

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad DAHLEB de Blida
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques
Département de Biologie

**Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie**

Option : Microbiologie - Bactériologie

Thème :

**Approche Méthodologique de l'Activité
Antimicrobienne des Huiles Essentielles :
Fragrance de Citronnelle (*Cymbopogon citratus*(DC).)**

Réalisé par :

• **Tayeb Khadija**

Date de soutenance :

18/09/2013

Devant le jury composé de :

M^{me} Benazouz F.	MAA, Département de Biologie, USDB	Présidente
M^{me} Zerkaoui A.	MAA, Département de Biologie, USDB	Examinatrice
M^{me} Ouarab S.	MCB, Département de Biologie, USDB	Examinatrice
Mr. Boukhatem M.N.	MAA, Département de Biologie, USDB	Promoteur

Promotion : 2012 /2013

Travaux antérieurs :

Une partie du présent mémoire a fait l'objet d'une communication affichée (Poster) à la 6^{ème} Journée Nationale d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Associées aux Soins, organisée par l'Etablissement Public Hospitalier Bologhine Ibn Ziri d'Alger, et qui s'est tenue le 23 Mai 2013 au Palais de la culture d'Alger. En voici le résumé de cette présentation :

Antimicrobial screening of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: Disc Diffusion versus Vapour Diffusion Methods

Boukhatem MN, Tayebi K, Kameli A, Saidi F, Hamaidi MS, and Mekarnia M.

Abstract

Aims

The essential oil (EO) from *Cymbopogon citratus* (Lemon grass) is reported to have a wide range of biological activities and is widely used in traditional medicine. However, there are few controlled studies confirming its antimicrobial activity against microbial strains.

The aim of this study was to test the efficacy of the EO of Lemongrass against a wide spectrum of pathogenic bacteria and yeasts by disc diffusion and vapour diffusion methods at different concentrations.

Material and Methods

The chemical composition of the oil was analysed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and 14 components were identified, where Geraniol (23.9%), Nerol (24.30%) and Myrcene (23.92%) were the most abundant constituents.

Results

By disc diffusion method, Lemongrass EO showed potent antimicrobial activity against Gram positive more than Gram negative bacteria. The zone of inhibition varied from 17 mm to 42 mm for Gram positive bacteria and from 31 to 70 mm for *Candida* yeasts. The oil exhibited the strongest antifungal effect against *Candida* strains whereas no inhibitory effect was found against *Klebsiella pneumoniae*.

However, the results obtained by both agar diffusion and vapour diffusion methods were different. Significantly higher antimicrobial activity was observed in the vapour phase at lower concentrations than in liquid phase. Therefore, smaller doses of EO in the vapour phase can be inhibitory to spoilage yeasts. The use in vapour phase could have additional advantages such as efficacy without requiring direct contact resulting in ease of application.

Conclusion

There is growing evidence that EO in vapour phase are effective antimicrobial systems and that they do have advantages over the use of EO in liquid phase such as an increase in activity, use at lower concentrations, ability to be used in a range of environments, for example, as air decontaminants in hospital.

Keywords: Lemongrass, Essential oils, Antimicrobial activity, Disc diffusion, Vapour diffusion, *Candida* strains.



maître assistant,

- *Je suis très honorée que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assurée de ma profonde gratitude.*
- *M^{me} Zerkaoui A., votre venue en tant qu'examinatrice m'honore, je vous suis très reconnaissante et je vous adresse mes vifs remerciements.*
- *M^{me} Ouaraï S., Merci pour avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire, pour l'intérêt que vous portez à mon travail et pour le temps consacré afin de l'évaluer.*

Toutes mes salutations à tous mes collègues de la promotion de master 2013 pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements





Dédicaces

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

A la mémoire de ma grand-mère que dieu repose son âme en paix,

Je dédie aussi cette modeste réalisation à:

- Mes très chers frères: P. Laouiani, Omar, Ali et Sid Ahmed.*
- Mes très chères sœurs: Moulkheir, Mebaraka, Saida, F. Zohra et Kheira.*
- Mes chers oncles, tantes, cousins et cousines.*
- Toutes mes meilleures amies: Numa, Houria, Meriem, Amina, Souad et Khadidja.*

- Tous les miens.*

Résumé

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles (HE) *in vitro* a fait l'objet de plusieurs études scientifiques. Cependant, les méthodes utilisées sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents ou contradictoires. L'objectif assigné à notre travail consiste à asseoir l'activité antimicrobienne de l'HE d'une plante à parfum largement exploitée en aromathérapie, la Citronnelle (*Cymbopogon citratus*), par plusieurs méthodes microbiologiques, qualitative et quantitative.

La composition chimique de l'HE, extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau, a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Le Géraniol est le composé majoritaire de cette huile avec un taux de 28,9%, suivi par le Néral (24,3%) et le Myrcène (23,3%).

Le screening antimicrobien de l'HE a été accompli par différentes méthodes sur des souches de référence et isolées cliniquement (20 bactéries, 9 levures et 4 moisissures).

En phase liquide (aromatogramme), l'huile a exhibé une activité bactériostatique majeure sur les bactéries à Gram+ avec des diamètres de zones d'inhibition (DZI) qui varient entre 34 et 85mm pour le genre *Staphylococcus*. De plus, ce l'huile est fongicide car la majorité des souches mycéliennes ont été inhibées totalement.

En phase vapeur (microatmosphère), de meilleurs résultats ont été obtenus notamment pour les Gram+ où l'HE est avérée bactéricide avec une dose de 3 gouttes par disque.

En diffusion à partir de puits, l'essence est plus active sur les levures et les moisissures avec des valeurs de DZI oscillant entre 20 et 85 mm.

En dilution à partir d'un disque, ce sont les levures qui ont été fortement inhibées avec des DZI qui s'échelonnent de 15 à 40 mm.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu gélifié. Les levures et les Gram+ sont les plus sensibles avec des CMI qui varient entre 0.625 et 1.25 mg/mL. Les Gram- sont toujours les plus résistants avec des CMI supérieures à 1.25 mg/mL.

Les résultats obtenus prouvent qu'il n'y a pas une méthode qui prime, mais que toutes sont complémentaires. Le choix de celle-ci dépendra grandement des objectifs recherchés.

Mots-clés : **Activité antimicrobienne, Huiles essentielles, *Cymbopogon citratus*, Aromatogramme, Microatmosphère, CMI, Citral.**

Abstract

The antibacterial and antifungal activity of essential oil (EO) have been widely studied and demonstrated *in vitro*. However, the results obtained are different. The aim of our study was to test the antimicrobial activity of Lemongrass EO (*Cymbopogon citratus*) by different methods.

The chemical composition of EO, determined by Gas chromatography, revealed that Geranial was the major component (28, 9%), followed by Neral (24, 3%) and Myrcene (23, 9%).

The antimicrobial activity has been carried out by different methods and with different concentrations against a wide spectrum of strains, referenced and clinical isolated microorganisms. In the liquid phase (disc diffusion method), the EO exhibited the stronger antimicrobial effect against Gram+ bacteria with Diameter of Inhibition Zone (DIZ) varied between 34 and 85mm for the genus of *Staphylococcus*. Else, the totality of *Candida* and filamentous fungi has been inhibited.

In the vapour phase, better results were obtained particularly with Gram+ strains which were inhibited totally in the dose of 3drops per disc.

In the agar well diffusion method, our study revealed that fungal strains were the most sensitive to the inhibitory effect of Lemongrass EO with DIZ varied between 20 and 85 mm.

With disc dilution method, the *Candida* strains were also the most sensitive. Else, the DIZ obtained by this method varied from 18 to 40mm.

The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) were determined by agar dilution method. MIC varied from 0.625 and 1.25 mg/mL for Gram+ bacteria and for yeast. Further, the Gram- strains (MIC = 1.25 mg/mL), were the most resistant.

Finally, our results obtained in this study suggest that there isn't a premium method to assess the antimicrobial properties of EO, but all are complementary. Besides, the choice of the latter greatly depends on the aims.

Keywords: Antimicrobial activity, Essential oil, *Cymbopogon citratus*, Disc diffusion method, Vapour phase, MIC, Citral.

ملخص

مخبريا, كان نشاط الزيوت العطرية المضاد للجراثيم موضوعا للعديد من الدراسات العلمية. مع ذلك فإن الأساليب المستخدمة عديدة و قد أعطت نتائج مختلفة. تهدف هذه الدراسة الى اختبار النشاط المضاد للجراثيم بواسطة عدة طرق ميكروبيولوجية كمية و نوعية لنبته عطرية, تسمى حشيشة الليمون (*Cymbopogon citratus*) (و هي نبته تستخدم على نطاق واسع في طب الروائح. تم تحديد التركيب الكيميائي للزيت الأساسي المستخرج بطريقة التقطير البخاري بالماء عن طريق الكروماتوغرافية الغازية (CG-SM). Géraniol هو العنصر الرئيسي في هذا الزيت بنسبة 28,9%, يليها néral (24,3% و myrcène (23,9%). و قد تم انجر العنصر المضاد للجراثيم بواسطة عدة طرق مختلفة ضد سلالات مرجعية وأخرى معزولة سريريا (20 بكتيريا, وسماء 4 فئات فطرية).

في المرحلة السائلة (aromatogramme) أظهر الزيت نشاط فعال ضد البكتيريا غرام ++ (Gram++) (بأقطار تثبيط تتراوح ما بين 34 و 85 مم وذلك لنوع المكررات العنقودية (*Staphylococcus*).

يعتبر زيت حشيشة الليمون منبط فطري قوي لأن أغلبية الخلايا قد ثبتت تماما.

في مرحلة البخار (microatmosphère), أفضل النتائج تم الحصول عليها مع السلالات الغرام + (Gram+) أين أظهر قدرة كبيرة على التثبيط و ذلك بالنسبة تركيز يتغير من 10⁻¹ من الزيت في القرص الواحد.

بالنسبة لطريقة الانتشار عن طريق (puit) كشفت عن نتائج أن سلالات السالبة هي الأكثر حساسية بأقطار تثبيط تتراوح بين 20 مم و 85 مم.

بطريقة التخفيف, كانت الخمائر هي الأكثر تثبيطا بأقطار تتراوح ما بين 18 و 40 مم.

تم تحديد التراكيز المثبته الدنيا بواسطة طريقة التخفيف في وسط اغار الخمائر و البكتيريا موجبة الغرام هن الأكثر حساسية بتراكيز مثبته دنيا (CMI) تتراوح بين 0,625 و 1,25 ملغ/مل. علاوة على ذلك كانت سلالات السالبة الغرام (Gram-) هي الأكثر مقاومة (CMI أكبر من 1,25 ملغ/مل).

أظهرت النتائج المتحصل عليها أنه لا توجد طريقة تتفوق على أخرى و لكن كلها متكاملة. اختيار هذه الأختبار يعتمد بشكل كبير على الأهداف المنشودة.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للجراثيم, الزيوت العطرية, *Cymbopogon citratus*, aromatogramme, microatmosphère, التخفيف, التراكيز المثبته الدنيا, Citral.

Liste des abréviations

% : pourcentage

⁰C : Degré Celsius

ATCC : Souches de références (American Type Collection Culture)

ATB : Antibiotique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DM : dilution mère

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

DZI : Diamètre de la Zone d'Inhibition

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un Spectromètre de masse.

HE : huile essentielle

h : heure

MH : milieu de Mueller Hinton

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

mg : milligramme

PAM : Plante Aromatique et Médicinale

SAC : Sabouraud chloramphénicol

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	10
2	Citronnelle (<i>Cymbopogon citratus</i>) = Aspects morphologique et botanique	18
3	Illustration de la méthode de l'aromatogramme	23
4	Illustration de la méthode de microatmosphère	23
5	Illustration de la méthode de dilution à partir des disques	23
6	Illustration de la différence dans la paroi bactérienne entre Gram+ et Gram-	29
7	DZI de quelques bactéries en aromatoigramme.	34
8	DZI de quelques levures et moisissures en aromatoigramme.	34
9	Effet antibactérien de l'HE en aromatoigramme	35
10	Effet antifongique de l'HE en aromatoigramme	36
11	DZI de quelques bactéries en Microatmosphère.	40
12	DZI de quelques levures et moisissures en Microatmosphère	40
13	Effet antibactérien de l'HE en microatmosphère	41
14	Effet antifongique de l'HE en microatmosphère	42
15	Etude comparative entre aromatoigramme et microatmosphère	44
16	Effet antimicrobien de l'HE par diffusion sur disques	46
17	Effet antimicrobien de l'HE en micro puits	49
18	Mécanisme d'action des HE au niveau de la cellule microbienne	52
19	Détermination des CMI pour les bactéries	53
20	Détermination des CMI pour les levures d'HE	54

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Définitions de la CMI	5
2	Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne	20
3	Souches fongiques utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne	20
4	Composition chimique de l'HE de citronnelle (<i>Cymbopogon citratus</i>)	26
5	Activité antimicrobienne de l'HE par différentes méthodes microbiologiques	30
6	Activité anticandidosique de l'HE par différentes méthodes microbiologiques	31
7	Activité antifongique de l'HE par différentes méthodes microbiologiques	31
8	Diamètre d'inhibition (mm) des germes vis-à-vis de l'HE par dilution	45
9	principaux agents dispersants utilisés pour les HE	47
10	Résultats des CMI de citronnelle de plusieurs équipes	51

Table des matières

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

Chapitre 1

Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

1.1. Techniques en milieu solide.....	3
1.1.1. Méthode de diffusion en disque = méthode en phase liquide.....	3
1.1.2. Méthode de diffusion par disque après dilution.....	4
1.1.3. Méthode de diffusion en puits.....	4
1.1.4. Méthode de microatmosphère = méthode en phase vapeur.....	4
1.2. Techniques en milieu liquide.....	5
1.2.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	5
1.2.1.1. Technique de macrodilution en milieu liquide.....	6
1.2.1.2. Technique de microdilution en milieu liquide et mesure de turbidité par densité optique.....	7
1.2.1.3. Dénombrement sur milieu gélose.....	8
1.2.1.4. Technique de macrodilution en milieu solide.....	8
1.2.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide.....	8
1.3. Dynamique d'action des HE par mesure de la croissance bactérienne (Time-kill assay).....	11
1.4. Expérience de lyse cellulaire.....	11
1.5. Microscopie Electronique à Transmission (MET).....	11
1.6. Évaluation de l'activité antifongique.....	11
1.7. Méthodes innovantes.....	12

Chapitre 2

Morphologie de la plante étudiée : Citronnelle (*Cymbopogon citratus*)

2.1. Histoire et origine.....	13
2.2. Botanique et culture.....	13
2.3. Systématique.....	14
2.4. Plantes voisines.....	14
2.5. Huile essentielle de la citronnelle.....	14
2.5.1. Composition chimique.....	15
2.5.2. Propriétés curatives de la citronnelle.....	15

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1. Matériel	19
3.2. Méthodes.....	21
3.2.1. Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle	21
3.2.1.1. Méthode des aromatogrammes = Technique en milieu solide.....	21
3.2.1.2. Microatmosphère = méthode en phase vapeur.....	22
3.2.1.3. Méthode de dilution à partir des disques	24
3.2.1.4. Méthode de diffusion en puits	24
3.2.1.5. Détermination des CMI par macrodilution en milieu gélosé.....	24

Chapitre 4

Résultats et Discussions

4.1. Composition chimique de l'huile essentielle de Citronnelle	26
4.2. Facteurs de variabilité de la composition chimique.....	27
4.3. Activité antibactérienne et antifongique de l'essence du Lemongrass.....	28
4.3.1. Résultats de l'Aromatogramme.....	28
4.3.2. Résultats de microatmosphère.....	37
4.3.3. Etude comparative : Aromatogramme versus Microatmosphère	43
4.3.4. Activité antimicrobienne d'HE de Citronnelle par dilutions à partir des disques.....	44
4.3.5. Méthode de diffusion à partir d'un puits.....	47
4.3.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	50
Conclusion.	55

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Dans le cadre d'un programme d'investigations visant, d'une part, la connaissance des plantes aromatiques et médicinales (PAM) de notre pays (Algérie), et d'autre part, la recherche de procédés modernes de conservation des aliments, inspirés des techniques traditionnelles, il était nécessaire de disposer de techniques simples, rapides, reproductibles, et économiques pour l'étude des propriétés antiseptiques des Huiles Essentielles (HE). Aussi, l'importance de pousser scientifiquement les investigations sur les HE comme source potentielle de nouveaux composés antimicrobiens, à visée thérapeutique, vient de l'utilisation traditionnelle des plantes à des fins médicinales. Cependant, la consommation de ces produits naturels nécessite une recherche plus approfondie dans ce domaine.

L'activité antimicrobienne des HE est le sujet de plusieurs études scientifiques *in vitro* depuis plusieurs années. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur. (Janssen et al., 1987 ; Adorjan et Buchbauer, 2010)

L'examen des données bibliographiques fait apparaître en plée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HE. Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans des livres (Nychas, 1995 ; Lawrence, 2005 ; Jaser et Buchbauer, 2010 ; Thormar, 2011 ; Worwood, 2012), des mémoires de Magister et thèses de Doctorat (Rhayour, 2002 ; Pibiri, 2005 ; Dridi, 2005 ; Makhloufi, 2013) ainsi que dans différentes publications (Benjilali et al., 1984 ; Hili et al., 1997 ; Delaquis et al., 2002 ; Edris, 2007 ; Gutierrez et al., 2009 ; Höferl et al., 2009 ; Solórzano-Santos et al., 2012 ; Lang et Buchbauer, 2012 ; Boukhatem et al., 2013a). Ces aperçus édités prouvent qu'il n'y a pas une seule méthode qui est employée par tous les chercheurs et on ne peut affirmer ou confirmer qu'elle technique la plus adéquate à même d'être utilisée pour le screening antimicrobien *in vitro*.

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* des HE peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Les méthodes les plus couramment utilisées sont la « méthode de diffusion dans l'agar » et la « méthode de dilution ». Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'HE et selon la nature du contact de l'HE avec le germe (Burt, 2004). Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas dénuées d'inconvénients (Wilkinson et Cavanagh, 2005). La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. De plus, des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations.

D'autre part, notre pays, de par sa position géographique et la diversité de son climat, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques à même de « booster » la culture et l'exploitation industrielle des PAM (**Boukhatem et al., 2011**). Malheureusement, rares sont les plantes qui sont cultivées d'une façon intensive pour en extraire leur principes actifs à des fins industrielles et/ou thérapeutiques.

A Chiffa (wilaya de Blida, 60 Km au sud-ouest d'Alger), il en existe actuellement une dizaine de PAM cultivée, ayant un intérêt industriel, par une unité moderne de production des HE (Extral-Bio). Nous citerons, entre autres, la Citronnelle (*Cymbopogon citratus*) dont la fragrance reste, hélas, peu étudiée et exploitée.

De ce fait, l'objectif assigné à notre travail consiste à étudier le pouvoir antibactérien et antifongique (sur des souches de références et isolées cliniquement) de la fragrance d'une plante à parfum, la Citronnelle (*Cymbopogon citratus*), communément appelé Lémongrass, et qui demeure très peu exploitée dans les domaines nutraceutique et agro-alimentaire malgré ses immenses potentialités thérapeutique et antiseptique (**Onawunmi et al., 1984 ; Paranagama et al., 2003 ; Fandohan et al., 2008 ; Blanco et al., 2009 ; Akhila, 2010**). Aussi, plusieurs méthodes microbiologiques et approches techniques ont été examinées lors de cette étude. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE en phase liquide (antibiogramme ou plus précisément aromatoigramme) et en phase vapeur (microamblyphère) ont été les deux techniques préliminaires effectuées pour y sélectionner les souches sensibles à l'action inhibitrice de l'essence de Citronnelle. Par la suite, la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), par dilution en milieu gélosé, a été accomplie uniquement sur les souches sensibles, de même pour les méthodes de diffusion à partir de puits ou de dilution à partir de disques, qui ne sont ni plus ni moins, que deux variantes de la méthode des aromatoigrammes. En outre, la composition chimique de l'essence de la plante a été déterminée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CG-SM) afin d'établir le profil chromatographique et le chémotype de l'essence de cette plante aromatique.

La finalité de ce travail sera étayer par une discussion globale qui donnera un aperçu général sur la meilleur technique à adopter pour le test antimicrobien des extraits aromatiques végétaux, mais aussi une approche critique sur les avantages et inconvénients des différentes techniques abordées lors de notre travail.

Chapitre 1
**Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne
des huiles essentielles**

Chapitre 1 :

Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

1.1. Techniques en milieu solide

1.1.1. Méthode de diffusion en disque = méthode en phase liquide

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme (Figure 1a)(**Abou Samra, 2003**), elle est appelée aussi technique de l'aromatogramme (**Goetz et Ghedira,2012**), méthode de Vincent (**Pibiri, 2005**) ou encore méthode de diffusion dans la gélose agar.(**Vendeville et al., 1991**)

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'une HE. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. (**Blackwell et Smith, 1995**)

Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'HE, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'HE, est ainsi déterminé.(**Guedj, 1983**)

Après un temps de latence à 37°C ou 25°C (pour les bactéries ou les champignons), le diamètre du halo ou de la zone d'inhibition (DZI) entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des huiles utilisées. Une classification des HE chémotypées en rapport avec leur spectre d'activité antimicrobienne peut être établie en fonction de l'importance du halo d'inhibition. Généralement, les microorganismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition.(**Wilkinson et Cavanagh, 2005**)

La mesure manuelle des DZI peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques doivent être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement, cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose.

La méthode de l'aromatogramme est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne ensuite viennent des méthodes plus détaillées. Dans cette méthode, les paramètres tels que le volume de l'HE placé sur les disques de papier, l'épaisseur de la couche d'agar et si un dissolvant est employé varient considérablement entre les études (**Manou et al., 1998 ; Burt, 2004**). Ceci signifie que cette méthode est utile pour le choix des HE actives et pour la mise en évidence de leur activité antibactérienne, mais la comparaison des données éditées reste non faisable.

Une soixantaine d'HE chémotypées sont ainsi testées sur un grand nombre de germes de classes différentes. La limite de ces tests est bien sûr celle de l'*in vitro*. L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques. (Valnet et Duraffourd, 1978 ; Blackwell et Smith, 1995 ; Chami, 2005 ; Goetz et Ghedira, 2012)

1.1.2. Méthode de diffusion par disque après dilution

Elle permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien des HE par solubilisation dans un solvant à différentes concentrations et incorporation de chacune des concentrations sur un disque dans un milieu gélosé, ensemencé, puis coulé en boîtes de Pétri. Le solvant faciliterait la diffusion de l'essence dans le milieu. La dilution des HE se fait toujours dans un solvant approprié (éthylène glycol, acétone, éthanol à 95%). Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'HE par diffusion dans la gélose. Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux HE. (Kim et al., 1995 ; Prabuseenivasan et al., 2006)

1.1.3. Méthode de diffusion en puits

Le test de diffusion sur gélose a été développé par Tramer et Fowler (1964), puis amélioré par Woolf et Gibbons (1996). Ce test est typiquement utilisé pour des extraits alimentaires ayant une forte opacité, ce qui empêche l'utilisation des tests de turbidité. Elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire, facilement mesurable. (Thomsen et al., 2011)

Cette méthode consiste à préparer un milieu nutritif à base d'agar qui contient l'organisme ciblé. Le milieu est ensuite versé dans une boîte Pétri afin de former la gélose après refroidissement. De petits puits ronds (7 ou 10 mm de diamètre) sont alors percés dans la gélose, puis l'agent antimicrobien (HE) est inoculé dans les puits et la gélose est incubée dans les conditions favorisant la croissance de l'organisme ciblé. L'HE diffuse radialement. Si l'agent antimicrobien est efficace à inhiber la croissance de l'organisme, une zone d'inhibition claire apparaît alors autour des puits. Toutefois, la mesure de la DZI est manuelle et le manque de définition claire et de repère de la zone mènent à une faible précision, ce qui limite l'interprétation des résultats. (Candan et al., 2003 ; Tyagi et Malik, 2011 ; Joseph et Priya, 2010)

1.1.4. Méthode de microatmosphère = méthode en phase vapeur

Son principe est d'ensemencer une boîte Pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit, après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance. La quantité en HE déposée sur le disque varie de zéro (témoin de croissance), 10, 20, 40, 80, et 160 μ L. (Goni et al., 2009 ; Tyagi et Malik, 2012)

Le disque n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (Figure 1b). Il se produit une évaporation des substances volatiles (Benjilali et al., 1986 ; Inouye et al., 2001 ; Lopez et al., 2005). Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase vapeur sont encore peu nombreux. (Edwards-Jones et al., 2004 ; Nedorostova et al., 2009 ; Tyagi et Malik, 2010)

L'efficacité des HE en phase vapeur a conduit à leur utilisation et/ou recommandation pour l'assainissement du système de traitement de l'air en milieu hospitalier, par micronisation dans les réseaux de climatisation au niveau des blocs opératoires, services cliniques, bureaux, halls de réception, locaux administratifs et salles d'exposition. (Pibiri, 2006 ; De Billerbeck, 2002)

Enfin, l'HE diffusée en aérosol, ou par simple évaporation au moyen d'une petite lampe, peut assurer la destruction de germes contenus dans l'air, tout en dégagant une odeur discrète et agréable. Cette méthode est utilisable par certains cabinets dentaires (Laird et Phillips, 2012) y compris les salles d'attente. D'aucuns ont observé un autre effet bénéfique de cette méthode, qui est celui d'être calmant (thérapeutique « antistress »). Ceci, sans compter, la sensation de « bien-être » procurée au praticien et à ses collaborateurs. (Pibiri, 2005)

1.2. Techniques en milieu liquide

L'efficacité de l'HE testée est évaluée par la mesure de 2 concentrations : la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB). Ces concentrations nous permettent de connaître la nature de l'activité antimicrobienne de l'HE : bactériostatique ou bactéricide. (Das et al., 2010)

On ne dispose pas de définition officielle de ces grandeurs, les définitions données (Tableau 1) sont celles utilisées dans les études scientifiques. Elles sont donc susceptibles de varier d'un auteur à un autre.

Tableau 1 : Définitions de la CMI

Terme	Définition	Références
CMI	Plus faible concentration d'HE inhibant tout croissement visible à l'œil nu après 16-24h d'incubation. Les microorganismes restent cependant viables.	Hammer et al. (1999) De Billerbeck et al. (2002)
	Concentration minimale d'HE qui réduit plus de 90% de la croissance des colonies microbiennes. Elle est déterminée par densité optique.	Ponce et al. (2003)
	Plus basse concentration requise pour l'inhibition complète des microorganismes d'essai, jusqu'à 48h d'incubation.	Wan et al. (1998)

1.2.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à inoculer le milieu de culture, par un inoculum standardisé, une gamme de concentrations décroissantes en HE. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Le but des méthodes de dilution en bouillon ou en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/mL ou en %). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate.

Cette technique de détermination des CMI par contact direct en milieu gélosé ou liquide, consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié. Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'émulsions des HE dans des solutions de différents détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 ou de solvant comme l'éthanol.

La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (**macrodilution**) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (**microdilution**). L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les microorganismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses. (**Carson et Riley, 1994 ; Das et al., 2010**)

1.2.1.1. Technique de macrodilution en milieu liquide

La méthode de dilution en bouillon (Figure 1e) est utilisée aussi pour déterminer les CMI. Une gamme de dilution de l'HE est additionnée à une série de tubes contenant un milieu de culture liquide, de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées et incubation dans les mêmes conditions, la CMI est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée, c'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'est observé dans le milieu. (**Opalchenova et Obreshkova, 2003 ; Souza et al., 2007**)

Des méthodes de micro-bouillon ont été également développées, utilisant des microplaques et de ce fait réduisant le volume de l'extrait requis. Une mesure de turbidité ou une utilisation d'un indicateur de viabilité des microorganismes permettent la détermination des CMI « resazurine, methylthiazoldiphenyltetrazolium (MTT) » (**Tavares et al., 2008 ; Daset al., 2010 ; Hussain et al., 2010**). Les méthodes de microplaques nécessitent moins de temps et de moyens que d'autres méthodes. (**Wilkinson et Cavanagh, 2005**)

Une autre variante de cette méthode consiste à disperser les HE en présence d'agar agar 0.2% selon la méthode décrite par **Rehman et al. (1993)** et **Satrani et al. (2007)**. Les CMI des HE pourront être déterminées par cette méthode. Du fait de la non miscibilité de l'HE à l'eau et donc aux milieux de culture, une mise en émulsion sera réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/composé. A partir d'émulsions de 10% d'HE ou de constituants à l'état pur, un volume variable en fonction de la concentration finale désirée est prélevé, puis mélangé avec la suspension de bactéries lavées. Cette suspension de bactéries traitées est mise aussitôt à 37°C au bain-marie avec agitation magnétique pendant toute la durée d'incubation. Des témoins, contenant le milieu de culture plus la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés. L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'une anse de platine calibrée afin de prélever le même volume d'inoculum. Ce dernier se présente sous forme de bouillon de culture.

1.2.1.2. Technique de microdilution en milieu liquide et mesure de turbidité par densité optique

La densité optique est une technique simple pour observer un effet d'inhibition sur la croissance bactérienne. La densité optique ou l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre préalablement étalonné avec la longueur d'onde d'absorbance de l'espèce chimique utilisée. Selon la loi de Beer-Lambert, à une longueur d'onde donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces dans la solution. La méthode turbidimétrique repose sur le principe que plus il y a de bactéries dans une solution, plus la solution est turbide et réfléchira la lumière à 650 nm (la valeur d'absorbance doit se situer entre 0 et 1). Cette longueur d'onde est celle utilisée pour mesurer la turbidité. D'autre part, le principe des dilutions en tubes est d'effectuer des dilutions en série à partir d'une solution bactérienne concentrée et ce, de manière à obtenir des concentrations en bactéries de plus en plus faibles. Ainsi, les dilutions en série permettent de s'assurer qu'au moins un tube (une dilution ou une concentration) aura une valeur d'absorbance valide à 650 nm. Les dilutions en tubes permettent donc de quantifier l'activité antimicrobienne d'un agent en fonction de la réduction de la concentration en bactéries dans le tube. (Carson et al., 1994 ; Pfaller et al., 1996 ; Mann et al., 1998 ; Hammer et al., 1999 ; Lambert et al., 2001 ; Cuenca-Estrella et al., 2002)

Toutefois, cette méthode manque de précision, possiblement en raison de l'effet du temps entre le moment de l'inoculation et la lecture des tubes. D'autre part, les essais peuvent aussi être réalisés dans des microplaques de 96 puits en vue de mesurer l'activité bactérienne dans un surnageant de milieu de culture. Ces essais sont réalisés par une série de demi-dilution, où le « titre » est obtenu par la plus grande dilution en mesure d'inhiber totalement l'organisme indicateur. (Eloff, 1998 ; Cavan, 1999 ; Palomino et al., 2002 ; Souza et al., 2007 ; Ncube et al., 2008 ; Gutierrez et al., 2009)

Des antibiotiques (ATB) pourront être utilisés comme témoins positifs, et le solvant comme témoin négatif. La lecture de l'absorbance sera effectuée après ajout d'un chromogène (iodonitrotétrazolium, INT). La présence de bactéries vivantes est détectée par la coloration en rose de l'INT. (Grare et al., 2008)

Récemment, Sultan et al. (2009) ont développé un test basé sur la microplaque turbidimétrique (TMB) (Figure 1d), lequel a permis d'améliorer l'exactitude et la précision des résultats et ce, par un meilleur contrôle de la croissance et de la concentration de l'organisme indicateur. Cette nouvelle technique corrige le manque de précision des méthodes de turbidimétrie conventionnelle, causé par le temps entre l'inoculation et la lecture des tubes. En effet, l'utilisation d'une pipette à multicanaux permet d'inoculer les 96 puits de la microplaque en seulement 20 à 30 secondes. De plus, l'utilisation d'un lecteur de microplaque permet de mesurer la densité optique de tous les puits en 4 à 5 secondes, ce qui améliore la précision des résultats. La courbe de croissance de la bactérie seule (témoin positif), et les courbes obtenues avec différentes concentrations de l'agent antimicrobien en présence de la bactérie, permettent alors de quantifier la baisse de la multiplication des microorganismes. En variant les concentrations de l'agent antimicrobien, il est alors possible d'observer l'efficacité de cet agent et d'obtenir un effet dose-réponse. Ainsi, la rapidité, la simplicité et la précision de la TMB font de cette méthode un outil bien adapté pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE. Pour cette raison, les résultats obtenus par TMB sont généralement validés par une mesure du dénombrement des bactéries sur milieu gélose et ce, afin de déterminer les concentrations initiales et finales des bactéries lors des tests de microtitration.

1.2.1.3. Dénombrement sur milieu gélose

Le dénombrement sur milieu gélose permet de valider l'inhibition bactérienne causée par un agent antimicrobien comme les HE. Ce milieu gélose à base d'agar permet de dénombrer les colonies de bactéries qui ont survécu à l'action antimicrobienne des HE. Plus le nombre de colonies formées est faible, plus l'HE d'intérêt a un pouvoir bactériostatique, c'est-à-dire qu'elle a la capacité d'inhiber la croissance des bactéries. Le dénombrement sur gélose est une technique pour dénombrer les microorganismes aérobies vivants. Le principe de la méthode est de diluer les échantillons provenant des puits de la microplaque dans une solution peptonée stérile (0,1%). Ensuite, chaque échantillon dilué est ensemencé dans la gélose d'agar préformée dans un Pétri. Ces Pétris sont alors incubés à la température optimale de croissance de la bactérie étudiée. L'unité de mesure du dénombrement sur milieu gélose s'exprime en unité formatrice de colonie (UFC) par millilitre.

1.2.1.4. Technique de macrodilution en milieu solide

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

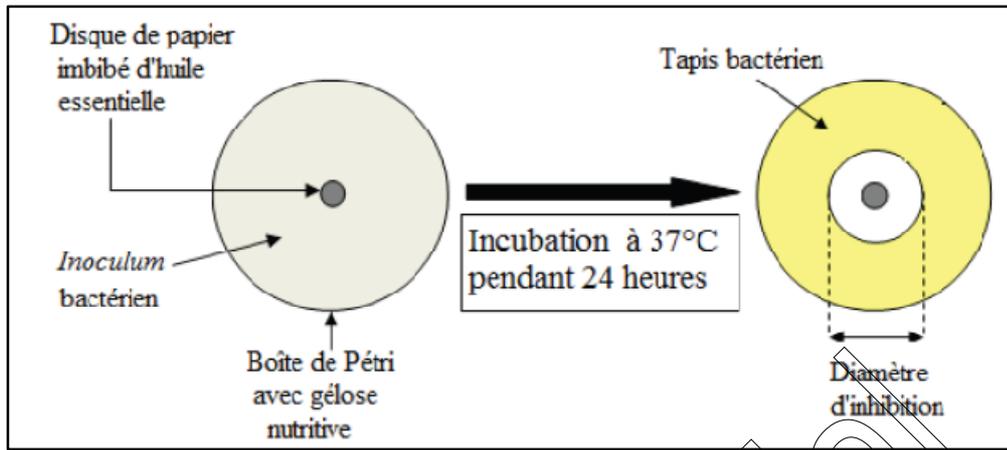
La méthode de dilution d'agar (Figure 1c) est plus économique que celle qui se pratique sur milieu liquide, parce qu'elle a beaucoup d'avantages : un grand nombre de souches peuvent être testées immédiatement, la contamination est facilement détectée et le milieu peut contenir des matériaux opaques. Elle consiste à réaliser des dilutions des HE, et les incorporer dans le milieu gélosé fondu et refroidi à 45°C, et à tester sur ce milieu les souches bactériennes à étudier (Hammer et al., 1996 ; Griffin et al., 2000 ; Prabuseenivasan et al., 2006 ; Wiegand et al., 2008 ; Klančnik et al., 2010). Ces dilutions sont ensemencées à la surface, soit en stries avec une anse calibrée, soit en point avec des micropipettes. (De Billerbeck et al., 2002)

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) pour évaluer la sensibilité des bactéries micro-aérophiles aux agents antibactériens. Cette méthode est utilisée comme un indicateur de l'activité antibactérienne, en plus de la recherche de la valeur réelle lorsque c'est possible. Dans la littérature, les études publiées sur la méthode de dilution d'agar pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plantes aromatiques ou de leurs HE ont employé différents dissolvants pour incorporer les extraits dans le milieu. (Gachkar et al., 2007)

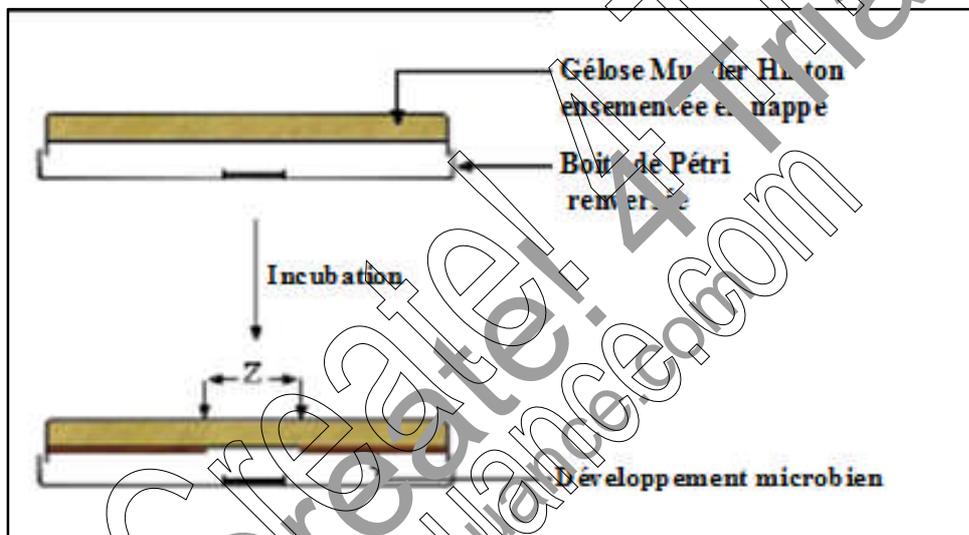
1.2.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide

La CMB correspond à la plus faible concentration en HE capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une HE. La même gamme de concentration, réalisée par la technique de macrodilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'HE à tester. (Basli et al., 2012)

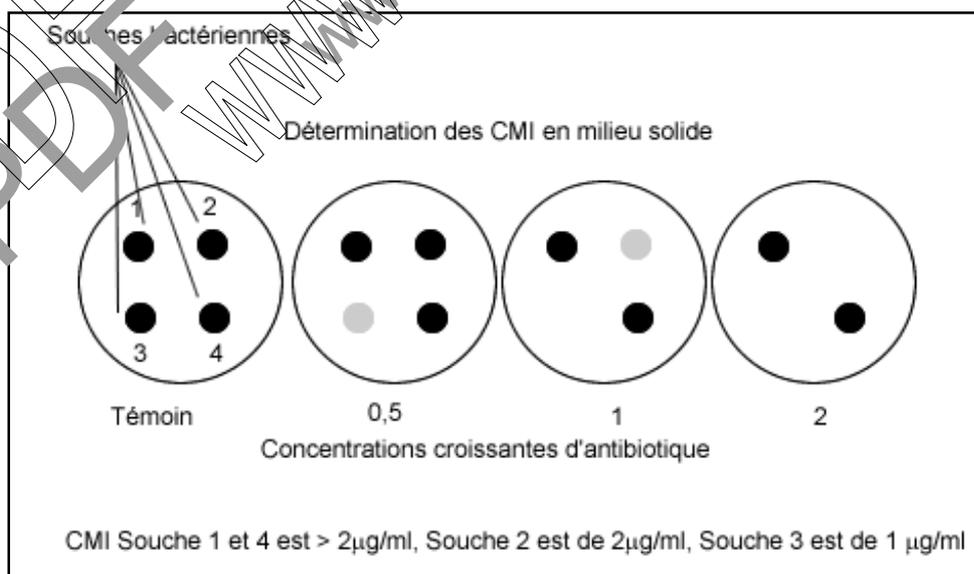
Des prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés « en strie » sur gélose Muller-Hinton (MH). Les boîtes ensemencées sont incubées 24 heures à 37°C. La détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible sur milieu de culture. S'il y a croissance bactérienne, l'HE a un effet bactériostatique sur la souche testée, sinon elle présente un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche. (Girardo et al., 1989 ; Oussou et al., 2004)



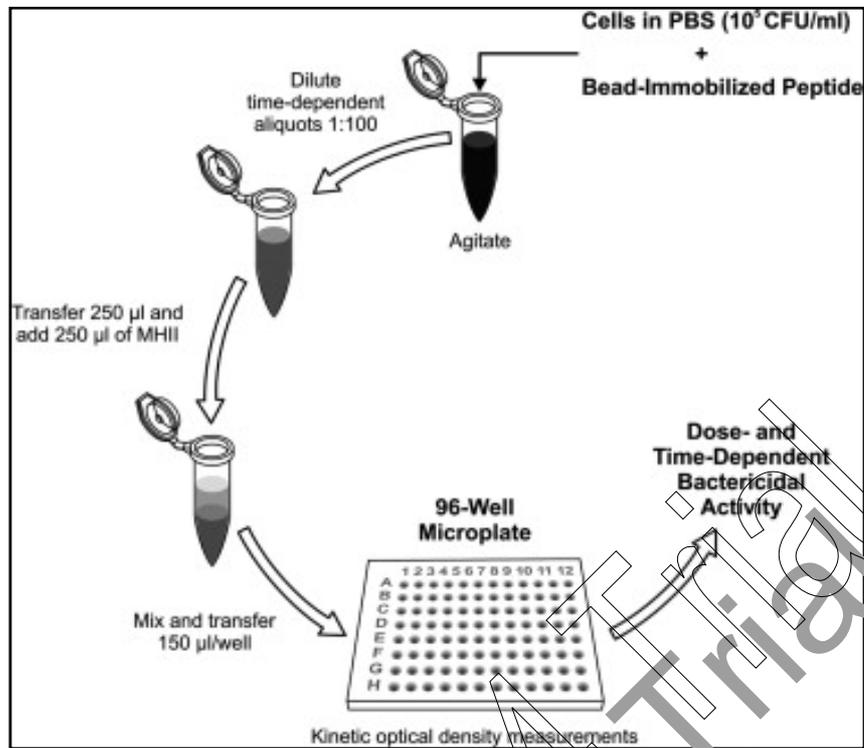
a) Principe de la méthode de l'aromatogramme



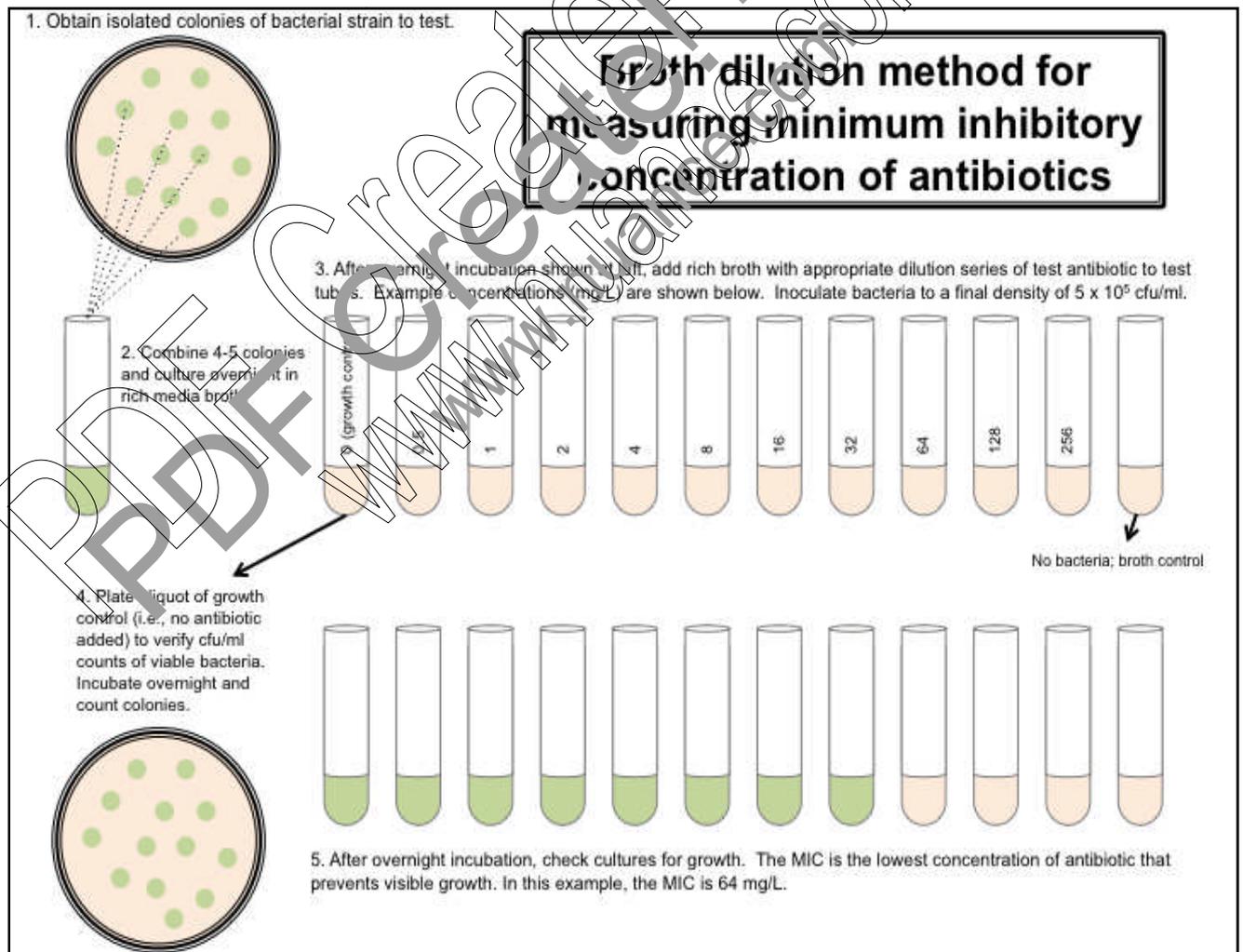
b) Principe de la méthode de microatmosphère



c) Détermination des CMI par dilution en milieu gélosé solide



d) Détermination des CMI par microdilution en milieu liquide (plaque à 96 micropuits)



e) Détermination des CMI par macrodilution en milieu liquide (Turbidimétrie)

Figure 1 : Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (images. Google.fr)

1.3. Dynamique d'action des HE par mesure de la décroissance bactérienne (Time-kill assay)

Cette méthode permet de caractériser l'activité antibactérienne d'une HE au cours du temps. Elle évalue la décroissance des bactéries, qui sont soumises à une concentration donnée en HE, sur plusieurs heures. (Viljoen et al., 2003 ; Guinoiseau, 2010a)

Une suspension microbienne est préparée et standardisée de manière à ce que sa concentration soit comprise entre 10^6 et 5.10^6 UFC.mL⁻¹. Pour cela, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 620 nm, ajustée au standard 0,5 de Mac Farland et diluée au 1/20. Un mL de cet inoculum est déposé dans 9 mL de MHB-Tween 80 (0,01%, v/v) en absence (témoin de croissance) ou en présence d'une concentration en HE correspondant à la CMI en milieu liquide. Les suspensions ainsi obtenues contiennent environ 5.10^5 UFC.mL⁻¹ et sont maintenues sous agitation à 37°C. 100 µL de suspension sont prélevés à différents temps (0, 2, 4, 6, 8 et 24 heures) afin de procéder à un dénombrement sur gélose MHA après une incubation à 37°C pendant 24 heures. La quantification du nombre de colonies bactériennes sera calculée en UFC/mL. (Carson et al., 2002 ; Boorn et al., 2010 ; Pietrella et al., 2011)

1.4. Expérience de lyse cellulaire

Cette méthode permet de déterminer une éventuelle action bactéricide des HE par mesure de l'absorbance à 620 nm. En effet, une bactérie non lysée absorbe à 620 nm, il y a donc bactériolyse si l'absorbance à 620 nm diminue au cours du temps. (Carson et al., 2002)

Cette méthode consiste à suivre la libération du matériel absorbant à 260 nm libéré par les cellules bactériennes lavées et traitées par les HE ou par leurs composés majoritaires en comparaison avec des bactéries lavées et non traitées. Les molécules libérées par les bactéries appartiennent à plusieurs familles : des phospholipides membranaires et des lipopolysaccharides, des sucres et des protéines péri plasmiques, des bases azotées et des nucléosides absorbant à 260 nm. Cette altération de la structure et de la perméabilité des membranes a pour conséquence de perturber le phénomène de phosphorylation oxydative qui nécessite une membrane intacte. (Deviet al., 2010 ; Tyagi et Malik, 2010 ; Guinoiseau et al., 2010a)

1.5. Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Cette technique est utilisée pour observer les effets d'une HE au niveau cellulaire. Elle est particulièrement adaptée pour visualiser les altérations de la paroi ainsi que la perte du contenu cytoplasmique. Cette méthode a été adaptée par plusieurs équipes afin d'élucider le mode d'action des HE au niveau cellulaire. (Tyagi et Malik, 2010 ; Bouhdid et al., 2012 ; Bautista-Baños, 2012)

1.6. Évaluation de l'activité antifongique

Plusieurs méthodes d'étude de l'activité antifongique des HE sont disponibles, mais puisqu'elles ne se basent pas sur le même principe, les résultats peuvent être profondément influencés par la méthode (Delespaul et al., 2000 ; Khebrri et al., 2012). En général, les méthodes d'évaluation de l'activité antifongique sont rapides, moins coûteuses et faciles à réaliser. L'activité contre les mycètes filamenteux peut être évaluée par la méthode de diffusion et de la dilution avec les mêmes inconvénients et avantages pour les analyses antibactériennes. (Wilkinson et Cavanagh, 2005)

La méthode de diffusion des disques est intensivement employée pour étudier l'activité antifongique des substances naturelles et des extraits des plantes. Cette technique est basée sur l'utilisation des disques comme réservoirs contenant la solution des substances à examiner (**Mohammedi et Atik, 2012**). Elle a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'HE vis-à-vis des souches fongiques. Le test des disques est limité seulement au criblage de l'activité antifongique, parce que, la capacité des disques est limitée et les zones d'inhibition ne permettent pas de faire une comparaison entre les souches testées et elles ne sont pas représentatives et par conséquent le calcul des diamètres d'inhibition n'est pas exact.

En conséquent, l'évaluation de l'activité antifongique avec cette méthode est insuffisante, il fallait donc utiliser d'autres techniques telle que l'incorporation de l'HE directement dans le milieu de culture (**Ouraimi et al., 2007**). **Sharma et Tripathi (2008)** ont prouvé que l'activité antifongique des HE peut être évaluée par la méthode de dilution mieux que par la méthode de diffusion, puisque dans cette dernière, la taille de la zone d'inhibition dépend de la diffusion des composés insolubles dans le milieu de culture. Les mêmes résultats ont été rapportés par **Hammeret al. (2003)**.

Dans la méthode de dilution d'agar, l'HE à tester est incorporée à l'agar et alors un disque mycélien activement grandissant (5mm de diamètre coupés du périphérique d'une culture de 7 jours) est inoculé au centre de la boîte de Pétri puis incubées à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. La croissance radiale du mycète après un temps approprié, selon les caractéristiques de croissance du mycète, est alors mesurée et comparée aux échantillons témoins (**Wilkinson et Cavanagh, 2005 ; Ali-Shtayeh et al., 1999**). Dans la méthode de dilution, le seul inconvénient est qu'elle exige une grande quantité de l'HE. (**Delespaul et al., 2000**)

La mesure des diamètres de croissance de l'hyphes par rapport au contrôle se traduit par l'application de la formule de l'indice fongique (**Wang et al., 2005 ; Cheng et al., 2011**). Cet indice se calcule comme suit :

$(I) = \{1 - (Da/Db)\} \times 100$ où Da représente le diamètre de croissance des boîtes traités (mm) et le Db le diamètre de croissance du contrôle (mm). La lecture est suivie jusqu'au huitième jour.

De plus, l'évaluation de l'activité antifongique des HE peut être effectuée par la méthode de microatmosphères (**De Billerbeck et al., 2002 ; Mohammedi et Atik, 2010 ; Bajpai et Kang, 2010**). Malgré l'existence de nombreux rapports sur l'activité antifongique des HE par la méthode de contact direct, nous avons constaté que les informations sur l'activité antifongique de la phase volatile d'huile essentielle sont rares. Certains chercheurs ont trouvé que l'HE est efficace par la méthode des boîtes inversées que par la méthode de contact direct. Ils ont supposé que la nature lipophile des HE les rend plus absorbables par les mycéliums fongiques que par l'agar de nature hydrophile. (**Soyluet al., 2005**)

1.7. Méthodes innovantes

Par ailleurs, des méthodes immunologiques, utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux, ont été utilisées pour tester des HE comme le dosage immuno-enzymatique sur support solide (ELISA) en compétition directe et indirecte. Ces méthodes sont rapides et sensibles, mais les résultats ne sont pas toujours corrélés avec l'activité antimicrobienne. (**Guinoiseau, 2010a**)

Chapitre 2

Monographie de la plante étudiée : Citronnelle

(Cymbopogon citratus)

Chapitre 2 :

Monographie de la plante étudiée : Citronnelle (*Cymbopogon citratus*)

2.1. Histoire et origine

Le nom botanique de la citronnelle, *Cymbopogon* est dérivé des mots grecs kymbe = «nacelle» et pogon = «barbe»; il se réfère à ses épis en forme de nacelle porteurs de nombreuses fleurs qui font songer à une barbe. Originnaire d'Inde, du Sri Lanka et de tout l'espace sud-asiatique, la citronnelle a une longue tradition et est utilisée depuis des siècles, et ce pas seulement dans la cuisine ou la médecine. Les parfums et huiles fabriqués dans l'espace asiatique ont été importés au 17^{ème} siècle par des navigateurs anglais, français et hollandais en Europe, où ils étaient très appréciés par la noblesse européenne.

Le genre *Cymbopogon* comprend une cinquantaine d'espèces originaire d'Asie mais dont certaines sont depuis très longtemps introduites et naturalisées dans tout le monde (Teuscher et al., 2005). La citronnelle ou verveine des Indes, nommée par les anglophones « Lemongrass », est une graminée très commune en Asie du Sud-Est, d'où elle est originaire.

C'est à partir de 1820 que la distillation de l'HE d'espèces du *Cymbopogon* a débuté à des fins commerciales sur le marché mondial. On cultive cette plante pour son huile, qui sert de parfum, d'assaisonnement et de remède. (Iserin, 2001)

Son parfum, rappelant l'odeur du citron, est à l'origine du nom de la plante. Cette plante des zones tropicales, pousse aussi en Afrique, Amérique du Sud, Amérique centrale et à Madagascar. (Teuscher et al., 2005)

2.2. Botanique et culture

La citronnelle est une plante phanerogame qui appartient à la famille des Poacées (Poaceae) ou graminées. On la trouve dans presque toutes les régions tropicales. La citronnelle, dont il n'existe pas moins de 56 espèces, est riche en huiles essentielles qui ont une teneur élevée en citral et en géraniol.

C'est est une plante herbacée vivace, formée de tiges serrées pouvant atteindre 1,5 m de haut, lisses et glabres. Elles forment des touffes composées de feuilles linéaires (Figure 2), terminées en pointe, de 90 cm de long sur 3 à 5 cm de large ; ces feuilles sont raides, coupantes, lisses sur leurs deux faces et de couleur vert clair grisâtre ; elles ont une nervure centrale saillante et plus claire, un pétiole engainant et présentent une ligule parcheminée d'à peine 1 mm de long. (Teuscher et al., 2005)

Elles dégagent une forte odeur de citron quand on les froisse (Pousset, 2004 ; McVicar, 2006). La plante se termine dans sa partie souterraine par une base renflée comme un oignon mais qui ne correspond pas à un bulbe (Teuscher et al., 2005). Ce sont des rhizomes supportant un chevelu de radicle fines et longues, peu tortueuses à odeur assez faibles et fugace. (Boullard, 2001)

Elle ne fleurit qu'exceptionnellement pour donner naissance à une inflorescence terminale, d'une trentaine de cm de long, formée d'épis de 6 mm de long. (Gilly, 1997 ; Teuscher et al., 2005)

Les touffes denses à l'odeur de citron et aux longues feuilles très étroites ont besoin de suffisamment d'humidité et d'un emplacement ensoleillé pour bien pousser. Cette plante aromatique et médicinale ne doit pas être exposée à des températures de moins de 13°C en hiver. La citronnelle se multiplie par semis ou par division des touffes. Elle se récolte en coupant la tige à sa base et est utilisée fraîche ou séchée.

Dans le Kerala, dans l'Inde du Sud, la verveine des Indes orientales est cultivée de manière extensive pour en extraire l'huile de citronnelle très appréciée en tant qu'arôme alimentaire. (Pousset, 2004)

2.3. Systématique

Plusieurs noms communs sont attribués à *Cymbopogon citratus*. Nous citerons : citronnelle, herbe citron, verveine des Indes, jonc odorant, Lemongrass. La classification botanique de la plante est la suivante :

- **Règne:** plantae
- **Division:** Magnoliophyta
- **Classe:** Liliopsida
- **Ordre:** Cyperales
- **Famille:** poaceae
- **Genre:** Cymbopogon
- **Espèce:** *Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf

2.4. Plantes voisines

Le genre *Cymbopogon* comprend une cinquantaine d'espèces originaires d'Asie, dont certaines sont depuis très longtemps introduites et naturalisées dans tout le monde intertropical du fait de leurs excellentes aptitudes aromatiques culinaires et médicinales. Les noms commerciaux de *C. citratus* sont citronnelle des Indes et verveine des Indes. Elle se dit en effet d'origine indienne. La citronnelle dite *de Ceylan*, est la plus commercialisée dans le monde et est extraite de *C. nardus*(L.) Rendle. La citronnelle de Java correspond à l'espèce *C. winterianus*. Les appellations Lemongrass, Gingergrass et Palmarosa renvoient respectivement à *C. flexuosus*, *C. martinii* var. *solia* et *C. martinii* var. *motia*.

La citronnelle de l'Inde ne doit pas non plus être confondue avec d'autres « citronnelles » :

- le *Cym citron*, appelé aussi citronnelle ;
- la verveine citronnelle, plante aromatique de la famille des *Verbenaceae* ;
- la mélisse citronnelle, plante médicinale et aromatique de la famille des *Lamiaceae* ;
- l'aurone citronnelle, plante aromatique de la famille des *Asteraceae*.

2.5. Huile essentielle de la citronnelle

La citronnelle, ou citronnelle de l'Inde ou de Madagascar ou de Java, est une plante herbacée tropicale de la famille des Poaceae (graminées), cultivée pour ses tiges et feuilles aux qualités aromatiques (à goût de citron). Son HE est obtenue par distillation des feuilles hachées que l'on récolte plusieurs fois par an. Ses parties utilisées sont généralement les feuilles.

L'HE de citronnelle est obtenue par distillation à la vapeur d'eau à partir des feuilles et tiges fraîches ou sèches. La matière fraîche de citronnelle contient de 0.26 à 0.52% d'HE et parfois 0.7% et la matière sèche en contient 0.4%.(Bardeau, 2009)

2.5.1. Composition chimique :

Les principaux constituants sont le citral dont la teneur varie entre 65 et 86 %, renfermant dans les mêmes proportions du néral et du géraniol. Les autres composés majoritaires sont le myrcène (jusqu'à 20 %), le camphène (10 %) et le géraniol (2 à 10 %). Ces composés sont accompagnés d'acétate de géranyle, de linalol, de nérol, de citronellal et de 2-méthylhept-5-èn-2-one.(Salle, 1991 ; Akhila, 2010)

2.5.2. Propriétés curatives de la citronnelle.

La citronnelle a de nombreux bienfaits pour la santé et ses propriétés curatives consistent en de nombreux composés, huiles, minéraux et vitamines qui sont connus pour avoir des propriétés antioxydantes et qui peuvent prévenir certaines maladies. Le composant chimique principal de la citronnelle est le citral qui a des fortes propriétés antimicrobiennes et antifongiques.

La citronnelle inhibe donc la croissance microbienne et bactérienne dans le corps, à la fois interne et externe, en aidant à prévenir et à guérir les infections bactériennes du colon, de l'estomac, des voies urinaires et du système respiratoire(Baudoux et Zhiri 2005 ; Grosjean, 2007 ; Bardeau, 2009). Ses feuilles et ses tiges sont riches en acide folique et vitamines essentiels tels que l'acide pantothénique (vitamine B5), la pyridoxine (vitamine B6) et la thiamine (vitamine B1). Elle contient également de nombreux minéraux antioxydants et des vitamines telles que la vitamine C, la vitamine E, le potassium, le zinc, le calcium, le fer, le manganèse, le cuivre et le magnésium.

Lorsqu'elle est utilisée en aromathérapie, l'huile restaure et revitalise tout le corps, en aidant à soulager les symptômes de maux de tête, les douleurs corporelles, l'épuisement nerveux ainsi que les conditions liées au stress. (Akhila, 2010 , Baba Aïssa, 2011)

L'HE de citronnelle possède de nombreuses vertus. Son action première est de repousser les moustiques. En effet, sa forte odeur citronnée fait de cette HE un excellent répulsif pour insectes. (Tennstedt, 2004 ; Chiasson et Beloin, 2007)

Les propriétés cataloguées en aromathérapie de l'HE du Lemongrass sont : vasodilatatrice, tonique digestive, anti-inflammatoire et sédative. Elle est indiquée dans les cas d'insuffisance digestive et hépatique, de cellulite, d'artérite et de dystonie neurovégétative (dérèglement du système nerveux viscéral). Sous forme concentrée, elle est irritante en usage externe.

En outre, cette HE est antiseptique et anti-infectieuse. Elle possède également des vertus antifongiques qui permettent de traiter radicalement certaines mycoses. Elle est notamment présente dans beaucoup de crèmes antimycosiques. (De Billerbeck, 2007)

Elle est aussi connue pour ses propriétés anti-transpirantes. Elle lutte contre la transpiration excessive, ce qui explique sa présence dans de nombreux déodorants.C'est un anti-inflammatoire reconnu pour soigner les douleurs articulaires et certains rhumatismes.

Aussi, l'HE a un effet apaisant sur les nerfs agités et peut soulager plusieurs troubles neurologiques. Elle est connue pour son effet relaxant et est donc aussi utilisée pour traiter l'insomnie et le stress.

L'HE sert à parfumer les produits d'entretien, les désodorisants, les lessives, les savons liquides, les déodorants et les gels douches. Dans l'industrie alimentaire, la citronnelle est employée pour aromatiser les pâtisseries et les sucreries ainsi que les limonades ; elle est en outre utilisée pour l'extraction du citral qui sert notamment pour l'hémisynthèse de la vitamine A. **(I Idrissi et al., 1993 ; Gilly, 1997 ; Teuscher et al, 2005)**

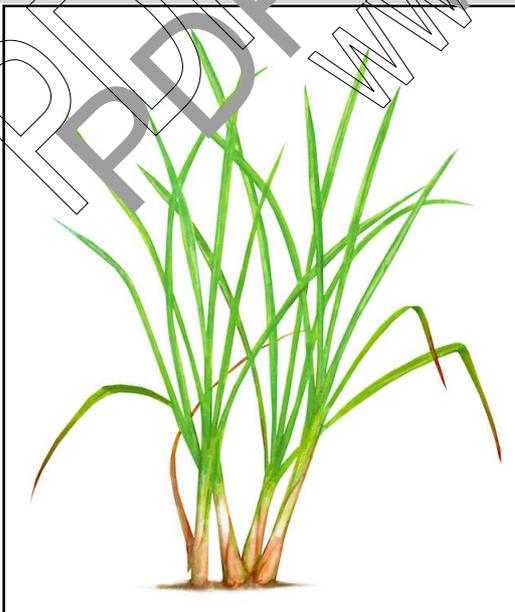
En usage interne, elle est efficace contre les problèmes digestifs, les douleurs d'estomac et les diarrhées. De plus, elle aide le corps à se désintoxiquer en augmentant la régularité et l'étendue de la miction. Elle aide le corps à se débarrasser de l'acide urique et des substances toxiques indésirables. Ce diurétique efficace permet de nettoyer le système et contribue aussi à la perte de poids. La citronnelle aide à la digestion et agit mieux contre les flatulences et la gastro-entérite. Elle est connue pour détendre la région abdominale du corps et permettre à l'air compressé à l'intérieur de se déplacer facilement vers le bas, ce qui réduit le vomissement et les douleurs d'estomac. **(Koh, 2009)**

Cependant, les femmes enceintes de moins de 3 mois ne doivent pas utiliser cette HE qui pourrait être néfaste pour leur santé.



a) Citronnelle : Aspects morphologiques

1. Point de sortie des fleurs ; 2. Base de la plante ; 3. Deux feuilles ; 4. Partie de l'inflorescence



b) illustration de la partie aérienne



c) partie aérienne de la plante



d) Tiges et feuilles



e) Champs de culture

**Figure 2 : Citronnelle (*Cymbopogon citratus*) = Aspects morphologique et botanique
(images.google.fr)**

Chapitre 3

Matériel et méthodes

Chapitre 3 :

Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale s'est étalée sur une période de quatre mois, de mars jusqu'au Juin 2013. Les différentes expérimentations microbiologiques que nous avons réalisées ont été faites dans les structures sanitaires suivantes :

- Unité bactériologie du laboratoire central d'analyses médicales appartenant à l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) de Boufarik (Blida).
- Service de microbiologie alimentaire du Laboratoire d'Hygiène de la wilaya de Blida.

Aussi, l'objectif assigné à cette étude était de tester, *in vitro*, le pouvoir antibactérien et antifongique de l'essence de Citronnelle sur plusieurs souches, de référence ou isolées cliniquement, à travers l'application de plusieurs méthodes microbiologiques. Ce travail fait le point sur la meilleure technique à adopter pour le screening antimicrobien des essences aromatiques pour une éventuelle utilisation, soit comme désinfectant de l'air, antiseptique pour tissus biologiques, conservateur agro-alimentaire ou encore principe actif dans une préparation pharmaceutique antimicrobienne.

3.1. Matériel :

3.1.1. Matériel végétal et huile essentiel :

L'huile essentielle de citronnelle (*C. citratus*) a été achetée de la société « Extral-Bio » de production des huiles essentielles et cosmétiques Bio, sise à Chiffa (Blida). L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de la plante (tige et feuilles), cultivée au niveau de ladite société, au mois de Juin 2012. En outre, l'identification botanique de la plante a été faite antérieurement au niveau du conservatoire du Jardin d'Essais d'El-Hama (Alger). Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle (Annexe 2). Aussi, l'HE est certifiée « 100% naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. Elle est aussi certifiée « Biologique » car provenant d'une culture de citronnelle où aucuns engrais ou pesticides chimiques n'ont été utilisés durant la phase de culture. Une quantité de 20 ml en HE est vendu au prix de 400 Da (TVA comprise). Elle a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.

3.1.2. Souches microbiennes:

L'activité antibactérienne a été évaluée sur 3 souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) et 17 souches bactériennes (Tableau 2) isolées cliniquement à partir des prélèvements de malades ayant contracté différentes infections. Concernant les souches fongiques, nous avons utilisé 4 champignons filamenteux (moisissures) et 9 levures (Tableau 3). Toutes les souches microbiennes ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie de l'EPH de Boufarik sauf pour les moisissures qui proviennent de la mycothèque du laboratoire de Mycologie de la clinique M'hamed Yazid (ex Ferroudja, Blida). Ces bactéries et champignons ont été conservés et maintenus en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats.

Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE.

Nom	Origine
Gram-	
<i>Escherichia coli</i> (E1)	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i> (E2)	ECBU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P1)	ATCC 27853
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P2)	ECBU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P3)	Pus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P4)	Hémoculture
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P5)	Crachat
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P6)	LB
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (K1)	ECBU
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE (K2)	ECBU
<i>Proteus mirabilis</i>	Pus d'une plaie
<i>Salmonella typhi</i>	Hémoculture
<i>Serratia marcescens</i>	Pus de pied
<i>Morganella morganii</i>	Pus de pied diabétique
Gram⁺	
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa1)	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa2)	Pus d'oreille
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa3)	Hémoculture
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Se1)	ECBU
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Se2)	LCR
<i>Enterococcus sp.</i>	Pus de pied diabétique

ECBU : examen cyto bactériologique des urines ; LCR : liquide céphalo-rachidien ; ATCC : souche de référence (ATCC = American Type Culture Collection) ; LB : liquide bronchique.

Tableau 3 : Souches fongiques utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE.

Nom	Origine
Levures	
<i>Candida albicans</i> (Ca 1)	Pus de plaie ouverte
<i>Candida albicans</i> (Ca 2)	Pus de la gorge
<i>Candida albicans</i> (Ca 3)	Ongle
<i>Candida albicans</i> (Ca 4)	ECBU
<i>Candida albicans</i> (Ca 5)	Perte vaginale
<i>Candida parapsilosis</i> (Cp 1)	Squame du thorax
<i>Candida parapsilosis</i> (Cp 2)	Ongle
<i>Candida tropicalis</i> (Ct 1)	Liquide biliaire
<i>Candida tropicalis</i> (Ct 3)	Ongle
Moisissures	
<i>Aspergillus flavus</i>	Air de l'hôpital
<i>Aspergillus terreus</i>	Air de l'hôpital
<i>Aspergillus niger</i>	Air de l'hôpital
<i>Penicillium sp.</i>	Air de l'hôpital

3.1.3. Milieux de cultures et agents chimiques :

Suivant les méthodes employées et selon les souches en question, nous avons utilisé des milieux de culture d'isolement solides, en l'occurrence la gélose nutritive (GN) ou Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et la gélose Sabouraud additionné de Chloramphénicol (SAB) pour les champignons. Aussi, des milieux de culture sélectifs ont été utilisés (gélose Chapman pour les Staphylocoques, gélose Hecktoen pour les Entérobactéries et gélose au sang frais pour les bactéries exigeantes). Tous ces milieux de culture proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA, Alger, Algérie).

Afin de mener une étude comparative du pouvoir antibactérien entre notre échantillon d'HE et des produits de références, nous avons utilisé des disques Antibiotiques (ATB) comme témoins positifs. Les ATB utilisés sont les suivants : Ampicilline (AMP, 10 μ g), Gentamicine (CN, 10 μ g), Céfotaxime (CTX, 30 μ g), Erythromycine (E, 15 μ g), Acide Fusidique (FA, 10 μ g), Céfalotine (KF, 30 μ g), Oxacilline (OX, 5 μ g), Ticacilline (TIC, 75 μ g) et Tobramycine (TM, 10 μ g).

Cependant et concernant les souches fongiques, aucune étude comparative n'a été possible pour cause de non disponibilité des disques antifongiques.

Les solvants Tween 80 et DMSO (Diméthyle Sulfoxyde) ont été utilisés pour la dilution de l'HE afin de déterminer la CMI. Les deux solvants sont purs chimiquement et proviennent de Sigma-Aldrich (Allemagne).

3.2. Méthodes :

3.2.1. Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle :

La recherche de l'activité antibactérienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'HE de Citron (ell). Pour cela, quatre méthodes qualitatives (aromatogramme, microatmosphère, dilution par disque et diffusion de puits) et une quantitative (CMI) ont été examinées.

3.2.1.1. Méthode des aromatogrammes = Technique en milieu solide

Cette méthode utilisée par certains auteurs (Carson et Riley, 1994 ; Boukhatem et al., 2013a) est la technique que nous avons utilisée pour évaluer dans un premier temps l'activité antimicrobienne de l'HE. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, l'antibiogramme. (Satrani, 2007)

Dans cette méthode (Figure 3), nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblättchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne) que nous avons imprégnés d'une certaine quantité d'HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques.

Dans notre étude, nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'HE en imprégnant les disques par 3 doses croissantes à savoir 1 goutte (20,5 mg), 2 gouttes (41 mg) ou 3 gouttes (61,5 mg) d'HE par disque, séparément. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action "dose-dépendante" de l'HE sur la croissance des germes microbiens. De même, la suspension microbienne a été standardisée (0.5 McFarland pour les bactéries et 1.5 McFarland pour les champignons) et bien homogénéisée (vortex) avant son ensemencement sur le milieu gélosé adéquat (MH pour les bactéries et SAB pour les champignons).

Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 3 ou 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement).

L'essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries et champignons croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence aromatique suffisante qui inhibe leur croissance.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en millimètres (mm). Plus le DZI est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Ainsi, la souche microbienne sera classée comme étant sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis de l'HE.

Aussi et pour chaque souche microbienne, des témoins positifs ont été réalisés en appliquant, dans les mêmes conditions citées précédemment, des disques d'ATB qui vont servir comme référence, pour pouvoir comparer leur pouvoir antibactérien avec notre échantillon d'HE. A cet effet, plusieurs disques d'ATB ont été utilisés et choisis selon la sensibilité de la souche bactérienne, en concertation avec le chef de service du laboratoire.

3.2.1.2. Microatmosphère = méthode en phase vapeur :

Nous avons utilisés cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés de la phase volatile de l'HE (Figure 4). Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux. (Tyagi et Malik, 2011, Boukhatem et al., 2013a)

La différence entre cette méthode et les aromatochromogrammes réside principalement dans la position du disque imprégné. Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte Pétri.

Le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 3 doses croissantes au disque. En premier lieu, 1 goutte d'HE déposée sur un disque de papier filtre de 10 mm de diamètre. Dans le 2^{ème} essai, un disque de 20 mm a été imprégné par 2 gouttes alors que pour le 3^{ème}, un disque de 30 mm a été chargé par 3 gouttes d'HE. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement de l'essence sur le couvercle et, par conséquent, une meilleure diffusion et évaporation de l'HE.

La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière que la première méthode (Aromatogramme). La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 72h ou 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement. Il se produit une évaporation des substances qui, en contact avec les microorganismes ensemencés sur la gélose, va inhiber leur croissance.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire.

Une boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'HE. Une autre boîte témoin est ensemencée dans les conditions de l'expérience, sans disque. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis microbien. A noter que dans ce test, aucun témoin positif n'a été utilisé car les ATB ne sont en aucun cas volatils.

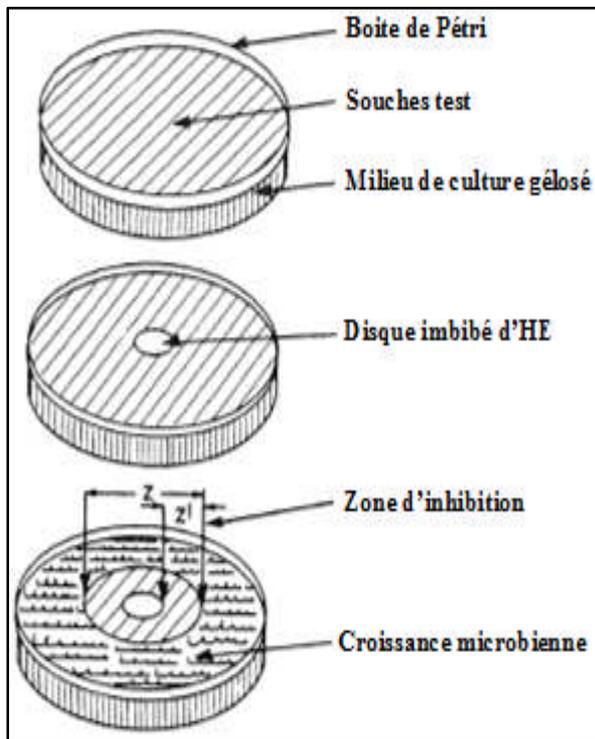


Figure 3: Illustration de la méthode de l'aromatogramme. (Zaika, 1988)

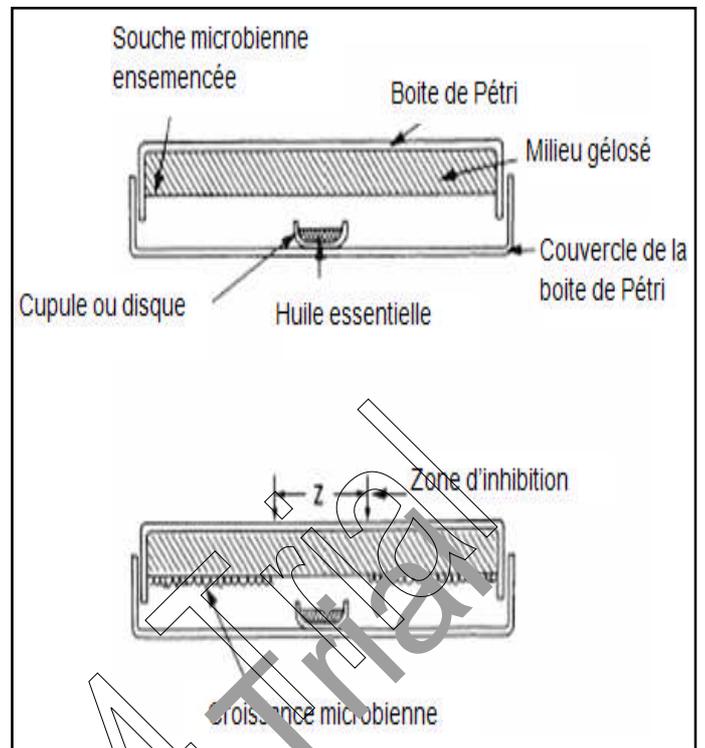


Figure 4: Illustration de la méthode de micro-atmosphère. (Zaika, 1988)

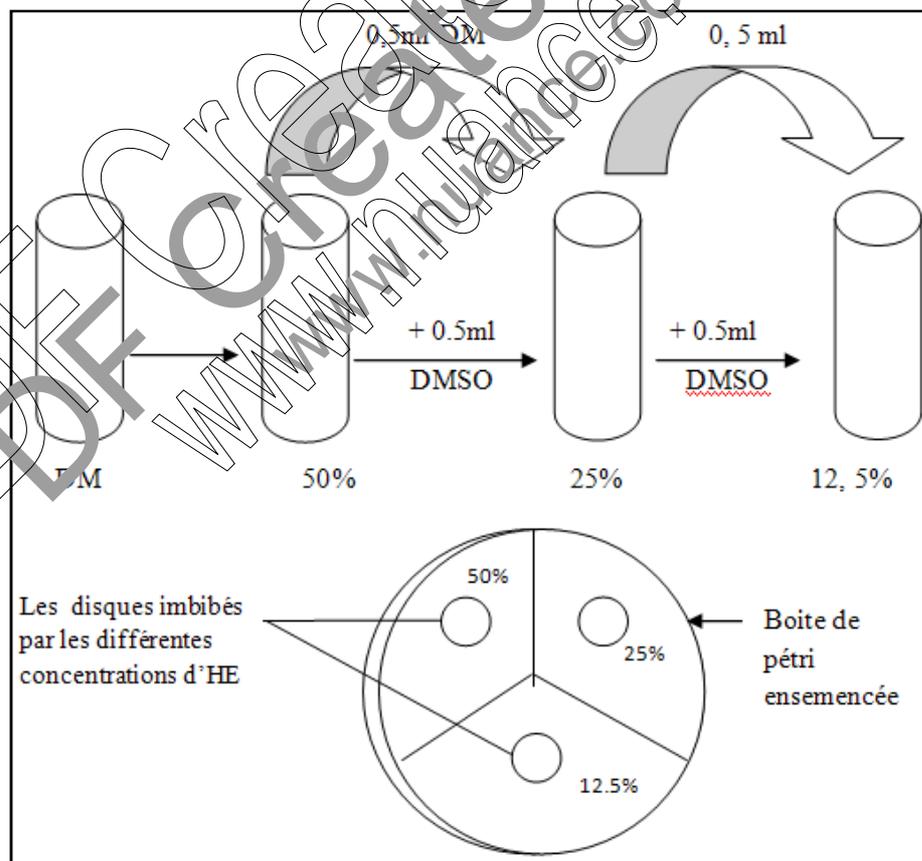


Figure 5: Illustration de la méthode de dilution à partir des disques. (Original, 2013)

3.2.1.3. Méthode de dilution à partir des disques :

Cette méthode consiste à mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'HE après une série de dilutions, en mettant cette dernière en présence des germes (Figure 5). C'est une variante de l'aromatogramme en imprégnant le disque avec les différentes dilutions en HE. (Prabuseenivasan et al., 2006)

On introduit aseptiquement 0.5 mL de l'HE à l'aide d'une pipette stérile dans un tube stérile contenant 0.5 mL du diluant (DMSO). Cette suspension constitue la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 1/2 ou 50 %. La DM est mise dans une étuve à 37°C pendant 20 mn avec agitation du tube pour homogénéiser les deux phases du milieu. Ensuite, nous avons introduit aseptiquement, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 0.5 mL de la DM dans un tube stérile contenant 0.5 mL du même diluant. Cette dilution nouvellement obtenue correspond au 1/4 ou 25 %. Nous avons recommencé la même procédure pour l'obtention de la dilution 1/8 ou 12.5%. Ainsi, les différentes dilutions obtenues seront imprégnées sur un disque papier whatman (9mm de diamètre, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) et déposées à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec la souche microbienne. A noter que dans cette méthode, seules les souches bactérienne et fongique qui ont présenté une grande sensibilité vis-à-vis de l'HE en aromato gramme ou en microatmosphère seront étudiées. Les germes résistants n'ont pas été inclus dans notre recherche.

3.2.1.4. Méthode de diffusion en puits :

C'est une méthode qui assure une diffusion radiale de l'HE à partir de puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. La méthode consistait à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution d'HE de concentration connue. L'HE diffuse radialement créait une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose ensemencée avec la suspension bactérienne. (Tyagi et Malik, 2011)

L'activité antibactérienne de l'huile diluée à 10% a été étudiée pour chaque souche bactérienne. A partir d'une culture jeune de 18 à 20 h, l'ensemencement de l'inoculum est réalisé en surface du milieu MH ou SAB préalablement coulé dans des boîtes Pétri. Après 15 mn, des puits (6 mm de diamètre) ont été découpés à l'aide de pipette Pasteur stérile. Par la suite, une dilution de 50% (2 gouttes HE + 2 gouttes DMSO) de notre échantillon à tester a été distribuée dans chaque puits. Après diffusion (20 mn), les boîtes seront incubées dans des étuves à une température adéquate (37°C pendant 24 h et 25°C pendant 72h pour les bactéries et les levures, respectivement). Après la durée d'incubation, les auréoles d'inhibition seront mesurées. Le diamètre du puits (6 mm) est inclus dans le calcul de la DZI.

A noter que le DMSO (solvant inerte exempt de toute activité antimicrobienne) a été additionné à l'HE pour faciliter sa diffusion dans le milieu gélosé.

3.2.1.5. Détermination des CMI par macrodilution en milieu gélosé :

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) pour évaluer la sensibilité des bactéries micro-aérophiles aux agents antibactériens. Elle consiste à ensemencer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE dispersée de façon homogène et stable dans le milieu de culture. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'un agent dispersant et solubilisant inerte, en l'occurrence le DMSO.

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

Une série de dilution de l'HE est préparée avec un intervalle de concentrations qui varie entre 0.25 % (2.5 mg/mL) à 0.0078 % (0.078 mg/mL). La réalisation des dilutions se fait en ajoutant une quantité de 0.1 mL d'HE à 40 mL de milieu de culture en surfusion (45°C, MH pour les bactéries et MAB pour les levures), supplémenté en DMSO (0.12 %, v/v). La préparation obtenue correspond à la dilution mère (0.25%). Une dilution en série de 2 en 2 est effectuée dans du milieu MH, de manière à obtenir une gamme de concentration en HE qui varie entre 0.25 % (2.5 mg/mL) à 0.0078 % (0.078 mg/mL).

L'ensemencement de chaque milieu sera fait par touche à l'aide d'un écouvillon stérile. Les boîtes Pétri seront incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 10 µL de l'inoculum standardisé ont été déposés dans du milieu MHB-DMSO (0.12 %, v/v), est également réalisé.

La lecture des résultats se fait visuellement en observant s'il y a l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin (exemple d'HE). La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Le résultat sera exprimé en % (v/v) ou en mg/mL.

A noter que les CMI ont été déterminées uniquement pour les souches ayant manifesté une certaine sensibilité à l'action inhibitrice de l'HE par les méthodes préliminaires.

Chapitre 4

Résultats et Discussions

Chapitre 4 : Résultats et Discussion

4.1. Composition chimique de l'huile essentielle de Citronnelle :

Les résultats de la composition chimique de l'HE du Citronnelle, accomplie par CG-SM, sont rapportés dans le tableau 4. Les différents composés ont été listés selon leur temps de rétention.

Tableau 4 : Composition chimique de l'HE de citronnelle (*Cymbopogon citratus*)

Temps de rétention(mn)	Composés	Concentration(%)
8.31	Myrcène	23.92
9.74	Limonène	0.07
10.19	β -Ocimène	1.47
10.67	3-Carène	0.99
16.22	Citronellal	0.41
20.97	Citronellol	0.35
22.60	Linalool	6.56
23.69	Géranial	28.93
25.65	Néral	24.30
30.33	Géranol	2.42
54.58	Eicosane	0.19
55.18	Nonadécane	0.55
55.42	Triacontane	1.33
55.65	Tétracosane	0.25
Total identifié		91.74

Au total, 14 composés ont été identifiés ce qui représente un taux de 91,74%. Le composé majoritaire est le Géranial, de la famille des aldéhydes, avec un pourcentage de 28.93%, suivi par un autre composé de la même famille, le Néral (24.30%). Ce dernier est présent presque avec la même proportion que le Myrcène (23.92%). Deux autres composés (Linalool et Géranol) sont présents aussi mais avec un taux faible (6.56% et 2.42%) par rapport aux composés précédemment cités. Les autres molécules sont présentes mais à un taux inférieur à 2%. Sur le plan biochimique, la famille des aldéhydes, représentée par le Géranial, Néral et Citronellal, reste la fraction la plus dominante avec un pourcentage supérieur à 53.64%. Les monoterpènes, constitués par Myrcène, Limonène, Eicosane, et Carène, sont présents à 25.17%.

Aussi, cette HE est composée en majorité par des composés monoterpéniques (87.67%), avec une prépondérance de composés oxygénés (55.72%) dominés par le Géranial (28.93 %), le Géranol (2.42 %) et le Néral (24,3%). Dans le groupe des monoterpènes hydrocarbonés, le Myrcène représente 23,92% du mélange.

Etant donné que le Géraniol est le composé majoritaire, cette HE pourra être classée « chémotype Géraniol ». L'échantillon de l'HE de *C. citratus* étudiée ici est riche en 2 composés, Géraniol - Nérol, ensemble souvent dénommé Citral, avec un pourcentage de 53.23%.

Une revue de littérature fait apparaître que les deux aldéhydes, Nérol et Géraniol, sont des composés caractéristiques d'HE de citronnelle quelle que soit son origine géographique. Ces composés, par exemple, ont été signalés en quantité importante (39,7 % et 60,3 %, respectivement) dans l'HE de l'espèce *C. citratus* cultivée en Amérique latine (Brésil). (Cavalcantiet al., 2004)

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés dans plusieurs publications (Sun Og et al., 2007 ; Tchoumboungang et al., 2009 ; Matasyoh et al., 2011) avec des concentrations en Citral qui varient entre 54 et 61%. En revanche, d'autres auteurs ont rapportés des résultats différents (Koba et al., 2004 ; Kanko et al., 2004 ; Koba et al., 2008), avec un profil chromatographique caractérisé par un taux de Citral très élevé, oscillant entre 73% à 77%.

4.2. Facteurs de variabilité de la composition chimique

Des travaux de recherche ont montré que la composition chimique des HE est très fluctuante. En effet, elle dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, maturité, sol, climat, etc...) ou technologiques (mode de culture ou d'extraction). Du lieu où pousse le Lemongrass dépendra la composition biochimique de son essence et déterminera donc le chémotype, la spécificité de l'huile et les propriétés thérapeutiques. Tous ces paramètres étant influencés par les conditions géographiques et climatiques ainsi que les pratiques culturales.

Pour ce qui est des facteurs pédoclimatique et saisonniers, plusieurs études ont été réalisées. Selon les périodes (estivale ou hivernale), la composition chimique des HE est affectée par le climat, les températures maximales et minimales, la durée d'exposition au soleil et le pic des radiations solaires, la pluviométrie, l'altitude, la nature du sol et son pH (Gily, 1997)

Les pratiques culturales sont également déterminantes sur la qualité de l'HE. L'influence des apports organiques et minéraux a été étudiée pour diverses plantes à parfums. Le désherbage a un effet positif sur le rendement sans affecter la composition chimique. Plusieurs études ont confirmées cette tendance (Akhila, 2010). Le cycle végétatif a une influence sur la composition chimique de l'HE. En effet, la proportion des différents constituants d'une HE peut varier tout au long du développement de la plante. Il faut aussi évoquer, parmi les facteurs qui influent sur la composition, l'incidence de l'état de la matière première. Un stockage de 24 heures suffit pour induire des changements sensibles de composition, lesquels peuvent d'ailleurs être souhaités. En outre, la labilité des constituants des HE explique que leur composition peut varier selon le procédé d'extraction mis en œuvre. (Figueiredo et al., 2008 ; Barbosa et al., 2008)

Par ailleurs, au sein d'une même espèce, la composition chimique de l'HE peut être différente : on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des HE de compositions différentes. (Khanuja et al., 2005)

Toutes ces observations montrent les difficultés que l'on peut rencontrer lors de la préparation et de la conservation des HE. Aussi, pour assurer la qualité de celles-ci, il est donc nécessaire de définir et de contrôler tous les paramètres depuis la culture du végétal jusqu'à l'obtention du produit final.

4.3. Activité antibactérienne et antifongique de l'essence du Lemongrass :

L'activité antimicrobienne de l'essence de *Cymbopogon citratus*, effectuée par 5 méthodes différentes (aromatogramme, microatmosphère, dilution par disque, diffusion à partir de puits et détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé), a été réalisée sur des souches microbiennes, de référence ou isolées cliniquement. Au total, 6 bactéries à Gram+ et 14 à Gram- ainsi que 9 levures et 4 moisissures ont été utilisées dans cette étude. Les résultats de ce screening sont colligés dans les Tableaux 5, 6 et 7 pour bactéries, levures et moisissures respectivement. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

4.3.1. Résultats de l'Aromatogramme :

L'HE de Lemongrass présente, *in vitro*, une bonne activité inhibitrice sur la croissance de certaines bactéries testées et pratiquement sur toutes les souches fongiques (levures et moisissures) (Figure 9 et 10). Si on prend en considération les Diamètres des Zones d'Inhibition (DZI), l'HE est très active sur *Enterococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis* (Se1), *S. epidermidis*(Se2), *S. aureus* (Sa1), *S. aureus* (Sa2), *S. aureus* (Sa3), *Escherichia coli* (E1), *E. coli* (E2) et *Proteus mirabilis* avec des diamètres d'inhibition qui varient entre 18 et 50 mm pour un disque imbibé d'1 goutte d'HE, entre 20 à 60 mm pour 2 gouttes et entre 28 à 85 mm pour 3 gouttes.

Nos résultats obtenus ont été corroborés par plusieurs études antérieures qui ont révélé que plusieurs souches bactériennes, à l'exemple d'*E. coli* (Ogunlana et al., 1987) et de *S. aureus* (Syed et al., 1995 ; Ahn et al., 1998 ; El-Kamali et al., 1998), de *Klebsiella pneumoniae* et de *Saccharia marcescens* (Hammer et al., 1998), de *Proteus mirabilis* et de *Salmonella typhi* (Syed et al., 1995 ; Chalchat et al., 1997) sont sensibles à la phase liquide de l'HE de Citronnelle.

Pour les témoins positifs (disques d'ATB), les DZI varient selon les espèces mais ne dépassent en aucune manière la valeur de 35 mm (enregistrée pour *Morganella morganii*). Il est à noter que l'activité bactériostatique de l'HE avec la dose de 3 gouttes, paraît supérieure ou égale à celle des ATB.

Aussi, les résultats obtenus révèlent que les bactéries à Gram+ sont les plus sensibles. En effet, toutes les souches Gram+ ont manifesté une sensibilité vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'HE avec un diamètre qui varie entre 30 et ≥ 85 mm d'inhibition alors que certaines bactéries Gram- ont présenté une grande résistance, notamment les espèces de *Pseudomonas aeruginosa*. En fait ces dernières possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne (Nikaido, 1996 ; Tepe, 2005 ; Gille, 2010). De ce fait, le mécanisme d'action de l'HE est lié, à la probablement, à la structure de la paroi bactérienne (Figure 6). Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polysidiques (acides lipoteichoïques et teichoïques). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique,

et inactivent les produits chimiques toxiques. La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (Le Minor et Véron, 1982 ; Onawunmi et Ongulana, 1986). Cimanga et al. (2002) ont confirmé que les bactéries à Gram+ sont plus sensibles à l'HE de citronnelle que les bactéries à Gram-. Ceci est en adéquation avec nos résultats, à l'exception d'*Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. Malgré leur appartenance au groupe des Gram-, ces 2 bactéries restent très sensibles à l'action inhibitrice de l'HE.

Cependant, du fait que les mécanismes d'action des HE et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés, d'autres auteurs ont mentionné, dans leurs publications, qu'il n'existe aucun lien apparent ni aucune corrélation entre l'action bactéricide des HE et la nature de la paroi bactérienne. (Zaika, 1988 ; Wilkinson, 2003)

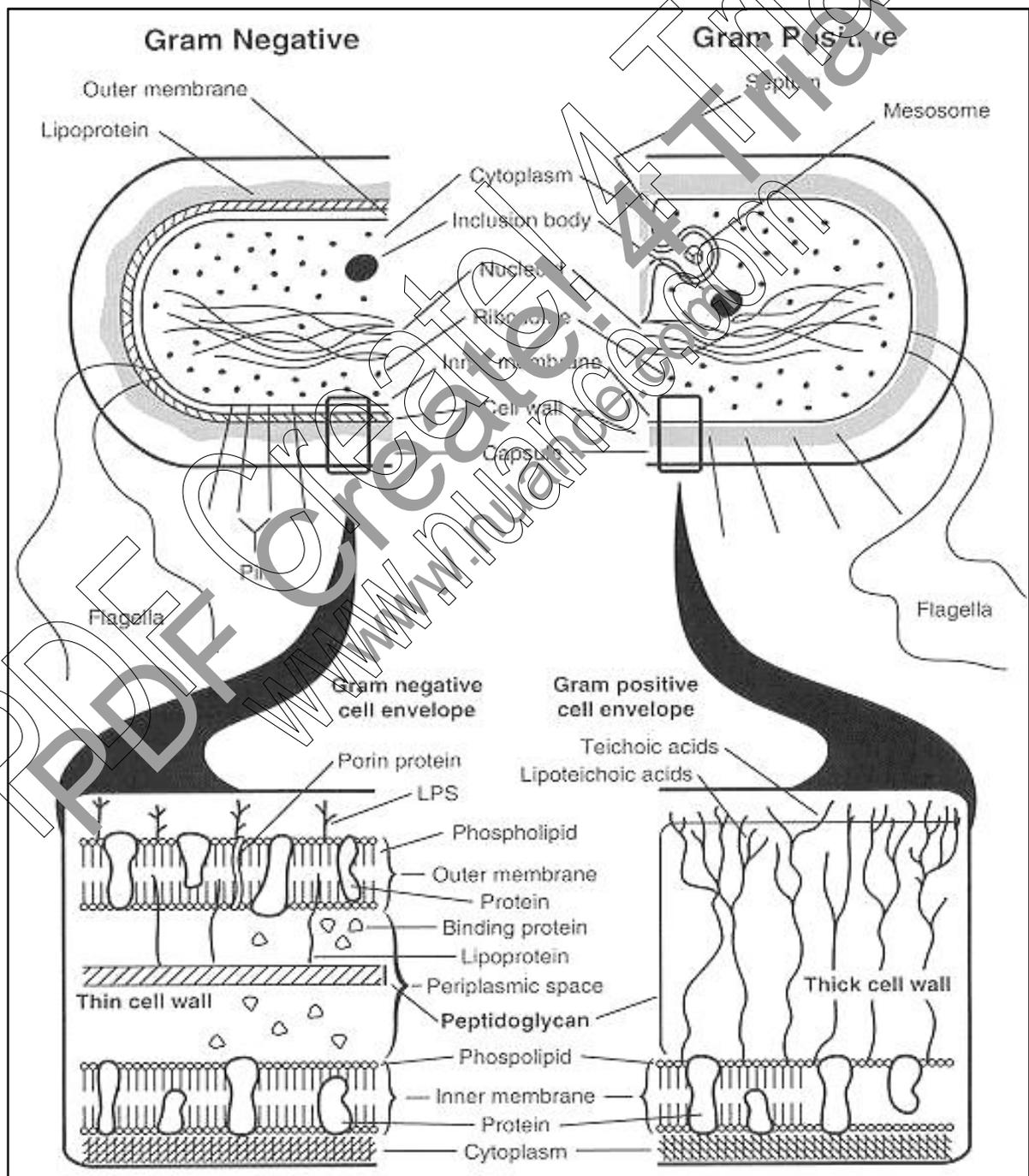


Figure 6 : Illustration de la différence dans la paroi bactérienne entre Gram+ et Gram-

Tableau 5 : Activité antimicrobienne de l'HE de Citronnelle par différentes méthodes microbiologiques.

		Méthodes antibactériennes																
Souches bactériennes	Origine	Aromatogramme			Microatmosphère			Diffusion		CMI		Disques ATB						
		(mm)			(mm)			de Puits(mm)		(mg/mL)								
		Quantité d'HE (goutte/disque)			1/1(HE/DMSO)													
		1	2	3	1	2	3			AMP	CTX	KF	TIC	TM	CN	FA	OX	E
Gram -																		
<i>Escherichia coli</i> (E1)	ATCC	20	26	30	15	35	38	15	1,25	2	35	23			25			
<i>Escherichia coli</i> (E2)	ECBU	24	31	35	23	30	45	12	2,5		35	15			25			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P1)	ATCC	-	-	-	-	-	-	-	nd				18	28	21			
<i>P. aeruginosa</i> (P2)	ECBU	-	12	14	-	-	-	-	nd				26	24	23			
<i>P. aeruginosa</i> (P3)	crachat	-	-	-	-	-	-	-	nd				20	23	18			
<i>P. aeruginosa</i> (P4)	LB	11	14	14	-	-	-	-	nd					22				
<i>P. aeruginosa</i> (P5)	Pus	-	-	-	-	-	-	-	nd				25	23	24			
<i>P. aeruginosa</i> (P6)	hémoculture	-	-	-	-	-	-	-	nd									
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (K1)	ECBU	15	16	21	-	-	-	15	nd		30	27	14		25			
<i>K. pneumoniae</i> BLSE (K2)	ECBU	11	12	14	-	-	-	9	nd			13			9			
<i>Proteus mirabilis</i>	Pus plaie	21	25	28	28	32	37	18	1,25		30	21	13		22			
<i>Salmonella typhi</i>	Hémoculture	13	14	23	25	35	42	5	1,25		32	28	33		17			
<i>Morganella morganii</i>	Pus diabétique	15	18	24	-	22	42	17	>2,5		35		33		15			
<i>Serratia marcescens</i>	Pus pied	13	16	21	-	-	-	10	nd		29	19	30		24			
Gram +																		
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa1)	ATCC	45	48	60	50	70	85	21	0,625					33	35	10	27	
<i>S. aureus</i> (Sa2)	Pus oreille	48	60	62	40	70	85	20	1,25					25	38	31	29	
<i>S. aureus</i> (Sa3)	Hémoculture	34	2	≥85	31	52	73	20	0,625					22	35		25	
<i>S. epidermidis</i> (Se1)	ECBU	45	50	73	40	60	85	25	1,25					20	40	36		
<i>S. epidermidis</i> (Se2)	LCR	50	30	76	37	63	85	20	1,25					35		22		
<i>Enterococcus sp.</i>	Pus diabétique	18	20	30	13	28	42	-	1,25	24				35				20

HE : Huile Essentielle ; DMSO : Diméthyle Sulfoxyde ; mm : Diamètre d'inhibition ; AMP : Ampicilline (10µg), CN : Gentamicine (10µg), CTX : Céfotaxime (30µg), E : Erythromycine (15µg), FA : Acide Fusidique (10µg), KF : Céfalotine (30µg), OX : Oxacilline (5µg), TIC : Ticarcilline (75µg), TM : Tobramycine (10µg) ; (-) : aucune inhibition ; nd : non déterminé.

Tableau 6 : Activité anticandidosique de l'HE de Citronnelle par différentes méthodes microbiologiques.

Levures	Origine	Méthodes antifongiques							CMI (mg/mL)
		Aromatogramme (mm)			Microatmosphère (mm)			Diffusion de puits (mm)	
		Quantité d'huile essentielle (goutte/disque)						1/1(HE/DMSO)	
1	2	3	1	2	3				
<i>Candida albicans</i> (Ca1)	Pus plaie	33	38	80	60	≥85	≥85	20	1,25
<i>C. albicans</i> (Ca2)	Pus de gorge	≥85	≥85	≥85	≥85	≥85	≥85	65	0,625
<i>C. albicans</i> (Ca3)	Ongle	≥85	≥85	≥85	75	≥85	≥85	55	1,25
<i>C. albicans</i> (Ca4)	ECBU	60	≥85	≥85	55	≥85	≥85	50	0,625
<i>C. albicans</i> (Ca5)	PV	≥85	≥85	≥85	65	≥85	≥85	≥85	0,625
<i>C. tropicalis</i> (Ct1)	LB	36	45	≥85	27	50	≥85	22	1,25
<i>C. tropicalis</i> (Ct2)	Ongle	≥85	≥85	≥85	45	≥85	≥85	40	0,625
<i>C. parapsilosis</i> (Cp1)	Thorax	≥85	≥85	≥85	60	≥85	≥85	50	0,625
<i>C. parapsilosis</i> (Cp2)	Ongle	≥85	≥85	≥85	60	≥85	≥85	40	1,25

Tableau 7: Activité antifongique de l'HE de Citronnelle par différentes méthodes microbiologiques.

Moisissures	Origine	Méthodes antifongiques						
		Aromatogramme (mm)			Microatmosphère (mm)			Diffusion de puits (mm)
		Quantité d'huile essentielle (goutte/disque)						1/1(HE/DMSO)
1	2	3	1	2	3			
<i>Aspergillus flavus</i>	Air	60	≥85	≥85	60	≥85	≥85	≥85
<i>Aspergillus terreus</i>	Air	65	≥85	≥85	50	≥85	≥85	50
<i>Aspergillus niger</i>	Air	≥85	≥85	≥85	60	≥85	≥85	≥85
<i>Penicillium sp.</i>	Air	≥85	≥85	≥85	≥85	≥85	≥85	65

HE : Huile Essentielle ; DMSO : Diméthyle Sulfoxyde ; PV : Prélèvement vaginal ; LB : Liquide Biliaire ; ECBU : Examen cytot bactériologique des urines.

Par ailleurs, nous avons noté qu'il existe une relation « dose-dépendante » de l'action antibactérienne de l'essence de citronnelle (Figure 7). En d'autres termes, plus la quantité en HE imprégnée dans le disque augmente, plus la valeur de la DZI est grande. Ceci a été vérifié pour toutes les souches bactériennes sauf pour *P. aeruginosa* (P 4) où nous avons noté une certaine stagnation dans la valeur pour 2 et 3 gouttes (14 mm). Ces résultats sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux antérieurs (Tyagi et Mali 2011 ; Tyagi et Malik, 2012). Hélas, par manque de moyens, nous n'avons pas pu réaliser des répétitions pour confirmer la significativité de différence entre les doses en HE sur le plan statistique (Analyse des variances ANOVA). C'est le cas aussi pour les différences entre les bactéries à Gram+ et à Gram-.

Concernant l'activité antifongique de la phase liquide de l'HE sur les levures et les champignons filamenteux (moisissures) utilisées, il apparaît que cette fragrance présente une grande activité inhibitrice sur la croissance de toutes ces souches mycéliennes testées. En effet, cette méthode de diffusion sur disque a donné des valeurs de DZI oscillant entre 33 et 85 mm pour les levures, et entre 60 et 85 mm pour les moisissures.

Aussi impressionnant que cela puisse paraître, les souches de *C. albicans* (Ca2, Ca3 et Ca5), *C. tropicalis* (Ct2), *C. parapsilosis* (Cp1 et Cp2), *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* ont été inhibées totalement par la phase liquide de l'HE et ce avec toutes les doses utilisées (1, 2 ou 3 gouttes d'HE par disque). Par conséquent, l'essence de citronnelle peut être considérée comme un fongicide puissant et son éventuelle utilisation contre les infections fongiques paraît pleinement justifiée. Malheureusement et à cause de la non disponibilité des disques d'antifongique de référence, nous n'avons pas pu réaliser une étude comparative entre les témoins positifs et notre échantillon d'HE.

En outre, nous avons noté que les valeurs des DZI obtenus sont largement supérieures à ceux des bactéries. En effet et sur les germes bactériens, l'HE de citronnelle est douée d'une activité « bactériostatique » où nous avons noté la résistance de certaines souches alors qu'elle est « fongicide » sur les souches mycéliennes. De la même façon que pour les bactéries, l'HE possède une action antifongique « dose-dépendante » pour toutes les souches étudiées (Figure 8).

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par plusieurs études. Pour Ibrahim (1992), l'HE de citronnelle, extraite par hydrodistillation à partir des feuilles, a présenté une activité antimicrobienne efficace lors d'un screening contre 42 micro-organismes (20 bactéries, 7 levures et 15 champignons). Dans le même sillage, Sookhee et al. (2003) rapportent que l'HE de *C. citratus* a présenté l'activité anticandidosique la plus marquée parmi les 18 HE des plantes médicinales thaïlandaises testées.

En analysant l'action antifongique des HE sur *Candida albicans*, d'autres auteurs (Syed et al., 1995 ; Chalchat et al., 1997 ; Hammer et al., 1999) ont confirmé que l'huile de citronnelle est douée d'une activité fongicide. De même, elle a inhibé la croissance d'*Aspergillus niger* (Joarder et Khatun, 1982) et d'*A. flavus* (Mishra et Dubey, 1994). Ces données paraissent en totale adéquation avec les résultats que nous avons obtenus.

Le mécanisme d'action des HE sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé. Cependant, certaines études soulignent que l'action antifongique de ces substances aromatiques est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox et al., 2000). En effet, les composés terpéniques des HE, et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes, réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures. (Knobloch, 1989)

Suppakul et al. (2003) ont suggéré que l'activité antifongique des HE, peut se faire selon deux mécanismes différents : certaines constituants provoquent la fuite des électrolytes et l'épuisement des acides aminés et des sucres alors que d'autres peuvent être insérés dans les lipides membranaires ce qui conduisait à une perte des fonctions membranaires. D'après les observations de Soylu et al. (2005), l'HE de *Foeniculum vulgare* a entraîné des détériorations de la morphologie des thalles ; ils ont observé également de grandes vésicules à l'intérieur de la paroi cellulaire. Dans beaucoup des cas, les cellules du mycélium n'ont plus un cytoplasme ou un cytoplasme épuisé des organelles. Des observations similaires avec d'autres HE ont été rapportées par Zambonelli et al. (1996) et Fiori et al. (2000). En outre, l'activité antifongique des HE pourrait également être liée à l'interférence des composants de l'essence dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, qui affecte la croissance fongique (Carmo et al., 2008). Ces suggestions ont été déjà rapportées par Bang et al. (2000). Ils ont étudié l'inhibition des enzymes synthétisant la paroi des cellules fongiques en examinant les effets inhibiteurs de l'HE sur le β -(1,3) glucanase sur la chaîne synthétase. Chalchat et al. (1997) signalent que les HE endommagent une série de systèmes enzymatiques des moisissures, affectant, de ce fait, la synthèse et la production énergétique composantes structurales.

Le mécanisme d'action des composés terpéniques des HE sur les champignons est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contre un groupement SH dans leur site actif (Celimene et al., 1999). Plusieurs auteurs, notamment L. P. Berberk et al. (2001), Mares et al. (2004), Rai et Mares (2004) ; Rasooli et Abyaneh (2004) et Sharma et Tripath (2007), ont constaté que les HE peuvent causer des changements morphologiques comprenant l'insuffisance de sporulation, la perte de pigmentation, le développement anormal des conidiophores et la déformation des hyphes.

L'activité antifongique de l'HE de citronnelle pourrait être due à la présence de plusieurs éléments connus pour leur activité biologique. Ces principaux composants sont le Géraniol, le Néral et le Géraniol, qui ont montré une forte activité antifongique (Lee et al., 2008). Un mélange naturel de Géraniol et de Néral (citril), a été signalé pour son activité antifongique (Onawunmi, 1988). Aussi, le Géraniol, un monoterpénol, a été marqué pour son activité antifongique avérée à cause de son mode d'action à améliorer le taux de fuite de potassium dans les cellules (Bard et al., 1988). Pour le Myrcène, une molécule terpénique, son activité antifongique n'a pas été décelée (Pattnaik, 1997 ; Skaltsa et al., 2003) mais sa présence dans la composition chimique renforce l'effet du citral. (Onawunmi et al., 1984)

Une étude similaire à la nôtre (Koba et al., 2003), publiée dans le Journal de Mycologie Médicale, dirigée par une équipe Togolaise en collaboration avec des laboratoires Européens, a été menée sur les HE de plusieurs variétés de *Cymbopogon*, y compris la citronnelle, et ce pour asseoir leur activité antifongique. Les auteurs

du dit travail, et au vu des résultats obtenus, recommandent l'essence de *C. citratus* et celle de *C. nardus* comme principes actifs dans des formulations (crèmes, lotions, etc.) contre les mycoses superficielles.

Les résultats que nous avons obtenus sont très prometteurs pour l'utilisation de la fragrance de citronnelle comme principe actif dans des préparations galéniques à visée thérapeutique et pour lutter contre les infections microbienne et fongique. En général, une substance peut être considérée comme un bon agent antimicrobien *in vivo* lorsqu'elle agit à de faibles concentrations *in vitro* car il y a un risque de confrontation aux problèmes de toxicité *in vivo*. Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* sont très encourageants pour tester l'activité de cette essence *in vivo*.

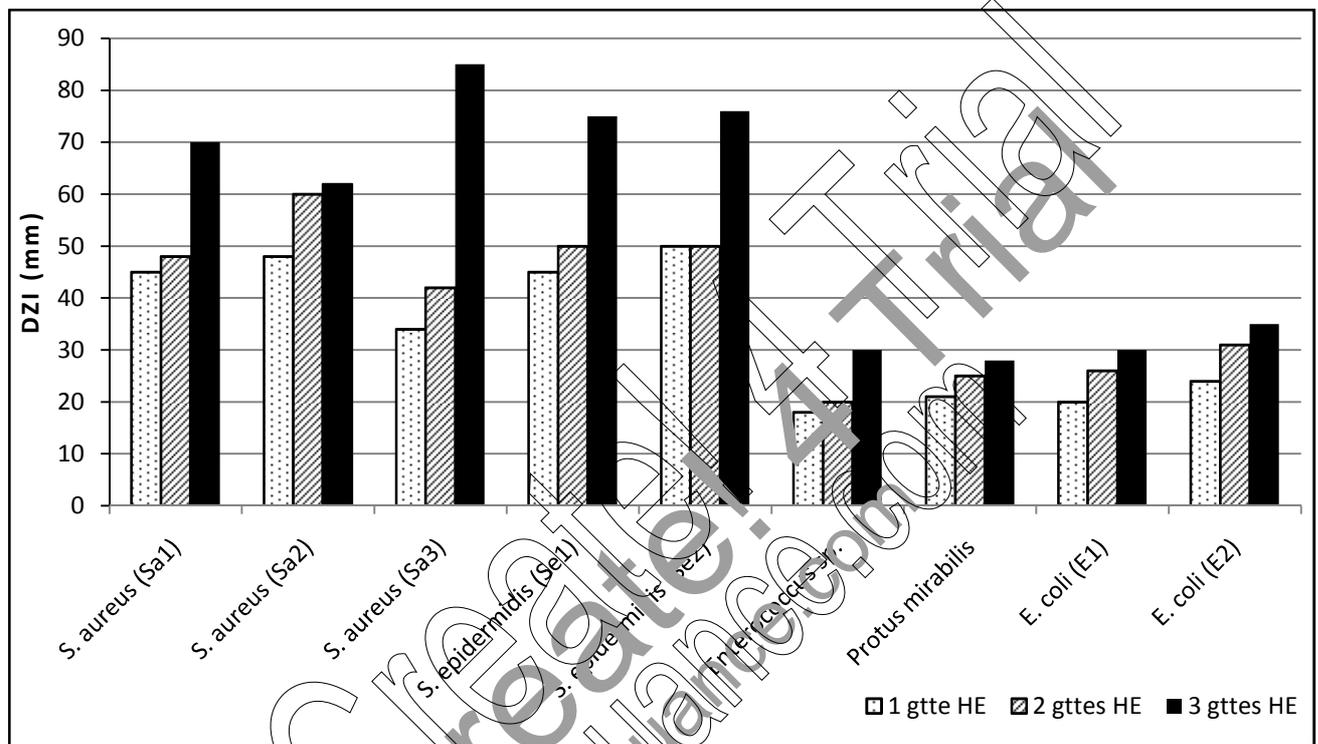


Figure : DZI de quelques bactéries en aromagramme.

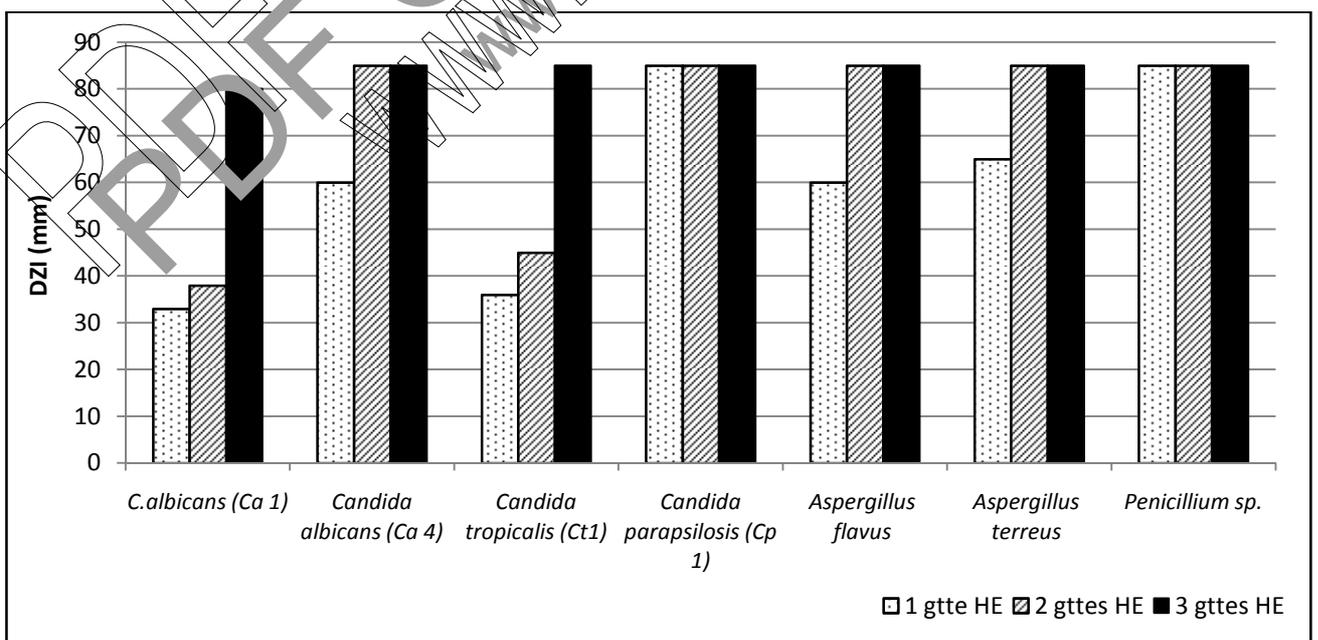
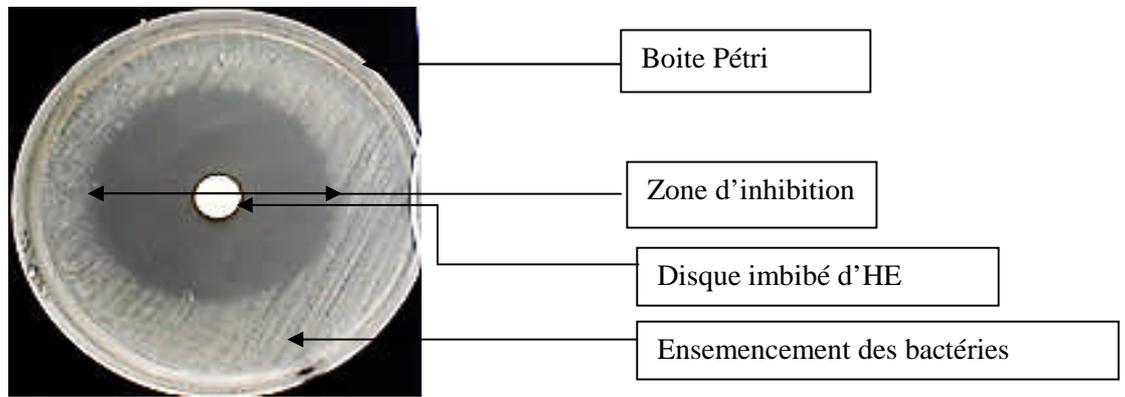
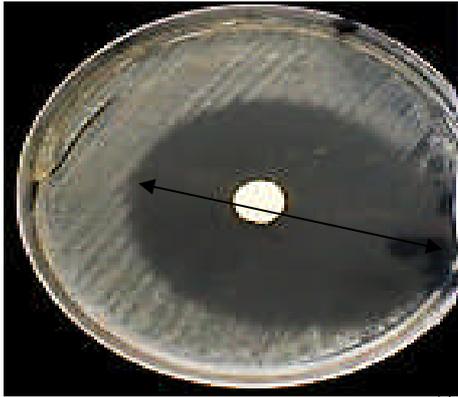


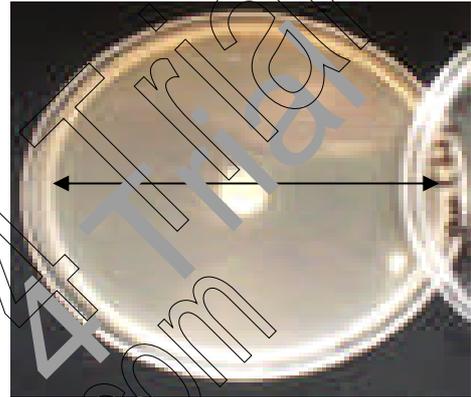
Figure 8: DZI de quelques levures et moisissures en aromagramme.



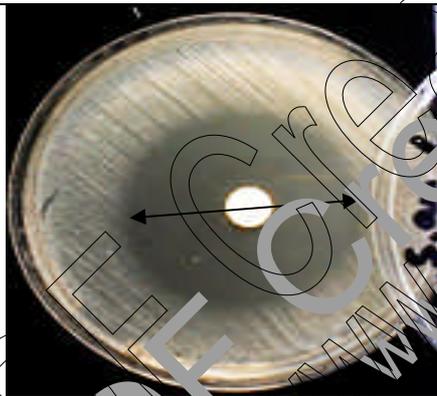
S. epidermidis (Se 2) avec 2 gouttes d'HE



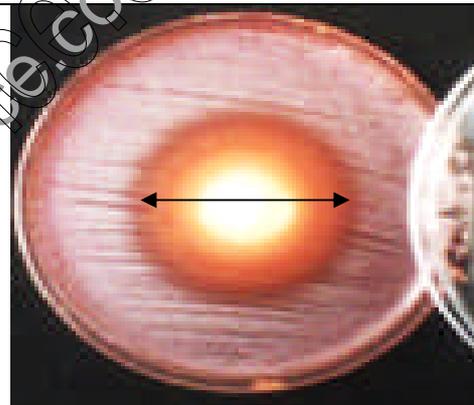
S. epidermidis (Se 2) (1goutte)



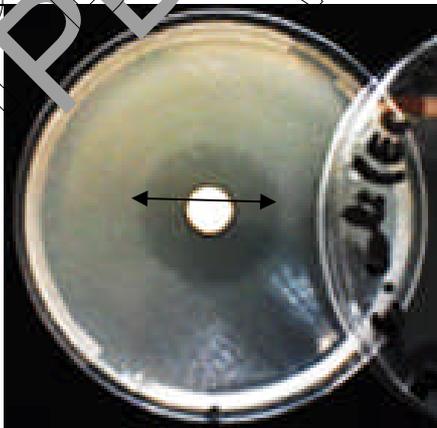
S. aureus (Sa 3) (3gouttes)



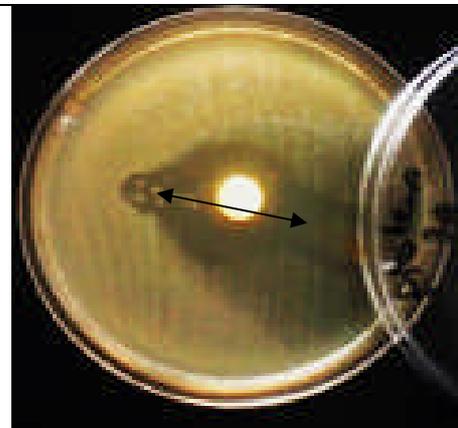
S. aureus (Sa1) (2 gouttes)



Enterococcus sp. (3gouttes)

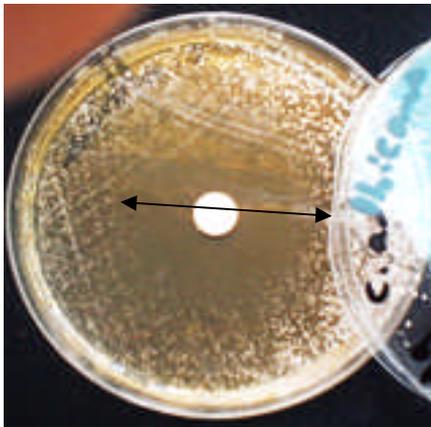


E. coli (E2) (2 gouttes)

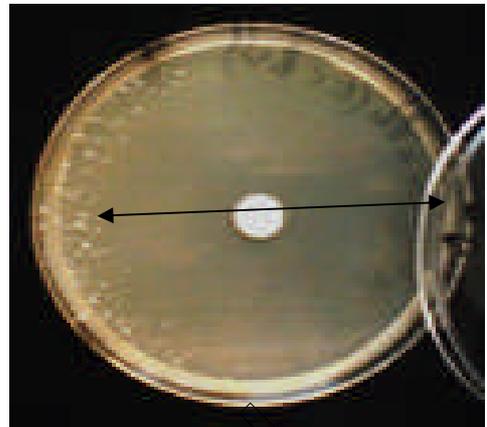


Proteus mirabilis (3gouttes)

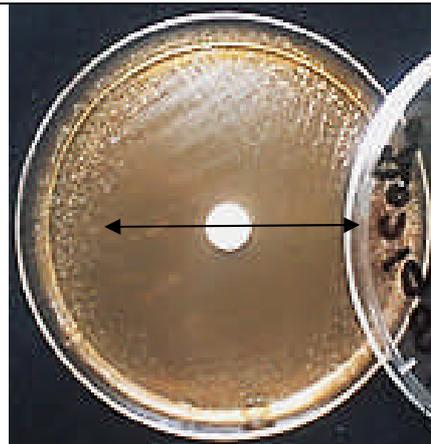
Figure 9: Effet antibactérien de l'HE en aromatoigramme. (Original, 2013)



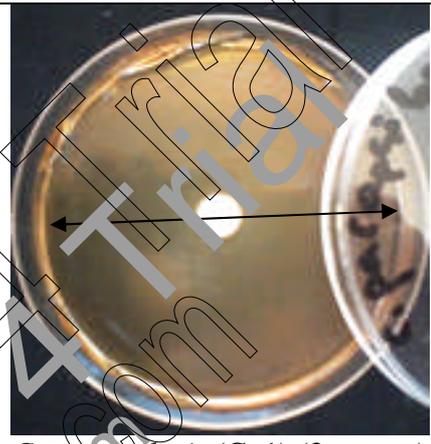
C. albicans (Ca1) (1 goutte)



C. albicans (Ca4) (1 goutte)



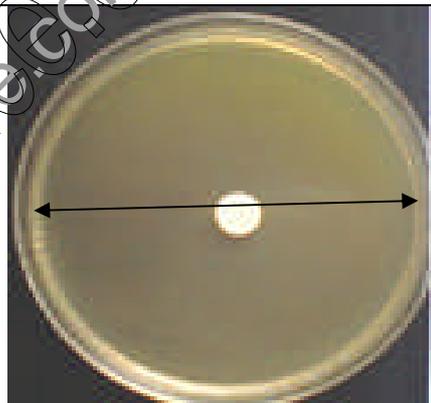
C. tropicalis (Ct1) (2 gouttes)



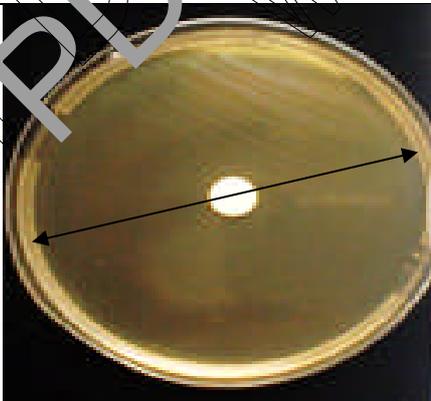
C. parapsilosis (Cp1) (3 gouttes)



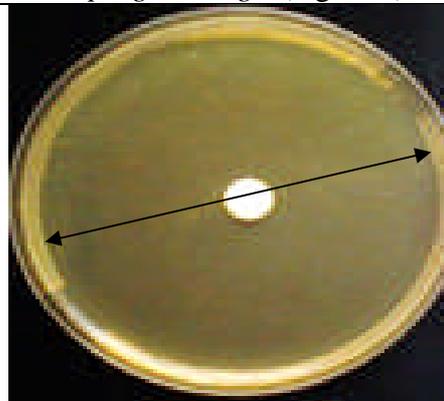
Aspergillus terreus (1 goutte)



Aspergillus niger (1 goutte)



Aspergillus flavus (2 gouttes)



Penicillium sp. (3 gouttes)

Figure 10: Effet antifongique de l'HE en aromatoگرامme. (Original, 2013)

4.3.2. Résultats de microatmosphère :

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de la phase vapeur de l'HE, nous avons utilisé la technique de la microatmosphère avec trois doses croissantes différentes (1,2 et 3 gouttes d'HE par disque). Les résultats de cette étude sont rapportés dans le Tableau 5.

A la lecture de ces résultats, il apparaît clairement que l'action inhibitrice de la phase vapeur (Microatmosphère) est différente à celle de la phase liquide (Aromatogramme). En effet et comme en aromatoigramme, certaines bactéries ont manifesté une grande résistance à l'action inhibitrice de l'HE. C'est le cas notamment pour les souches de *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia marcescens*. En effet, *P. aeruginosa* a la réputation d'être très résistante à toutes sortes d'agents antimicrobiens et antibiotiques en général. Cela est probablement dû à la capacité qu'a la bactérie à de former un biofilm. Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antimicrobiens. (Fleurette et al., 1995)

En revanche et ce qui est plus intéressant, d'autres isolats bactériens ont manifesté une sensibilité importante vis-à-vis de l'HE. C'est le cas en particulier de *Proteus mirabilis* et *Salmonella typhi* pour les bactéries à Gram- où les valeurs des DZI varient entre 25 et 42 mm. Pour les bactéries à Gram+, l'HE présente une action bactériostatique importante puisque la croissance de toutes les souches a été inhibée avec des DZI variant entre 31 et >85 mm pour les bactéries du genre *Staphylococcus*.

Une grande différence a été soulignée entre les Gram+ et les Gram- puisque les meilleurs résultats de ce screening antimicrobien ont été obtenus avec les Gram+.

Les différentes souches d'*E. coli* (E2), *S. aureus* (Sa1, Sa2 et Sa3), *S. epidermidis* (Se1 et Se2), *Proteus mirabilis* ainsi que *Salmonella typhi* (Figure 12) sont les bactéries les plus sensibles à la phase vapeur de l'HE avec des DZI importantes qui varient entre 23 à 50 mm pour un disque imbibé d'1 goutte d'HE, 30 à 70 mm pour 2 gouttes et 37 à 85 mm pour 3 gouttes.

Encore une fois, l'essence de citronnelle possède une action « dose-dépendante » pour toutes les souches bactériennes (Figure 11). La concentration à appliquer sur le disque nous paraît donc un élément important qui peut influencer les résultats obtenus. Cependant, cette différence n'a pu être vérifiée sur le plan statistique (répétition non réalisées).

Nous avons signalé que pour la dose d'une goutte d'HE par disque, *S. aureus* (Sa1) apparaît la plus sensible à la phase vapeur de l'HE avec un diamètre d'inhibition de 50mm. Par conséquent, cette vapeur a une action bactériostatique majeure sur cette souche comparativement aux disques d'ATB, utilisés comme témoins positifs, et qui n'ont donné que des diamètres moyens d'inhibition (< 30 mm pour CN, FA et OX).

Le pouvoir antimicrobien de la phase gazeuse des essences aromatiques n'est pas surprenant du moment que plusieurs travaux ont été publiés en ce sens mais la littérature scientifique reste peu prolifique (Tyagi et Malik, 2011 ; Boukhatem et al, 2013ab). A l'heure actuelle, nous pouvons affirmer, sans conteste, qu'il existe des centaines de publications et autres conférences publiées et qui mettent en évidence le potentiel

antimicrobiens des extraits végétaux aromatiques en aromatogramme. Cependant, ce nombre ne dépasse pas, au mieux, une vingtaine d'articles de recherche ou revues de synthèse (review) qui mettent en exergue l'effet bactériostatique de ces produits volatils en microatmosphère.

Concernant l'activité inhibitrice d'HE sur les souches fongiques utilisées (levures et moisissures), nous avons remarqué une sensibilité majeure à la phase vapeur de l'HE avec des diamètres d'inhibition impressionnants qui varient entre 27 à 85 mm pour les différentes doses utilisées (Figure 14). En plus, l'essence de citronnelle pourra être considérée comme fongicide aux doses de 2 et 3 gouttes d'HE/disque mais pas à la dose de 1 goutte car les valeurs de DZI obtenues, certes très élevées, mais restent au-dessous de 85 mm. Par ailleurs et plus impressionnant encore, les isolats fongiques de *C. albicans* (Ca2) et *Penicillium sp.* ont été inhibés totalement et ce pour les 3 doses utilisées.

Une autre remarque s'impose, l'HE a exhibé, comme dans le cas des bactéries, une activité « dose-dépendante » pour toutes les souches mycéliennes. (Figure 12)

En ce qui concerne l'activité antifongique des HE, il apparaît que cette dernière peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés de l'HE. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antimicrobienne de cette HE. (Giordani et al., 2008 ; Regnier et al., 2008)

D'après Deba et al. (2008), les composés majoritaires ou mineurs peuvent augmenter l'activité antifongique. L'effet synergique ou antagoniste de ces composés joue un rôle important dans l'inhibition des champignons. Pour d'autres auteurs (Meincke et al., 2005 ; Ebrahimabadi et al., 2010), les monoterpènes (Citral), diffusent et endommagent les structures de la membrane cellulaire des microorganismes. Cette action est majeure avec la phase gazeuse de l'HE car elle facilite leur solubilisation dans la membrane cellulaire. Cette hypothèse a été confirmée récemment par une étude indienne (Tyagi et Malik, 2010) publiée dans *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Une déformation de celle-ci a été notée pour le germe de *Pseudomonas fluorescens*.

Il en découle, d'après les résultats de ce screening, que les HE, étant volatiles, pourront être utilisées en tant qu'agents de désinfection pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment dans le milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air. C'est un procédé permettant de répandre un brouillard (microgouttelettes d'HE) de molécules actives potentiellement antibactériennes, antivirales et immunostimulantes. Bien conduite, la diffusion atmosphérique devient un procédé idéal visant à la protection et à la prévention contre les infections nosocomiales et les pathologies hivernales (De Billerbeck et al., 2002). Rappelons pour mémoire que, ancêtres des CLIN hospitaliers modernes (Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales), dès le 16^{ème} siècle et jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle, ce sont médecins, « parfumeurs et fumigateurs » qui sont chargés de la désinfection des locaux et de l'hygiène hospitalière (Druilles et al., 1995). En plus de leurs actions bactéricides et fongicides, les HE ont la particularité d'avoir des effets psychophysiologiques. (Tisserand, 1988 ; Goeb, 1995)

Une étude décrite précédemment (**Pibiri et al., 2006**) montre une activité bactéricide et fongicide de certaines HE sur les microorganismes de l'air ambiant. Ces résultats suggèrent une possible utilisation de ses propriétés pour le traitement des ambiances en milieux hospitalier. Il faut cependant considérer ces données avec prudence car ce sont des résultats obtenus en laboratoire (bioréacteur de 7 litres) et l'application en conditions réelles soulèvent de nombreuses interrogations. De plus, l'étude de **Su et al., (2007)**, montre que l'efficacité microbicide est limitée dans le temps. Les dispositifs d'évaporation sont également susceptibles d'entraîner la formation de composés potentiellement toxiques pour l'Homme. Il est donc nécessaire d'obtenir plus de données sur ces différents aspects.

Une étude récente (**Doran et al., 2009**) a testé l'activité de la phase vapeur de l'essence de Citronnelle contre les germes microbiens de *S. aureus* résistant à la Méthicilline (SARM). Les résultats de cette étude ont révélé que la vapeur de l'HE a exhibé une certaine activité inhibitrice sur la croissance de toutes les bactéries, mais qu'elle est variable et dépendante du temps d'exposition. De plus, d'autres souches ont été inhibées *in vitro* (*Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile* et *Enterococcus faecium* résistant à la Vancomycine).

Une étude japonaise (**Abe et al., 2003**), publiée dans le Journal Japonais de Mycologie Médicale, a démontré que l'essence de Citronnelle ainsi que son composé majoritaire (le citral) réduise de façon significative la croissance mycélienne de *Candida albicans*. Ils ont démontré que le mode d'action de la vapeur réside dans la déformation morphologique et la rupture de la membrane cellulaire de la cellule. Par conséquent, ces altérations réduisent l'aptitude d'adhérence des cellules fongiques et donc la réduction de leur virulence.

Sur un autre plan, orienté plus particulièrement sur les dégradations du patrimoine dans les musées, les résultats du travail de **DeBillerbeck (2000)** constituent la preuve irréfutable de l'action des HE de *Cymbopogon nardus* en phase gazeuse sur *Aspergillus niger*. Cette étude a révélé l'influence de l'HE et de ses composés majoritaires sur le développement et la morphologie d'*Aspergillus niger*. La croissance du mycélium est totalement inhibée par 800 µL d'HE en milieu gélosé. De plus, l'association des composés majoritaires (citronellal, citronellol et géraniol) révèle un effet synergique. Des observations en microscopie photonique, électronique à balayage et électronique à transmission montrent des perturbations morphologiques au niveau des hyphes traités. Les principaux changements ultrastructuraux affectent le diamètre des hyphes et l'épaisseur de la paroi, ainsi que la structure des mitochondries.

Dans un autre registre et pour ce qui est de l'industrie agro-alimentaire et précisément l'usage des produits naturels comme conservateurs alimentaires, en substitution aux additifs chimiques, **Tyagi et Malik (2011)** recommandent l'exploitation de cette phase vapeur des HE. En effet, en phase liquide, l'HE est ajoutée, dans les denrées alimentaires, à une grande concentration pour obtenir l'effet escompté (à savoir la bonne conservation de l'aliment) mais cela sera fait au détriment des propriétés organoleptiques des denrées qui vont être modifiées voire altérées. Pour y remédier à ce problème, lesdits auteurs préconisent l'usage de l'HE en phase vapeur car une très faible quantité de celle-ci permettra d'avoir l'effet recherché. A titre d'exemple, ils recommandent l'incorporation des HE dans l'emballage et le packaging des aliments. Et puisque l'HE est volatile, donc elle va inhiber et éliminer toute contamination bactérienne et fongique sans le moindre contact

avec aliment ce qui permet de conserver, au même temps, ses propriétés organoleptique et sensorielle. Cette constatation a été confirmée par une étude récente. (Boukhatem et al., 2013a)

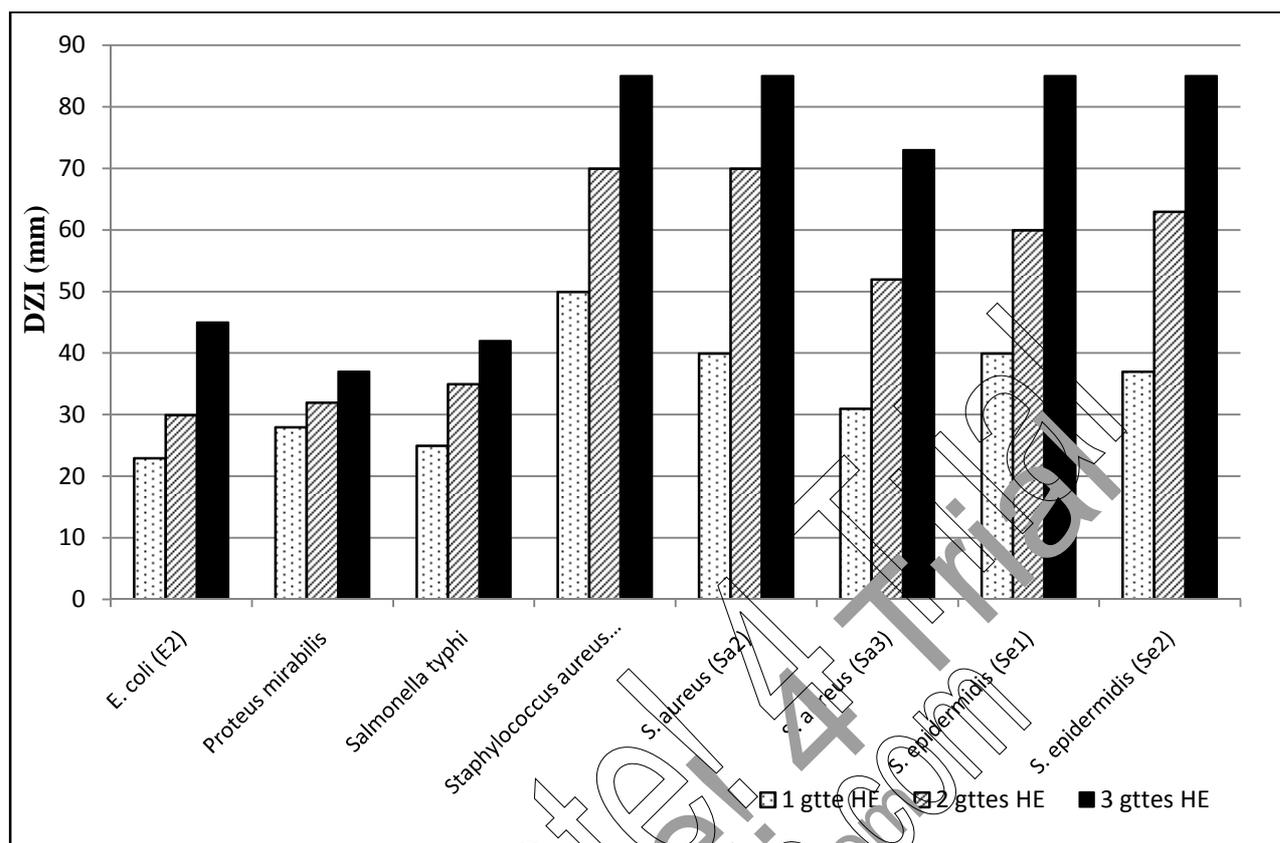


Figure 11 : DZI de quelques bactéries en Microatmosphère.

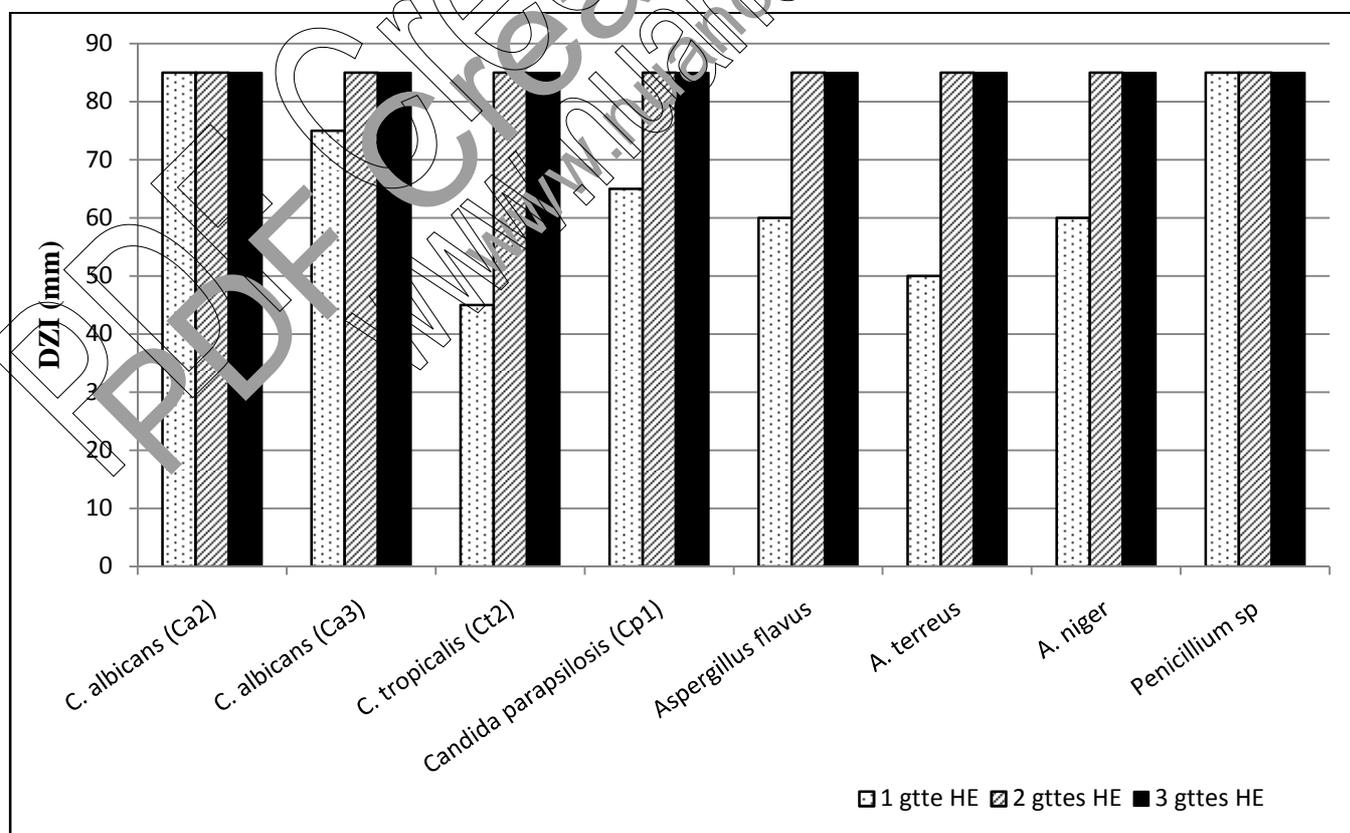
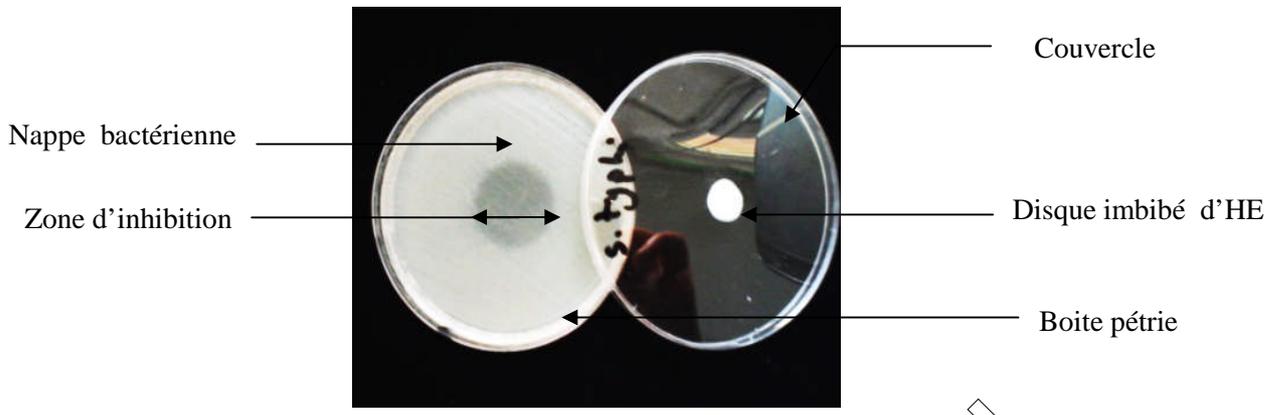
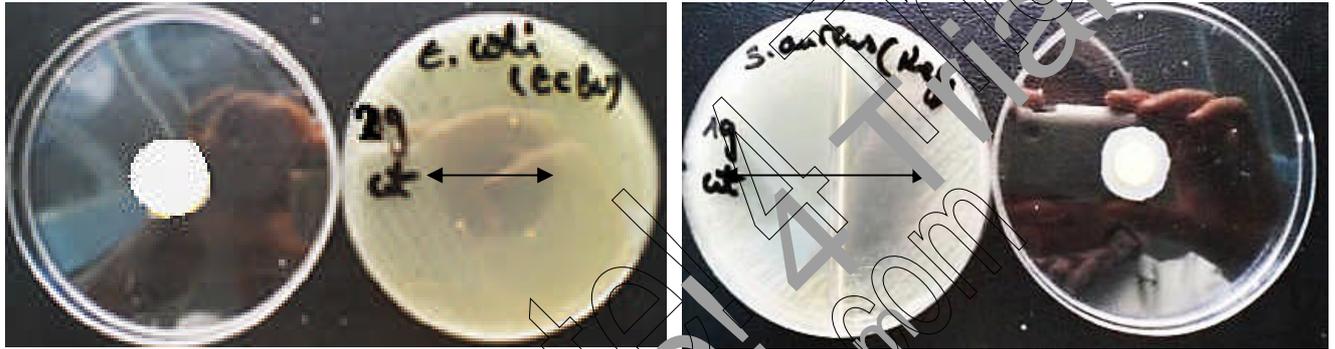


Figure 12: DZI de quelques levures et moisissures en Microatmosphère



Salmonella typhi (1goutte)



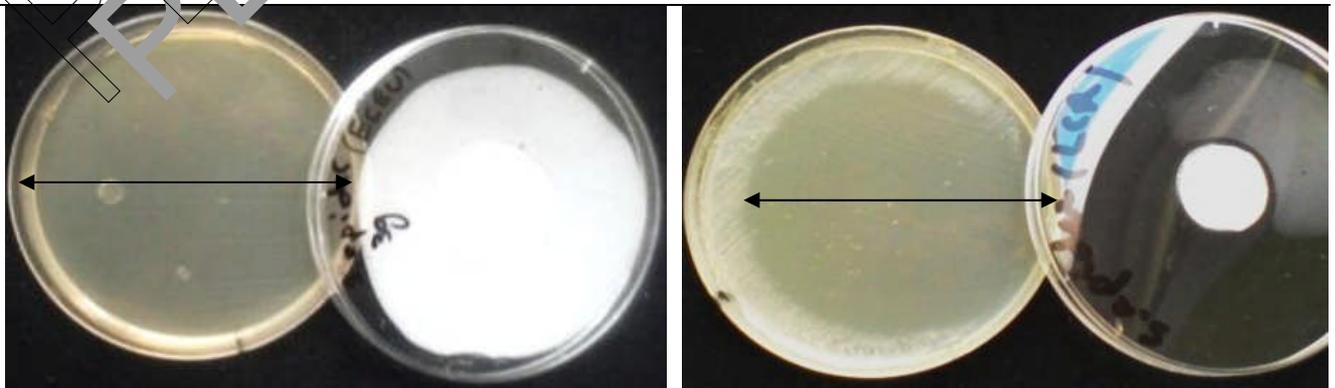
E. coli (E2) (2 gouttes)

S. aureus (Sa1) (1 goutte)



S. aureus (Sa3) (2 gouttes)

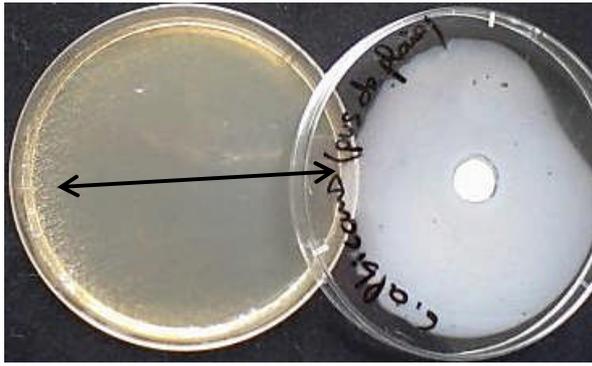
S. aureus (Sa 2) (1 goutte)



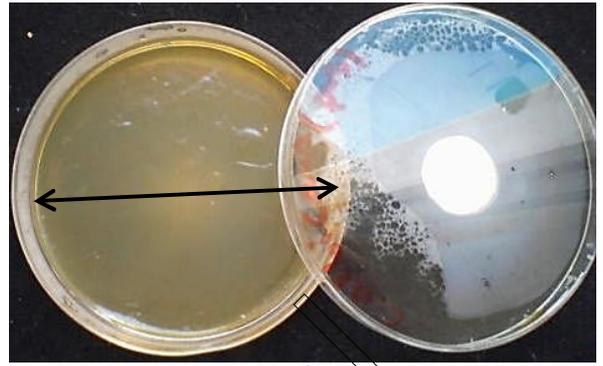
S. epidermidis (Se1)(3gouttes)

S. epidermidis (Se 2) (2gouttes)

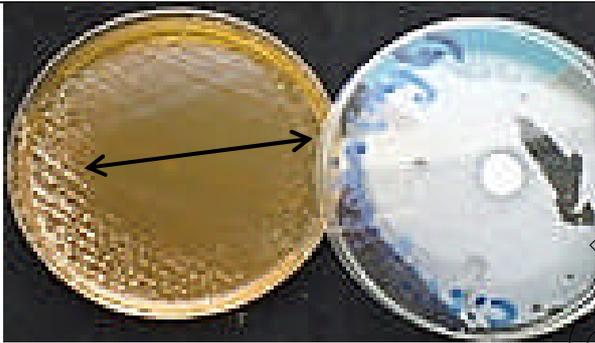
Figure 13: Effet antibactérien de l'HE en microatmosphère. (Original, 2013)



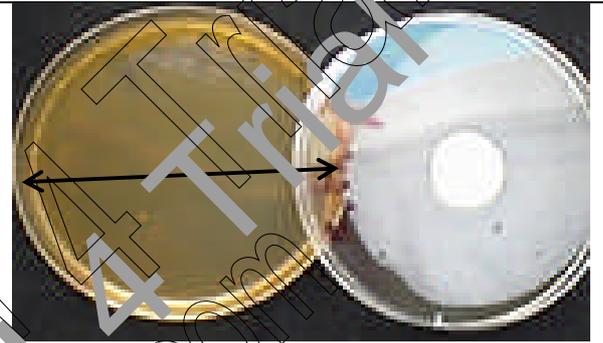
C. albicans (Ca1) (1 goutte)



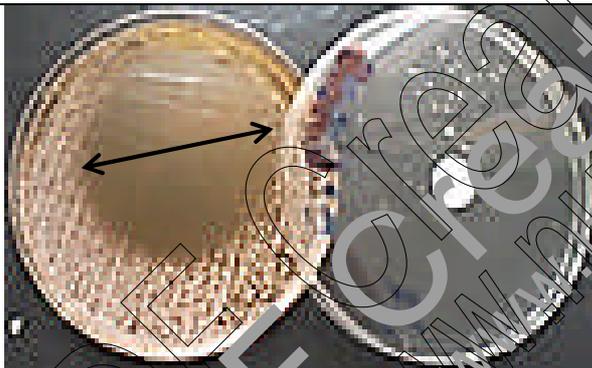
C. albicans (Ca2) (2 gouttes)



C. albicans (Ca3) (1 goutte)



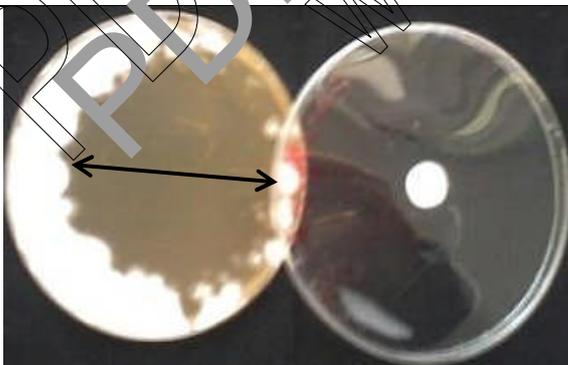
C. albicans (Ca3) (2 gouttes)



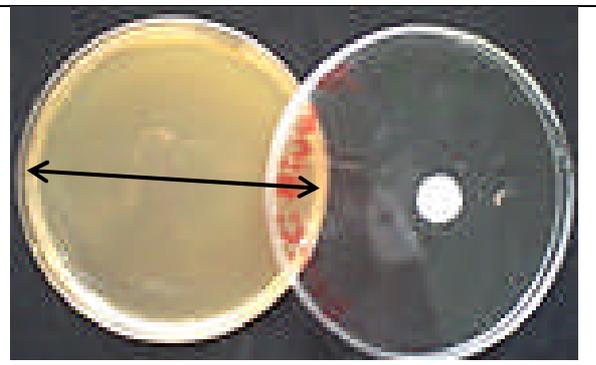
C. parvulus (Cp2) (1 goutte)



Aspergillus niger (1 goutte)



Aspergillus flavus (1 goutte)



Penicillium sp. (1 goutte)

Figure 14: Effet antifongique de l'HE en microatmosphère. (Original, 2013)

4.3.3. Etude comparative : Aromatogramme versus Microatmosphère :

Au cours de notre travail et de la lecture comparative (Figure 15) entre les résultats obtenus par les deux méthodes, aromatogramme et microatmosphère, il apparaît clairement que cette dernière technique a présenté une action inhibitrice légèrement supérieure à celle de l'aromatogramme, en particulier avec les bactéries à Gram+ du groupe *Staphylococcus*. En effet, l'inhibition de la croissance bactérienne a été totale pour ces dernières en phase vapeur alors qu'elle n'est que partielle en phase liquide, ne dépassant, dans les meilleurs des cas, 76 mm sauf pour *S. aureus* (Sa3).

Aussi et avec les bactéries à Gram-, la différence notée est flagrante pour les souches de *Proteus mirabilis* et *Salmonella typhi*. A titre d'exemple et pour la souche de *Salmonella typhi*, nous avons obtenu des DZI de l'ordre de 25, 35 et 42 mm en microatmosphère et qui sont le double comparativement à celles de l'aromatogramme où les valeurs sont de 13, 14 et 23 mm pour 1, 2 et 3 gouttes d'HE diluée, respectivement.

D'un autre côté et en ce qui concerne les champignons, aucune différence notable ne peut être dégagée pour les différentes souches fongiques étudiées sauf pour *C. albicans* (Ca1) où les DZI en microatmosphère sont largement supérieurs à ceux de l'aromatogramme pour les 3 doses utilisées.

En somme, en se basant sur les résultats de ces deux techniques, l'activité antimicrobienne de l'HE du Lemongrass pourrait être due à l'effet combinatoire de la vapeur de l'HE et du contact direct.

Dans tous les cas, cette action inhibitrice de la croissance bactérienne par l'HE paraît supérieure à celle des ATB utilisés comme référence, notamment pour les bactéries à Gram+ où les valeurs des DZI s'échelonnent entre 20 et 40 mm pour les ATB, ce qui est au-dessous de celles obtenus avec l'HE, atteignant parfois les 85 mm.

Concernant le screening antimicrobien par la méthode de microatmosphère, il a été constaté que, avec certains germes, la phase volatile de l'HE de Citronnelle, est plus active que la phase liquide. Ceci peut s'expliquer par le fait que, en contact direct, les HE diffusent mal en gélose du fait de leur non miscibilité, donc un contact réduit entre le germe et l'HE. Par contre et en microatmosphère, l'HE est très volatile et, de ce fait, il y aura une bonne diffusion sur une géloseensemencée préalablement. (Inouye et al., 2001 ; Valero, 2003 ; Edwards-Jones et al., 2004 ; Pibiri, 2005 ; Goni et al., 2009)

Actuellement, une équipe au Japon travaille sur l'activité HE en phase gazeuse (Abe et al., 2002 ; Inouye et al., 2003a ; Inouye et al., 2003b). Leur dispositif expérimental permet d'effectuer des prélèvements dans des boîtes test étanches de 1.3 litres afin de déterminer les concentrations en HE. Selon leurs résultats, les valeurs des doses minimales inhibitrices (MID) des HE en phase gazeuses sont plus faibles que les concentrations minimales inhibitrices (MIC) en phase liquide. La bioactivité des HE est plus importante en phase gazeuse qu'en phase liquide, en particulier sur les champignons filamenteux et sur les bactéries à Gram négatif. Ceci est en accord avec la sensibilité des germes aux HE.

Pour y dégager de plus amples renseignements, il serait préférablement d'approfondir ses essais avec d'autres HE en utilisant la technique de microatmosphère.

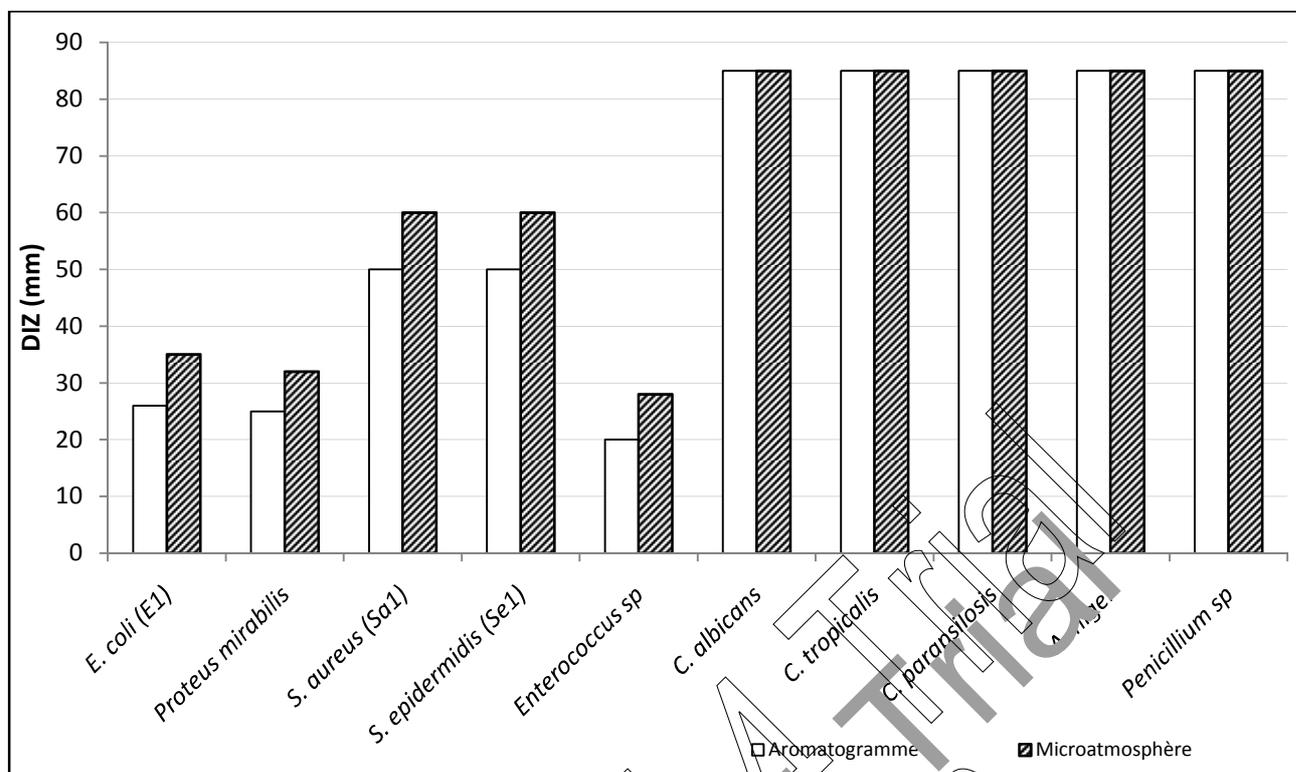


Figure 15 : Etude comparative entre aromato gramme et microatmosphère.

4.3.4. Activité antimicrobienne d'HE du Citronnelle par dilutions à partir des disques :

Les souches bactérienne et fongique qui ont manifesté une grande sensibilité à l'action inhibitrice de l'HE du Lemongrass ont été sélectionnées pour être testées dans la méthode de dilution sur milieu gélosé à partir des disques. Les germes résistants ou qui ont donné un faible DZI n'ont pas été inclus dans notre recherche.

Les résultats de cette activité antimicrobienne sont rapportés dans le Tableau 8. A noter que toutes les bactéries à Gram+ et les levures ont été testées car avant toutes présentées des valeurs de DZI importantes. Hélas, les moisissures mycéliennes n'ont pu être incluses par manque de réactif (quantité de DMSO épuisée).

Par ailleurs, lors de ce screening, le DMSO a été utilisé comme diluant et dispersant car ne possédant aucune activité antimicrobienne et donc ne pouvant influencer positivement sur l'activité de l'HE.

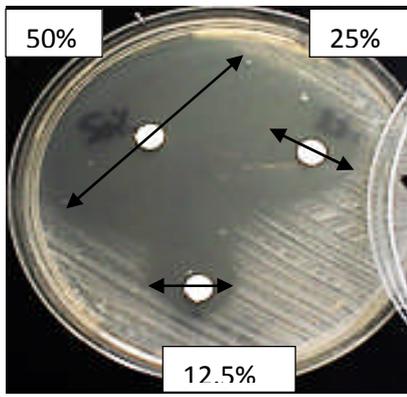
Les résultats obtenus révèlent que la majorité des souches bactérienne et fongique sont sensibles vis-à-vis de l'action antimicrobienne de l'HE, en particulier pour la dilution 50%. En revanche, les valeurs du DZI diminuent d'une façon importante pour les dilutions 25 et 12.5% pour les isolats bactériens. A titre d'exemple, les DZI diminuent par moitié pour le cas de *S. aureus* (Sa1 et Sa3), ce qui est tout à fait logique. Pour les Gram-, l'HE s'est avérée inefficace à la dilution 12.5% puisque les DZI obtenus sont les plus faibles, ne dépassant pas 10 mm.

Pour les levures par contre, et malgré une dilution de 12.5%, certaines souches ont été inhibées d'une façon importante avec des DZI de l'ordre de 24 et 21 mm pour *C. albicans*(Ca1) et *C. albicans* (Ca2), respectivement. Ceci dénote, une fois de plus, la puissance de l'action antifongique de l'essence de citronnelle.

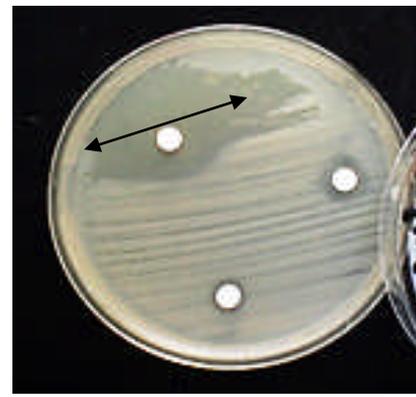
Tableau 8 : Diamètre d'inhibition (mm) des germes vis-à-vis de l'HE par dilution.

Souches microbiennes	Dilutions (%)		
	50	25	12,5
Bactéries à Gram -			
<i>Escherichia coli</i> (E1)	13	10	9
<i>Escherichia coli</i> (E2)	17	10	9
<i>Proteus mirabilis</i>	13	10	10
<i>Salmonella typhi</i>	12	10	-
<i>Morganella morganii</i>	13	10	9
Bactéries à Gram+			
<i>S. aureus</i> (Sa1)	50	25	19
<i>S. aureus</i> (Sa2)	20	12	9
<i>S. aureus</i> (Sa3)	40	15	13
<i>S. epidermidis</i> (Se1)	24	10	8
<i>S. epidermidis</i> (Se2)	43	17	12
<i>Enterococcus sp.</i>	10	8	7
Levures			
<i>C. albicans</i> (Ca1)	8	12	11
<i>C. albicans</i> (Ca2)	42	32	24
<i>C. albicans</i> (Ca3)	40	21	21
<i>C. albicans</i> (Ca4)	18	18	12
<i>C. albicans</i> (Ca5)	15	20	11
<i>C. tropicalis</i> (Ct1)	18	15	11
<i>C. tropicalis</i> (Ct2)	35	20	18
<i>C. parapsilosis</i> (Cp1)	27	18	15
<i>C. parapsilosis</i> (Cp2)	20	11	10

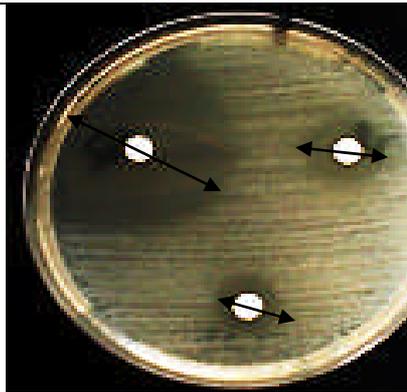
Sur le plan méthodologique et du fait de la toxicité (irritation cutanée, dermocaustique ou photosensibilisation) de certaines HE, leur utilisation thérapeutique à l'état pure n'est plus recommandés. Il sera utile, dans ce cas, de les utiliser en petites quantité ou, mieux encore, en dilution dans un excipient. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé cette technique afin d'apprécier l'efficacité antimicrobienne des HE avec les différentes dilutions.



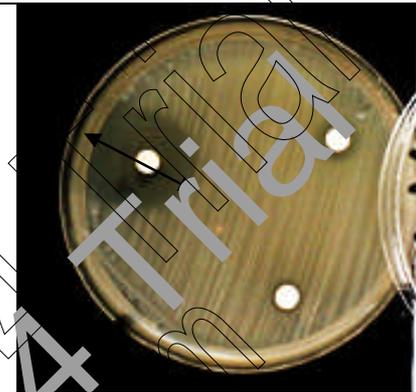
S. aureus (Sa1)



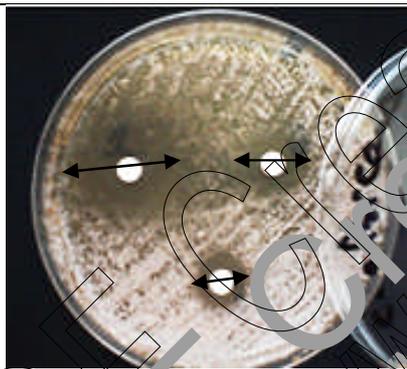
S. aureus (Sa2)



S. aureus (Sa3)



S. epidermidis (Se1)



C. albicans (Ca1)



C. albicans (Ca2)



C. albicans (Ca3)



C. albicans (Ca5)

Figure 16: Effet antimicrobien de l'HE par dilution sur disques. (Originale, 2013)

Méthodes de dispersion

Du fait de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, des agents dispersants de nature différente ont été utilisés : des solvants tel l'éthanol, ou des émulsifiants tel le tween 80 (Burt, 2004). Remmal et al. (1993a) ont montré dans un travail sur l'activité antimicrobienne des HE que l'éthanol, le tween 20 et 80 avaient tous un effet dépréciateur de l'activité antimicrobienne des HE, déterminée en milieu solide par rapport à l'agar-agar utilisé à 0.2%. À cette concentration, elle donne au milieu une viscosité capable d'empêcher les constituants des HE de se réassocier après agitation. La comparaison des résultats obtenus montre que l'éthanol et les détergents exercent une inhibition de l'activité antifongique des HE étudiées.

Au cours d'une étude préliminaire sur l'activité antimicrobienne des solvants, nous avons remarqué que le Tween 80, l'éthanol à 95° et le merystate d'isopropyle sont doués d'une certaine activité bactériostatique vis-à-vis d'une minorité de germes microbiens. Seul le DMSO est dénué de toute activité et donc il a été retenu dans notre étude pour l'évaluation des CMI. Les autres n'ont pas été retenus.

Notre choix pour le DMSO a été judicieux du moment que la majorité des études (Tableau 9) l'ont retenues pour y solubiliser et disperser les huiles aromatiques lipophiles.

Tableau 9 : principaux agents dispersants utilisés pour les HE. (in Akhila, 2010)

Agent dispersant	Concentration	Germes testés	Méthode d'étude	Références
DMSO	0.2% (v/v)	Bactéries	Micro dilution en milieu liquide	Ohno et al. (2003)
DMSO	1% (v/v)	Champignons	Dilution en milieu gélosé	Inouye et al. (2001)
DMSO	10% (v/v)	Bactéries	Diffusion à partir des disques	Prabuseenivasan et al. (2006)
Tween 20	0.001% (v/v)	Champignons	Microdilution en milieu liquide	Devkotte et al. (2005)
Tween 20	5% (v/v)	Bactéries	Dilution en milieu gélosé	Hammer et al. (1999)
Tween 80	1% (w/v)	Bactéries + levures	Dilution en milieu gélosé	Jirovetz et al. (2007)

4.3.5 Méthode de diffusion à partir d'un puits :

La technique de diffusion de l'HE à partir de puits n'est qu'une variante de la méthode de l'aromatogramme. L'échantillon à tester est déposé dans des puits circulaires creusés dans le milieu gélosé. De ce fait, cet échantillon diffuse à travers toute l'épaisseur du milieu de culture et non pas uniquement en surface, comme c'est le cas de l'aromatogramme. Les résultats de cette analyse sont représentés dans les Tableaux 5, 6 et 7.

Et afin d'obtenir une meilleure diffusion à travers la gélose, l'HE de citronnelle qui est de nature lipophile a été additionnée avec un solvant inerte (DMSO) pour une meilleure pénétration. Le rapport HE/DMSO était de 1/1 (v/v). De plus, le témoin négatif (disque imbibé avec DMSO) n'a manifesté aucune activité antimicrobienne sur toutes les souches étudiées. Ceci démontre, si besoin est, son inertie biologique et qu'il est l'un des meilleurs solvants pour ce genre de méthodologie.

A la lecture des résultats obtenus, nous remarquons que les valeurs des DZI sont en accord avec ceux de l'aromatogramme et de microatmosphère.

Les bactéries à Gram+ ont manifesté la plus grande sensibilité comparativement aux Gram-. Les DZI varient entre 20 et 25 mm pour les Gram+ mais restent cependant inférieurs à ceux des autres méthodes citées ultérieurement (Figure 17). En ce qui concerne les souches à Gram-, les DZI sont peu reluisants, ne dépassant, dans les meilleurs des cas 18 mm. Les mêmes constatations faites précédemment ont été confirmées lors de ce test avec une résistance totale des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Concernant les isolats fongiques (levures et moisissures), les DZI obtenus sont largement supérieurs à ceux des souches bactériennes certes, mais demeurent en deca de ceux obtenus avec les phases liquide et vapeur. Ceci est vrai pour toutes les souches sauf pour *C. albicans* (Ca5), *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* où une inhibition totale a été rapportée pour ces 3 souches.

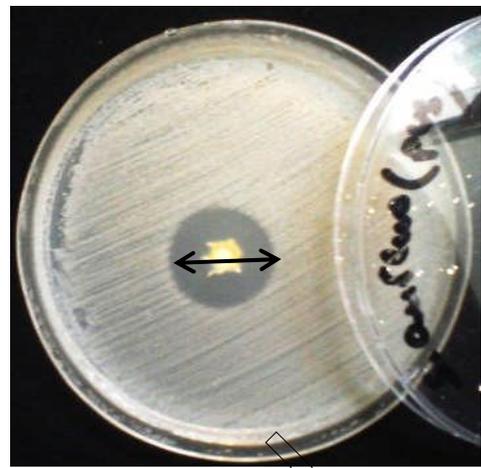
La méthode des puits est une nouvelle technique utilisée pour apprécier la diffusion des HE ou d'une façon générale, les substances hydrophobes dans des milieux solides. A la lecture de la bibliographie, il en ressort que la technique de diffusion à partir de puits est très peu documentée. En effet rares sont les recherches qui lui ont y été consacrée. **(Tyagi et Malik, 2011)**

Concernant les diluants ou dispersants utilisés dans le cas des HE plusieurs ont été testés (Tween 80, DMSO, Merystate d'isopropyle, Ethanol 95°, Ether et d'autres solvants organiques). Plusieurs études ont confirmé que le DMSO reste le diluant le plus approprié (sélectionné comme un bon agent pour la dilution des HE) car il ne présente aucune interaction avec les HE (ni synergiste ni antagoniste) c'est-à-dire un solvant neutre. **(Gachkar et al., 2007)**

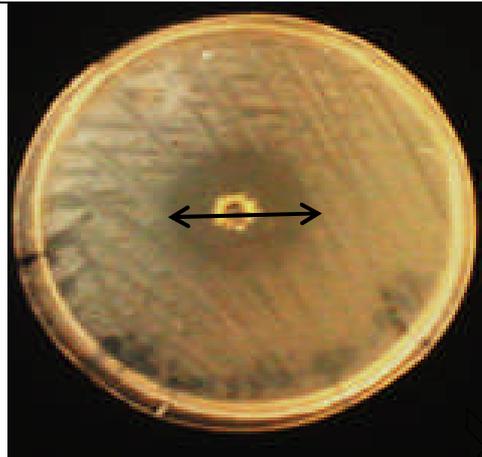
En règle générale, et quelque soit la méthodologie utilisée (aromatogramme, microatmosphère ou diffusion à partir d'un puits), il apparaît que l'activité antimicrobienne de l'essence de citronnelle est toujours marquée. Cependant, les meilleurs résultats ont été obtenus en phase liquide et en phase vapeur. Pour les bactéries, c'est l'action de la phase vapeur qui l'emporte pour les Gram+, alors que pour les Gram-, plusieurs divergences ont été notées. Certaines souches sensibles dans une technique ont manifesté une grande résistance à l'autre, et vice versa. Dans ce cas, aucun consensus ne peut être dégagé mais il semblerait que la diffusion à partir de puits demeure en retard en terme d'efficacité des résultats par rapport aux deux autres, sauf pour 3 bactéries à Gram-. A notre point de vue, ces mauvais résultats peuvent être expliqués par la faible diffusion des HE dans le milieu gélosé malgré l'usage d'un dispersant reconnu ou encore l'utilisation d'un rapport HE/DMSO non adéquat. Notre choix s'est porté sur un rapport 1/1 mais avec d'autres rapports (en augmentant surtout la quantité de DMSO), les résultats seront, probablement, bien meilleurs. Ceci a été confirmé dans une étude antérieure avec l'essence de géranium rosat où les auteurs de cette étude ont rapporté que plus la quantité en DMSO est grande, plus les DZI seront importants. Pour atteindre une grande partie du milieu gélosé et être en contact avec le germe ensemencé, il faut une quantité en solvant suffisante à même d'entraîner l'extrait aromatique lipophile dans un milieu hydrophile. Il convient donc, pour les études ultérieures, d'utiliser un rapport HE/DMSO inférieur à 1 (1/2, 1/4 ou encore 1/8).



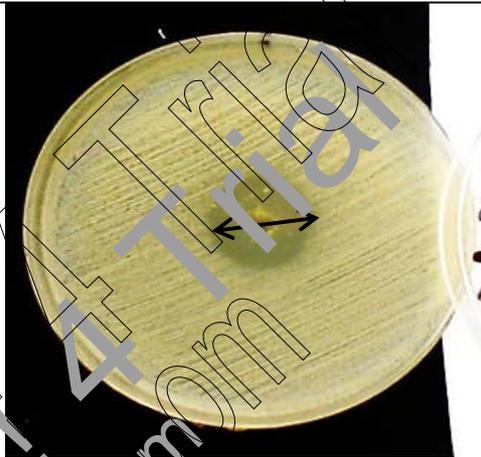
S. aureus (Sa1)



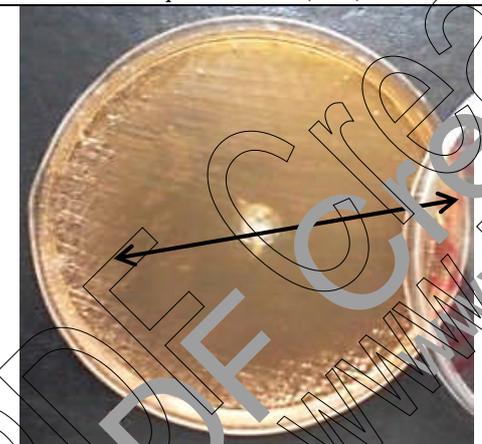
S. aureus (Sa2)



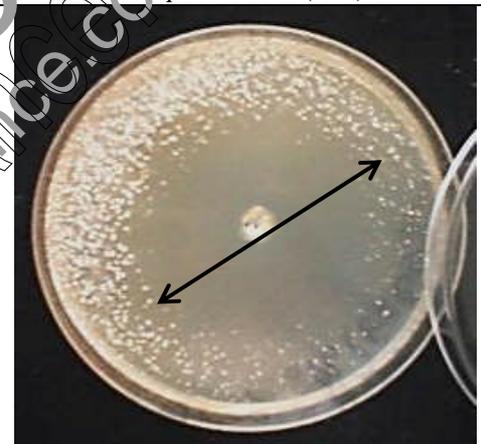
S. epidermidis (Se1)



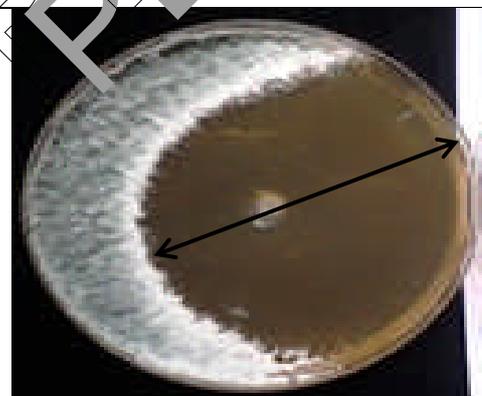
S. epidermidis (Se2)



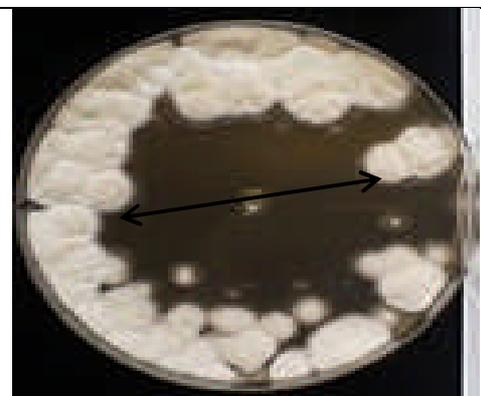
C. albicans (Ca 2)



C. albicans (Ca 4)



Penicillium sp



Aspergillus flavus

Figure 17: Effet antimicrobien de l'HE en micropuit. (Original, 2013)

4.3.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La détermination des CMI a été accomplie uniquement pour les germes microbien ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action antimicrobienne de l'HE (Figures 19 et 20). Les germes résistants n'ont pas été inclus dans notre recherche.

Du fait de la non miscibilité des HE dans la gélose, l'incorporation d'un dispersant (DMSO) a été nécessaire pour une bonne diffusion de l'HE à travers le milieu gélosé. De même, nos différents essais antérieurs ont révélé que ce solvant n'exerce aucune inhibition sur la croissance des germes testés. Par ailleurs, la gamme de dilutions en HE utilisée, lors de cette étude, varient entre 2,5 à 0.078 mg/mL. Les résultats de cette analyse sont rapportés dans les tableaux 5 et 6 pour les bactéries et les levures, respectivement. En revanche, les moisissures, bien qu'elles soient sensibles n'ont pas été étudiée car elles nécessitent une approche totalement différente du fait de leur croissance lente et de la nature de la colonie mycélienne (grand tapis fortement fixé au milieu gélosé) d'où l'impossibilité de le retirer en bonne forme.

Dans le même sillage que les résultats obtenus précédemment, cette étude a révélé que les bactéries à Gram + sont les plus sensibles avec des valeurs de CMI qui oscillent entre 0.625 et 2.5 mg/mL. Loin d'être exhaustif, *Staphylococcus aureus* (Sa1) et *S. aureus* (Sa3) ont présenté la CMI la plus faible (0.625 mg/mL). Les autres souches bactériennes ont présenté une CMI de 1.25 mg/mL à l'exception de *E. coli* (2.5 mg/mL) et de *Morganella morganii* ($\geq 2,5$ mg/mL).

Les levures ont montré une grande sensibilité à l'HE de *Cymbopogon citratus*. Une concentration de 0.625 mg/mL d'HE était suffisante pour inhiber la croissance de *C. albicans* (Ca 2, Ca 4 et Ca 5), *C. tropicalis* (Ct 2), *C. parapsilosis* (Cp 1 et Cp2).

Plusieurs études, de part du monde, ont été réalisées pour évaluer les activités biologiques de l'HE de Citronnelle ainsi que leurs composés majoritaires (Onawunmi et al., 1984 ; Bassole et al., 2011 ; Singh et al., 2011). Aussi et d'un point de vue microbiologique que, cette huile a été classée dans la catégorie des antimicrobiens les plus puissants. (Pattraik et al., 1997 ; Jirovez et al., 2007)

De plus, elle possède des propriétés antimicrobiennes avérées mais la quantité nécessaire pour inhiber ces germes est variable (de 1 à 100 mg/ml) selon les souches microbiennes. (Onawunmi et al., 1984 ; Negerelle et Gomes, 2007 ; Singh et al., 2011)

Il semblerait que l'HE de Citronnelle ainsi que son composé majoritaire (citral) sont plus actifs sur *E. coli* avec des CMI qui varient entre 1 à 5µl/ml et 0,001µl/ml, respectivement.

En revanche, nos résultats semblent être totalement en désaccord avec ceux obtenus par l'étude de Hammer et al. (1999). Ces derniers ont rapporté que, parmi les 52 HE testées, celle de Citronnelle est la plus active sur *Pseudomonas aeruginosa*. Par conséquent, il est difficile, voire problématique, de faire des comparaisons entre les valeurs des CMI de différentes publications. Primo, la composition chimique de l'huile varie considérablement, en quantité et en qualité, entre les différents travaux et, secondant, les méthodes utilisées pour asseoir cette activité *in-vitro* et le choix des microorganismes étudiés (phénotype et sérovare) diffèrent d'une étude à une autre.

Les interactions entre les agents émulsifiants et dissolvants (Tween 80 et DMSO), et les constituants des HE représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antimicrobienne car elles peuvent diminuer l'activité antimicrobienne.

La matière organique du milieu de culture est susceptible de réduire l'efficacité d'un agent antibactérien en se combinant avec lui pour former des composés inactifs, en l'adsorbant et en diminuant sa concentration, ou en le précipitant et en l'éliminant purement. Ainsi, l'activité antibactérienne peut dépendre de la composition du milieu de culture. (Burt, 2004)

La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'huiles essentielles. Les notions de CMI et CMB ne sont pas définies de façon précise et universelle, les auteurs ont exprimé les résultats avec différentes unités (Tableau 10). Ces concentrations peuvent être exprimées en $\mu\text{g}/\text{m}$ (Oussou et al., 2008), en $\mu\text{l}/\text{ml}$ (De Billerbeck et al., 2002) ou en % (vol/vol) (Hammer et al., 1999), ce qui rend la comparaison des résultats entre eux difficile.

Tableau 10 : Résultats des CMI de citronnelle de plusieurs équipes. (in Akhila, 2010)

Souches microbiennes	CMI	Auteurs (année)	Notre étude (2013)
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,12% (v/v)	Hammer et al., (1999)	0,125% (v/v)
<i>E. coli</i>	0,06% (v/v)	Hammer et al., (1999)	0,25% (v/v)
	>0,1% (v/v)	Inouye et al., (2001)	0,125% (ATCC) (v/v)
<i>K. pneumoniae</i>	0,25% (v/v)	Hammer et al., (1999)	Résistante
<i>P. aeruginosa</i>	1% (v/v)	Hammer et al., (1999)	Résistante
	1,3% (v/v)	Kalemba et Kunicka (2003)	
<i>Salmonella typhi</i>	0,25% (v/v)	Hammer et al., (1999)	0,125% (v/v)
	0,8% (v/v)	Kalemba et Kunicka (2003)	
	1,6 $\mu\text{l}/\text{ml}$	Oussalah et al (2007)	
<i>Serratia marcescens</i>	0,25% (v/v)	Hammer et al., (1999)	Résistante
<i>S. aureus</i>	0,06% (v/v)	Hammer et al., (1999)	0,0625% (ATCC) (v/v)
	0,1% (v/v)	Inouye et al., (2001)	0,125% (v/v)
	0,3% (v/v)	Kalemba et Kunicka (2003)	0,0625% (v/v)
<i>C. albicans</i>	0,06% (v/v)	Hammer et al., (1999)	0,0625% (v/v)
	322 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Devkattet et al., (2005)	0,125% (v/v)

Le mode d'action des HE sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Burt, 2004**). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**Carson et al., 2002**). De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HE sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules. Les localisations ainsi que les sites d'action des composants des HE dans la cellule bactérienne sont indiqués dans la figure 18. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action. D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases (**Burt, 2004**) :

- attaque de la paroi bactérienne, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

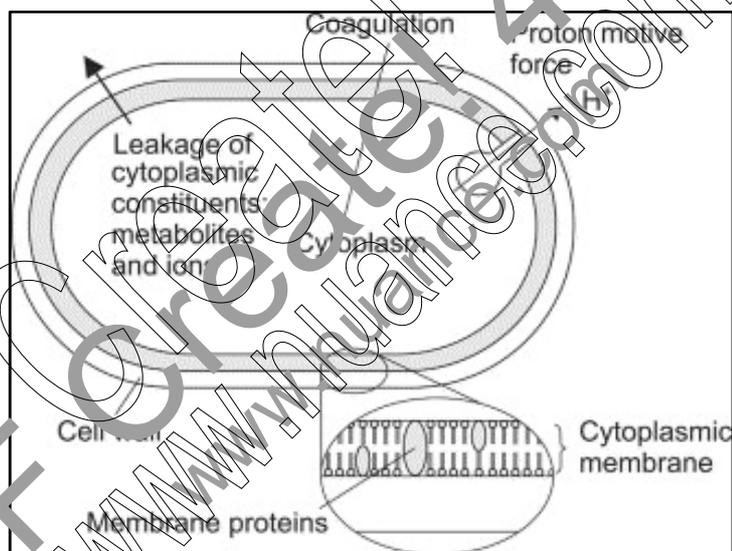


Figure 18 Mécanisme d'action des HE au niveau de la cellule microbienne. (**Burt, 2004**)

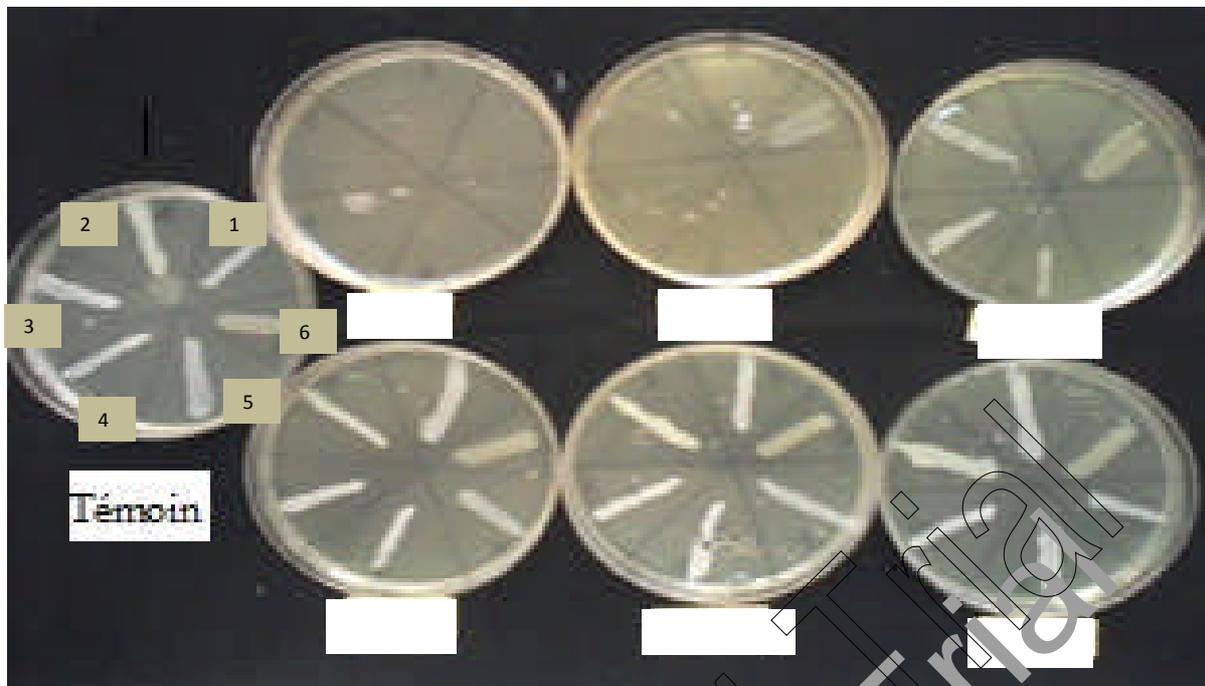


Figure 19 : Détermination des CMI pour les bactéries.(Original, 2013)

1 : *E. coli* (E2), 2 : *S. aureus* (Sa1), 3: *S. aureus* (Sa2), 4: *S. epidermidis*(Se1), 5: *S. epidermidis*(Se2), 6: *S. aureus* (Sa3), 7: *E. coli* (E2), 8: *Enterococcus sp*, 9: *P. mirabilis*, 10: *S. typhi*, 11 : *Morganella morganii*.

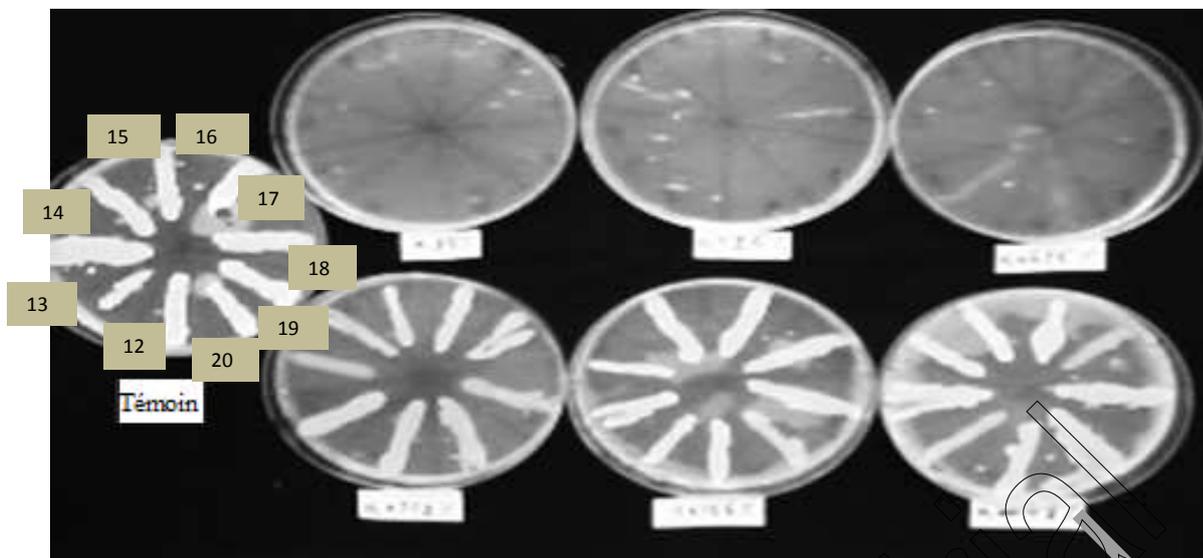


Figure 20 : Détermination des CMI pour les levures d'HE. (Ogino et al., 2013)

12 : *C. albicans* (Ca1), 13 : *C. albicans* (Ca3), 14 : *C. albicans* (Ca2), 15 : *C. albicans* (Ca4), 16 : *C. albicans* (Ca5), 17: *C. tropicalis* (Ct2), 18 : *C. tropicalis* (Ct1), 19 : *C. parapsilosis* (Cp1), 20 : *C. parapsilosis* (Cp2).

Conclusion et perspectives

Conclusion

En égard de l'importance, sans cesse croissante, des huiles aromatiques en phytothérapie anti-infectieuse, il nous a semblé nécessaire, voire primordial, de leur consacrer une étude complète pour asseoir leur activité antimicrobienne *in vitro*.

Cette étude se veut une approche méthodologique de l'activité antiseptique des huiles essentielles. Et comme plante à parfum, nous nous sommes focalisés sur la fraction aromatique de Citronnelle (*Cymbopogon citratus*). A cet effet, nous avons examiné plusieurs méthodes microbiologiques.

En phase liquide, l'essence de Citronnelle s'est avérée un fongicide puissant sur les souches mycéliennes, uni et pluricellulaire. Elle est aussi bactériostatique sur les bactéries à Gram+ mais sans effet sur les *Pseudomonas*.

En phase vapeur, de meilleurs résultats ont été obtenus notamment avec le genre *Staphylococcus*. Cette activité antimicrobienne est « dose-dépendante ». Ces résultats, très encourageants, nous amènent à recommander cette essence comme principe actif dans les formulations galéniques topique à visée antiseptiques.

L'autre méthode abordée était la dilution à partir de disques. Les résultats sont, par contre, peu reluisants mais démontrent que les champignons sont toujours les plus sensibles. Les mêmes remarques ont été notées pour la méthode de diffusion à partir des puits. Ceci pourrait être expliqué par la mauvaise diffusion des huiles lipophiles à travers un milieu gélosé hydrophile. Les solvants utilisés peuvent réduire l'action inhibitrice de cette huile.

Une seule méthode quantitative (dilution en milieu gélosé) a été abordée pour la détermination des CMI. Les levures semblaient être les plus sensibles avec des valeurs de CMI les plus basses. En somme, l'essence de Citronnelle peut être retenue parmi le groupe des huiles ayant une activité antifongique majeure.

A l'heure actuelle, aucun consensus ne peut être dégagé sur la méthode "Premium" de référence pour le screening des extraits aromatiques naturels.

La complémentarité entre ces méthodes est un fait avéré qu'aucun ne peut l'occulter. Le choix d'une méthode dépendra, en plus, des objectifs assignés. Si l'usage de l'essence sera par voie topique, l'aromatogramme sera donc indiqué. Si c'était l'effet thérapeutique par inhalation ou la désinfection atmosphérique qui sont recherchés, la microatmosphère pourra être recommandée. Si, par contre, l'usage de l'HE sera interne, la dilution en milieu gélosé sera préconisée. De même si l'HE présente un certain degré de toxicité à l'état pure, par conséquent, son application nécessite des dilutions préalables.

Comme perspectives et en continuité à ce travail, il serait intéressant d'aborder d'autres techniques microbiologiques. La microplaque, méthode récente, constitue une approche moderne et dont les résultats sont très précis.

Il serait temps de s'affranchir la barrière *in vitro* et de passer aux études *in vivo*, voire clinique. Tester les composés majoritaires des huiles isolement ou en synergie avec les antibiotiques, pourrait un autre créneau de recherche afin de réduire la surconsommation des produits chimiques. Le mode d'action des huiles au niveau cellulaire des germes microbiens a été rarement abordé. De même que la cinétique d'inhibition au cours de la croissance microbienne.

Un autre point, ô combien important, serait d'élargir la gamme des souches microbiennes à tester afin de mieux cerner la différence de sensibilité entre les Gram+ et Gram-. Inclure aussi des germes multi-résistants, responsables d'infections nosocomiales ou encore ceux des toxi-infections alimentaires pourrait présenter un intérêt industriel patent.

L'image positive que véhiculent les produits naturels est un acquis qui ne devra pas occulter l'aspect toxicologique. Naturel ne rime pas avec innocuité.

Finalement, l'objectif premier de ce travail a été atteint puisque nous avons mis en exergue l'importance de chaque technique antimicrobienne, ses avantages et inconvénients.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Abe, S., Sato, Y., Inoue, S., Ishibashi, H., Maruyama, N., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2002). Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Japanese journal of medical mycology*, 44(4), 285-291.
2. Abou Samra, C. (2003). Activité antiseptique d'huiles essentielles: exploitation de l'aromatogramme. *La phytothérapie européenne*, (16), 18-22.
3. Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426.
4. Ahn, Y. J., Park, S. J., Choi, D. H., Cho, H. C., & Hiremath, I. G. (1998). Growth-inhibitory responses of human intestinal bacteria to extracts from Indian and African plants. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 41.
5. Akhila, A. (Ed.). (2010). *Essential oil-bearing grasses: the genus Cymbopogon*. CRC Press.
6. Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168-4170.
7. Ali-Shtayeh, M. S., & Abu Ghdeib, S. I. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42(11-12), 665-672.
8. Baba Aïssa F. (2011). *Encyclopédie des plantes utiles : Plantes médicinales, Plantes aromatiques, Plantes alimentaire. Flore d'Algérie. (Méditerranéenne, maghrébine et sahariennes)*. Editions el Maarifa, 471p.
9. Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(3), 327-336.
10. Barbosa, L. C. A., Pereira, U. A., Martinazzo, A. P., Maltha, C. R. Á., Teixeira, R. R., & Melo, E. D. C. (2008). Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf samples. *Molecules*, 13 (8), 1864-1874.
11. Bard, M., Leuchli, M. R., Gupta, N., Guynn, C. J., & Stillwell, W. (1988). Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids*, 23(6), 534-538.
12. Baudou F. (2009). *Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale*. Fernand Lanore.
13. Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2010). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press.
14. Basli, A., Chibane, M., Madani, K., & Oukil, N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.
15. Bautista-Baños, S., Ramos-García, M. D. L., Hernández-López, M., Córdova-Albores, L., López-Mora, L. I., Gutiérrez-Martínez, P., & Sánchez-Domínguez, D. (2012). Use of scanning and transmission electron microscopy to identify morphological and cellular damage on phytopathogenic fungi due to natural products application.

16. Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ayadi, A., & Ihlal, M. (1984). Method to study antimicrobial effects of essential oils: application to the antifungal activity of six Moroccan essences. *Journal of Food protection*, 47(10), 748-752.
17. Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ismaili-Alaoui, M., & Ayadi, A. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 20(2), 155-67.
18. Blackwell, R., & Smith, M. (1995). Aromatograms. *International Journal of Aromatherapy*, 7(1), 22-27.
19. Blanco, M. M., Costa, C. A. R. A., Freire, A. O., Santos Jr, J. G., & Costa, M. (2009). Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine*, 16(2), 265-270.
20. Boorn, K. L., Khor, Y. Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T. A., & Hammer, K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigonacarbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 1534-1543.
21. 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. *Journal de Pharmacie Clinique*, 31(3), 141-148.
22. Boukhatem, M. N., Saidi, F., Hamaidi, M. S., Hakim, Y., & Tekarnia, M. (2011). Culture et exploitation industrielle du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) en Algérie: état des lieux et perspectives. *Phytothérapie*, 9(5), 304-309.
23. Boukhatem, M. N., Kameli, A., & Saidi, F. (2013a). Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. *Food Control*, 34(1), 208-213.
24. Boukhatem, M.N., Kameli, A., Melarnia, M., Saidi, F., Tayebi, K. (2013b). Antimicrobial activity of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: Disc diffusion versus Vapour diffusion methods. 6^{ème} Journée Nationale sur l'Hygiène Hospitalière et les Infections Nosocomiales, Hôpital Bologhine, Alger, Algérie.
25. Boullard, B. (2011). *Plantes médicinales du monde: croyances et réalités*. De Boeck Secundair.
26. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
27. Cardan, F., Chau, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2), 215-220.
28. Carmo, E. S., Lima, E. D. O., & Souza, E. L. D. (2008). The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 362-367.
29. Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (1994). Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82(332), 181-185.
30. Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.

31. Cavalcanti, E. S. B., Morais, S. M. D., Lima, M. A. A., & Santana, E. W. P. (2004). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5), 541-544.
32. Celimene, C. C., Micales, J. A., Ferge, L., & Young, R. A. (1999). Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung*, 53(5), 491-497.
33. Chalchat, J. C., Garry, R. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., & Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 9(1), 67-75.
34. Chami, F. (2005). Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo: Application dans la prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de Doctorat.
35. Cheng, S. S., Lin, C. Y., Gu, H. J., & Chang, S. T. (2011). Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from *Cunninghamia acconishii*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 31(3), 204-217.
36. Chiasson, H., & Beloin, N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides" Nouveau genre. *Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec*, 14(1), 3-6.
37. Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., ... & Vlietinck, A. J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 213-220.
38. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
39. Cox, S. D., Gustafson, J. E., Martin, C. M., Markham, J. L., Liew, Y. C., Hartland, R. P., Wyllie, S. G. (1998). Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26(5), 355-358.
40. Cox, S. D., Martin, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175.
41. Cox, S. D., Martin, C. M., Markham, J. L., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2001). Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*, 6(2), 87-91.
42. Cuenca-Estrella, M., Lee-Yang, W., Ciblak, M. A., Arthington-Skaggs, B. A., Mellado, E., Warnock, D. W., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2002). Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3644-3647.
43. Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104-111.
44. De Billerbeck, G. (2000). Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur *Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase

- vapeur. Thèse de Doctorat, Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.
45. De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 9-17.
 46. De Billerbeck, V. G. (2002). Essais d'utilisation d'huiles essentielles en traitement de l'air. Les contaminants biologiques des biens culturels, 2, 345.
 47. De Billerbeck, V. G., Roques, C., Vanière, P., & Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiène*, 10(3), 248-251.
 48. De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
 49. Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn var. *Radiata*. *Food Control*, 19(4), 346-352.
 50. Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 101-109.
 51. Delespaul, Q., de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Michel, G., Marquier-Viñuales, C., & Bessière, J. M. (2000). The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 256-266.
 52. Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3818-3824.
 53. Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107-115.
 54. Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
 55. Druil, F. (2007). Extraction et analyse de l'huile essentielle de cumin formulation d'une pommade décongestionnante. Mémoire de Magister en Génie civile Université de Boumerdès, Algérie.
 56. Druilles, J., Chantefort, A., & Huet, M. (1995). La désinfection chimique de l'air: mythe ou réalité? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 15(8), 421-429.
 57. Ebrahimabadi, A. H., Ebrahimabadi, E. H., Djafari-Bidgoli, Z., Kashi, F. J., Mazoochi, A., & Batooli, H. (2010). Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chemistry*, 119(2), 452-458.
 58. Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
 59. Edwards-Jones, V., Buck, R., Shawcross, S. G., Dawson, M. M., & Dunn, K. (2004). The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*, 30(8), 772-777.

60. El-Kamali, H. H., Ahmed, A. H., Mohammed, A. S., Yahia, A. A. M., El-Tayeb, I. H., & Ali, A. A. (1998). Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. *Fitoterapia*, 69(1), 77-78.
61. Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *PlantaMedica*, 64(08), 711-713.
62. Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Laleye, A., Gbenou, J. D., Darboux, R., & Moudachirou, M. (2008). Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2493-2497.
63. Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213-226.
64. Fiori, A. C. G., Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Vida, J. B., Scapim, C. A., Cruz, M. E. S., & Pascholati, S. F. (2000). Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymellabryoniae*. *Journal of Phytopathology*, 148(7-8), 485-487.
65. Fleurette, J., Freney, J., & Reverdy, M. E. (1995). *Antiseptie et désinfection*, éditions ESKA.
66. Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Amaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Resarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), 898-904.
67. Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119(2), 731-737.
68. Gilly, G. (1997). *Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché*. Editions L'Harmattan.
69. Giordani, R., & Kaloustian, J. (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytothérapie*, 4(3), 121-124.
70. Girard, P., Reverdy, M. E., Maatra, A., & Fleurette, J. (1989). Détermination de la concentration minimale bactéricide de trois antiseptiques et un désinfectant sur 580 souches de bacilles à Gram négatif d'origine hospitalière. *Pathologie Biologique*, 37, 605-11.
71. Goeb, P. (1995). La diffusion atmosphérique d'huiles essentielles : bien-être olfactif, purification de l'air et bienfaits thérapeutiques. *Infections Dent*. 41, 3371-3374.
72. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). Introduction à la phytothérapie anti-infectieuse. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 3-14). Springer Paris.
73. Goni, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
74. Grare, M., Fontanay, S., Cornil, C., Finance, C., & Duval, R. E. (2008). Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How?. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 156-159.
75. Griffin, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (2000). An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 249-255.
76. Grosjean N. (2007). *L'aromathérapie tout simplement*. Editions eyrolles, Belgique. pp 53, 54, 55.

77. Guedj, R. (1983). Contribution à l'étude de l'aromathérapie anti-infectieuse: l'aromatogramme et les préparations officinales aromatiques. Thèse de Doctorat.
78. Guinoiseau, E. (2010a). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, Université de Corse, France.
79. Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P. G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., & Berti, L. (2010b). Cellular effects induced by *Inulagraveolens* and *Santolinacorsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(7), 873-879.
80. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26(2), 142-150.
81. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1998). *In-vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(5), 591-595.
82. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
83. Hili, P., Evans, C. S., & Veness, R. G. (1997). Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethyl sulfoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, 24(4), 269-275.
84. Höferl, M., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Schmidt, E., Stoyanova, A., Denkova, Z., & Geissler, M. (2009). Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 21(5), 459-463.
85. Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827-1836.
86. Ibrahim, D. (1992). Antimicrobial activity of the essential oil of the local serai, *Cymbopogon citratus*. *Journal of Bioscience*, 31(2), 87-90.
87. Il Idrissi, A., Pellakhdar, J., Caniguel, S., Iglesias, J., & Vila, R. (1993). Composition de l'huile essentielle de la citronnelle (*Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF) acclimatée au Maroc. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 26(4), 274-277.
88. Inouye, S. (2003). Laboratory evaluation of gaseous essential oils (part 1). *International Journal of Aromatherapy*, 13(2), 95-107.
89. Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 47(5), 565-573.
90. Inouye, S., Abe, S., Yamaguchi, H., & Asakura, M. (2003). Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *International Journal of Aromatherapy*, 13(1), 33-41.
91. Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Moulard, F., de La Roque, R., de La Roque, O., & Botrel, A. *Encyclopédie des Plantes Médicinales*, 2ème édition, 2001.
92. Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., & Svendsen, A. B. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *PlantaMedica*, 53(05), 395-398.

93. Joarder, G. J., & Khatun, M. (1982). Inhibitory effects of lemon grass oil on indigenous microflora. Part 1-Inhibition of *Aspergillus niger*. Bangladesh Journal of Science and Industry Research, 17, 219-226.
94. Joseph, B., & Priya, R. M. (2010). In vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf essential oil and extracts using agar well diffusion method.
95. Kanko, C., Sawaliho, B. E. H., Kone, S., Koukoua, G., & N'Guessan, Y. T. (2004). Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. Comptes Rendus Chimie, 7(10), 1039-1042.
96. Khanuja, S. P., Shasany, A. K., Pawar, A., Lal, R. K., Darokar, M. P., Naqvi, A. A., & Kumar, S. (2005). Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng.* (Poaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 33(2), 171-186.
97. Khebri, S., Chelgham, I., Dridi, S., & Athamena, S. (2012). L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology, 22(1), 116.
98. Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. I. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(11), 2839-2845.
99. Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of Microbiological Methods, 81(2), 121-126.
100. Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. Journal of Essential Oil Research, 1(3), 119-128.
101. Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenoué Y., Millet J., Chaumont J.P. (2004). Activité antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. Annales de Médecine Vétérinaire, 148, 202-206.
102. Koba, K., Sanda, K., Guyon, C., Raynaud, C., Chaumont, J. P., & Nicod, L. (2008). In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. Bangladesh Journal of Pharmacology, 31, 27-34.
103. Koh, H. L. (2009). A Guide to Medicinal Plants: An Illustrated Scientific and Medicinal Approach. World Scientific.
104. Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? Letters in Applied Microbiology, 54(3), 169-174.
105. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91(3), 453-462.
106. Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Flavour and Fragrance Journal, 27(1), 13-39.
107. Lawrence, B. M. (2005). Antimicrobial/biological activity of essential oils. Allured Publishing Corporation.
108. Le Minor, L., & Véron, M. (Eds.). (1982). Bactériologie médicale. Flammarion médecine-sciences.
109. Lee, Y. S., Kim, J., Shin, S. C., Lee, S. G., & Park, I. K. (2008). Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. Flavour and Fragrance Journal, 23(1), 23-28.

110. Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2005). Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939-6946.
111. Makhloufi, A. (2013). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricariapubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de Doctorat.
112. Mann, C. M., & Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84(4), 538-544.
113. Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M. J., & Barel, A. O. (1998). Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3), 368-376.
114. Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004). Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium tirium*. *Microbiological Research*, 159(3), 295-304.
115. Matasyoh, J. C., Wagara, I. N., Nakavuma, J. L., & Kiburai, A. M. (2011). Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *African Journal of Food Science*, 5(3), 138-142.
116. McVicar, J. (2006). *Le grand livre des herbes: jardin, santé, cuisine, maison*. Editions de Borée.
117. Meincken, M., Holroyd, D. L., & Rautenbach, M. (2005). Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), 4085-4092.
118. Mishra, A. K., & Dubey, N. K. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1101-1105.
119. Mohammadi, Z., & Atik, F. (2012). Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. Revue «Nature & Technologie». n, 35.
120. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. In: **Approved standard M7-A5**. Fourth Edition. Villanova, Pa: NCCLS; 2000;
121. Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
122. Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20(2), 157-160.
123. Nikaido H. (1996). Outer membrane. In: F. C. Neidhardt, (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (Vol. 1, pp. 29-47). Washington, DC: ASM Press
124. Nychas, G. J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In *New methods of food preservation* (pp. 58-89). Springer US.

125. Ogunlana, E. O., Höglund, S., Onawunmi, G., & Sköld, O. (1987). Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. *Microbios*, 50(202), 43.
126. Onawunmi, G. O., & Ogunlana, E. O. (1986). A study of the antibacterial activity of the essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). *Pharmaceutical Biology*, 24(2), 64-68.
127. Onawunmi, G. O., Yisak, W. A., & Ogunlana, E. O. (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology*, 12(3), 279-286.
128. Onawunmi, G. O. (1988). In vitro studies on the antibacterial activity of phenoxyethanol in combination with lemon grass oil. *Die Pharmazie*, 43(1), 42.
129. Opalchenova, G., & Obreshkova, D. (2003). Comparative studies on the activity of basil—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.—against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological methods*, 54(1), 105-110.
130. Ouraïni, D., Agoumi, A., Ismaïli-Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y., Alaoui, M. A., & Belabbas, M. A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*, 5(1), 6-14.
131. Oussou, K. R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Desso, M., N'Guessan, Y. T., & Koukoua, G. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10), 1081-1086.
132. Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2720-2722.
133. Paranagama, P. A., Abeysekera, K. J. T., Abeywickrama, K., & Nugaliyadde, L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 86-90.
134. Pattnaik, S., Chhabra, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89(358), 39-46.
135. Pfäfer, M. A., Messer, S. A., & Coffmann, S. (1995). Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1094-1097.
136. Pibiri, M. C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Federal Polytechnic Institute, Lausanne, Suisse (infoscience. epfl.ch: thesis-3311).
137. Pibiri, M. C., Goel, A., Vahekeni, N., & Roulet, C. A. (2006). Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 16(3), 149-153.
138. Pietrella, D., Angiolella, L., Vavala, E., Rachini, A., Mondello, F., Ragno, R., & Vecchiarelli, A. (2011). Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC complementary and alternative medicine*, 11(1), 18.

139. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
140. Pousset, J. L. (2004). *Plantes médicinales d'Afrique: comment les reconnaître et les utiliser*. Secum/Edisud.
141. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39.
142. Rai, M. K., & Mares, D. (Eds.). (2003). *Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects*. Psychology Press.
143. Rasooli, I., & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15(6), 479-483.
144. Regnier, T., du Plooy, W., Combrinck, S., & Botha, B. (2008). Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 48(2), 254-258.
145. Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., & Tantaoui-Elaraki, A. (1993a). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of essential oil research*, 5(2), 179-184.
146. Remmal, A., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., & Ettayebi, M. (1993b). Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 48(5), 352.
147. Rhayour, K. (2002). *Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Escherichia coli, Bacillus subtilis et sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat.
148. Salle JL. (1991). Le totum en phytothérapie: Approche de phyto-biothérapie. Edition Frison- Roche, Paris, pp: 12-35.
149. Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., & Talbi, M. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 146, 85-89.
150. Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344.
151. Sirgen, C., Maruya, S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. (2006). Chemical constituents, antifungal and antioxidant potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, 17(9), 745-752.
152. Skaltsa, H. D., Demetzos, C., Lazari, D., & Sokovic, M. (2003). Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 64(3), 743-752.
153. Solórzano-Santos, F., & Miranda-Navales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136-141.
154. Sookhee S., Krisanaprakornkij S., Chatmahamongkol W., Muttarak W., Wattanarat C., Somjitra P., Manosroi J., Manosroi A. (2003). Anticandidal activity of 18 essential oils extracted from Thai medicinal plants. p.449. In Programme and Abstract, the 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III) 3-7 February 2003 Chiang Mai, Thailand.

155. Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., & Trajano, V. N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18(5), 409-413.
156. Soyulu, E. M., Tok, F. M., Soyulu, S., Kaya, A. D., & Evrendilek, G. A. (2005). Antifungal activities of the essential oils on post-harvest disease agent *Penicillium digitatum*. *Pakistan Journal of Biological Science*, 8, 25-29.
157. Sridhar, S. R., Rajagopal, R. V., Rajavel, R., Masilamani, S., & Narasimhan, S. (2003). Antifungal activity of some essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7596-7599.
158. Su, H. J., Chao, C. J., Chang, H. Y., & Wu, P. C. (2007). The effects of evaporating essential oils on indoor air quality. *Atmospheric Environment*, 41(6), 1230-1236.
159. Sultanbawa, Y., Cusack, A., Currie, M., & Davis, C. (2009). An innovative microplate assay to facilitate the detection of antimicrobial activity in plant extracts. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 17(4), 519-534.
160. Sun Og Lee, Gyung Ja Choi, Kyoung Soo Jang, He Kyoung Lim, Kwang Yun Cho and Jin-Cheol Kim. (2007). Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soil borne. Plant Pathogenic Fungi. *Plant Pathology Journal*. 23(2): 97-102.
161. Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3197-3207.
162. Syed, M., Khalid, M. R., & Chaudhary, F. M. (1990). Essential oils of Gramineae family having antibacterial activity. Part-1. (*Cymbopogon citratus*, *C. martinii* and *C. jawarancusa* oils). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 3(1), 1-5.
163. Tavares, A. C., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. R. (2008). Essential oil of *Daucus scotia* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 129-134.
164. Tchoumoungang, F., Dongmo, P. M. J., Sameza, M. L., Mbanjo, E. G. N., Fotso, G. B. T., Zollo, P. A., & Menut, C. (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnologie Agronomie Société Environnement*, 15(1), 77-84.
165. Tennstedt, D. (2004). *Peau et moustiques*. Progrès en dermato-allergologie: Lille 2004, 10, 91.
166. Terzi, B., Dancera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333-340.
167. Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles*. Tec et Doc.
168. Thomsen, P. S., Jensen, T. M., Hammer, K. A., Carson, C. F., Mølgaard, P., & Riley, T. V. (2011). Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17(9), 835-841.
169. Thormar H. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. J. Wiley, 2011.
170. Tisserand, R., & Balacs, T. (1995). *Essential oil safety: a guide for health care professionals* (Vol. 12). London: Churchill Livingstone.

171. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 65.
172. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.
173. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2012). Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 169-177.
174. Valero, M., & Salmeron, M. C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1), 73-81.
175. Valnet, J., Ch, D., & Duraffourd, P. (1978). L'Aromatogramme, nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 12.
176. Vendeville, F., Loisel, M., & Guide, M. (1991). Intérêt d'une technique d'aromatogramme en phase liquide interprétable en quatre heures. *Phytotherapy*, (36-37), 20-24.
177. Viljoen, A., van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Başar, H., & van Wyk, B. E. (2003). *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2), 137-143.
178. Wan J, Wilcock A, Coventry MJ (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonashydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology* 84: 152-8
179. Wang, S. Y., Chen, P. F., & Chang, S. T. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum csmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 96(7), 813-815.
180. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, P. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-175.
181. Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, C., & Cavanagh, H. M. (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 76-81.
182. Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. (2005). Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytotherapy Research*, 19(7), 643-646.
183. Worwood, V. A. (2012). *The complete book of essential oils and aromatherapy: over 600 natural, non-toxic & fragrant recipes to create health beauty a safe home environment*. New world library.
184. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
185. Zambonelli, A., d'Aulerio, A. Z., Bianchi, A., & Albasini, A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Phytopathology*, 144(9-10), 491-494.
186. Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). *Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique*. Luxembourg: Édition Inspir Development.

Annexes

Annexe 1

Appareillage, Verrerie et Milieux de culture

Appareillage	Verrerie	Milieu de culture et réactifs
<ul style="list-style-type: none">- Agitateur- Balance de précision- Chauffe ballon- Etuve bactériologique (25°C, 35°C)- Incubateur- Portoir de tubes à essai	<ul style="list-style-type: none">- Anse de platine- Bec bunsen- Flacons- Disques d'imbibé l'HE de 9 mm, 15 mm, 20 mm- Boites de Pétri stériles- Pipettes Pasteurs- Burette 20 ml- Fiole	<ul style="list-style-type: none">- Gélose Sabouraud + Chloramphénicol- Milieu de culture Muller-Hinton- Éthanol- Eau de javel- Eau distillée- Solution physiologique- Myristade d'isopropyle- Tween- DMSO- Ecouvillons

Annexe 2

Appareillage d'entrainement à la vapeur à échelle industrielle

(Sarl Extral-Bio, Chiffa, Blida)

