alors qu'il s'agit plutôt d'un problème de distribution du médicament (**Muylaert et Mainil, 2012**).

1-3 Définition génétique

L'antibiorésistance est un phénomène dans lequel les bactéries acquièrent la capacité de survivre en présence d'antibiotiques, principalement par le transfert horizontal de gènes (THG), un processus clé dans la dissémination des gènes de résistance dans les écosystèmes microbiens. Ce transfert se fait via trois mécanismes principaux (transformation, transduction et conjugaison) permettant ainsi aux bactéries de s'adapter rapidement aux pressions antibiotiques et de propager la résistance dans divers environnements (humains, animaux et environnementaux) (**Wintersdorff et al., 2016**).

2- Origine de l'antibiorésistance

On cite classiquement deux types de résistance : résistance naturelle et la résistance acquise.

2-1 La résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque désigne la capacité toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien à résister à la présence d'un antibiotique donné. Habituellement, le support de cette résistance est chromosomique (Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001). Elle est due à la présence de gènes spécifiques. Elle se manifeste par des modifications structurelles ou métaboliques qui empêchent l'action des antibiotiques. L'expression de ces gènes de résistance peut être constante ou déclenchée en réponse à un signal, permettant ainsi à la bactérie de contrer l'effet de l'antibiotique (Bouyahya *et al.*, 2017).

Ces mécanismes de résistance sont spontanés et assez constants. L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à (Muylaert et Mainil, 2012) :

- 1- Un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne (par exemple, la faible affinité de l'acide nalidixique pour la gyrase des entérocoques) ;
- 2- Une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (imperméabilité de la membrane externe des bactéries Gram négatives aux glycopeptides comme la vancomycine) ;
- 3- Une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques (résistance aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux quinolones chez *Pseudomonas aeruginosa*, ou encore ;
- 4- Une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (la production d'une bêta-lactamase AmpC chez certains membres de la famille *Enterobacteriaceae*).

2-2 La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes (Guinoiseau, 2010). C'est une propriété de souche. Cette résistance correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce (Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001). On décrit deux phénomènes majeurs à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale du matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012). Ces processus permettent aux bactéries d'échanger des informations génétiques, ce qui leur confère une grande capacité d'adaptation aux divers environnements dans lesquels elles vivent (Bouyahya *et al.*, 2017).

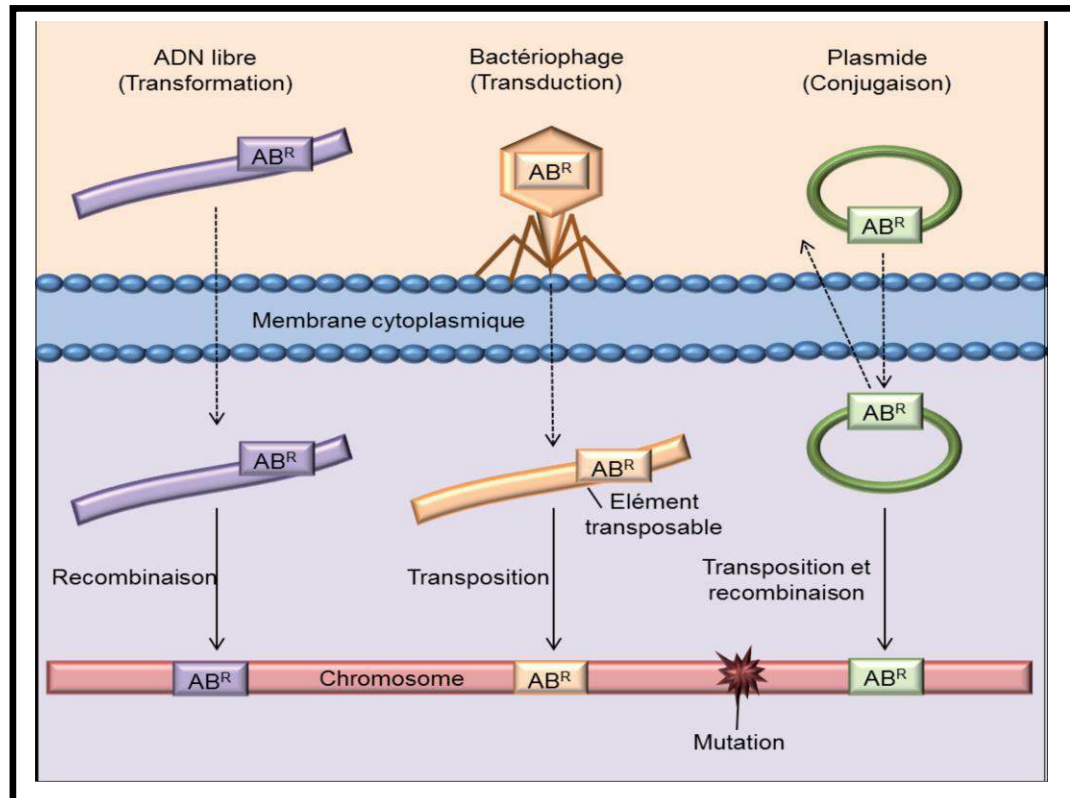
2-2-1 L'acquisition verticale

Une bactérie peut devenir résistante à un antibiotique par mutation survenant au niveau du gène codant pour la cible de l'antibiotique au sein du chromosome (Muylaert et Mainil,

2012). Elle représente 10 à 20% de la résistance rencontrée chez les bactéries isolées en clinique (Ferron, 1994).

2-2-2 L'acquisition horizontale (figure 1.5)

Elle est basée sur la transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries (Guinoiseau, 2010). Elle représente de 80 à 90% des résistances rencontrées chez les bactéries isolées en clinique (Ferron, 1994).



AB^R : Gène de résistance à un antibiotique.

Figure 1.5 : Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques, d'après (Aleksun et Levy, 2007).

2-2-2-1 La transformation

C'est l'acquisition d'un matériel génétique étranger par incorporation de segments d'ADN libre dans leur chromosome (Muylaert et Mainil, 2012).

2-2-2-2 La transduction

C'est le transfert lors d'une infection par un bactériophage ; qui utilise son équipement moléculaire spécialisé ; pour insérer de l'ADN bactérien dans les bactéries receveuses (Bonnet, 2014).

2-2-2-3 La conjugaison

C'est la méthode de transmission la plus fréquente. Ce transfert nécessite un contact physique entre deux bactéries. Un pont cytoplasmique se met alors en place et les bactéries peuvent échanger leur plasmide porteur de résistance (**Ferron, 1994 ; Bonnet, 2014**).

En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gène, comme par exemple les événements conduisant à l'élargissement du spectre des bêta-lactamases ou qui leur confèrent une résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

3- Les causes

- L'utilisation excessive et inappropriée des antibiotiques est le principal moteur de l'émergence et de la persistance des souches bactériennes résistantes. Par ailleurs, l'environnement (sols, sédiments, milieux aquatiques, faune sauvage et même certaines espèces végétales), en particulier lorsqu'il est contaminé par des polluants tels que les métaux lourds, les biocides ou les résidus médicamenteux, pourrait jouer un rôle de réservoir et/ou de catalyseur dans la propagation de ces bactéries résistantes (**Gouvernement et al., 2021**).

Les prescriptions d'antibiotiques sont couramment utilisées pour traiter les infections humaines, mais leur usage s'étend aussi à l'agriculture, ce qui affecte le microbiome environnemental. Une grande partie des antibiotiques administrés aux animaux est rejetée dans l'environnement par les excréments, contribuant ainsi à la propagation de la résistance bactérienne. De plus, les arbres fruitiers sont traités avec des antibiotiques, ce qui, bien que représentant une faible proportion de leur utilisation globale, peut avoir un impact environnemental significatif (**Nadgir et al., 2023**).

L'exposition des micro-organismes environnementaux aux substances antimicrobiennes favorise le développement de résistances, modifiant ainsi l'équilibre écologique. Par ailleurs, l'usage excessif de produits antibactériens dans l'hygiène quotidienne réduit la capacité du système immunitaire à développer une réponse efficace contre les agents pathogènes, ce qui pourrait accroître les risques d'infections plus graves (**Nadgir et al., 2023**).

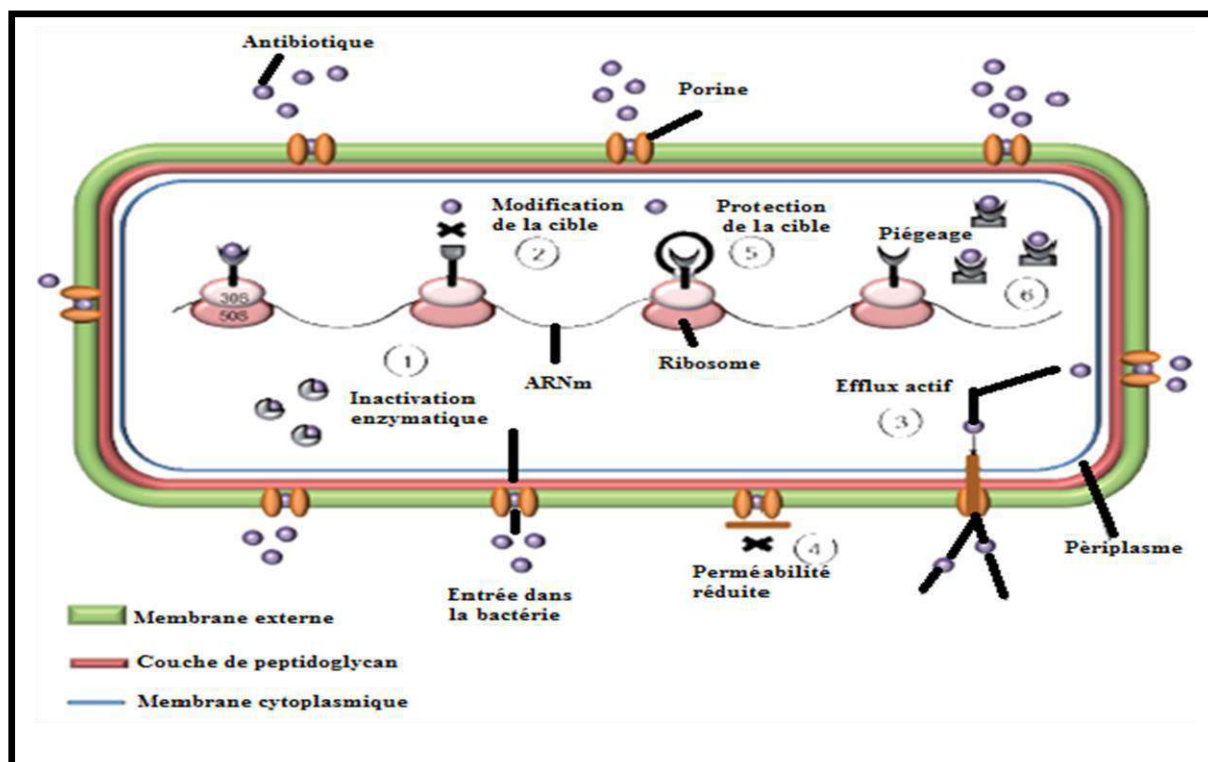
La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron *vanA*, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (**Noble et al., 1992 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Guinoiseau, 2010**).

4- Types de mécanismes d'antibiorésistance

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées

contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances (figure 1.6) (Guinoiseau, 2010 ; Muylaert et Mainil, 2012).

Aux niveaux physiologique et moléculaire, la résistance bactérienne est la résultante de trois phénomènes : la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique par diminution de la perméabilité membranaire et/ou sur-activation de l'efflux bactérien, l'inactivation des antibiotiques par dégradation ou modification enzymatique et l'altération de leurs cibles cellulaires par modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique ainsi que par piégeage de l'antibiotique (Guinoiseau, 2010).



1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique.

ARNm : acide ribonucléique messager

Figure 1.6 : différents mécanismes de résistance aux antibiotiques d'une bactérie Gram négative (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Ould Amer, 2023).

4-1 Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier les antibiotiques (Wright, 2005 ; Guinoiseau, 2010). Les réactions enzymatiques, conduisant à l'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour macrolides, lincosamides, streptogramines, les tétracyclines et plus récemment

pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

Exemple de réaction enzymatique inactivant les antibiotiques (Fusheng et Wei, 2022) :

- N-acétyltransférase, O-phosphotransférase et O-adenyltransférase altèrent les aminoglycosides par acétylation, phosphorylation ou adénylation.
- Les β -lactamases dégradent les β -lactamines, notamment les pénicillines et céphalosporines ; certaines bactéries, comme *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, produisent des β -lactamases à spectre élargi (ESBL) ou des *carbapénémases*, conférant une résistance avancée.
- Le NAD-dépendantes, inactivent la rifampicine par ADP-ribosylation, compromettant son efficacité contre les bactéries causant la tuberculose et la lèpre.
- Les chloramphénicols acétyltransférases (CATs) empêchent la fixation du chloramphénicol aux ribosomes en l'acétylant.
- Les gènes de résistance, comme *lnu(A)* - *lnu(F)* et *linAN2*, codent les enzymes qui inactivent la lincomycine dans plusieurs bactéries pathogènes.

4-2 Modifications ou remplacement des cibles cellulaires des antibiotiques

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance (**Lambert, 2005 ; Guinoiseau, 2010**). C'est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition d'un gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation (**Guinoiseau, 2010**). Cette altération empêche le médicament de se lier efficacement à sa cible (**Alenazi, 2024**). Ces changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire de la cible (**Guinoiseau, 2010**).

Elle est décrite pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides, aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines chez les bactéries Gram positives (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

Les bactéries Gram positives et Gram négatives peuvent développer une résistance aux quinolones (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012**) et aux fluoroquinolones en raison de mutations dans la région QRDR des enzymes topoisomérase II et IV (**Alenazi, 2024**).

Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprim) et les bêta-lactames dont les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ainsi qu'à toutes les bêtalactames d'usage vétérinaire qui sont un exemple remarquable par la synthèse d'une nouvelle PBP (*Penicillin Binding Protein*) possédant une affinité moindre pour la méthicilline (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

4-3 Pompes à efflux

Connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs. C'est un mécanisme nécessitant de l'énergie. Il est utilisé par les bactéries pour expulser à l'extérieur des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que des antibiotiques et d'autres médicaments. Ces pompes à efflux ont généralement une spécificité de substrats assez large, et seulement certaines d'entre elles confèrent une résistance aux antibiotiques. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible. On classe ces pompes à efflux sur la base de leur spécificité de substrats et de la source d'énergie employée. Certains de ces transporteurs sont très spécifiques et on les appelle pompes SDR (pour *specific-drug- resistance*), alors que d'autres agissent sur une multitude de molécules et on les nomme pompes MDR (pour *multiple-drug-resistance*) (**Muylaert et Mainil, 2012**).

Les antibiotiques de toutes les classes, à l'exception de la polymyxine, sont sensibles à l'activation des systèmes d'efflux (**Kapoor et al., 2017**).

4-4 Perméabilité réduite

Vue la différence dans la composition de la paroi des bactéries gram positives et gram négatives, la perméabilité des antibiotiques s'effectue par une diffusion simple chez les bactéries gram positives (**Muylaert et Mainil, 2012**). Cependant, chez les bactéries gram négatives, la membrane externe agit comme une barrière limitant l'entrée des substances externes, y compris les antibiotiques (**Pagès et al., 2008**). Chez ces derniers, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique (**Muylaert et Mainil, 2012**). La perméabilité réduite est un mécanisme de résistance bactérienne aux antibiotiques, particulièrement observé chez les bactéries à Gram négatif (**Pagès et al., 2008**), plus précisément chez *P. aeruginosa* et les *Enterobacteriaceae*, étant

donné le large spectre d'antibiotiques qu'elle cible. Toutefois, La membrane externe de certaines bactéries telles que *P. aeruginosa* est moins perméable que celle d'autres espèces, ce qui lui confère un niveau moins élevé de sensibilité aux antimicrobiens (Muylaert et Mainil, 2012).

En outre, des mutations au niveau des gènes qui codent pour les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques (cas de la porine OmpF chez *E. coli* entraînant une réduction de sensibilité aux quinolones, aux bêta-lactames, aux tétracyclines et au chloramphénicol). Ce type de phénomène permet d'expliquer la résistance aux aminoglycosides parmi les germes anaérobies facultatifs (les entérocoques et les streptocoques) où la pénétration des aminoglycosides à l'intérieur des cellules bactériennes s'effectuent via un mécanisme de transport dépendant d'un métabolisme aérobie (Muylaert et Mainil, 2012).

4-5 Protection de la cible de l'antibiotique

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ainsi, on ne dénombre pas moins de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome. Les résistances aux fluoroquinolones sont dues à la présence de gènes plasmidiques qnr (pour quinolone résistance) dont 5 groupes existent. Ce mécanisme a été rapporté parmi différentes bactéries Gram négatives à travers le monde, et des analogues de ces gènes ont également été décrits chez des bactéries Gram positives (Rodriguez-Martinez et al., 2008). Les protéines qnr en se fixant sur les topoisomérases, cible des fluoroquinolones, réduisent l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles (Robiczek et al., 2006a ; Cavaco et al., 2009 ; Wang et al., 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012).

4-6 Piégeages de l'antibiotique

La modification peut toucher la structure de la cible mais aussi sa concentration. Les cibles de la vancomycine sont les sous-unités constitutives du peptidoglycane. L'épaississement de la paroi, observé chez des souches de *S. aureus* résistants à la vancomycine (SARV), serait responsable de l'inactivation de cet antibiotique. En effet, l'augmentation du nombre de cibles piégerait les molécules de vancomycine, les rendant ainsi inefficaces contre ce type de bactéries (Cui et al., 2003 ; Guinoiseau, 2010).

Chapitre III :
Les Huiles
essentielles

1- Définition

Les huiles essentielles (HEs) sont des liquides aromatiques volatils extraits de différentes parties des plantes (feuilles, fleurs, écorces, etc.) par distillation ou pression à froid. Elles sont principalement composées de dérivés terpénoïdes (80 %) et phénylpropanoïdes, qui déterminent leur odeur et leurs propriétés biologiques (**Sattayakhom et al., 2023**).

Le terme « huile essentielle » vient du latin quinta essentia, symbolisant l'élément spirituel extrait de la plante. Les HEs sont utilisées depuis longtemps en médecine pour leurs nombreuses propriétés : antiseptiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydantes, etc. Elles sont administrées par inhalation, par application cutanée ou par ingestion (**Sattayakhom et al., 2023**).

2 - Modes d'extraction des huiles essentielles

2-1 Hydrodistillation

C'est la méthode standard d'extraction des huiles essentielles (HEs) (figure 1.7). Elle permet d'extraire des produits naturels insolubles dans l'eau ayant un point d'ébullition élevé. Le procédé consiste à immerger complètement le matériau végétal dans l'eau, suivi d'une ébullition. Cette opération est généralement réalisée à pression atmosphérique. La vapeur formée est condensée par un système de réfrigération avec un débit d'eau. Cette méthode est utilisée pour l'extraction des HEs des poudres et des matériaux durs. La durée de la distillation varie en fonction du type de matériel végétal, les organes ligneux nécessitant des temps de distillation plus longs que les plantes herbacées (**Souiy, 2023**).

2-2 Extraction par fluide supercritique (ESF)

Cette technique d'extraction utilise le dioxyde de carbone. Elle permet d'obtenir des extraits volatils à partir de matériaux végétaux sans aucune trace de solvant (figure 1.8). Le dioxyde de carbone est le fluide supercritique le plus utilisé, en particulier pour l'extraction de composés pharmaceutiques et alimentaires, en raison de ses propriétés chimiques et physiques ainsi que de ses valeurs relativement faibles de température et de pression critiques (304 K et 7,38 MPa, respectivement). L'ESF est une technique dite « verte » qui utilise peu ou pas de solvant organique et présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide que les méthodes traditionnelles (**Rhouma et al., 2023**).

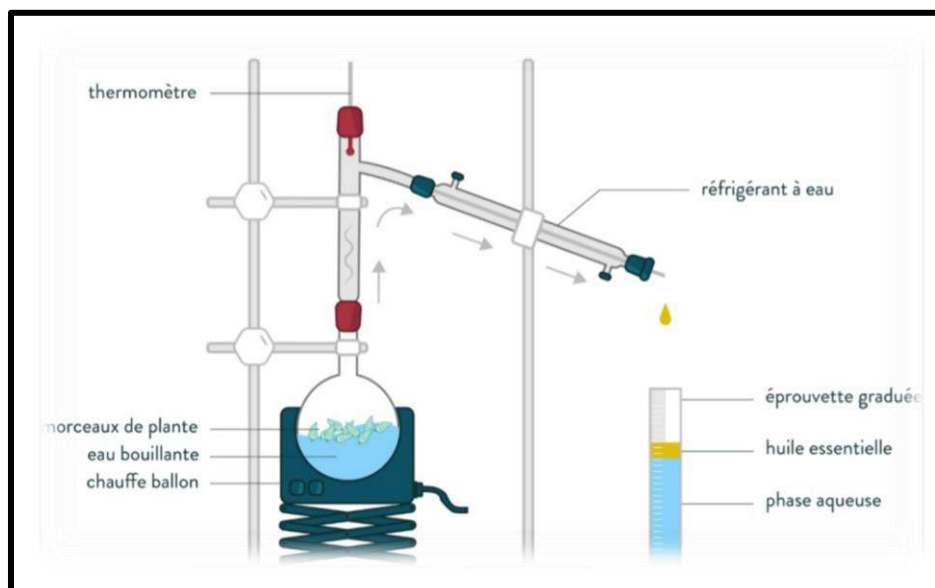


Figure 1.7 : Schéma d'extraction par hydrodistillation (Laiche et Mecheri, 2023).

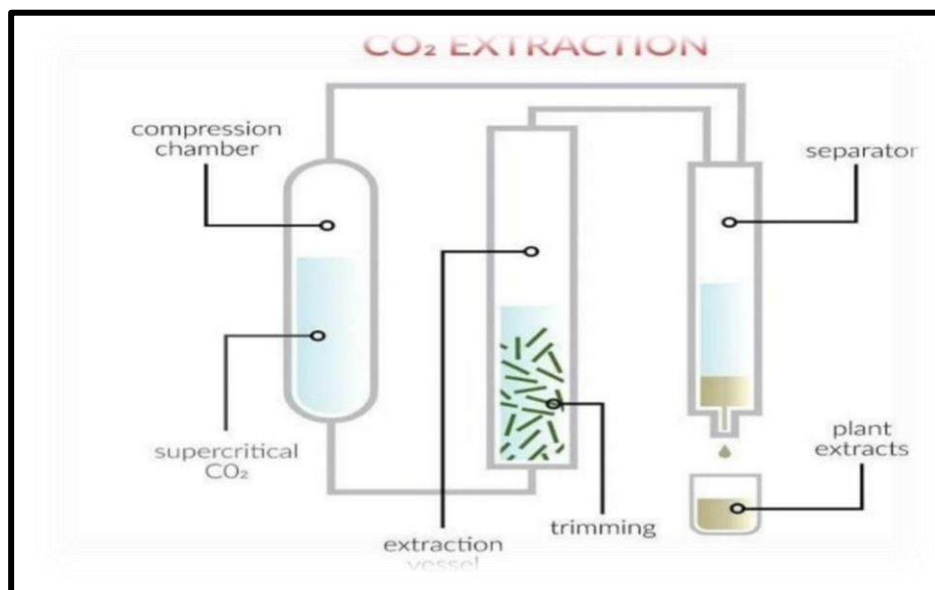


Figure 1.8 : Schéma d'extraction par fluide supercritique (ESF)
(Laiche et Mecheri, 2023).

2-3 Extraction par micro-ondes

Elle consiste à chauffer l'extractant (eau ou solvant organique) mis en contact avec la plante sous l'effet des micro-ondes, ce qui permet un chauffage homogène (figure 1.9). Ce nouveau procédé d'extraction permet des économies de temps et d'énergie considérables (Rhouma et al., 2023).

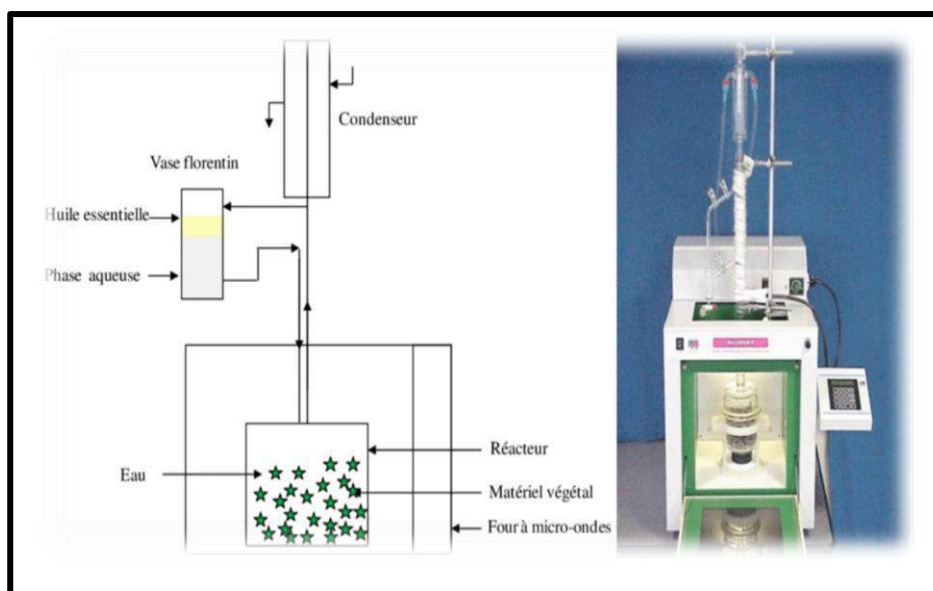


Figure 1.9 : Schéma d'extraction par micro-onde (Laiche et Mecheri, 2023).

2-4 Extraction par ultrasons (EU)

C'est une méthode d'extraction simple et efficace. Les ondes ultrasonores endommagent la paroi cellulaire, entraînant la libération du contenu cellulaire (y compris les composés bioactifs) et le réchauffement de l'espace liquide (figure 1.10). Cette séquence d'événement entraîne une augmentation de la diffusion des extraits. L'utilisation de l'EU permet de réduire la consommation de produits chimiques, le temps d'extraction et la dégradation des composants ciblés (Rhouma et al., 2023).

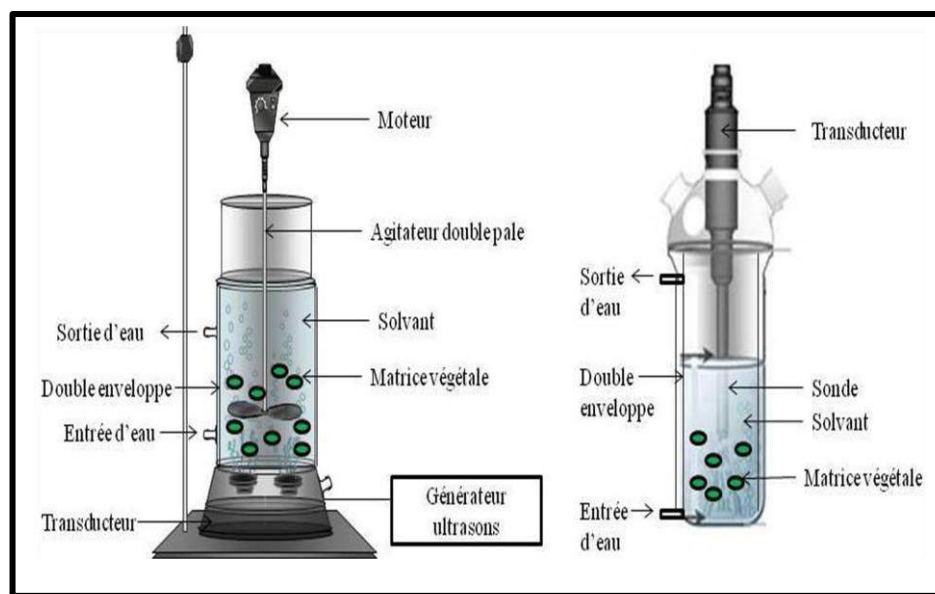


Figure 1.10 : Extraction par Ultrasons (EU) : bac et sonde (Mnayer, 2014).

2-5 Extraction par solvant

L'extraction par solvant est privilégiée pour les matières végétales délicates qui ne supportent pas la chaleur. Des solvants de qualité alimentaire comme l'hexane et l'éthanol sont utilisés pour extraire l'huile essentielle. Lorsque le matériel végétal est traité avec le solvant, il se forme un composé aromatique cireux appelé concrète. Ce composé est ensuite mélangé avec de l'alcool absolu, où l'huile est extraite puis distillée à basse température (Shankar et al., 2021).

2-6 Enfleurage

C'est une autre méthode d'extraction conventionnelle qui remonte à l'Antiquité. Elle est basée sur l'affinité des fragrances pour les graisses, et concerne les plantes qui conservent leur parfum après avoir été cueillies (comme le jasmin ou la tubéreuse). Les fleurs sont étalées sur des châssis enduits de graisse inodore. Le parfum des fleurs est absorbé par la graisse jusqu'à saturation. Les fleurs sont changées régulièrement (par exemple, toutes les 24 heures pour le jasmin). Lorsque la graisse est saturée par les fleurs, l'opération est terminée. La saturation peut durer jusqu'à un mois. La pommade résultante est ensuite fondue. Après décantation, le mélange est traité à froid avec de l'alcool. L'alcool extrait la fragrance seule, sans entraîner les graisses. Cette technique d'extraction est pratiquement en voie de disparition en raison de son coût élevé et les huiles extraites n'ont aucune application dans l'industrie alimentaire (Souiy, 2023).

2-7 Extraction par pression à froid

La méthode d'extraction par pression à froid est réalisée à la ferme à l'aide de dispositifs mécaniques simples, et elle ne permet pas d'obtenir autant d'huile que d'autres méthodes (figure 1.11). Le sous-produit solide, appelé tourteau, contient encore une teneur élevée en huile, ce qui le rend appétent pour le bétail. Les matériaux végétaux (généralement des fruits dans cette méthode) sont placés dans un appareil appelé presse à vis, où le fruit est mécaniquement perforé pour rompre les sacs à huile. Le fruit est ensuite pressé afin d'extraire totalement le jus et l'huile. Ce mélange liquide est ensuite centrifugé pour éliminer les particules solides et séparer l'huile de l'eau (Shankar et al., 2021).

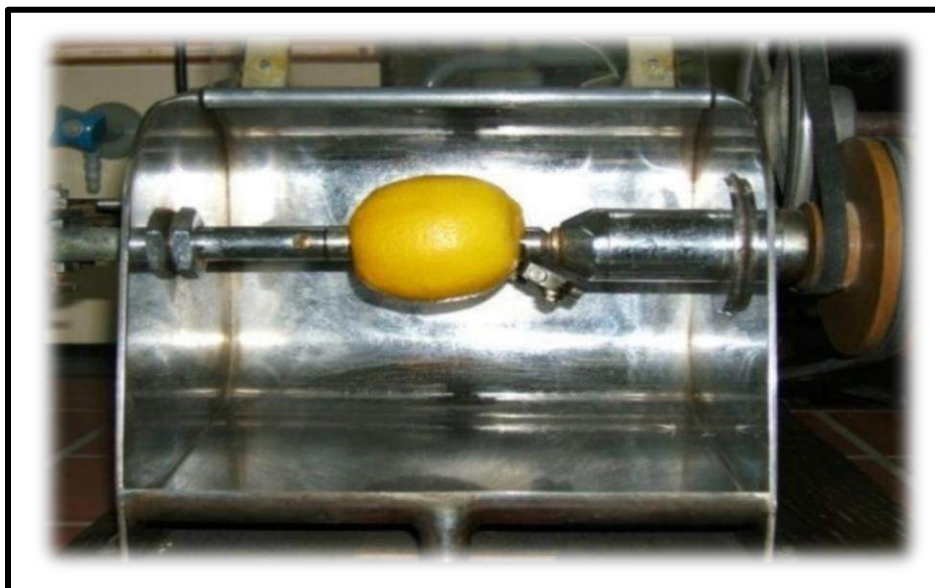


Figure 1.11 : Extraction par pression à froid (Ferhat, 2007).

3- Localisation de l'huile essentielle

Les HE sont des sécrétions naturelles produites par les cellules et trouvées dans les parties des plantes telles que les fleurs (rose), les feuilles (citronnelle), les sommités fleuries (lavande), l'écorce (cannelle), les racines (iris), les bulbes (ail), les fruits (vanille), les graines (noix de muscade) ou les rhizomes (gingembre). Les huiles essentielles sont extraites de parties spécifiques des plantes, telles que la sauge ou la lavande. (Souiy, 2023).

Les parties les plus concentrées ou sécrétoires de la plante sont récoltées pendant la période de rendement optimal, qui varie selon la plante. Par exemple, les menthes sont récoltées avant la floraison, les lavandes pendant la floraison et les plantes à graines après la floraison ou après la rosée matinale pour les fleurs fragiles. De même, l'obtention d'un rendement maximale en huile essentielle peut être affecté par les conditions de croissance des plantes, la période de récolte et les méthodes de séchage (Souiy, 2023).

4- Propriétés physiques et chimiques

Les huiles essentielles sont les substances qui donnent aux plantes leur odeur caractéristique. Elles sont composées de molécules aromatiques et sont généralement des liquides légèrement colorés, moins denses que l'eau (à l'exception notable des huiles de cannelle, de girofle et de saffron). On les caractérise par leurs propriétés physiques (densité, pouvoir rotatoire, indice

de réfraction, solubilité dans l'alcool) et chimiques (indices d'acide, d'ester, d'iode et de carbonyle), qui permettent de déterminer les types de composés organiques (acides, esters, alcènes, carbonyles) qu'elles contiennent. Etant peu polaires, elles ne se mélangent pas bien à l'eau mais se dissolvent dans les solvants organiques. Elles sont également sensibles à l'oxydation et peuvent se transformer en substances résineuses par polymérisation (Ariba et al., 2020).

5- Propriétés pharmacologiques

5-1 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des HEs est connue depuis l'antiquité. Elles ont suscité un regain d'intérêt suite à la progression de la résistance bactérienne aux antibiotiques amplifié par l'usage excessif des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire. De nombreux travaux ont étudié et confirmé in vitro leur efficacité contre diverses bactéries pathogènes, Gram positives et Gram négatives. Par exemple, les HEs du thym, de verveine ou d'eucalyptus permet d'inhiber la germination de spores de *Clostridium botulinum* et *Bacillus cereus*. Cependant, celles de clou de girofle, de cardamome ou de muscade permet de réduire la virulence de *Listeria monocytogenes* et l'hémolyse provoquée par *S. aureus*. L'efficacité de ces HEs repose sur leurs composants chimiques tels que les phénols (carvacrol, thymol, eugénol), les alcools (linalol) et les aldéhydes (cinnamaldéhyde). De plus, il a été démontré que l'huile essentielle entière peut être plus active que ses composants isolés, suggérant un effet synergique. Par exemple, le p-cymène, peu actif seul, facilite l'action du carvacrol en augmentant la perméabilité membranaire des bactéries, renforçant ainsi l'efficacité globale de l'huile (Bouhdid et al., 2012).

5-2 Activité antifongique

Les huiles essentielles possèdent une activité antifongique remarquable. Des études récentes ont montré que divers agents pathogènes fongiques, aussi bien chez les plantes que chez l'humain- y compris les levures- sont sensibles aux HEs. Il a été démontré que *Candida albicans*, principal agent pathogène humain était sensible aux HEs riches en terpénoïdes. L'efficacité des HE et de leurs composants contre les biofilms de *C. albicans* résistants aux médicaments est particulièrement importante. Cette activité pourrait être liée à l'inhibition de la membrane à ergostérol et des voies de signalisation impliquées dans la morphogenèse des hyphes (Medrano, 2019).

5-3 Activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles 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). Ce pouvoir est principalement attribué aux polyphénols présents dans ces huiles (Richard, 1992). Plusieurs investigations ont montré la capacité des essentielles de basilic, cannelle, clou de girofle, muscade, origan et thym a piégé les radicaux libres lors du test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) à température ambiante. Cette activité antioxydante est attribuée à la forte teneur en thymol et carvacrol dans l'HE de *Thymus serpyllus* et *Thymus spathulifolius*. De même, l'activité antioxydantes de l'huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare* L.) a été attribué à sa richesse en thymol et au carvacrol. Cette HE a exercé une activité antioxydante comparable à celle de l' α -tocophérol et du BHT (hydroxytoluène butylé).

Cette activité antioxydante ne dépend pas uniquement des groupes phénoliques. Les cétones, les aldéhydes, les hydrocarbures et les éthers sont capable de neutraliser les radicaux libres. Bien que les huiles essentielles de *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* et *Thymus mastichina* sont caractérisés par une absence de thymol et de carvacrol Possesse une activité antioxydante notable grâce à leurs richesses en linalol et 1,8-cinéole. Cependant, l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'arbre à thé a été attribué à sa teneur en α -terpinène, γ -terpinène et α -terpinolène (Bansal et Kaur, 2016).

5-4 Activité antivirale

De nombreuses plantes présentent des propriétés antivirales notables. Par exemple : *Origanum vulgare* possède une activité antivirale contre les virus entériques. Egalement, HES d'*Eucalyptus globulus* ont été actif contre les virus respiratoires. Les HE d'eucalyptus, de thym ainsi que de *Melaleuca alternifolia* possèdent une activité inhibitrice contre le virus de l'herpès. Des preuves montrent que l'HE de l'arbre à thé est efficace dans le traitement de ce virus. De même, l'HE de *Salvia fruticosa* possède également des activités antivirales.

Cette activité inhibitrice de la réplication virale est due à la présence de composants tels que les monoterpènes, sesquiterpènes et phénylpropanoïdes dans les HES. Le mécanisme d'action passe notamment par l'interférence avec les structures de l'enveloppe virale, ce qui empêche l'adsorption ou l'entrée du virus dans les cellules hôtes. Par exemple, l'huile d'origan provoque la dissolution de l'enveloppe du virus d'*Herpès simplex*, réduisant ainsi sa capacité infectieuse. Il existe également des données montrant que certains composants des HES inhibent spécifiquement

l'expression précoce des gènes du CMV (cytomégalovirus), empêchant ainsi son activation (Medrano, 2019).

6- Effet toxique

Le caractère naturel des huiles essentielles ne garantit pas leur innocuité pour l'organisme. Leur toxicité dépend fortement de la dose administrée et de la voie d'exposition : par ingestion, notamment en cas de consommation excessive ou aléatoire, ou par contact cutané avec des concentrations élevées. Certaines huiles essentielles peuvent ainsi provoquer des irritations cutanées, être allergènes, phototoxiques, neurotoxiques, ou encore présenter un potentiel cancérigène, notamment celles contenant des dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes. Bien que la majorité des huiles essentielles présentent une toxicité aiguë faible à très faible par voie orale, avec des doses létales (DL_{50}) variant de 2 à 5 g/kg pour des huiles comme l'anis ou l'eucalyptus, et souvent supérieures à 5 g/kg pour des huiles telles que la lavande ou la camomille, certaines restent particulièrement dangereuses. Par exemple, les huiles essentielles de basilic, d'estragon ou d'hysopé présentent une DL_{50} entre 1 et 2 g/kg, tandis que les plus toxiques, comme celles de boldo (0.13 g/kg), de chénopode (0.25 g/kg), de thuya (0.83 g/kg) ou d'essence de moutarde (0.34 g/kg), peuvent induire des convulsions dès 0.07 g/kg (Naab et Hadibi, 2018).

Partie *Expérimentale*

Matériel
&
Méthodes

Notre étude expérimentale scindée sur deux parties, avait tracé les objectifs suivants ;

- Déterminer le rendement des huiles essentielles *Cinnamomum aromaticum* et *Syzygium aromaticum* extraites par hydrodistillation ;
- Déterminer la sensibilité de quatre souches référenciées à savoir (*E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6528, *Bacillus subtilis* ATCC6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027) aux huiles essentielles de *Cinnamomum aromaticum* et *Syzygium aromaticum*;
- Déterminer la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide des huiles essentielles étudiées ;
- Déterminer l'activité bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles étudiées ;
- Evaluer l'activité synergique de ces deux huiles essentielles vis-à-vis de quatre souches référenciées à savoir ; *E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC6528, *Bacillus subtilis* ATCC6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027.

Première Partie

Cette première partie a été réalisée au laboratoire de pharmacologie de l'Institut des Sciences Vétérinaires ; Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

1- Matériel végétal

Deux plantes médicinales ont été utilisées au cours de cette étude, à savoir le clou de girofle et la cannelle.

Les deux plantes utilisées dans la présente étude ont été importées du Vietnam (d'après la fiche du produit) (voir annexe). Les échantillons du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) et de la cannelle (*Cinnamomum aromaticum*) ont été achetés au près d'un magasin spécialisé dans la vente des épices dans la wilaya de Tiaret.

1-1 *Syzygium aromaticum*

Le giroflier ou girofle (*Syzygium aromaticum*) est un arbre originaire d'Indonésie (Mbaveng et Kuete, 2017). Il appartient au genre *Eugenia*, l'un des 75 genres (~ 3000 espèces), famille des *Myrtaceae*. Ces boutons de fleurs séchées (figure 2.1), connus sous le nom de clou de girofle, comme épice dans les cuisines dans de nombreuses régions du monde (Singh *et al.*, 2012). 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, la Malaisie, le Brésil, la République Malgache, la Jamaïque et la Guinée (Singh *et al.*, 2012). Les boutons giroflier sont appréciés pour ses propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires et analgésiques. Il est utilisé pour traiter diverses affections, notamment les problèmes dentaires et gastro-intestinaux. Son huile essentielle est utilisée en parfumerie, en pharmacie et en industrie agroalimentaire comme conservateur alimentaire. Cependant, une part importante de la production mondiale est destinée à la fabrication de cigarettes « kretek » en Indonésie (Mbaveng et Kuete, 2017).



Figure 2.1 : Les Boutons de *S. aromaticum*
(Photo personnelle)

L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle) est principalement composée d'eugénol (70-90 %), un composé phénolique aux propriétés antimicrobiennes, antifongiques et anesthésiques, suivi de l'acétate d'eugényle (5-20 %), qui contribue à son arôme et possède des effets anti-inflammatoires. On y retrouve également du β -caryophyllène (2-12 %), reconnu pour son activité anti-inflammatoire et antioxydante, ainsi que d'autres composés en moindre quantité, tels que l' α -humulène, le méthyl salicylate, la vanilline et le benzaldéhyde. La composition chimique de cette huile essentielle peut varier en fonction de l'origine botanique, des conditions de culture et de la méthode d'extraction (**Chaieb et al., 2007**).

1-2 *Cinnamomum aromaticum*

Cinnamomum cassia, également connue sous le nom de *Cinnamomum aromaticum*, de cannelier de Chine, casse, cannelier casse, cassia ou encore fausse cannelle et est communément appelée "El Kerfa" (القرفة) en arabe (**Elmecheri, 2018**). Elle appartient au genre *Cinnamomum*, famille des *Lauraceae*. Elle contient plus de 300 arbres et arbustes aromatiques à feuilles persistantes. Parmi elles, Quatre espèces ont une grande importance économique pour leurs utilisations culinaires multiples comme les épices communes, y compris la cannelle zeylanicum Blume (un synonyme de cannelle verum J. Presl, connu comme la cannelle du Sri Lanka), *Cinnamon loureiroi* Nees (connu comme la cannelle vietnamienne), *Cinnamon burmanni* (Nees & T. Nees) Blume (cannelle indonésienne) et *Cannelle aromaticum* Nees (synonyme de *Cinnamon cassia* (L.) J. Presl, connue sous le nom de cannelle chinoise) (**Nabavi et al., 2015**). De plus, elle a une valeur économique élevée, puisqu'elle constitue la matière première pour la préparation des médicaments (**Chunling et al., 2019**).

Les tuyaux de cannelle (figure 2.2) ou l'écorce de cannelle contient jusqu'à 2 % d'huile essentielle dont le cinnamaldéhyde (60 à 80 %) est le principal constituant (**Charles, 2013**). Cette huile essentielle est largement utilisée pour ses propriétés biologiques remarquables. Elle possède une forte activité antifongique (inhibe la croissance d'*Aspergillus flavus*, de *Fusarium verticillioides* et de *Penicillium spp.*). De même une activité antibactérienne à l'égard d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium* et un fort pouvoir antioxydant. De plus, elle exerce une activité antimycotoxigène. Ces propriétés font de cette huile un conservateur naturel de choix dans les aliments. Par ailleurs, elle est utilisée en médecine traditionnelle pour prévenir diverses affections telles que le diabète, les troubles digestifs, les infections, les spasmes ou encore la

candidose. Enfin, son parfum chaud et épicé en fait un ingrédient prisé en cosmétique et en parfumerie (Darji *et al.*, 2022).



Figure 2.2 : Tuyaux de *C. aromaticum*.

(Photo personnelle)

2- Extraction des huiles essentielles

2-1 Mode opératoire

Les clous de girofle et les tuyaux de la cannelle ont été concassés à l'aide d'un mortier et d'un pilon afin d'éclater les cellules et de permettre la libération des molécules volatiles.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydro-distillation (figure 2-3). Le processus consiste à imprégner la matière première végétale (cannelle : 40g et clou de girofle : 15g) dans 500ml d'eau distillée dans un ballon d'un litre. Le tout est ensuite porté à l'ébullition à pression atmosphérique pendant 3 heures et ½. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.

2-2 Traitement de l'extrait (figure 2-4)

Après décantation, l'eau est rejetée et la phase huileuse est récupérée par une micropipette, puis séchée par le sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) (Eyob *et al.*, 2008).

L'huile essentielle extraite (*Cinnamomum aromaticum* : 1.48% ; *Syzygium aromaticum* : 3.22%) a été conservée à 4 °C dans des fioles scellées hermétiquement et couvertes de papier aluminium jusqu'à leur utilisation ultérieure.

2-3 Calcul du rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter.

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage, il est calculé par la formule suivante :

$$R_{HE}(\%) = (M_{HE} / M_s) \times 100$$

Où : R_{HE} : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle en gramme.

M_s : Masse de la matière végétale sèche en gramme.



Figure 2-3 : Dispositif d'hydro-distillation lors d'extraction des huiles essentielles

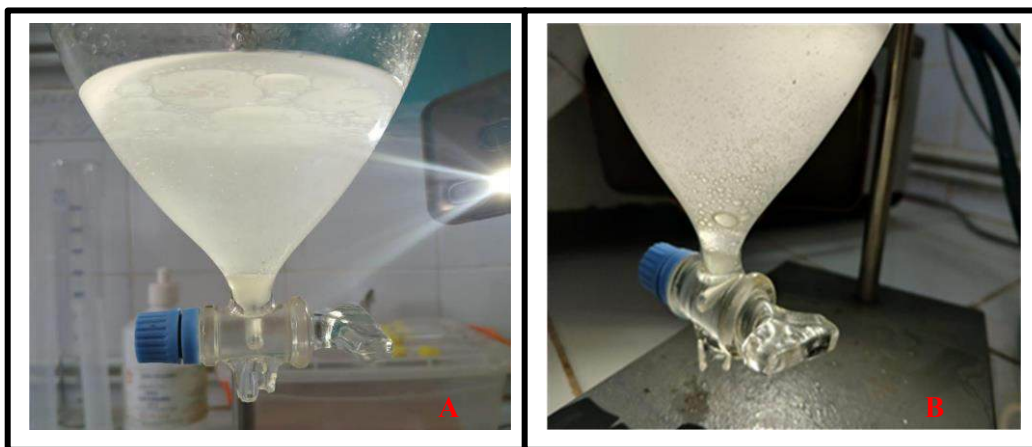


Figure 2-4 : Huile essentielle avant décantation. **A :** Huile essentielle Cannelle ; **B :** Huile essentielle clou de girofle.

Deuxième partie

Cette deuxième partie a été réalisée aux :

1- Laboratoire Pédagogique de Microbiologie (Bloc B) de la Faculté des Sciences de la Nature et de vie : purification et revivification des souches bactériennes utilisées dans la présente étude.

2- Laboratoire pédagogique de pharmacologie de l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret : étude de l'activité antibactérienne et synergétique des huiles essentielles testées.

1- Confirmation des souches bactériennes référenciées à testées

1-1 Les souches bactériennes référenciées

Les quatre souches bactériennes référenciées ; *E. coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6528, *Bacillus subtilus* ATCC 6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, utilisées dans la présente étude ont été fournis par le Laboratoire Pédagogique de Microbiologie (Bloc B) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

1-2 Coloration de gram

Cette coloration a été réalisée selon la méthode décrite par **Paul (2004)**.

Le principe fondamental de la coloration de Gram réside dans la mise en évidence des disparités de la composition chimique de la paroi bactérienne. Une différence notable concerne la concentration en lipides, qui est nettement inférieure chez les bactéries Gram positif (1 à 2.5%) comparativement aux bactéries gram négatif (10 à 22%) (**Paul, 2004**).

- Technique

- Déposer délicatement une goutte de la suspension bactérienne.
- Sécher la lame en la passant brièvement au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.
- Fixer les bactéries sur la lame en passant cette dernière rapidement à travers la partie jaune de la flamme.

Coloration primaire (Violet de Gentiane)

- Recouvrir le frottis avec le violet de Gentiane et laissez agir pendant une minute.
- Rincer ensuite soigneusement à l'eau distillée.

Fixation par Lugol :

- Recouvrir le frottis avec le Lugol et laissez agir pendant une minute.
- Rincer délicatement à l'eau distillée.

Décoloration (Alcool à 95°)

- Incliner la lame et faites couler doucement de l'alcool à 95° pendant environ 30 secondes, jusqu'à ce que le liquide qui s'écoule devienne incolore.
- Rincer immédiatement à l'eau distillée.

Coloration de Fuch sine

- Recouvrir le frottis avec la fuch sine et laissez agir pendant une minute.
- Rincer à l'eau distillée et laissez égoutter.

Séchage final

- Éponger délicatement la lame entre deux papiers buvards et laissez-la sécher complètement à l'air.

- Lecture

Elle consiste à déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis sec et observer sous microscope à l'objectif X100.

- Interprétation

- Les bactéries Gram négatif apparaîtront de couleur rose.
- Les bactéries Gram positif apparaîtront de couleur violette.

Au cours de cet examen, la morphologie des cellules bactériennes peut être observée (bacilles, coccobacilles, Cocci, etc.).

2 Etude de l'activité antibactériennes des huiles essentielles**2-1 Préparation de l'inoculum**

Les suspensions d'inoculum ont été préparées à partir des cultures bactériennes jeunes de 24 h. Cinq colonies ont été mises en suspension dans 5 ml de solution d'eau physiologique stérile (0,9 % de NaCl) en agitant pendant 15 secondes. La densité a été ajustée à la turbidité du standard Mc Farland 0,5 (ce qui est équivalent à $1-5 \times 10^8$ cfu/ml). La densité optique de chaque suspension a été confirmée sur un spectrophotomètre UV-visible (JENWAY 7205) (NCCLS, 2001).

2-2 Méthode de diffusion sur gélose (Aromatogramme)

L'évaluation de la sensibilité des quatre souches bactériennes référenciées (*E. coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6528, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) testées a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose, appelée aromatogramme, selon la méthode décrite par **Ponce et al. (2003)**.

▪ Protocole expérimental

Couler aseptiquement la gélose Mueller Hinton en surfusion dans des boîtes de Pétri (90mm de Ø) à raison de 10 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse. Les boîtes ont été par la suite inoculées à l'aide des écouvillons.

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de cellulose stérile et l'imbiber avec l'H.E à tester en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'H.E jusqu'à l'imprégnation totale du disque (5µl d'HE), puis déposer sur la gélose Mueller Hinton préalablement ensemencé.

Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 min, et mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24 heures. Dans les boîtes de contrôle, les disques sont trempés dans de l'eau physiologique stérile. L'expérience est répétée trois fois pour chaque H.E et pour chaque souche bactérienne.

▪ Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.Es, (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.

2-3 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 quatre souches bactériennes référencées.

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) en bouillon Mueller 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 10 µl/ml pour l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* et 40 µl/ml pour l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*.

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 1.5×10^6 UFC / ml, les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.

Pour chaque expérience, un contrôle positif (bouillon Müeller Hinton+ émulsifiant + inoculum) et un contrôle négatif (bouillon Müeller Hinton+ émulsifiant) 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 à 4 et bactéricide, lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4 (**Mogana et al., 2020 ; Strompfová et al., 2024**).

2-4 Etude de la synergie

La méthode du damier a été utilisée pour évaluer la synergie entre les huiles essentielles de *Cinnamomun aromaticum* et *Syzygium aromaticum* à l'égard de quatre souches bactériennes référenciées 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 puit contenant le milieu inoculé et les huiles essentielles avec un volume final de 200 µl, avec des concentrations décroissantes d'huile essentielle de *Cinnamomun aromaticum* (HE_A) dans la direction horizontale, et celle d'huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* (HE_B) ayant une concentration décroissante dans la direction verticale. La plage de concentrations testées pour chaque huile essentielle est de trois dilutions inférieures 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 réalisée selon la 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 décrites 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

1. Rendement en huile essentielle

Les huiles essentielles ont été extraites des matériaux végétaux secs de deux plantes largement commercialisées en Algérie à savoir *Cinnamomum aromaticum* et *Syzygium aromaticum*. Le rendement en huile essentielle a été exprimé en pourcentage % (p/p).

La figure 2.5 montre les rendements moyens en huiles essentielles de *Cinnamomum aromaticum* et *Syzygium aromaticum* qui ont été de 1.48 % (p/p) et 3.22 % (p/p), respectivement.

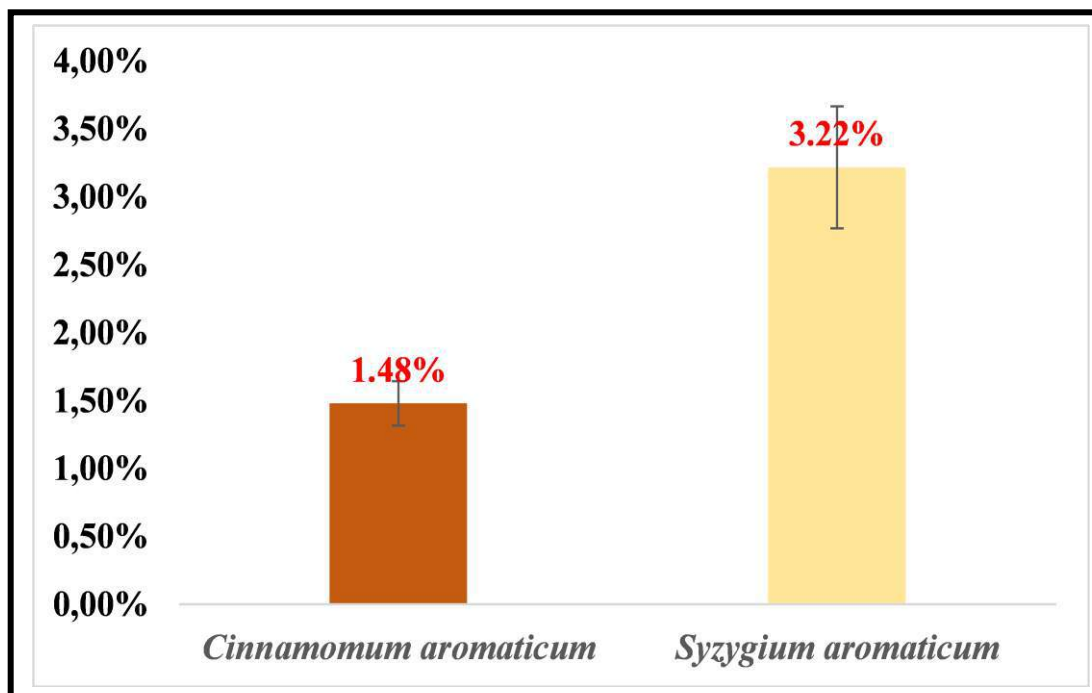


Figure 2.5 : Rendement en huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* et *Syzygium aromaticum*.

▪ *Syzygium aromaticum*

Le rendement en huile essentielle de *Syzygium aromaticum* obtenu lors de la présente étude a été de 3.22 % (p/p). Ce taux est supérieur à ceux mentionnés par **Alitonou et al. (2012)**, **Rodríguez et al. (2014)** et **Saeed et Shahwar (2015)** avec des pourcentages de 0.18%, 2.2% et 2.1%, respectivement.

Notre résultat est inférieur aux normes de **AFNOR (1992)** qui rapporte que le rendement en huile essentielle de *Syzygium aromaticum* varie entre 5% et 8%. Des résultats supérieurs ont été cités par **Ayoola et al. (2008)** et **Sokomate et al. (2016)** obtenus par la méthode d'hydrodistillation avec des taux de 7% et 7.6%, respectivement. De même, **Guan et al. (2007)** ont rapporté des taux de 11.5%, 19.6% et 10.1% obtenus par la méthode

d'hydrodistillation, d'extraction par fluide supercritique et de distillation par entraînement à la vapeur d'eau, respectivement. Egalement, **Selles et al. (2020)** et **Nana et al. (2015)** ont enregistré, respectivement des rendements de 11.6% et 10.54% pour la même méthode d'extraction.

Cette différence dans le rendement peut être expliquée par la saison de récolte et l'origine géographique (**Nana et al., 2015**), la technique d'extraction (température et pression exercées sur les particules) (**Guan et al., 2007**), les conditions de séchage (**Naili, 2013**). Toutefois, **Guan et al. (2007)** montrent que le rendement d'extraction augmente en diminuant la taille des particules des boutons de clou de girofle broyés. Néanmoins, **Nana et al. (2015)** montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans le rendement en huile essentielle de clou de girofle attribuée à la différence de taille des particules.

▪ *Cinnamomum aromaticum*

Dans la présente étude, le rendement moyen en huile essentielle de la cannelle a été de 1.48% (p/p). Un rendement similaire a été noté par **Selles et al. (2017)** avec un taux de 1.46%

Des taux proches ont été obtenus par **Deng et al. (2014)** et **Kasim et al. (2014)** qui ont enregistré un taux de 1.69% pour *Cinnamomum cassia*, provenant de la province du Guangdong (Sud de la Chine) et 1.82%, respectivement.

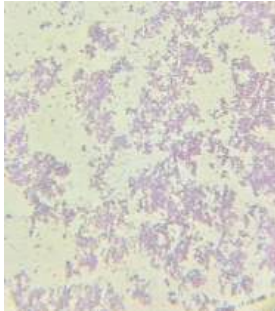
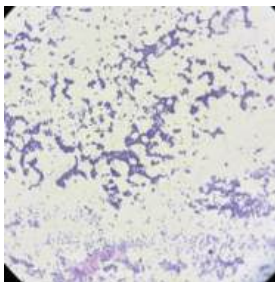
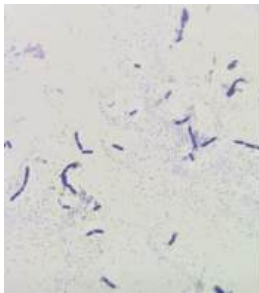
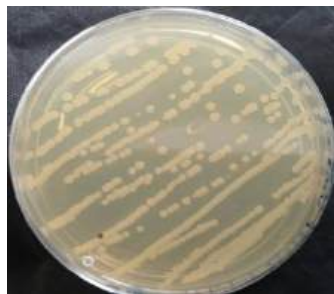
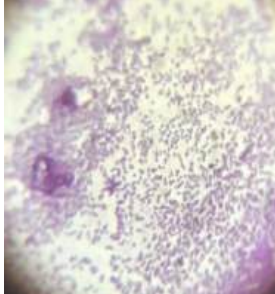
Des taux supérieurs ont été enregistré par **Geng et al. (2011)**, **Li et al. (2013)**, **Huang et al. (2014)** et **Jeyaratnam et al. (2016)** avec des rendements moyens variant de 2.38% à 3.3%. Toutefois, l'huile essentielle de l'écorce de *Cinnamomum cassia*, provenant de la province du Guangxi (Sud de la Chine) a été de 3.33% (p/p) (**Deng et al., 2014**).

Cette différence dans le rendement peut être attribuée à la situation géographique, la culture, la variété de la cannelle, le temps de récolte et la méthode d'extraction qui affectent aussi la composition de l'huile essentielle (**Adinew, 2014 ; Bernard et al., 1989**).

2- Evaluation de l'activité antibactérienne

Le tableau 2.1 résume les résultats de l'évaluation de l'aspect microscopique des souches bactériennes référenciées testées au cours de cette étude.

Tableau 2.1 : Observation microscopique des souches bactériennes.

Les souches	Résultat de culture	Résultat microscopique	Appréciation microscopique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			Forme en bâtonnets sporulées bacilles Gram -.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6528			Coques en amas Non capsulées non sporulées, Gram +
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633			Bâtonnets, Gram+, sporulés
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027			Bacilles, Gram-, non sporulés

2-1- Activité antibactérienne

2-1-1 Méthode de diffusion sur gélose (Aromatogramme)

Le tableau 2.2 résume les résultats du test de diffusion en disque pour les huiles essentielles contre les souches bactériennes référenciées testées. L'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* (figure 2.6) a présenté les plus grandes zones d'inhibition, avec des diamètres allant de 31 à 36,33 mm. Ces diamètres ont permis de donner une appréciation d'extrêmement sensible pour les quatre bactéries testées vis-à-vis de cette huile essentielle. Tandis que, l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (figure 2.7) a montré des zones d'inhibition variant de 14 à 17 mm. Ces diamètres ont permis d'attribuer une appréciation sensible à l'égard des souches d'*E. coli* ATCC 8739, de *S. aureus* ATCC 6528 et *P. aeruginosa* ATCC 9027. Alors qu'une appréciation très sensible a été enregistrée vis-à-vis de *B. subtilis* ATCC 6633.

Tableau 2.2: Halos d'inhibition* en (mm) (moyenne $\pm$ écart type) provoqués par les huiles essentielles testées.

	Huile essentielle <i>Cinnamomum aromaticum</i>	
	Diamètre de la zone (mm)	Appréciation
<i>E. coli</i> ATCC 8739	31 $\pm$ 1	Extrêmement sensible
<i>S. aureus</i> ATCC 6528	36.33 $\pm$ 3.06	Extrêmement sensible
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	31.67 $\pm$ 1.15	Extrêmement sensible
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	35.67 $\pm$ 1.15	Extrêmement sensible
	Huile essentielle <i>Syzygium aromaticum</i>	
	Diamètre de la zone (mm)	Appréciation
<i>E. coli</i> ATCC 8739	14 $\pm$ 0	Sensible
<i>S. aureus</i> ATCC 6528	14 $\pm$ 1	Sensible
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	17 $\pm$ 1.73	Très sensible
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	14 $\pm$ 1.73	Sensible

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

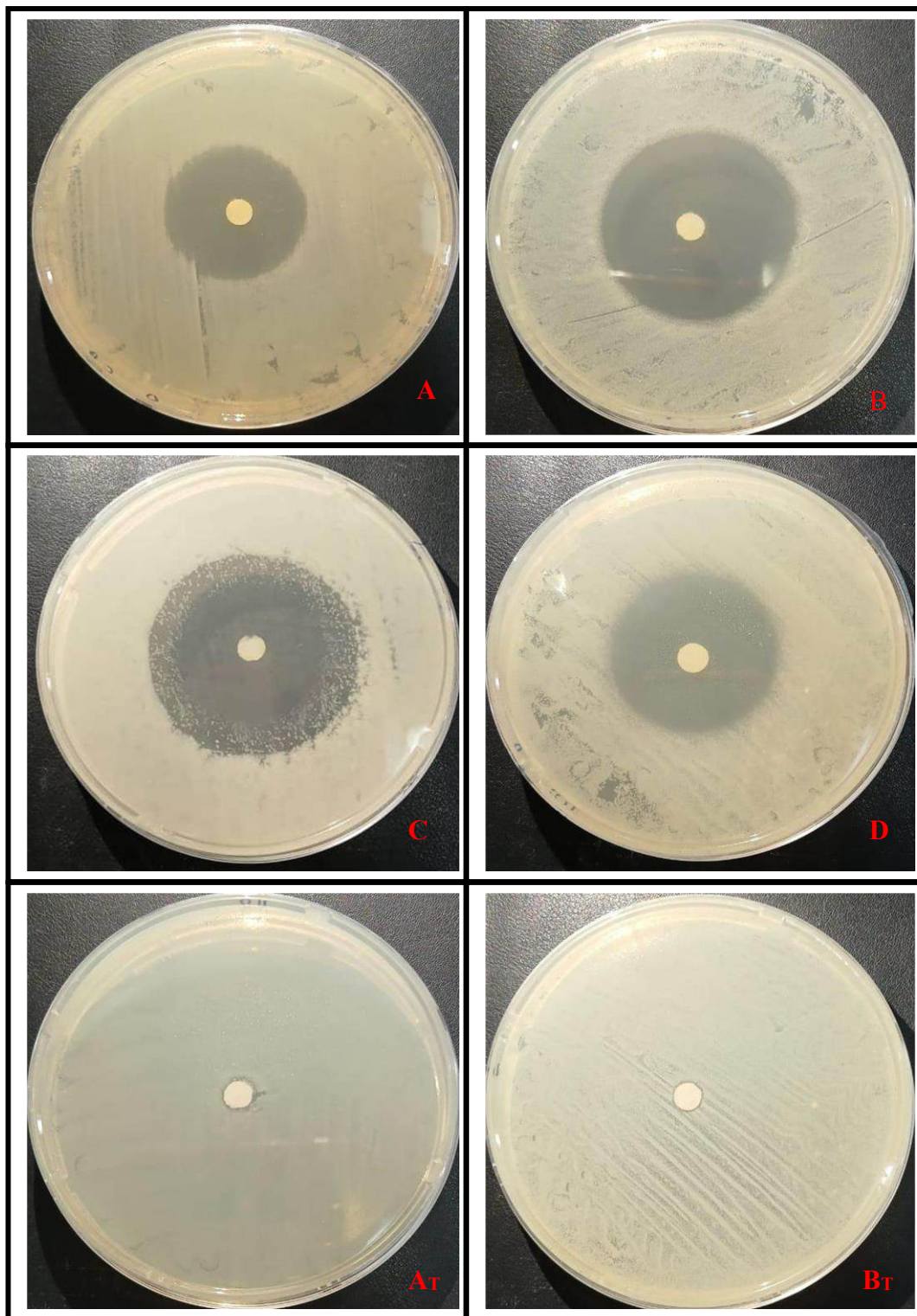


Figure 2.6 : Aromatogramme des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum*.

A : *E. coli* ATCC 8739 ; **B :** *S. aureus* ATCC 6528 ; **C :** *B. subtilis* ATCC 6633 ; **D :** *P. aeruginosa* ATCC 9027 ; **A_T :** Témoin *E. coli* ATCC 8739 ; **B_T :** Témoin *S. aureus* ATCC 6528.

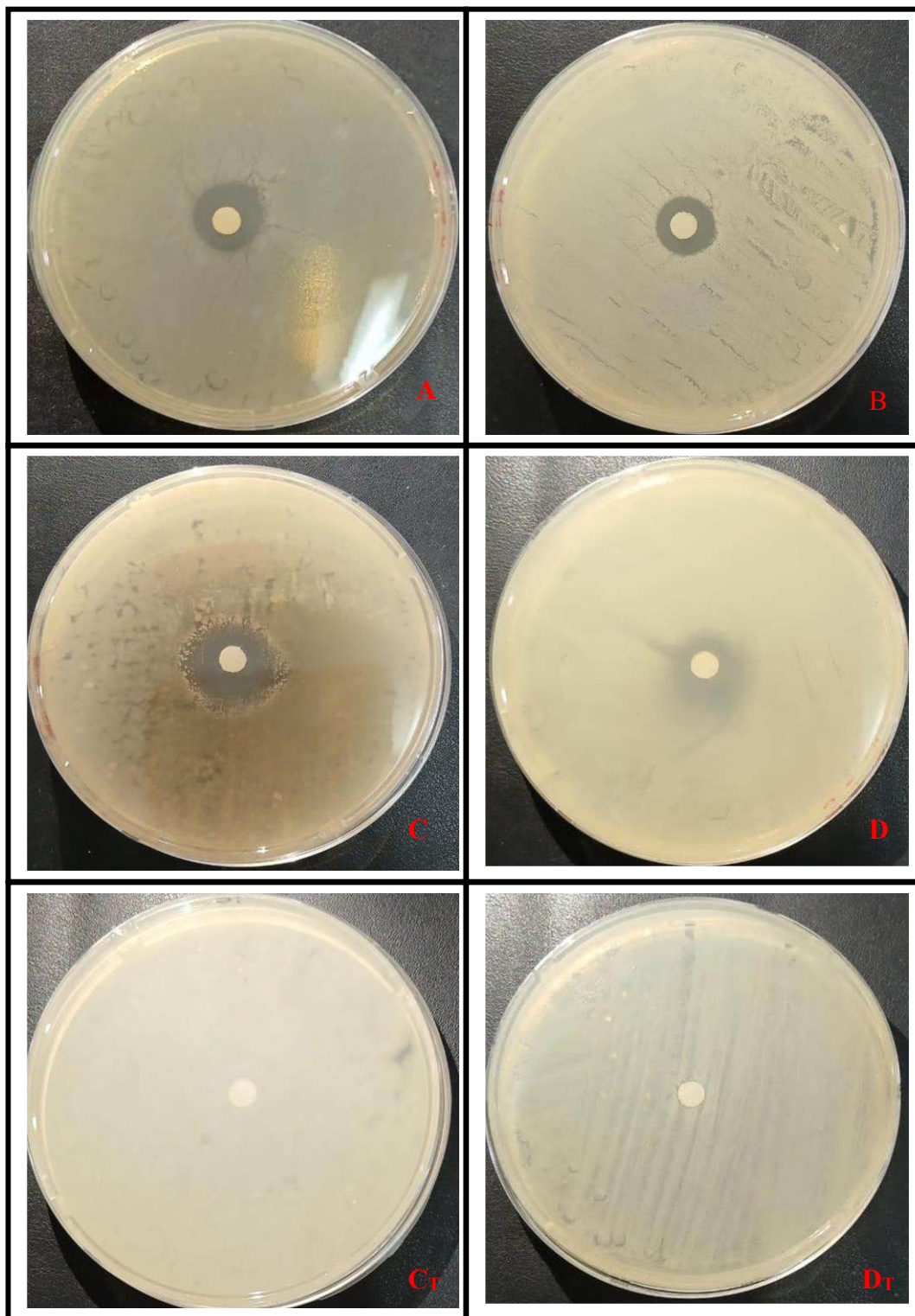


Figure 2.7 : Aromatogramme des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*.

A : *E. coli* ATCC 8739 ; **B :** *S. aureus* ATCC 6528 ; **C :** *B. subtilis* ATCC 6633 ; **D :** *P. aeruginosa* ATCC 9027 ; **C_T :** Témoin *B. subtilis* ATCC 6633 ; **D_T :** Témoin *P. aeruginosa* ATCC 9027.

2-1-2 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 (micro-dilution) sur quatre souches bactériennes référenciées. Les CMI et les CMB des deux huiles essentielles étudiées sont présentées dans le tableau 2.3 et les figures 2.8 et 2.9.

L'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* a présenté un CMI importante de 1.25 µl/ml à l'égard des quatre souches testées. Tandis que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a montré des CMI plus élevées, allant de 10 à 20 µL/ml. Les résultats des analyses de CMB/CMI ont révélé que l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* possédait des propriétés bactéricides vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 8739 et *S. aureus* ATCC 6528. Alors que cette même huile essentielle a exercé une activité bactériostatique contre les souches de *B. subtilis* ATCC 6633 et *P. aeruginosa* ATCC 9027. Cependant, une activité bactériostatique a été observée pour l'huile essentielle *Syzygium aromaticum* à l'égard des quatre souches testées.

Tableau 2.3: CMI et CMB des deux huiles essentielles testées, nécessaires pour l'inhibition totale de la croissance bactérienne in vitro, exprimée en solution µl/ml (n = 3).

Isolats	HE de <i>C. aromaticum</i>			HE de <i>S. aromaticum</i>		
	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>E. coli</i> ATCC 8739	1.25	5	4	20	>40	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 6528	1.25	5	4	20	>40	ND
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1.25	> 10	>4	10	>40	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1.25	>10	>4	20	>40	ND

▪ *C. aromaticum*

L'huile essentielle de la *Cinnamomum aromaticum* a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des quatre bactéries testées avec une valeur de CMI de 1.25 µl/ml.

Une CMI similaire pour l'HE de *Cinnamomum aromaticum* a été obtenue par **Djilaili et al. (2018)** avec une valeur de 1.25 µl/ml vis-à-vis d'*E. coli*.

Un effet inhibiteur de l'huile essentielle de *C. aromaticum* sur plusieurs souches d'*E. coli* responsable de diarrhée néonatale du veau et une souche de référence *E. coli* ATCC 25922 avec des CMI allant de 0.17 mg/ml à 0.33 mg/ml a été mentionné par **Selles (2019)**.

Medjani (2017) ont noté une dose de 0.6µl/ml en huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* a été suffisante pour inhiber *S. aureus*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*.

Des concentrations plus faibles de l'ordre de 0.005 mg/ml ont été enregistrées par **El Atki et al. (2020)** pour l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia* à l'égard de *E. coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Cependant, ces mêmes auteurs ont annoncé une CMI de 0.002 mg/ml de cette huile essentielle vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (**El Atki et al., 2020**).

Toutefois, **Iseppi et al. (2024)** ont montré que des doses respectives de 4 µg/ml et 64 µg/ml d'huile essentielle de *Cinnamomum zeylanicum* ont permis d'inhiber *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Cependant, **El Baz et al. (2025)** ont montré que l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* a exercé un effet inhibiteur à l'égard de *S. aureus* et *E. coli* avec des doses de 0.039 mg/ml et 0.078 mg/ml, respectivement.

La présente étude a mis en évidence un rapport CMB/CMI de 4 vis-à-vis des *S. aureus* ATCC 6528 et *E. coli* ATCC 8739. Alors qu'un rapport >4 a été constaté à l'égard de *B. subtilis* ATCC 6633 et *P. aeruginosa* ATCC 9027. Selon **Mogana et al. (2020)** et **Strompfová et al. (2024)** l'HE de *Cinnamomum aromaticum* possède une activité bactéricide à l'égard de *S. aureus* ATCC 6528 et *E. coli* ATCC 8739, et bactériostatique vis-à-vis *B. subtilis* ATCC 6633 et *P. aeruginosa* ATCC 9027. **El Baz et al. (2025)** ont rapporté un résultat similaire concernant l'activité bactéricide de l'huile essentielle de *Cinnamomum zeylanicum* à l'égard d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Selon **Inouye et al. (2001)**, l'huile essentielle de cannelle exerce son action antimicrobienne en altérant la membrane plasmique des cellules microbiennes, entraînant leur destruction.

Cette forte activité antibactérienne de l'huile essentielle de cannelle est liée principalement à sa richesse en cinnamaldéhyde (**Chang et al., 2001 ; Singh et al., 2007**).

Le trans-cinnamaldéhyde a été signalé comme étant le composant majoritaire de l'huile essentielle *cinnamomum aromaticum* avec des concentrations variables (**Giordani et al., 2006 ; Singh et al., 2007 ; Liu et al., 2014 ; Deng et al., 2014 ; Huang et al., 2014 ; Poaty et al., 2015**).

Le cinnamaldéhyde possède au moins trois mécanismes d'action contre les bactéries. A faible concentration, il inhibe les enzymes impliquées dans les interactions avec les cytokines ou d'autres fonctions cellulaires moins importantes, et à une concentration plus élevée, il agit comme un inhibiteur de l'ATPase. Cependant, à une concentration létale, le cinnamaldéhyde perturbe la membrane (**Nazzaro et al., 2013**).

Ces mêmes auteurs ont noté que le cinnamaldéhyde est capable de modifier le profil lipidique de la membrane cellulaire microbienne. Cependant, des informations contradictoires sur l'effet de cinnamaldéhyde en perturbant la membranaire ont été rapportées dans la littérature. Par exemple, une concentration sub-létale en cinnamaldéhyde n'affecte pas l'intégrité de la membrane chez *E. coli*, mais peut inhiber la croissance et la bioluminescence du micro-organisme *Photobacterium leiognathi*. Ces constatations ont permis de suggérer que le cinnamaldéhyde accède au périplasme et peut-être aussi au cytoplasme (Nazzaro *et al.*, 2013).

Par ailleurs, les aldéhydes interagissent avec les macromolécules telles que les protéines et les acides nucléiques, modifiant ainsi leur structure. Des études *in vitro* ont démontré que les huiles essentielles riches en aldéhydes (tel que le cinnamaldéhyde) ainsi qu'en composés phénoliques possèdent une activité antimicrobienne marquée. Ces composés agissent en perturbant et en déstabilisant la membrane cellulaire des bactéries (Inouye *et al.*, 2001).

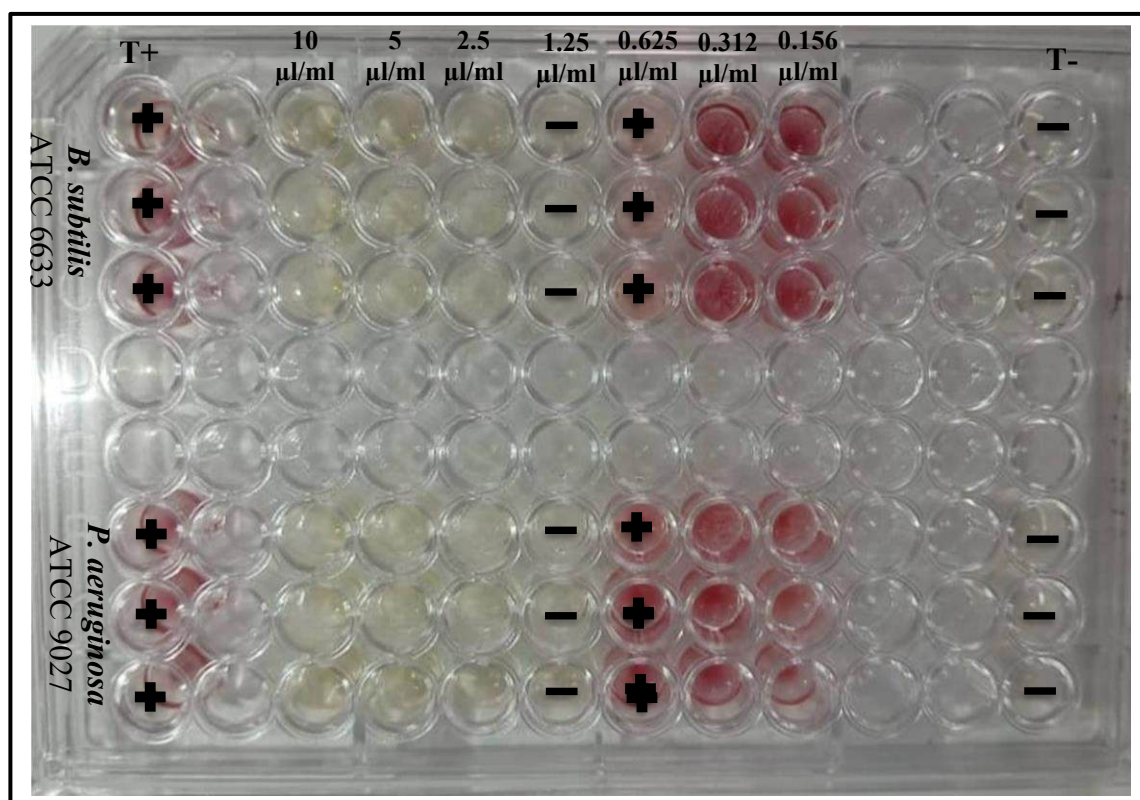


Figure 2.8: Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* vis-à-vis de *B. subtilis* ATCC 6633 et *P. aeruginosa* ATCC 9027.

▪ *S. aromaticum*

L'huile essentielle de *S. aromaticum* a exercé des CMI de 20 µl/ml vis à vis des souches *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6528 et *P. aeruginosa* ATCC 9027. Cependant, un CMI de 10µl/ml a été enregistré contre *B. subtilis* ATCC 6633. Selon les valeurs du tableau 2.3 l'huile essentielle *Syzygium aromaticum* a montré une activité bactériostatique à l'égard des quatre souches testées.

Des concentrations minimales inhibitrices (25 mg/ml) proches de celles rapportées dans le présent travail ont été mentionnées par **Marouf et al. (2023)** à l'égard des trois souches d'*E. coli* uropathogène. Toutefois ces mêmes auteurs ont montré qu'une CMI de 6.25mg/ml permet d'inhiber la croissance d'*E. coli* ATCC 25922.

Des résultats plus faibles ont été enregistrés par **Alitonou et al. (2012)** et **Prabuseenivasan et al. (2006)** contre *E. coli* avec une concentration de 0.2mg/ml et > 1.6 mg/ml, respectivement. De même, **Naveed et al. (2013)** ont mentionné une concentration de 5.4 mg/ml à l'égard d'*E. coli* SS1. Des études antérieures ont signalé des CMI 0.2% (p/v) vis-à-vis d'*E. coli* (**Poaty et al., 2015**). Egalement, **Adda et Rouane (2024)** ont noté une CMI de 1.25 µl/ml vis-à-vis d'*E. coli*.

Cependant, **El Baz et al. (2025)** ont montré que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a exercé un effet inhibiteur à l'égard d'*E. coli* et de *S. aureus* avec des doses de 0.625 mg/ml et 1.25 mg/ml, respectivement.

Boumelit et Rabia (2023) ont constaté des CMI de 0.19 µl/ml, 0.78µl/ml et 1.56µl/ml à l'égard de *P. aeruginosa*, *B. subtilis* et *S. aureus*, respectivement.

Des CMI plus faibles de l'ordre de 4µg/ml et 8 µg/ml ont été enregistrées par **Iseppi et al. (2024)** pour l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

D'après nos résultats, le rapport CMB/CMI pour l'HE de *Syzygium aromaticum* a été >4 vis-à-vis des quatre souches testées. En se basant sur les interprétations **Mogana et al. (2020)** et **Strompfová et al. (2024)** l'HE de *Syzygium aromaticum* possède une activité bactériostatique à l'égard de *S. aureus* ATCC 6528, *E. coli* ATCC 8739, *B. subtilis* ATCC 6633 et *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Contrairement à nos résultats, un effet bactéricide de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a été noté par **Marouf et al. (2023)** à l'égard d'*E. coli* uropathogène, d'*E. coli* ATCC 25922. Le même constat a été enregistré par **Adda et Rouane (2024)** et **El Baz et al. (2025)** vis-à-vis d'*E. coli*, *S. aureus*. De plus, **Boumelit et Rabia (2023)** ont montré que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* exerce une activité bactéricide contre *P. aeruginosa*, *B.*

subtilis et *S. aureus*.

L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* est reconnue d'être riche en Eugénol (Pinto *et al.*, 2009). Ce composant agit en altérant la membrane cellulaire, affectant 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, ces composés phénoliques perturbent les protéines incorporées dans la membrane et inhibent la respiration cellulaire (Trombetta *et al.*, 2005).

Trombetta *et al.*, (2005) ont rapporté que les altérations des processus de transport ionique de la membrane cellulaire et les modifications de l'activité du calcium provoquent une augmentation de la perméabilité cellulaire et une libération consécutive des constituants intracellulaires vitaux.

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

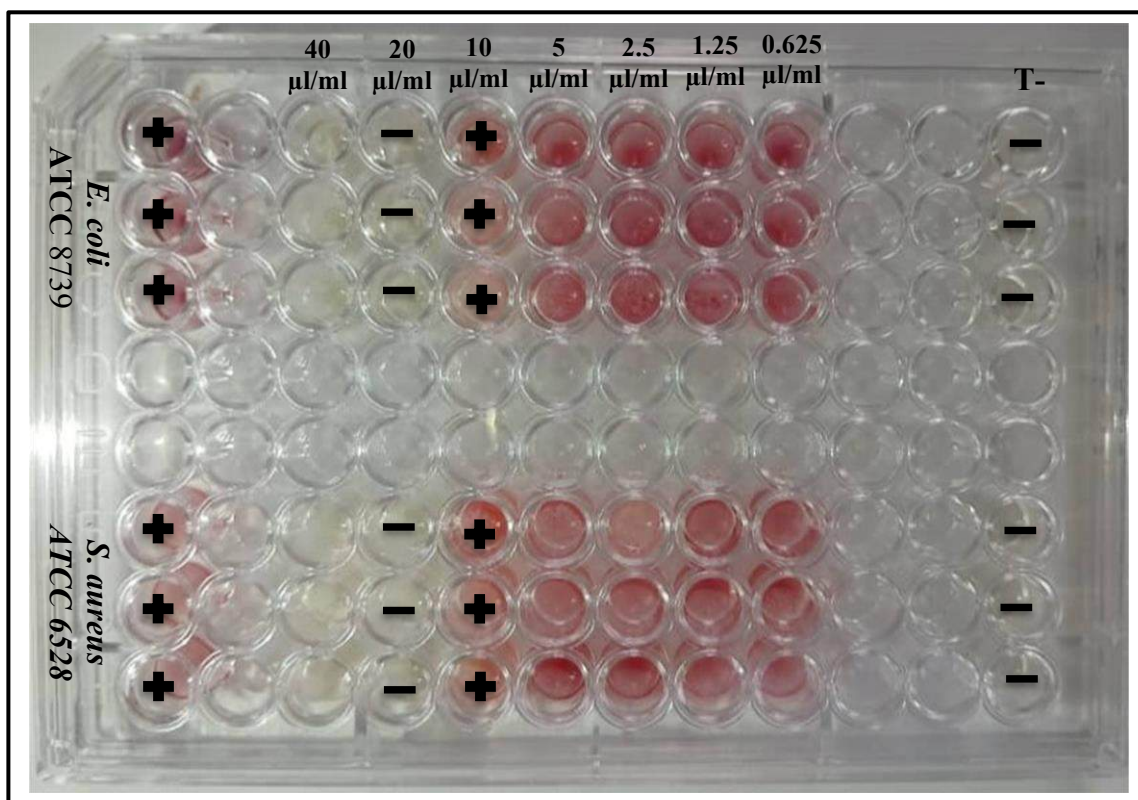


Figure 2.9 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 8739 et *S. aureus* ATCC 6528.

3- Etude de la synergie

La présente étude a présenté un indice de concentration fractionnelle inhibitrice d'huiles essentielles de *Cinnamomum aromaticum* et de *Syzygium aromaticum* variant de 1.125 à 2.25 à l'égard de quatre souches bactériennes référencées testées. Cette valeur permet d'attribuer un effet indifférent de cette association selon la méthode de lecture décrite par **Anon (1992)**. Le tableau 2.4 résume les indices de concentrations fractionnelles inhibitrices de l'association des huiles essentielles de *Cinnamomum aromaticum* et de *Syzygium aromaticum*.

La CMI du clou de girofle a été réduite au $\frac{1}{2}$ par rapport à la valeur initiale à l'égard *B. subtilis* ATCC 6633 et *E. coli* ATCC 8739, respectivement. Toutefois, aucune réduction de la CMI de cette l'huile essentielle n'a été observée vis-à-vis des *S. aureus* ATCC 6528 et *P. aeruginosa* ATCC 9027. Cependant, La CMI de l'huile essentielle de la cannelle a été réduite au $\frac{1}{4}$ et au $\frac{1}{2}$ par rapport à la valeur initiale à l'égard *B. subtilis* ATCC 6633 et *E. coli* ATCC 8739, respectivement. Alors qu'aucune réduction de la CMI de cette l'huile essentielle n'a été observée vis-à-vis des *S. aureus* ATCC 6528 et *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Tableau 2.4: Indices de concentration fractionnelle inhibitrice (FIC) des huiles essentielles de *Cinnamomum aromaticum* et *Syzygium aromaticum*.

Bactéries				Huile essentielle µl/ml			FICI	Appréciation
	<i>C. aromaticum</i> (µl/ml)			<i>S. aromaticum</i> (µl/ml)				
	CMI	CMI	FIC	CMI	CMI	FIC		
	seule	comb		seule	comb			
<i>E. coli</i> ATCC 8739	0.625	1.25	2	10	2.5	0.25	2.25	Indifférent
<i>S. aureus</i> ATCC 6528	1.25	2.5	2	20	2.5	0.125	2.125	Indifférent
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,312	0.312	1	5	1.25	0.25	1.25	Indifférent
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1.25	1.25	1	20	2.5	0.125	1.125	Indifférent

Un résultat similaire concernant l'effet indifférent a été annoncé par **Adda et Rouane (2024)** concernant la combinaison de deux huiles essentielles (*Syzygium aromaticum* et *Origanum vulgare*) à l'égard d'*E. coli*.

Iseppi et al. (2024) ont rapporté un effet synergétique de l'association de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et *Cinnamomun aromaticum* vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Conclusion

A la lumière de la présente étude nous pouvons conclure ce qui suit :

Les rendements en huiles essentielles de *Cinnamomum aromaticum* et du *Syzygium aromaticum* ont été de 1,48 % (p/p) et 3,22 % (p/p), respectivement.

L'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* a montré une bonne activité antibactérienne. L'aromatogramme a permis d'afficher des zones d'inhibition allant de 31 mm à 36.33 mm vis-à-vis des quatre souches référenciées testées. De même, cette huile essentielle a exercé une activité bactéricide vis-à-vis de *E. coli* ATCC 8739 et *S. aureus* ATCC 6528 avec une concentration minimale inhibitrice de 1.25 µl/ml et une concentration minimale bactéricide de 5µl/ml. Cependant, cette même huile essentielle a déployé une activité bactériostatique à l'égard de *B. subtilis* ATCC 6633 et *P. aeruginosa* ATCC 9027 avec une concentration minimale inhibitrice de 1.25 µl/ml et une concentration minimale bactéricide supérieure à 10µl/ml.

En revanche, l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a présenté une activité antimicrobienne plus modérée. L'aromatogramme a permis de déterminer des zones d'inhibition plus réduite que l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* avec des hallos d'inhibition allant de 14 mm à 17 mm. La méthode de micro-dilution nous a permis de déduire que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* possède une activité bactériostatique à l'égard des quatre souches référenciées testées avec une concentration minimale inhibitrice plus élevées variant entre 10 et 20 µl/ml et une concentration minimale bactéricide supérieur à 40 µl/ml, traduisant une efficacité réduite en comparaison avec l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum*.

L'étude de la combinaison de l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* avec l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* a permis d'afficher des indices de concentration fractionnelle inhibitrice allant de 1,125 à 2,25, indiquant un effet indifférent à l'égard des quatre souches référenciées testées. Des diminutions des concentrations minimales inhibitrices seules ont été observées vis-à-vis de *B. subtilis* ATCC 6633 et d'*E. coli* ATCC 8739.

Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* présente un potentiel antimicrobien supérieur par rapport à celle de l'huile essentielle *Syzygium aromaticum*. Ces résultats pourraient contribuer au développement de nouvelles stratégies pour lutter contre les résistances bactériennes. Des études complémentaires et plus élargies afin de déterminer la composition chimique de ces deux huiles essentielles et faire un screening d'un nombre assez important de bactéries multirésistantes.

Références Bibliographiques



1. Adda H, Rouane F. 2024. Étude 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. Master en Sciences Biologiques, Université Ibn Khaldoun-Tiaret.
2. Adinew B. 2014. GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from Cinnamon Bark growing in South-west of Ethiopia. *Int J Herbal Med.* 1: 22-31.
3. Afema J A, Davis M A, Sisco W M. 2019. Antimicrobial use policy change in pre-weaned dairy calves and its impact on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli*: a cross sectional and ecological study. *BMC Microbiol.* 19 : 217.
4. AFNOR (Association Française de Normalisation). 1992. Recueil des normes françaises « Huiles essentielles », 4ème édition, Paris.
5. Alekshun M N, Levy S B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 128: 1037-1050.
6. Alenazi N. 2024. Mechanisms and implications of antibiotic resistance in gram-positive bacterial strains. *Cellular and Molecular Biology.*
7. Alitonou A G, Tchobo F P, Avlessi F, Yehouenou B, Yedomonhan P, Koudoro A Y, Menut C, Sohounhloue D K. 2012. Chemical and biological investigations of *Syzygium aromaticum* L. essential oil from Benin. *Int J Biol Chem Sci.* 6(3): 1360-1367.
8. Anjum H, Arefin M S, Jahan N, Oishee M J, Nahar S, Islam S, Rahman M H. 2023. Roles of intrinsic and acquired resistance determinants in multidrug-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* in Bangladesh. *Bangladesh J Med Sci.* 22(3): 489-507.
9. Anon. 1992. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenberg H D (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 5.18.1–5.18.28.
10. Ariba F Z, Benchiheb H, Deneche S. 2020. Synthèse des propriétés physicochimiques et biologiques d'*Eucalyptus globulus* Labill. Université des Frères Mentouri Constantine.
11. Atoche Medrano J J. 2019. Essential oils in the development of new medicinal products. In: *Essential Oils – Oils of Nature*. IntechOpen.
12. Ayoola G A, Lawore F M, Adelowotan T, Aibinu I E, Adenipekun E, Coker H A B, Odugbemi T O. 2008. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). *Afr J Microbiol Res.* 2: 162-166.



13. Bansal T, Kaur H. 2016. Benefits of essential oil. J Chem Pharm Res. 8(6): 143-149.
14. Barus C. 2008. Étude électrochimique de molécules antioxydants et de leur association en milieux homogène et diphasique - Application aux produits cosmétiques. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
15. Basavaraju M, Gunashree B S. 2022. Escherichia coli: An overview of main characteristics.
16. Bernard T, Perineau F, Delmas M, Gaset A. 1989. Extraction of essential oils by refining of plant materials. II. Processing of products in the dry state: Illicium verum Hooker (fruit) and Cinnamomum zeylanicum Nees (bark). Flavour Fragr J. 4: 85-90.
17. 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. Phytother Res. 35(11) : 6089–6100.
18. Bonnet J. 2014. Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin. Démarche d'accompagnement dans sept élevages. Thèse, École Nationale Vétérinaire d'Alfort.
19. Bouhdid S, Abrini J, Baudoux D, Manresa A, Zhiri A. 2012. Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan : pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. J Pharm Clin. 31(3) : 141-148.
20. Boumelit A, Rabia I. 2023. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles du girofle (*Syzygium aromaticum*) et du romarin (*Rosmarinus officinalis*). Master biotechnologie végétale. Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf- Mila.
21. Bouyahya Y, Bakri A, Et-Touys A, Talbaoui A, Khouchlaa S, Charfi J, Abrini N, Dakka N. 2017. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. Phytothérapie.



22. Cavaco L M, Hasman H, Xia S, Aarestrup F M. 2009. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enterica sérovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrob Agents Chemother. 53 : 603-608.
23. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. 2021. FICHE TECHNIQUE : Staphylococcus aureus.
24. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Nakbi K A B, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Syzygium aromaticum* (L.). Phytother Res. 21(6) : 501-506.

25. Chang S T, Chen P F, Chang S C. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol.* 77 : 123-127.
26. Charles D J. 2013. *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. Springer.
27. Chowdhury M A N, Hossain M N, Rahman M M, Ashrafuzzaman M. 2013. Prevalence of multidrug resistance in human pathogenic *Staphylococcus aureus* and their sensitivity to *Allamanda cathartica* L. leaf extract. *Int Curr Pharm J.* 2(11) : 185-188.
28. CLSI. 2006. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard, 7th Ed.*
29. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover F C, Mamizuka E M, Gemmell C G, Kim M N, Ploy M C, El-Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K. 2003. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 41: 5-14.



30. Darji D R, Sapra P, Mankad A U. 2022. Bioactivity of Cinnamon Essential Oil. *Int Assoc Biol Comput Digest.* 1(1) : 47-54.
31. Delarras C. 2007. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Paris : Edition Lavoisier ,476p.
32. Deng X, Liao Q, Xu X, Yao M, Zhou Y, et al. 2014. Analysis of essential oils from cassia bark and cassia twig samples by GC-MS combined with multivariate data analysis. *Food Anal Methods.* 7: 1840-1847.
33. 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. *J Ethnopharmacol.* 130: 107-115.
34. Diggle S P, Whiteley M. 2020. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology.* 166 : 30-33.
35. Djilaili I, Kharroubi S, SLIMANE F. 2018. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*).
36. 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.
37. Dziri S, Casabianca H, Hanchi B, Hosni K. 2014. Composition of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) as influenced by drying method. *J Essent Oil Res.* 26(2): 91-96.

Æ

38. Earl A M, Losick R, Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends Microbiol. 16(6) : 269-275.
39. El Atki Y, Aouam I, Taroq A, El Kamari F, Timinouni M, Lyoussi B, Abdellaoui A. 2020. Antibacterial effect of combination of cinnamon essential oil and thymol, carvacrol, eugenol, or geraniol. J Rep Pharm Sci. 9: 104-109.
40. El Baz S, Soulaïmani B, Abbad I, Azgaou Z, Lotfi E M, Malha M, Mezrioui N. 2025. Antimicrobial Activity and the Synergy Potential of *Cinnamomum aromaticum* Nees and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry Essential Oils with Antimicrobial Drugs. Microbiol Res. 16 : 63.
41. Elmecheri A. 2018. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la cannelle de Chine (*Cinnamomum aromaticum*) [Mémoire de doctorat vétérinaire, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, Institut des Sciences Vétérinaires].
42. Errington J, van der Aart L T. 2020. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. Microbiology. 166(5): 425-427.
43. Eyob S, Martinsen B K, Tsegaye A, Appelgren M, Skrede G. 2008. Antioxidant and Antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen). Afr J Biotechnol. 7: 2585-2592.

F

44. 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 J Biol Sci. 28(1) : 928-935.
45. Ferhat M. 2007. Extraction sans solvant assistée par microondes des huiles essentielles des citrus d'Algérie : Compréhension, application et valorisation. Thèse, Université des Sciences et Technologies Houari Boumediene, Faculté de Chimie, Algérie.
46. Ferreira E D S, Rosalen P L, Benso B, Orlandi Sardi J C, Denny C, Alves de Sousa S, Queiroga Sarmento Guerra F, de Oliveira Lima E, Almeida Freires I, Dias de Castro R. 2021. The Use of Essential Oils and Their Isolated Compounds for the Treatment of Oral Candidiasis: A Literature Review. Evid Based Complement Alternat Med. 2021 : 1059274.
47. Ferron A. 1994. Chapitre 76 : La résistance des bactéries aux antibiotiques. In : Bactériologie médicale. 15e éd., Ed. C. et R., Paris, 12 p.



48. Gaylord R, Jahiel M, Duclos T, Panja Ramanoelina P, Fawbush F, Danthu P. 2014. Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. *Int J Basic Appl Sci.* 3(3): 224-233.
49. Geng S, Cui Z, Huang X, Chen Y, Xu D, Xiong P. 2011. Variations in essential oil yield.
50. Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H. 2006. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytother Res.* 20 : 58-61.
51. Gouvernement, HAS, Assurance Maladie, ANSM, Haute Autorité de Santé, ANSES, Inserm, Santé publique France. 2021. ANTIBIORESISTANCE : De la recherche à l'action, tous mobilisés pour lutter contre l'antibiorésistance.
52. Guan W, Ly S, Yan R, Tang S, Quan C. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chem.* 101: 1558-1564.
53. Guardabassi L, Courvalin P. 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aarestrup F M (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press, Washington, p. 1-18.
54. Guinoiseau E. 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat, Université de Corse, France. p. 114.
55. Gupta N, Jain A, Sen R, Mishra S, Gupta M. 2022. A Study on Isolation of *E. Coli* Bacteria from Different Human Clinical Specimens. *Int J Health Sci Res.* 12(6) : 255-263.
56. 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 Microbiol.* 26: 142-150.



57. Hanna M I, El-Hady M A, Ahmed H A, Elmeadawy S A, Kenawy A M. 2014. A contribution on *Pseudomonas aeruginosa* infection in African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 5(5): 575-589.
58. Huang D F, Xu J G, Liu J X, Zhang H, Hu Q P. 2014. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. *Microbiology.* 83: 357-365.

J

59. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Antimicrob Chemother.* 47: 565-573.
60. Iseppi R, Truzzi E, Sabia C, Messi P. 2024. Efficacy and Synergistic Potential of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and Clove (*Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry) Essential Oils to Control Food-Borne Pathogens in Fresh-Cut Fruits. *Antibiotics.* 13 : 319.

L

61. Jeyaratnam N, Nour A H, Kanthasamy R, Nour A H, Yuvaraj A R, Akindoyo J O. 2016. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Ind Crops Prod.* 92: 57-66.
62. Jha S S, Joshi S J, Joshi G S. 2016. Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Braz J Microbiol.* 47 : 955-964.

K

63. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 33(3): 300-305.
64. Kasim N N, Ismail S N A S, Masdar N D, Ab Hamid F, Nawawi W I. 2014. Extraction and potential of cinnamon essential oil towards repellency and insecticidal activity. *Int J Sci Res Publ.* 4 : 1-6.

L

65. Laiche C, Mecheri M. 2023. Extraction des huiles essentielles et hydrolats [Mémoire de master, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie].
66. Lambert P A. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev.* 57: 1471-1485.
67. Li H B, Wong C C, Cheng K W, Feng C. 2008. Antioxidant properties in vitro and Total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensm Wiss Technol.* 41(3): 385-390.

68. Liu X C, Cheng J, Zhao N N, Liu Z L. 2014. Insecticidal activity of essential oil of *Cinnamomum cassia* and its main constituent, trans-Cinnamaldehyde, against the booklice, *Liposcelis bostrychophila*. Trop J Pharm Res. 13: 1697-1702.



69. Marchese A, et al. 2017. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. Crit Rev Microbiol. 43(6): 668-689.
70. Mare A D, Ciurea C N, Man A, Tudor B, Moldovan V, Decean L, Toma F. 2021. Enteropathogenic *Escherichia coli*—A summary of the literature. Gastroenterol Insights. 12(1): 28-40.
71. Marouf R, Ermolaev A A, Podoprigora I V, Senyagin A N, Mbarga M J A. 2023. Antibacterial activity of Clove *Syzygium aromaticum* L. and synergism with antibiotics against multidrug-resistant uropathogenic *E. coli*. RUDN J Med. 27(3): 379-390.
72. Mbaveng A T, Kuete V. 2017. *Syzygium aromaticum*. In Medicinal Spices and Vegetables from Africa (pp. 611-623). Elsevier. DOI : 10.1016/B978-0-12-809286-6.00029-7.
73. Medjani C, Maguemoun K. 2017. Extraction, analyse et évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la cannelle de chine.
74. Melles D C. 2008. Natural Population Dynamics and Carriage of *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat, Erasmus University Rotterdam.
75. Mogana R, Adhikari A, Tzar M N, Ramliza R, Wiart C. 2020. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. BMC Complement Med Ther. 20: 55.
76. Moore L, Goodwin AC (eds). Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. CRC Press, Boca Raton, p. 275-298.
77. Moore N M, Flaws M L. 2011. Introduction : *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Lab Sci. 24(1) : 41-43.
78. Morand A, Morand J-J. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie. Ann Dermatol Venereol. 144 : 327-334.
79. Muylaert A, Mainil J G. 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». Ann Méd Vet. 156 : 109-123.



80. Naab D, Hadibi S. 2018. Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Zingiber officinale* et *Rosmarinus officinalis* en combinaison avec la nisine. Mémoire, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
81. Nabavi S F, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M, Nabavi S M. 2015. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*. 7: 7729-7748.
82. Nadgir C A, Biswas D A. 2023. Antibiotic Resistance and Its Impact on Disease Management. *Cureus*. 15(4) : e38251.
83. Naili N E P, Kesraoui M. 2013. Activité antibactérienne du Cumin velu *Ammodaucus leucotrichus*. Mémoire de Master, Botanique médicale et Cryptogamie.
84. Nana W L, Eke P, Fokom R, Bakanrga-Via I, Begoude D, Tchana T, Tchameni N S, Paris M, Hurabielle M. 1981. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie), Tome. Ed. Masson. p 339.
85. Nappi F, Singh S S A. 2023. Host-Bacterium Interaction Mechanisms in *Staphylococcus aureus* Endocarditis: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 24: 11068.
86. 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.
87. 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.
88. Naveed R, Hussain I, Mahmood M S, Akhtar M. 2013. In vitro and in vivo evaluation of antimicrobial activities of essential oils extracted from some indigenous spices. *Pak Vet J*. 33(4) : 413-417.
89. Nazzaro F, Fratianni F, de Martino L, Coppola R, de Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 6: 1451-1474.
90. Nikaido H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*. 78: 119-146.
91. Noble W C, Virani Z, Cree R G. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 72: 195-198.



92. Pagès J M, James C E, Winterhalter M. 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 6(12) : 893-903.
93. Paul S. 2004. *Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie.* Paris.
94. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 58(11): 1454-1462.
95. Poaty B, Lahlah J, Porqueres F, Bouaff H. 2015. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven essential oils from the North American boreal forest. *World J Microbiol Biotechnol.* 31(6): 907-919.
96. 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 Sci Technol.* 36(7): 679-684.
97. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med.* 6: 39.
98. Purkait S, Bhattacharya A, Bag A, Chattopadhyay R R. 2020. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. *Arch Microbiol.* 202(6): 1439-1448.



99. Radulovic N, Dekic M, Stojanovic-Radic Z, Palic R. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). *Turk J Chem.* 35(3): 499-512.
100. Rhouma A, Hajji-Hedfía L, Bousselma A, Matrood A A A. 2023. Essential oils: An ecofriendly approach for plant pest and disease management. *Int J Plant Soil Sci.* 35(8) : 80-89.
101. Richard F. 1992. *Manuel des corps gras.* Paris: Lavoisier, Tec & Doc.
102. Robicsek A, Jacoby G A, Hooper D C. 2006. The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 6: 629-640.
103. Rocha L G, Almeida J R, Macedo R O, Barbosa-Filho J M. 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine.* 12: 514-535.
104. Rodríguez O, Sánchez R, Verde M, Núñez M, Ríos R, Chávez A. 2014. Obtaining the essential oil of *Syzygium aromaticum*, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*. *J Oral Res.* 3(4): 218-224.

- 105.Rodriguez-Martinez J M, Velasco C, Briales A, Garcia I, Conejo M C, Pascual A. 2008. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. J Antimicrob Chemother. 61: 1240-1243.



- 106.Saeed A, Shahwar D. 2015. Evaluation of biological activities of the essential oil and major component of *Syzygium aromaticum*. J Anim Plant Sci. 25(4): 1095-1099.
- 107.Santos A L, Santos D O, Freitas C C, Ferreira B L A, Afonso I F, Rodrigues C R, Castro H C. 2007. *Staphylococcus aureus* : visitando uma cepa de importância hospitalar. Bras Patol Med Lab. 43(6) : 413-423.
- 108.Sattayakhom A, Wichit S, Koomhin P. 2023. The effects of essential oils on the nervous system: A scoping review. Molecules. 28: 3771.
- 109.Schwarz S, Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. J Vet Res. 32 : 201-225.
- 110.Selles S M A, Kouidri M, Belhamiti B T, Ait Amrane A. 2020. Chemical composition, in-vitro antibacterial and antioxidant activities of *Syzygium aromaticum* essential oil. J Food Meas Charact. 14(4) : 2352-2358.
- 111.Selles S M A. 2019. Diarrhée néonatale du veau et son traitement par les plantes médicinales et les produits de la ruche. Thèse de doctorat. Université de Mascara.
- 112.Selles S M A, Kouidri M, Ait Amrane A, Belhamiti B T, Drideche M, Hammoudi S M, Boukrâa. 2017. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Cinnamomum aromaticum* Essential Oil Against Four Enteropathogenic Bacteria Associated with Neonatal Calve's Diarrhea. Asian J Anim Vet Adv. 12 (1) : 24-30.
- 113.Shankar S, Prasad S, Owaiz M, Yadav S, Manhas S, Yaqoob M. 2021. Essential oils, components and their applications: A review. Plant Arch. 21(Suppl 1): 2027-2033.
- 114.Singh G, Maurya S, De Lampasona M P, Catalan C A N. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. Food Chem Toxicol. 45: 1650-1661.
- 115.Singh J, Baghotia A, Goel S P. 2012. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A review. Int J Res Pharm Biomed Sci. 3(4) : 1469-1475.
- 116.Sokamte T A, Jazet D P M, Tatsadjieu N L. 2016. In vitro activity of *Syzygium aromaticum* against food spoilage fungi and its potential use as an antiradical agent. J Microbiol Res. 6(1): 1-7.

- 117.Souiy Z. 2023. Essential oil extraction process. In: Essential Oils – Recent Advances, New Perspectives and Applications. IntechOpen, p. 1-15.
- 118.Strompfová V, Štempelová L, Wolaschka T. 2024. Antibacterial activity of plant-derived compounds and cream formulations against canine skin bacteria. Vet Res Commun. 48(3) : 1459-1470.
- 119.Stülke J, Grüppen A, Bramkamp M, Pelzer S. 2023. Bacillus subtilis, a Swiss Army Knife in Science and Biotechnology. J Bacteriol. 205(5) : 1-10.

T

- 120.Trombetta D, Castelli F, Sarpietro M G, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antim Agents Chemother. 49: 2474-2478.

T^o

- 121.Vasconcelos N G, Croda J, Simionatto S. 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. Microb Pathog. 120: 198-203.
- 122.Verman P. 2007. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. In: Schwalbe R, Steele
- 123.Von Wintersdorff C J H, Penders J, van Niekerk J M, Mills N D, Majumder S, van Alphen L B, et al. 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. Front Microbiol. 7: 173.

W^o

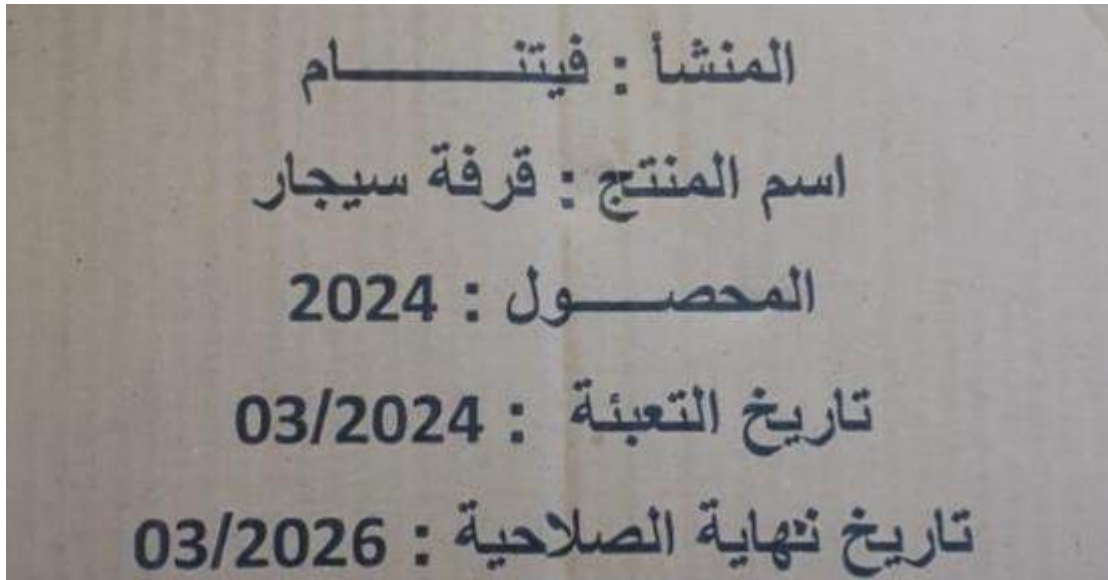
- 124.Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper D C. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis. Antimicrob Agents Chemother. 53: 1892-1897.
- 125.Wright G D. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev. 57: 1451-1470.

Z

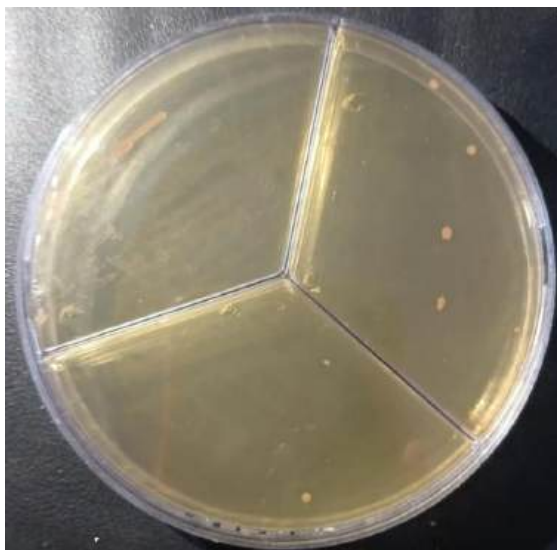
- 126.Zengin H, Baysal A H. 2014. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*. 19(11): 17773-17798.
- 127.Zhang C, Fan L, Fan S, Wang J, Luo T, Tang Y, Chen Z, Yu L. 2019. *Cinnamomum cassia* Presl: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Molecules*. 24(19): 3473.
- 128.Zhang F, Cheng W. 2022. The mechanism of bacterial resistance and potential bacteriostatic strategies. *Antibiotics*. 11: 1215.
- 129.Zhang X, Al-Dossary A, Hussain M, Setlow P, Li J. 2020. Applications of *Bacillus subtilis* spores in biotechnology and advanced materials. *Appl Environ Microbiol*. 86(17): e01096-20.
- 130.Zhou X, Li Y (eds). 2015. Chapter 1: Basic biology of oral microbes. In: *Atlas of Oral Microbiology*. Academic Press, p. 1-14.

ANNEXES

Annexe 1: fiche de produit



Annexe 2 : Concentration minimale bactéricide de *Cinnamomum aromaticum*



Annexe 3 : Concentration minimale bactéricide de *Sygygium aromaticum*

