

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de Fin d'Etudes En vue de l'obtention du diplôme de
Master en Sciences Biologiques
Option : **Génie Biologique**

THEME

Essence Aromatique de Citronnelle (*Cymbopogon citratus*) :
Potentiels Applications comme
Conservateur Nutraceutique

Présenté le : 21 /09/2017

Par :

GUICI EL KOUACHEUR Khadidja & BOUCETTA Fatima

Devant le jury :

Mme KEBBAS S.	MC-B	Université Blida 1	Présidente
Mme SAIDI F.	Professeur	Université Blida 1	Examinatrice
M. BOUKHATEM M.N.	MC-A	Université Blida 1	Promoteur

∞ Année Universitaire : 2016-2017 ∞

Remerciement

Nous adressons nos sincères remerciements:

A Madame « Kebbas S. », MC-B au département de Biologie et physiologie cellulaire, de l'université Blida 1, pour avoir accepté de présider le jury. Sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, nous vous prie de croire en notre éternel respect et notre sincère gratitude.

A Madame « Saidi F. », Professeur à la faculté des sciences de nature et de vie de l'université Blida 1, pour nous avoir honoré d'examiner ce travail, nous vous sommes très reconnaissantes de votre présence, et nous vous adressons nos vifs remerciements.

A Monsieur, « Boukhatem MN » MC-A au département de Biologie et physiologie cellulaire, de l'université de Blida 1, pour avoir encadré ce travail, un grand merci pour la gentillesse, la sympathie, la disponibilité et la patience que vous avez manifestées à notre égard tout au long de la réalisation de ce travail. Nous vous prie de croire en notre éternel respect et notre sincère gratitude.

Ainsi qu'à tous ceux et celles qui ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail :

Monsieur « Chader », MC-A au département de pharmacie de l'université Alger 1 et le chef du service de l'unité pharmacotoxicologie du LNCPP -Alger

Professeur Oudjida du laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Beni Messous, pour la lecture et l'interprétation des coupes histologiques

Madame Mekaoui N. chef service du laboratoire de la chimie analytique CRD-el Harrach-

Madame Nait Tahar I. du service bactériologie du Chu Fabour -Blida

Mr Latlout chef du service du laboratoire d'hygiène de l'EPSP- Tipaza

Aussi Mr Teffahi Djamel du laboratoire d'hygiène de l'EPSP -Blida

Veillez trouver l'expression de notre sincère gratitude et nos

Très vifs remerciement

Merci a tous

Dédicace *

A mes très chers parents

*Aucun mot, aucune dédicace ne peut exprimer mon respect, ma considération et l'amour éternel
pour mon instruction et mon bien être*

*Trouvez en ce travail le fruit de votre dévouement, de votre patience et l'expression de ma
gratitude et mon profond amour*

A toi mon papa et à toi ma mère et sachez que je suis très reconnaissante

A ma très chère sœur et mes frères surtout mon frère et mon meilleur ami « Sid Ahmed »

*Vous m'avez beaucoup soutenu dans mon cursus je vous souhaite une vie pleine de bonheur et
de réussite*

A mes deux neveux Younes et Achref et ma très chère nièce « Nada »

A toute ma famille

A toutes mes amies

A ma chère voisine et binôme « Fatima »

Et à ma meilleure amie « Kouche Aicha » et son binôme fatma

A tous c qui me aidé de près ou de loin

Je dédie ce travail avec hommage

Khadija[^]

Je dédie ce mémoire:

*A mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celle qui s'est toujours sacrifiée pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi
ma mère.*

A mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes frères et mes sœurs, mes nièces et mes neveux, je dédie ce modeste travail à mes chères amies Aicha et Fatma et mes collègues de l'Université de SAAD DAHLEB de Blida
A ma chère binôme Khadidja et toute sa famille « GUICI EL KOUACHEUR ».*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Fatima

RESUME

L'objectif de cette étude consiste à évaluer le pouvoir antimicrobien, anti-inflammatoire et cicatrisant d'une plante à parfum, *Cymbopogon citratus*, pour une éventuelle utilisation en aromathérapie anti-infectieuse et/ou comme ingrédient nutraceutique.

Le profil chromatographique de l'huile essentielle (HE) est caractérisé par la présence de 14 constituants. Le géraniol est le composé majoritaire avec un taux de 28,9%, suivi par le néral (24,3%) et le myrcène (23,9%).

Le pouvoir antimicrobien de l'HE a été évalué par différentes approches méthodologiques. En phase liquide, l'essence a révélé une activité inhibitrice remarquable sur la croissance de toutes les souches étudiées avec des diamètres des zones d'inhibition (DZI) variant entre 45 et 85 mm pour *Acinetobacter baumannii*. Les staphylocoques pathogènes ont été inhibés totalement. Cette huile est douée aussi d'un pouvoir fongicide à forte dose car toutes les souches testées ont été inhibées. En phase vapeur, de meilleurs résultats ont été obtenus notamment pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ainsi que toutes les espèces fongiques testées où une inhibition totale a été notée à forte concentration. De plus, cette action inhibitrice est « dose-dépendante ». La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a permis de confirmer la sensibilité des levures à l'action inhibitrice de l'huile avec des valeurs de CMI les plus faibles (entre 0.625% et 0.007%). L'HE est douée aussi d'un pouvoir inhibiteur de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* dans une matrice alimentaire (boisson Orangina), seule ou en combinaison avec un traitement thermique.

Sur le plan pharmacologique, l'administration topique de l'HE (82 mg/kg) a permis de réduire l'œdème inflammatoire induit par le xylène avec un taux de 54%. Cette activité a été confirmée, à l'échelle cellulaire, par une étude histopathologique. L'essence, incorporée dans une crème dermique, a prouvé son efficacité dans le processus de cicatrisation des plaies circulaires (test d'exicision à J-14) avec un taux de rétraction des plaies de 92.2%, supérieur à celui du Madécassol® (89.2%) et du contrôle négatif (71.4%).

En définitive, le screening pharmacologique de l'essence de citronnelle a été concluant. D'autres études approfondies, en particulier l'aspect toxicologique, seront nécessaires afin d'estimer la balance bénéfice-risque.

Mots-clés: *Cymbopogon citratus* ; Huile essentielle ; Fongicide ; Citral ; Anti-inflammatoire ; Crème cicatrisante.

ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the antimicrobial, anti-inflammatory and wound-healing properties of an Algerian medicinal plant, *Cymbopogon citratus*, for a future use as bioactive component in aromatherapy and/or as a nutraceutical ingredient.

The chromatographic profile of the *C. citratus* essential oil (CCEO) is characterized by the presence of 14 constituents. Gernial is the major compound with a rate of 28.9%, followed by neral (24.3%) and myrcene (23.9%).

The antimicrobial activity of CCEO has been evaluated by several methods. In the liquid phase, CCEO exhibited a promising inhibitory activity against the growth of all bacterial strains with diameters of the zones of inhibition zone (DIZ) varying from 45 to 85 mm for *Acinetobacter baumannii*. Further, pathogenic staphylococci strains have been completely inhibited. The CCEO possess a huge antifungal action at a high dose because all fungal strains tested have been inhibited. In the vapor phase, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and all fungal species tested were inhibited totally at high concentration. In addition, this inhibitory action is "dose-dependent". The determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) confirmed the sensitivity of yeast species to CCEO with the lowest MIC values (between 0.625% and 0.007%). Else, the potential use of CCEO as a natural food preservative in a real food system (Orangina juice) has been confirmed, alone or in combination with thermal treatment.

Topical administration of the CCEO (82 mg/kg) reduced the ear inflammatory edema induced by xylen with a rate of 54%. This activity is confirmed by histopathology analysis. CCEO has been incorporated into a dermal cream to assess its wound-healing effect *in vivo*. The results proved the ability of CCEO in the reduction of circular wound healing area (at D-14) with a retraction rate of 92.2%, which has been found higher than Madecassol® (89.2%) and negative control (71.4%).

Finally, our findings suggest the effectiveness use of CCEO in the treatment-management of inflammation, human infection and to control food-spoilage micro-organisms. Further studies will be needed to assess the cytotoxicity of this oil in the future.

Keywords: *Cymbopogon citraus*; Essential oil; Fungal effect; Citral; Anti-inflammatory; Wound-healing cream.

الملخص

ان الهدف من هذه الدراسة تقييم الخصائص المضادة للجراثيم؛ المضادة للالتهاب والتئام الجروح لنبتة عطرية تدعى Cymbopogon حشيشة وهذا لاحتمال استعمالها مستقبلا كمكون نشط بيولوجيا في مجال التداوي بالاعشاب العطرية او كمقدار *citratus/Nutraceutique* اثبتت نتائج الصورة الكروماتوغرافية الغازية تواجد 13 مكونا بحيث ان العنصر الرئيسي هو *laineréG* بنسبة 28.9% يليه *laréN* بنسبة 24.3% و *enècryM* (28.9%).

وقد تم تقييم نشاط خصائصها المضادة للميكروبات بطرق متعددة؛ اظهرت نتائج المرحلة السائلة *emmarginamorA* فعالية هاته الزيت العطرية ضد نمو جميع السلالات البكتيرية با قطار التثبيط *IZD* تتراوح ما بين 45 و 85 ملم بالنسبة *baumanni* لسلالة *retcabotenicA*

اما بالنسبة لسلالات المكورات العنقودية المسببة للأمراض فقد تم تثبيطها كليا. كما انها فعالة أكثر على الفطريات وخاصة عند استخدامها بجرعة عالية. وقد تم تسجيل أفضل النتائج في المرحلة الغازية مع *SuccocolyhpatS*, *illoc.E*, بالإضافة الى السلالات الفطرية التي اثبتت تماما اثناء استعمال جرعة عالية من زيت حشيشة النحل؛ كما ان الجرعة المعطاة لها تأثير على فعالية هاته الزيت؛ فكلما كانت جرعتها كبيرة كانت فعالة أكثر. هذا و اكدت نتائج التراكيز المثبطة الدنيا *IMC* تاثر وحساسية الخمائر حيث قيمتها تتراوح (بين 0.625% و 0.007%). عدا ذلك؛ قد تم تأكيد امكانية استخدام زيت حشيشة النحل كمادة حافظة في المواد الغذائية (عصير أورانجينا) وحدها أو بالاشتراك مع المعالجة الحرارية. اثبت الاستخدام الموضعي للزيت قدرته في خفض مستوى التهاب الاذن بمعدل 54% المقفل ب *enélyX*؛ وتم تأكيد هذه النسبة

بواسطة نتائج دراسة التحليل المرضي لانسجة الاذن. كما تم ادراجها كعنصر فعال في تركيب مرهم جلدي وهذا بهدف تقييم تأثيرها في تطهير والتئام الجروح حيث اكدت فعاليتها بنسبة 92.2% أعلى من ماديكاسول® (89.2%) والسواغات (71.4%).

وأخيرا، تشير نتائجنا إلى فعالية استخدام في علاج الالتهابات او كمضاد للعدوى؛ في انتظار إجراء المزيد من الدراسات لتقييم السمية الخلوية لهذا الزيت مستقبلا.

الكلمات المفتاحية: زيت حشيشة النحل؛ زيت عطري؛ قاتل للفطريات. *artiC1*. المضادة للالتهابات. كريم شفاء الجروح.

Liste des Tableaux

Tableau I. Espèces bactériennes utilisées lors du screening antibactérien <i>in vitro</i> .	10
Tableau II. Espèces mycéliennes utilisées lors du screening antifongique <i>in vitro</i> .	10
Tableau III. Composition de la crème dermique à base d'huile essentielle de citronnelle.	18
Tableau IV. Composition chimique de l'huile de citronnelle (<i>Cymbopogon citratus</i>).	21
Tableau V. Activité antimicrobienne de l'essence de citronnelle par différentes méthodes.	23
Tableau VI. Activité antifongique de l'essence <i>in vitro</i> par différentes méthodes.	25
Tableau VII. Concentrations Minimales Inhibitrices pour différentes souches microbiennes.	32
Tableau VIII. Résultats des concentrations minimales inhibitrices de citronnelle.	34
Tableau IX. Résultats de l'activité anti-inflammatoire aigue <i>in vivo</i> .	37
Tableau X. Activité anti-inflammatoire topique mesurée par la réduction de l'œdème.	40

Liste des Figures

Figure 1. Citronnelle (<i>Cymbopogon citratus</i>) = Aspects morphologique et botanique	4
Figure 2. Champs de culture de citronnelle appartenant à la société « Extral-Bio ».	8
Figure 3. Pouvoir antimicrobien par diffusion en milieu solide.	12
Figure 4. Pouvoir antimicrobien de l'huile déterminé par diffusion en phase vapeur.	13
Figure 5. Illustration de la filtration sur membrane pour l'analyse microbiologique.	15
Figure 6. Excision circulaire du lombeau dermique au niveau de la région dorso-cervicale.	19
Figure 7. Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence.	22
Figure 8. Diamètre des zones d'inhibition (Aromatogramme) sur quelques espèces.	26
Figure 9. Action antimicrobienne « dose-dépendante » de l'essence de citronnelle <i>in vitro</i> .	28
Figure 10. Zone d'inhibition (microatmosphère) de deux espèces bactériennes.	29
Figure 11. Etude comparative : Aromatogramme vs Microatmosphère vs AntibioGramme.	31
Figure 12. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par macrodilution.	33
Figure 13. Cinétique de la croissance fongique dans une matrice alimentaire.	35
Figure 14. Résultats comparatifs de la cinétique d'inhibition de <i>S. cerevisiae</i> par filtration.	36
Figure 15. Pouvoir anti-inflammatoire par la mesure de différence de poids des pattes.	38
Figure 16. Mesure de l'inflammation topique par la différence de poids des oreilles.	40
Figure 17. Coupes histopathologiques au niveau des oreilles des souris.	44
Figure 18. Cinétique de la cicatrisation des plaies circulaires pour différents traitements.	45
Figure 19. Suivi de la cicatrisation des plaies cutanées pour différents lots.	46
Figure 20. Cinétique du taux de rétraction des plaies pour différents traitements.	47
Figure 21. Observation microscopique des coupes histopathologiques (Hématoxyline-Eosine) au niveau de la peau des rats à différents temps du processus de cicatrisation.	49

Liste des Abréviations

®	Marque enregistrée
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AIS	Anti-Inflammatoire Stéroïdien
AMX	Amoxicilline
ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Collection Culture
CG-SM	Chromatographie gazeuse- Spectrométrie de masse
CH	Centre Hospitalo-Universitaire
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CN	Gentamicine
COX	Cyclo-Oxygénase
DMSO	Diméthyl Sulfoxide
DPP	Différence du Poids des Pattes
DZI	Diamètre de la Zone d'Inhibition
ECBU	Examen Cytobactériologique des urines
EM	Ecart-Moyen
EPH	Etablissement Public Hospitalier
EPSP	Etablissement de Proximité de la Santé Publique
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
HE	Huile Essentielle
H-E	Hématoxyline-Eosine
HEX	Héxomidine
IK	Indices de Kovats
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
LOX	Lipo-Oxygénase
MH	gélose Mueller-Hinton
NA	Acide Nalidixique
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NMRI	Naval Medical Research Institute
OD	Oreille Droite
OFX	Ofloxacin
OG	Oreille Gauche
ONAB	Office Nationale de l'Alimentation du Bétail
PAM	Plante Aromatique et Médicinale
PNN	Polynucléaires Neutrophiles
PPD	Patte Postérieure Droite
PPG	Patte Postérieure Gauche
SAB	Sabouraud chloramphénicol
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la Méricilline
SIN202	Sorbate de potassium
SIN211	Benzoate de sodium
TE	Tétracycline
TR	Temps de Rétention
UFC	Unité Formant Colonie

Table des Matières

Résumé

Abstract

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction 1

Chapitre 1. Généralités sur la Plante Étudiée : Citronnelle

1.1. Histoire et origine 3

1.2. Botanique et culture 3

1.3. Systématique 5

1.4. Plantes voisines 5

1.5. Huile essentielle de la citronnelle 6

 1.5.1. Composition chimique 6

 1.5.2. Propriétés curatives de la citronnelle

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel 8

2.1.1. Matériel végétal et huile essentielle 8

2.1.2. Matériel animal 9

2.1.3. Souches microbiennes 9

2.1.4. Milieux de cultures et agents chimiques 9

2.2. Méthodes 11

2.2.1. Détermination du profil chromatographique 11

2.2.2. Évaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro* 11

 2.2.2.1. Technique de diffusion en milieu solide (Aromatogramme) 12

 2.2.2.2. Technique de diffusion en phase vapeur (Microatmosphère) 13

 2.2.2.3. Technique de dilution en milieu gélosé (macrodilution) 14

2.2.3. Activité antifongique dans une matrice alimentaire 14

2.2.4. Détermination des propriétés anti-inflammatoires de l'huile essentielle <i>in vivo</i>	15
2.2.4.1. Activité anti-inflammatoire aiguë (Œdème des pattes à la carraghénine)	16
2.2.4.2. Activité anti-inflammatoire topique	17
2.2.4.3. Etude anatomopathologique au niveau des oreilles	18
2.2.5. Évaluation de l'activité cicatrisante <i>in vivo</i>	18
2.2.5.1. Préparation d'une Crème dermique à base d'huile essentielle	19
2.2.5.2. Évaluation de l'activité cicatrisante <i>in vivo</i> de la crème dermique	

Chapitre 3. Résultats et Discussion

3.1. Profil chromatographique de l'essence de citronnelle	21
3.2. Activité antimicrobienne de l'essence de citronnelle <i>in vitro</i>	23
3.2.1. Technique d'Aromatogramme	23
3.2.2. Technique de Microatmosphère	28
3.2.3. Etude comparative : Aromatogramme vs Microatmosphère	31
3.2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	32
3.3. Activité antifongique de l'huile essentielle dans une matrice alimentaire	35
3.4. Evaluation des propriétés anti-inflammatoires de l'huile essentielle <i>in vivo</i>	37
3.4.1. Activité anti-inflammatoire aiguë	37
3.4.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique	39
3.4.3. Etude histopathologie	41
3.5. Pouvoir cicatrisant de l'essence de citronnelle <i>in vivo</i>	45
3.5.1. Etude macroscopique et planimétrique	45
3.5.2. Etude histopathologique	47

Conclusion	52
-------------------	----

Références Bibliographiques	54
------------------------------------	----

Annexes	
----------------	--

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Pendant des milliers d'années, les *herbes* sont cultivées et transformées à des fins culinaires, cosmétiques, industrielles et médicinales ainsi que pour l'élaboration de parfums. Une grande partie de l'intérêt manifesté initialement à l'égard des aliments fonctionnels et des produits nutraceutiques reposait sur les utilisations médicinales des herbes (**Bruneton, 1999 ; Goetz et Ghedira, 2012**). L'histoire de la nutraceutique naquit ainsi et, avec les progrès de la science, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des herbes et des plantes à parfum d'authentiques médicaments. On s'aperçoit aujourd'hui que l'industrie pharmaceutique ne peut s'en passer des essences aromatiques dont les nombreuses actions biologiques peuvent corriger et traiter de nombreux phénomènes et infections et/ou lutter contre certaines maladies chroniques.

Bien qu'une grande partie de ces composés aient été catalogués, il reste encore de nombreuses autres substances naturelles à identifier et à évaluer. Les recommandations alimentaires doivent également être étayées par des études scientifiques afin d'établir une base scientifique solide en matière d'allégations liées aux aliments fonctionnels et aux nutraceutiques. Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM), (autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation des nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle, que nous allons recenser et corréler à certains types de structures chimiques (**Debré, 2010**).

A Chiffa (wilaya de Blida, 60 Km au sud-ouest d'Alger), il en existe actuellement une dizaine de PAM, ayant un intérêt industriel, cultivée 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 déterminer la composition chimique de l'essence de la plante par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CG-SM) afin d'établir le profil chromatographique et le chémotype de l'essence de cette plante aromatique. Etudier le pouvoir antimicrobien (sur des souches de références et isolées cliniquement) de la fraction aromatique de 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 ; Kouame et al., 2016 ; Lawal et al., 2017**).

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 (microatmosphère) 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 macrodilution, a été évaluée uniquement sur les souches sensibles. Par ailleurs, l'efficacité antifongique de cette essence a été explorée dans une matrice alimentaire (Boisson sucrée gazeifiée type Orangina) afin de cerner ses potentiels applications comme conservateur alimentaire.

Et enfin, les activités anti-inflammatoire (aigue et topique) et cicatrisante (test d'excision) ont été abordées *in vivo* par différentes techniques, suivies par une étude histopathologique.

Chapitre 1

Généralités sur la Plante

étudiée : la Citronnelle

GENERALITES SUR LA PLANTE ETUDIEE : CITRONNELLE

1.1. 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 XVII^{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 ; Kouame et al., 2016**).

1.2. Botanique et culture

La citronnelle est une plante pluriannuelle qui appartient à la famille des Poacées ou graminées. On la trouve dans presque toutes les contrées tropicales. La citronnelle, dont il n'existe pas moins de 56 espèces, est riche en huiles essentielles avec une teneur élevée en citral et en géraniol (**Kouame et al., 2016**). C'est est une plante herbacée vivace, formée de tiges serrées pouvant atteindre 1,5 m de haut, lisses et glabres (Figure 1.1b). Elles forment des touffes composées de feuilles linéaires (Figure 1.1c), 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 claire 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 radicelle fines et longues, peu tortueuses à odeur assez faibles et fugace (**Boullard, 2001**).



a) Illustration de Citronnelle : Aspect morphologique

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



b) Tiges et feuilles



c) partie aérienne de la plante

Figure 1. Citronnelle (*Cymbopogon citratus*) = Aspects morphologique et botanique

(images.google.fr)

Elle ne fleurit qu'exceptionnellement pour donner naissance à une inflorescence terminale (Figure 1.1a), d'une trentaine de cm de long, formée d'épis de 6 mm de long (**Kouame et al., 2016**).

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 citronnelle, ou localement nommée 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**).

1.3. Systématique

Plusieurs noms commun sont attribués *Cymbopogon citratus*. Nous citerons : citronnelle, herbe citron, verveine des Indes, jonc odorant, lemongrass (**Kouame et al., 2016**). 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

1.4. 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 serait 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. *sofia* et *C. martinii* var. *motia*.

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

- le thym 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* (**Akhila, 2010**).

1.5. Huile essentielle de la citronnelle

La citronnelle, encore appelée citronnelle d'Inde ou de Madagascar ou de Java, est une plante herbacée tropicale de la famille des *Poaceae*, cultivée pour ses tiges et feuilles aux qualités aromatiques (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 ; Lawal et al., 2017**).

1.5.1. 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 ; Ekpenyong *et al.*, 2014**).

1.5.2. Propriétés curatives de la citronnelle

La citronnelle a de nombreux bienfaits pour la santé et ses propriétés curatives contiennent de nombreux composés, huiles, minéraux et vitamines qui sont connus pour avoir des propriétés anti-oxydantes et qui peuvent prévenir certaines maladies. Le composant chimique principal de la citronnelle est le citral qui a des fortes propriétés antimicrobiennes et antifongiques (**Ekpenyong *et al.*, 2014**).

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 côlon, de l'estomac, des voies urinaires et du système respiratoire. 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 A, le potassium, le zinc, le calcium, le fer, le manganèse, le cuivre et le magnésium (**Baudoux et Zhiri 2005 ; Grosjean, 2007 ; Bardeau, 2009**).

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 ; Shah *et al.*, 2011 ; Ekpenyong *et al.*, 2014**).

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 (**Shahl et al., 2011**).

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 aussi un anti-inflammatoire reconnu pour soigner les douleurs articulaires et certains rhumatismes (**Shahl et al., 2011**). 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 (**Akhila, 2010**).

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 (**Il Idrissi et al., 1993 ; Gilly, 1997 ; Teuscher et al., 2005 ; Kouame et al., 2016**).

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. Cependant, les femmes enceintes de moins de 3 mois ne doivent pas utiliser cette HE qui pourrait être néfaste pour leur santé (**Koh, 2009**).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Chapitre 2 :

MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation de notre mémoire de fin d'études s'est étalée sur une période de 6 mois (Février-Juillet 2017). Les différentes analyses ont été réalisées dans les structures suivantes :

- Laboratoire Pharmaco-Toxicologie du Centre de Recherche et de Développement (CRD) de Saidal, Alger.
- Service Microbiologie Alimentaire du Laboratoire d'Hygiène relevant de l'Etablissement de Proximité de la Santé Publique (EPSP) de Blida et Tipaza.
- Laboratoire Anatomie Pathologique relevant aussi bien du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) « Nafissa Hammoud » (Ex-Parnet, Hussein-Dey) ainsi que celui du CHU « Issad Hassni » de Béni Messous, Alger.
- Laboratoire Bactériologie de l'Etablissement Publique Hospitalier (EPH) « Brahim Tirichine » de la wilaya de Blida.
- Service Pharmaco-toxicologie du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP), Dély-Brahim, Alger.

Les principaux objectifs de notre travail se résument à étudier, *in vitro*, le pouvoir antimicrobien de l'HE de Citronnelle sur plusieurs souches (ATCC et isolées cliniquement) en utilisant plusieurs méthodes microbiologiques, et à évaluer le pouvoir anti-inflammatoire et cicatrisant *in vivo* par plusieurs méthodes avec une confirmation histopathologique. Par ailleurs, la composition chimique de l'essence de la plante a été déterminée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse afin d'établir le profil chromatographique de cette plante médicinale.

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal et huile essentielle

L'essence aromatique de citronnelle (*Cymbopogon citratus* DC.) provient de la société « Extral-Bio » de production des huiles essentielles, sise à Chiffa (Blida). Cette huile aromatique a été distillée à partir de la partie aérienne fraîche de la plante (tige et feuilles) qui est cultivée au niveau de ladite société, et ce au mois de Juin 2016 (**Figure 2.**). 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 par la société est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle sous pression. Aussi, l'HE est certifiée « 100% naturelle » car

n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. De plus, aucuns traitements organique (engrais) ou chimiques (pesticide) n'ont été utilisés durant la phase de culture. L'HE 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, d'altération chimique ou de contamination microbienne.



Figure 2. Champs de culture de citronnelle appartenant à la société « Extral-Bio » (Chiffa, Blida).
(Originale, 2017).

2.1.2. Matériel animal

Pour les activités pharmacologiques réalisées, *in vivo*, un total de 55 Souris (NMRI) de sexe mâle et femelle (poids varie entre 25-28 g) ont été utilisé afin d'asseoir le pouvoir anti-inflammatoire de l'essence de citronnelle, et 6 rats (Wistar) de sexe femelle (160-200 g) pour l'activité cicatrisante.

Tous ces animaux de laboratoire ont été stabulés dans des cages en plastique, à une température ambiante, un taux d'humidité et un éclairage avec un régime alimentaire de granulés d'origine ONAB, de l'eau de manière *ad-libitum*.

2.1.3. Souches microbiennes

Le screening antimicrobien a été réalisé sur plusieurs souches bactériennes (3 espèces de référence ATCC (American Type Culture Collection) et 6 souches bactériennes (**Tableau I**)). Ces espèces ont été isolées cliniquement (prélèvements de malades ayant contracté différentes infections). Concernant le screening antifongique, nous avons utilisé 6 champignons filamenteux (moisissures) et 5 levures (**Tableau II**). Toutes les souches ont été isolées et identifiées, soit au niveau du laboratoire Bactériologie de l'EPH de Blida ou encore celui du

Laboratoire d'Hygiène de Blida. Ces bactéries et champignons ont été conservés et maintenus en vie, par repiquages, sur des milieux de culture adéquats.

2.1.4. Milieux de cultures et agents chimiques

Durant notre screening antimicrobien, nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la Gélose Nutritive (GN) ou Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les champignons. Aussi, des milieux de culture sélectifs ont été utilisés (gélose Chapman pour les Staphylocoques, gélose Hecktoen pour les Entérobactéries). Tous ces milieux de culture proviennent de la société idéal-Labo, sise à Beni Mered (Blida).

Et dans le but de mener une étude comparative du pouvoir antibactérien de l'essenc de citronnelle avec un contrôle positif, nous avons utilisé des disques Antibiotiques (ATB) comme référence. Les ATB utilisés sont: Gentamicine (CN, 10µg), Tétracycline (TE, 30µg), Ofloxacin (OFX, 5µg), Amoxicilline (AMX, 25µg) et Acide Nalidixique (NA, 30µg). Ces ATB proviennent de la société Bio-Rad (France).

En revanche et en ce qui concerne les espèces mycéliennes, aucune étude comparative n'a été faite avec des antifongiques (non disponibles). C'est la raison pour laquelle nous avons opté pour une solution antiseptique d'Hexomédine à 0.1% (Biopharm, Alger) comme contrôle positif. Cette solution est largement utilisée en milieu hospitalier.

L'émulsifiant non ionique de la famille des polysorbates (Tween 80) a été utilisé pour disperser et solubiliser l'HE (lipophile) dans un milieu gélosé (hydrophile) afin de déterminer la CMI. Ce solvant est pur chimiquement et provient de Sigma-Aldrich (Allemagne).

Tableau I. Espèces bactériennes utilisées lors du screening antibactérien *in vitro*.

Souches bactériennes	Origine	Famille
Bactéries à Gram -		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Enterobacteriaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25812	Pseudomonadaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pus d'oreille	Pseudomonadaceae
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ECBU	Pseudomonadaceae
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ECBU	Enterobacteriaceae
<i>Salmonella typhi</i>	Hémoculture	Enterobacteriaceae
Bactéries à Gram +		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Micrococcaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus pied diabétique	Micrococcaceae
<i>Enterococcus sp.</i>	ECBU	Enterococcaceae

ATCC: American Culture Collection; ECBU: Examen Cytobactériologique des urines.

Tableau II. Espèces mycéliennes utilisées lors du screening antifongique *in vitro*.

Nom	Origine	Famille
Levures		
<i>Candida albicans</i>	Prélèvement vaginal	Cryptococcaceae
<i>Candida parapsilosis</i>	Prélèvement vaginal	Saccharomycetaceae
<i>Candida tropicalis</i>	Prélèvement vaginal	Cryptococcaceae
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc1)	Alimentaire	Saccharomycetaceae
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc1)	Alimentaire	Saccharomycetaceae
Moisissures		
<i>Aspergillus terreus</i>	Alimentaire	Trichocomaceae
<i>Aspergillus niger</i>	alimentaire	Trichocomaceae
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC16404	Trichocomaceae
<i>Verticillium</i> sp.	Alimentaire	Plectosphaerellaceae
<i>Fusarium</i> sp.	Alimentaire	Nectriaceae
<i>Penicillium</i> sp.	Alimentaire	Trichocomaceae

ATCC : souche de référence (ATCC = American Type Culture Collection).

2.2. Méthodes

2.2.1. Détermination du profil chromatographique

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse (CPG), à régulation électronique de pression, de type Hewlett Packard (série HP 6890, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0.25 mm) avec une épaisseur de film de 0.25 μm , d'un détecteur FID réglé à 280 °C et un injecteur *split-splitless* réglé à 250 °C. Le mode d'injection est *split*. Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1.7 mL/min. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison d'une montée de 2 °C/min. L'appareil est piloté par un système informatique de type « *HP Chem Station* », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs Indices de Kovats (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0.25 mm), l'épaisseur du film est de 0.25 μm . La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison de 2 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1.2 mL/min. Le mode d'injection est *split* (rapport de fuite : 1/70).

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse (Wiley7, NIST 2002). L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (CG/SM) respectifs avec les spectres de la bibliothèque et de la bibliographie (Adams, 2007) et sur la base de calcul des Indices de Kovats (IK). L'indice de rétention ou l'IK d'un composé A est indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée. L'IK d'un composé A dépend de la phase stationnaire et de la température. Les IK sont calculés comme suit :

$$IK = 100n + \left[\frac{TR_c - TR_n}{TR_{(n+1)} - TR_n} \right] \times 100$$

n : Nombre d'atomes de carbone de l'alcane élué avant le composé ;

TR c : Temps de rétention du composé ;

TR n : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le composé ;

TR (n+1) : Temps de rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone élué après le composé.

2.2.2. Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro*

L'évaluation des propriétés antimicrobiennes des molécules terpéniques et des produits naturels est basée sur l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'HE. A cet effet, nous avons utilisé deux méthodes qualitatives (aromatogramme et microatmosphère) et une technique quantitative (détermination des concentrations minimales inhibitrices) lors de notre screening.

2.2.2.1. Technique de diffusion en milieu solide (Aromatogramme)

Cette technique a été décrites par plusieurs auteurs (Zaika, 1989 ; Tyagi *et al.*, 2013). C'est la méthode que nous avons adoptés pour évaluer, dans une première étape, le pouvoir antimicrobien de l'essence de citronnelle. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie, l'antibiogramme.

Au cours de cette méthode, nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne) qui ont été imprégnés d'une certaine dose d'HE (20, 40 et 60 µL d'HE par disque) afin d'apprécier l'effet « dose-dépendant ». Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. L'étude du pouvoir antimicrobien est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des disques d'ATB par des extraits aromatiques.

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). La phase liquide de l'essence aromatique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les espèces bactériennes et fongiques vont se développer sur toute la surface gélosée sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence suffisante qui inhibe leur croissance.

Après incubation et à 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). Ainsi, la souche microbienne sera classée comme étant sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis de l'HE.

Par ailleurs et afin de mener une étude comparative, des contrôles positifs ont été réalisés en appliquant, dans les mêmes conditions citées auparavant, des disques d'antibiotiques qui vont servir comme référence pour pouvoir comparer leur pouvoir antibactérien avec notre échantillon d'huile. A cet effet, plusieurs disques d'ATB ont été utilisés. Concernant les souches fongiques, c'est la solution antiseptique locale d'Héxoméline® 0.1% qui a été utilisée comme contrôle positif.

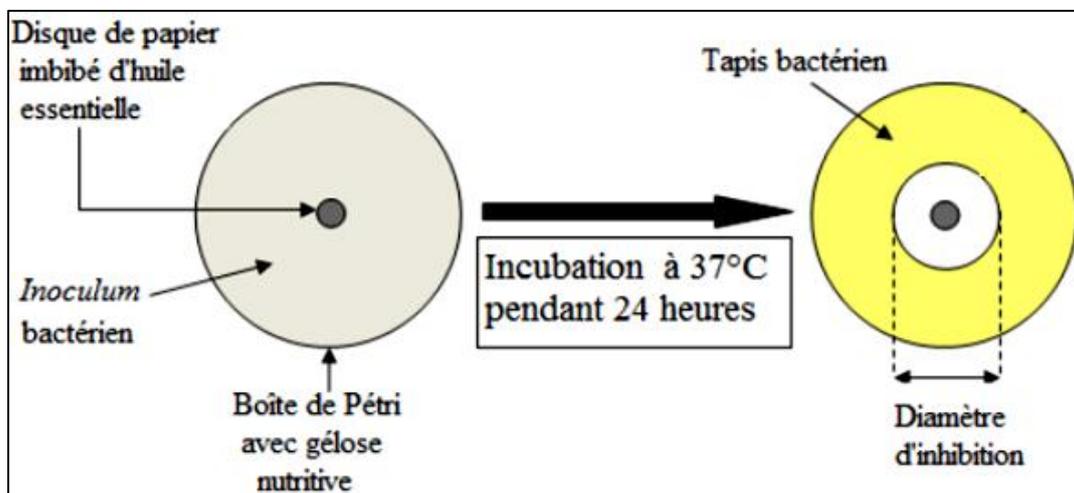


Figure 3. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle déterminé par diffusion en milieu solide (aromatogramme).

2.2.2.2. Technique de diffusion en phase vapeur (Microatmosphère)

Cette technique a été utilisée afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur de la phase volatile de l'HE (Figure 4.). Cette méthode est rarement explorée ; peu d'auteurs ont évalué les propriétés inhibitrices de la phase vapeur des molécules terpéniques (Tyagi et Malik, 2011 ; Amara *et al.*, 2017).

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 quantités croissantes au disque. En premier lieu, 20 μL d'huile a été déposée sur un disque de papier filtre de 2 cm de diamètre. Dans le second essai, un disque de 4 cm a été imprégné par 40 μL d'huile alors que pour le dernier, un disque de 6 cm a été chargé par 60 μL d'essence. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'huile à imprégner afin d'obtenir son bon étalement sur le couvercle et, par conséquent, une meilleure diffusion et évaporation. La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été réalisés de la même manière que la méthode de diffusion en milieu gélosé (Aromatogramme). La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 72 h ou 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement. Il se produit une évaporation des substances volatiles qui, en contact avec les microorganismes ensemencés préalablement sur le milieu gélosé, va inhiber leur croissance. Après incubation et à 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.

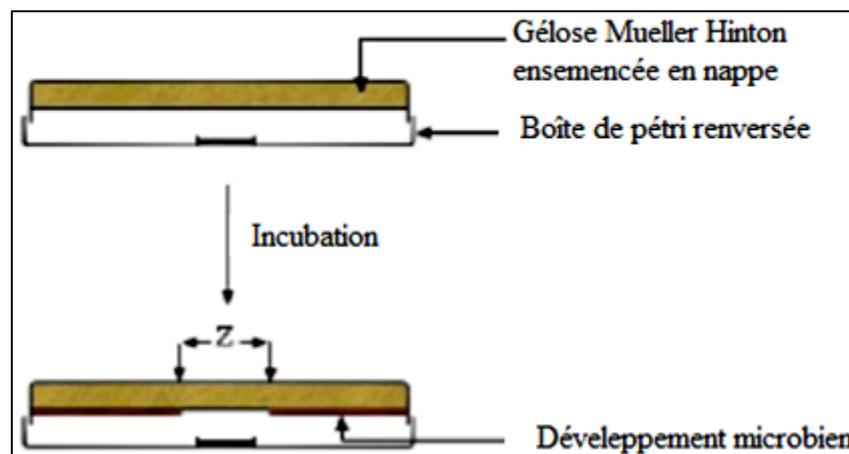


Figure 4. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle déterminé par diffusion en phase vapeur (microatmosphère).

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

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.

2.2.2.3. Technique de dilution en milieu gélosé (macrodilution)

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 émulsifiant non ionique, en l'occurrence le Tween 80.

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 2% à 0,031% pour les bactéries et de 1% à 0,007% pour les levures. 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.

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 (exempte 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.

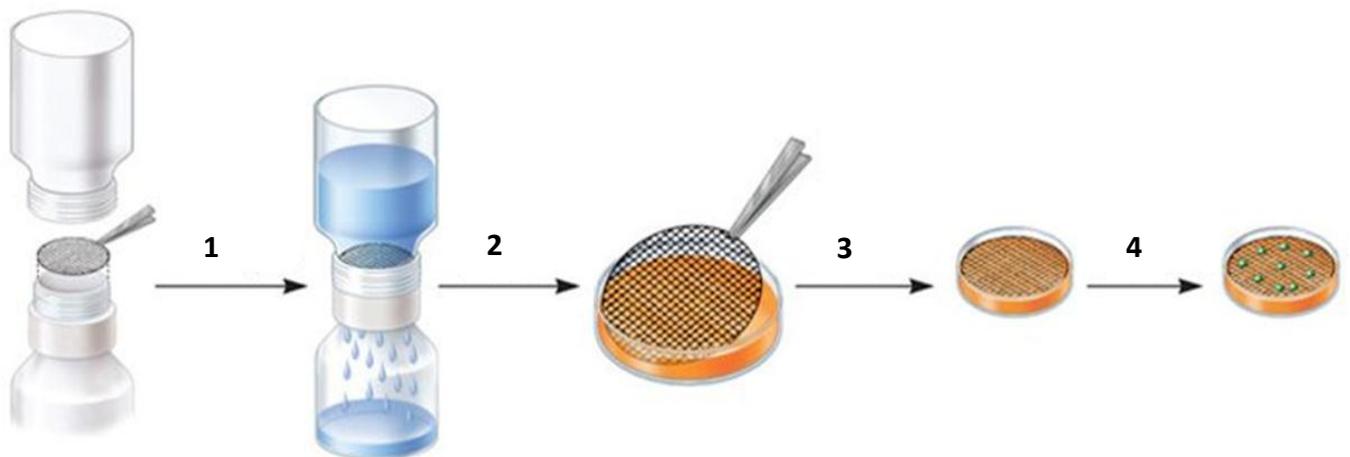
A noter que les CMI ont été déterminées uniquement pour les souches ayant manifesté une certaine sensibilité à l'action inhibitrice de l'HE par les méthodes préliminaires.

2.2.3. Activité antifongique dans une matrice alimentaire

Le pouvoir antifongique de l'essence aromatique de citronnelle dans un modèle alimentaire a été réalisé selon la méthode décrite par **Tyagi et al. (2013)**. Nous avons choisi comme matrice une boisson gazeuse sucrée et fruitée, type Orangina® (unité Djguaguen, Blida). De par son pH acide et la présence de deux conservateurs alimentaires (SIN202 : Sorbate de potassium et SIN211 : Benzoate de sodium) et un anti-oxydant (SIN300 : Acide citrique), ce type de boissons constitue un milieu défavorable pour la croissance bactérienne. Cependant, leur qualité organoleptique peut être altérée du fait de la possibilité d'une croissance fongique, apte à résister aux conditions d'osmophilie et d'acidophilie. C'est la raison pour laquelle nous avons inoculé cette boisson par une souche levuriforme (*Saccharomyces cerevisiae*) afin de provoquer une contamination fongique et apprécier ainsi sa cinétique de croissance en présence des

conservateurs de synthèse, de l'HE seule ou en combinaison avec un traitement thermique. Ce traitement physique a été adopté dans le but de limiter la quantité d'HE qui sera rajoutée dans les denrées alimentaires afin de garder les propriétés sensorielles intactes.

A cet effet, 3 types de jus Orangina® ont été testés. Le contrôle positif est représenté par un lot de boisson où des conservateurs de synthèse (Sorbate de potassium et Benzoate de sodium) aient été additionnés. Le second lot a été supplémenté de différentes concentrations en HE (400 µL, 200 µL, 100 µL, 50 µL et 25 µL). Le dernier lot va subir une combinaison HE-traitement thermique (80°C pendant 2 minutes) et ce pour apprécier l'effet synergique de ce traitement avec la présence des molécules terpéniques aromatiques pour une meilleure efficacité antifongique dans les boissons fruitées. Ces boissons ont été inoculées préalablement par une suspension fongique de *Saccharomyces cerevisiae*. Par la suite, une dilution décimale a été réalisée (10^{-2}) dans l'eau physiologique (NaCl, 0,09%). Ces dilutions vont être analysées par technique de filtration sur membrane pour apprécier le niveau de contamination initial. Les membranes filtrantes seront déposées sur gélose SAB et incubées, par la suite, à 25°C pendant 48-72h. La lecture des résultats se résume à dénombrer toute colonie levuriforme. Cette analyse correspond alors à J-0. La même démarche opératoire sera répétée à J-2, à J-4, à J-6 et J-9 pour les différentes boissons, conservés dans un réfrigérateur (4°C) entre temps, et ce afin d'apprécier la cinétique de croissance fongique.



1) Dépôt de la membrane filtrante (0,45µm de porosité) sur le support et filtration de l'échantillon à analyser. 2) Dépôt de la membrane filtrante sur milieu de culture adéquat (Sabouraud-Chloramphénicol). 3) Incubation de la boîte Pétri à 25°C pendant 2-3 jours. 4) Dénombrement des colonies levuriformes (blanches, brillantes et crémeuses) sur la membrane.

Figure 5. Illustration de la filtration sur membrane pour l'analyse microbiologique d'Orangina.

2.2.4. Détermination des propriétés anti-inflammatoires de l'huile essentielle *in vivo*

2.2.4.1. Activité anti-inflammatoire aiguë (Œdème des pattes à la carraghénine)

- Objectifs et Principe

Il s'agit d'évaluer l'HE dans un test discriminatoire anti-inflammatoire pour une éventuelle utilisation en thérapeutique. Ce test est très utilisé pour évaluer un nouvel anti-inflammatoire en première intention. Il a été décrit par **Winter *et al.* (1962)**. Le principe du test consiste à provoquer un gonflement aiguë dans la patte d'une souris. Il est réalisé par une injection d'une substance inflammatoire sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche. Ceci provoque une réaction qui peut être réduite par des substances anti-inflammatoires. Cette réaction se traduit par un œdème d'installation rapide et persistant. La mesure est effectuée en mesurant, à la fin de l'expérience (après 4 h), le poids (en grammes) des pattes des souris (gauche et droite) des différents lots.

- Déroulement de l'essai

Plusieurs doses en HE ont été testées (200, 20 et 2 µg/kg) en solution dans l'eau physiologique, en comparaison avec le Témoin positif (AINS).

A cet effet, nous avons constitués 5 lots de souris. Le premier recevra, par voie orale, de l'eau physiologique (Contrôle -) à raison de 0.5mL. Le second sera traité par un anti-inflammatoire de référence : Indometacine. Ce traitement sera administré par injection intra-péritonéale. Les quatre autres lots restants seront traités, individuellement et *per os*, par différentes doses en HE. L'induction d'une inflammation aiguë est faite par injection de 0.025 mL d'une solution de carraghénine (0.1 %) au niveau de la Patte Postérieure Gauche (PPG). La mesure du poids des pattes, gauche et droite de chaque souris se fera, à l'issue de l'expérience, après avoir sacrifié les animaux et coupé leur pattes au niveau de l'articulation tarso-métatarsienne.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins selon la formule suivante :

% *deréductiondel'oedème*

$$= \frac{(T-) - E}{(T-)} \times 100$$

(T-) : Moyenne de Différence des poids des Pattes (DPP) du contrôle - ; E : Moyenne DPP de l'essai (HE ou T+)

- Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne du poids des DPP ± Ecart-Moyen. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie par le test Fisher LSD de comparaison par paires. $P < 0.05$ a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLStat (Addinsoft, Paris, France).

2.2.4.2. Activité anti-inflammatoire topique

- Principe

L'activité anti-inflammatoire topique de l'HE a été évaluée *in vivo* sur des souris NMRI. L'œdème a été induit, au niveau de l'oreille gauche de chaque souris, par application d'une solution irritante de xylène à 0.3% comme agent phlogogène (irritant). L'oreille droite servait de témoin. La méthodologie suivie est celle décrite par **Sosa *et al.* (2005)** et **Al-Reza *et al.* (2010)**.

- Déroulement de l'essai

Quatre lots ont été constitués (4 souris chacun). Les différents traitements ont été administrés aux souris par voie topique (application cutanée au niveau de l'oreille gauche). Ces lots sont répartis comme suit :

- Lot 1 recevra une dose de 820 mg/Kg d'HE pure;
- Lot 2 recevra une dose de 410 mg/kg d'HE (diluée à 50% dans l'huile d'amande douce) ;
- Lot 3 recevra une dose de 82 mg/Kg d'HE (diluée à 10 % dans l'huile d'amande douce) ;
- Lot 4 (contrôle -) recevra une quantité de 20 mg d'huile d'amande douce ;
- Lot 5 (contrôle +) recevra une quantité de 40 µL/kg d'un gel dermique Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien (AINS) Voltarène Emulgel® 1% (Diclofénac de sodium, Novartis, France) ;
- Lot 6 (contrôle +) recevra une quantité d'une pommade dermique Anti-Inflammatoire Stéroïdien (AIS) de Betasone® 0.05% (Betamethasone, Sidal, Médéa, Algérie).

Après l'application des traitements, l'induction de l'inflammation a été effectuée par application cutanée d'une solution irritante d'xylène sur l'oreille gauche de toutes les souris déjà traitées. Après l'écoulement d'un temps estimé à 5 heures, les souris ont été sacrifiées par une forte dose de l'éther et des pièces circulaires, de 8 mm de diamètre, ont été coupées et retirées des oreilles traitées (gauches) et non traitées (droites). Ces pièces ont été pesées et conservées immédiatement dans du formol à 10% pour l'étude histopathologique.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au contrôle négatif, selon la formule suivante :

% de réduction de l'œdème

$$= \left[\frac{(\Delta T -) - \Delta E}{(\Delta T -)} \right] \times 100$$

$\Delta T -$: Différence entre les moyennes du poids de l'oreille (G-D) pour le lot Contrôle - (eau physiologique 0.9% NaCl) ; ΔE : Différence entre les moyennes du poids de l'oreille (G-D) pour le lot essai (HE ou Contrôles +).

- Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne du poids de l'oreille gauche (POG) \pm Ecart-Moyen. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test de Fisher LSD de comparaison par paires. $P < 0.05$ a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLStat 2012 (Addinsoft, Paris, France).

2.2.4.3. Etude anatomopathologique au niveau des oreilles

Afin de confirmer l'activité anti-inflammatoire aigue et topique de la citronnelle au niveau cellulaire, des coupes histopathologiques ont été réalisées sur des pattes et des pièces circulaires des oreilles gauches et droites coupées et précédemment. La coloration effectuée était celle de Hématoxyline-Eosine (H-E.) selon la procédure de **Martoja et Martoja-Pierson (1967)**. Le protocole opératoire est détaillé en **Annexe 1**.

Les coupes sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 μm d'épaisseur. L'observation a été accomplie par microscopie photonique (Olympus C \times 41) aux grossissements x10, x20 et x40. Des photos ont été prises pour quantifier l'intensité de l'inflammation (œdème) et l'infiltration cellulaire (recrutement ou non des polynucléaires neutrophiles (PNN)).

2.2.5. Évaluation de l'activité cicatrisante *in vivo*

2.2.5.1. Préparation d'une Crème dermique à base d'huile essentielle

L'objectif de cette étude consiste à mettre au point une formule galénique topique adaptée à l'extrait aromatique de citronnelle afin d'asseoir son pouvoir cicatrisant *in vivo*. La forme pharmaceutique choisie est celle d'une émulsion hydrophile largement utilisée pour le traitement local des pathologies cutanées. Notre formule d'émulsion est de type Lipophile/Hydrophile. Les ingrédients utilisés lors des formulations des crèmes sont consignés dans le **Tableau III**.

Tableau III. Composition de la crème dermique à base d'huile essentielle de citronnelle.

Ingrédients	Concentration (%)
Phase Huileuse (25-35%)	
- Huile d'amande douce	5-20
- Cire d'abeille blanche	3-5
- Acide stéarique	2-8
- Alcool cétylique	0.2-4
- Alcool céto-stéarylique	0.2-2
- Huile essentielle de citronnelle	0,5

Phase Aqueuse (60-70%)	
- Eau distillée	50-70
- Glycérine	4-5
- Triéthanolamine (TEA)	0.3-1.5

Le protocole de fabrication est celui d'une émulsion classique selon le mode opératoire suivant :

- Préparation de la phase huileuse : déposer dans un bécher la quantité appropriée d'huile d'amande douce, d'acide stéarique, de cire blanche et des tensioactifs (alcool cétylique et alcool céto-stéarylique).
- Préparation de la phase aqueuse : mélanger l'eau distillée avec la glycérine et le TEA.
- Nous portons les 2 béchers au bain-marie à 80°C jusqu'à fusion complète des composés. Ces derniers sont mélangés sous une agitation manuelle rapide.
- La phase aqueuse sera versée dans la phase grasse par petites fractions en mélangeant entre chaque adjonction jusqu'au refroidissement.
- A température ambiante, nous ajoutons, sous une homogénéisation continue, l'HE de citronnelle avec pour obtenir une concentration finale de 0.5%

Nous avons opté pour un conservateur dérivé d'isothiazoline, le Kathon CG® (izothiazoline) à 0,005%. Le conditionnement se fait en pot. Les ingrédients utilisés sont mentionnés selon la nomenclature INCI par ordre de concentration décroissante.

2.2.5.2. Évaluation de l'activité cicatrisante *in vivo* de la crème dermique

- Objectifs

Ce test a été réalisé *in vivo* chez des rats Wistar. Il a pour but l'évaluation du potentiel de la néoformation des tissus dermiques après l'application quotidienne d'une crème à base d'HE (0.5%) de citronnelle (**Bensegueni, 2007**) sur des plaies préalablement provoquées par excision. Les applications se feront quotidiennement jusqu'à l'épithélialisation complète de la plaie (environ 14 jours). Cette étude permet de comparer les différentes cicatrices et leur évolution sur la base de la modification de leur surface. La lecture des résultats a été faite en comparaison avec un groupe recevant une crème cicatrisante Madécassol® (Acide asiaticoside 1%, Roche-Nicholas, France), et avec un groupe traité uniquement par l'excipient exempt de principe actif (contrôle négatif).

- Méthodologie

Par manque des animaux de laboratoire, nous avons constitué 3 lots de 2 rats chacun préalablement rasés au niveau de la région dorso-cervical jusqu'à l'apparition nette de la peau. Tous les animaux ont été anesthésiés par l'injection de 1 mL de thiopental de concentration 9,8 mg/mL par voie intraveineuse.

Après avoir désinfecté la région épilée avec de l'alcool chirurgical à 70°, nous avons procédé à l'ablation de la peau par excision (**Figure 2.5**). Pour cela, les rats ont été placés dans une plaque de dissection. Nous avons tracé une zone à découper en forme arrondie de 15 mm² de surface qui sera, par la suite, découpée en utilisant une paire de ciseaux et une pince. La peau découpée sera enlevée de cette zone d'une façon à obtenir une surface (S).



Figure 6. Excision circulaire du lombeau dermique au niveau de la région dorso-cervicale
(originale, 2017)

Chaque animal est placé dans une cage individuelle. Il recevra de la nourriture granulée et de l'eau durant tout le traitement jusqu'à la cicatrisation totale.

Et afin d'éviter une surinfection de la région excisée, une injection d'un antibiotique (Retarciline 1.200.000 UI) par voie intramusculaire a été réalisée. Les surfaces (S) dépourvues de peau seront nettoyées à l'aide d'une compresse stérile imbibée d'eau physiologique pour la prise d'empreinte des plaies sur papier calque et ce pour chaque animal. Enfin, le produit à tester (crème dermique à base d'essence de citronnelle) sera appliquée (quantité 0.4g) en réalisant un massage local, jusqu'à la pénétration complète de la crème. Le contrôle positif

recevra une crème cicatrisante Madécassol®, alors que le lot contrôle négatif sera traité par une crème excipient.

L'application des produits sus-indiqués sera fera, d'une façon quotidienne, pendant 16 jours consécutifs et en mesurant, à chaque jour, l'empreinte de la plaie pour suivre son évolution et sa superficie.

A l'aide d'un logiciel Auto-CAD (logiciel de dessin assisté par ordinateur qui permet de mesurer les surfaces en mm² au), nous avons calculé le pourcentage de rétraction des plaies selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de rétraction (\%)} = \frac{(S_{j0} - S_{jn})}{S_{j0}} \times 100\%$$

S_{j0} : surface de la plaie au premier jour (avant l'application de produit à tester)

S_{jn} : Surface de la plaie chaque jour.

- Coupes histologiques

Afin de confirmer l'effet cicatrisant de l'essence de citronnelle et distinguer les différentes étapes d'épithélialisation au niveau cutané, des coupes histologiques ont été réalisées sur des pièces circulaires de peau prélevées au 7^{ème} et au 16^{ème} jour. La coloration effectuée était celle de Hématoxyline-Eosine selon la procédure de **Martoja et Martoja-Pierson (1967)**. Le protocole opératoire est détaillé en Annexe 1.

Les coupes sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 µm d'épaisseur. L'observation a été accomplie par microscopie photonique (Olympus C×41) aux grossissements x10, x40 et x100.

Chapitre 3

Résultats et Discussion

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Profil chromatographique de l'essence de citronnelle

Les résultats de la composition chimique de l'HE de citronnelle, réalisé par CG-SM, sont rapportés dans le **Tableau IV**. Les différents composés ont été listés selon leur temps de rétention.

Tableau IV. 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	Géraniol	2.42
54.58	Eicosane	0.19
55.18	Nonadecane	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, Néral (24.30%). Ce dernier est présent presque avec la même proportion que le Myrcène (23.92%). Deux autres constituants de la famille des alcools monoterpéniques (Linalool et Géraniol) sont présents aussi mais avec un taux faible (6.56% et 2.42%, respectivement) en comparaison 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 composé en majorité par des composés monoterpéniques (87.67%), avec une prépondérance de composés oxygénés (55.72%) dominés par Géraniol, Géraniol et le Néral. Eu égard des résultats obtenus, cette huile aromatique pourra être classée en « chémotype Géraniol ». L'échantillon de l'huile de *C. citratus* étudiée ici est riche en 2 composés, Géraniol - Néral, ensemble souvent dénommé Citral (**Figure 7.**), avec un pourcentage de 53.23%.

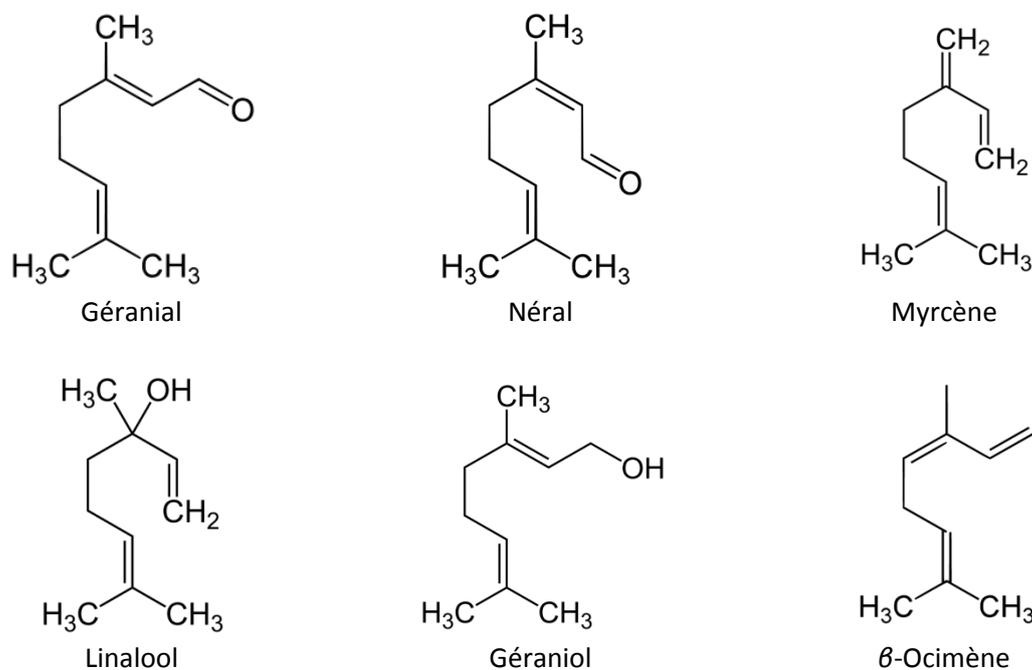


Figure 7. Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence de citronnelle.

Les deux aldéhydes, Néral et Géraniol, sont des composés caractéristiques d'HE de citronnelle quelle que soit son origine géographique. Ces deux composés 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) (Cavalcanti *et 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 aux nôtres (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%.

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 (génétique, localisation, maturité, sol, climat) ou encore technologiques (mode de culture ou d'extraction). Du lieu où poussent les citronnelles dépendra la composition biochimique de son essence et déterminera donc le

chénotype, la spécificité de l'huile et les propriétés thérapeutiques. Tous ces paramètres étant influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les pratiques culturales.

Par ailleurs et au sein d'une même espèce, la composition chimique de l'HE peut être différente : on parle alors de races chimiques ou de chénotypes. 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).

3.2. Activité antimicrobienne de l'essence de citronnelle *in vitro*

L'activité antimicrobienne de l'essence de *Cymbopogon citratus*, effectuée par 3 méthodes différentes (aromatogramme, microatmosphère et détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé), a été réalisée sur des souches microbiennes, de référence ou isolées cliniquement. Au total, 3 bactéries à Gram+ et 6 à Gram- ainsi que 5 levures et 6 moisissures ont été utilisées dans cette étude. Les résultats de ce screening sont colligés dans les Tableaux V et VI 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.

3.2.1. Technique d'Aromatogramme

Eu égard des résultats obtenus *in vitro* en aromatogramme (**Tableau V**), il apparaît que toutes les souches bactériennes sont sensibles à l'action inhibitrice de la phase liquide de l'essence de citronnelle. A la plus faible quantité (20 µL) en HE, c'est principalement les bactéries à Gram + qui étaient les plus sensibles avec des DZI qui varient entre 58-82 mm, suivie par *A. baumannii* (49 mm) et *K. pneumoniae* (30 mm). A forte dose (60 µL) en HE, une inhibition totale (85 mm) a été notée pour *S. aureus*, *Enterococcus sp.* et *A. baumannii*.

Uniquement les espèces du genre *Pseudomonas* qui ont manifesté une sensibilité faible, en comparaison avec les autres espèces. Par ailleurs, une action « dose-dépendante » a été enregistrée et ce pour toutes les espèces bactériennes étudiées lors de ce screening.

Tableau V. Activité antimicrobienne de l'essence de citronnelle par différentes méthodes.

Souches bactériennes	Méthodes utilisées						Antibiogramme				
	Aromatogramme			Microatmosphère			Disques d'Antibiotiques				
	Quantité HE (µL/disque)						CN	AMX	OFX	NA	TE
	20	40	60	20	40	60					
Bactéries à Gram -											
<i>E. Coli</i>	19	24	46	63	85	85	23	23	30	25	25
<i>P. aeruginosa</i> (P1)	13	14	15	-	-	-	16	-	24	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (P2)	12	13	17	-	-	-	16	-	26	-	-
<i>A. baumannii</i>	49	74	85	31	48	59	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	30	48	75	37	64	78	20	14	26	19	19

<i>S. typhi</i>	24	30	63	23	46	52	22	-	25	-	11
Bactéries à Gram +											
<i>S. aureus</i> (Sa1)	82	85	85	80	85	85	24	35	29	14	26
<i>S. aureus</i> (Sa2)	58	84	85	66	81	85	14	13	10	-	23
<i>Enterococcus</i> sp.	66	85	85	29	46	61	-	-	-	-	-

HE : Huile Essentielle ; mm : Diamètre d'inhibition ; CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CN : Gentamicine (10 µg), AMX : Amoxicilline (25 µg), OFX : Ofloxacine (5 µg), NA : Acide Nalidixique (30 µg), TE : Tétracycline (30 µg) ; (-) : aucune inhibition.

Concernant l'effet des ATB sur les germes, les DZI obtenus ne dépassent pas, dans les meilleurs des cas, 30 mm (*E. coli*).

En outre, nous avons noté, que certaines isolats bactériens, à l'exemple de *Enterococcus* sp., *A. baumannii* et *P. aeruginosa*, ont manifesté une résistance absolue à certains antibiotiques à large spectre (Tétracycline et Gentamycine), alors qu'en utilisant l'essence de citronnelle, une inhibition importante, voire totale dans certains cas (*Enterococcus* sp.), a été notée ce qui démontre l'utilité des huiles essentielles, la citronnelle dans notre cas, dans la lutte/prévention contre les infections humaines liées aux germes multirésistants.

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**), de *S. aureus* (**Ahn et al., 1998 ; El-Kamali et al., 1998**), de *Klebsiella pneumoniae* et de *Serratia marcescens* (**Hammer et al., 1998**), de *Proteus mirabilis* et de *Salmonella typhi* (**Chalchat et al., 1997**) sont sensibles à la phase liquide de l'HE de citronnelle.

Aussi, nos résultats obtenus révèlent que les bactéries à Gram+ sont les plus sensibles en comparaison avec les Gram – qui ont été inhibées certes, mais leurs DZI demeurent inférieurs. 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**). Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques et teichoïques). Par contre chez les bactéries 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 ainsi 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 semble être en totale adéquation avec nos résultats.

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).

Toujours en aromagramme et concernant les souches fongiques, de meilleurs résultats ont été obtenus, aussi bien pour les levures que les moisissures. Nous pouvons mentionner aussi que les levures alimentaires ont été inhibées totalement et ce quelque soit la quantité en HE utilisée. De la même manière, une inhibition totale a été notée pour toutes les souches mycéliennes, à l'exception de *Penicillium* sp. où les DZI s'échelonnent entre 36-78 mm. Une autre espèce, *Candida albicans*, impliquée souvent dans les mycoses cutanées et profondes, a été inhibée totalement (DZI > 85mm).

Ces résultats sont très prometteurs pour une éventuelle utilisation des essences de citronnelle en aromathérapie anti-infectieuse, d'autant plus que le contrôle positif (solution antiseptique locale d'Hexomédine) n'a pas démontré une grande efficacité dans l'inhibition de la croissance fongique avec des DZI modérés voire faibles, en particulier pour les espèces aspergillaires (30-32 mm) alors que d'autres isolats ont montré une résistance absolue (*Penicillium* sp. et *S. cerevisiae*). En somme et compte tenu des résultats obtenus, l'essence de citronnelle peut être référencée comme un puissant fongicide et son application potentielle, dans la lutte-prévention des mycoses humaines, paraît pleinement justifiée.

Tableau VI. Activité antifongique de l'essence de citronnelle *in vitro* par différentes méthodes.

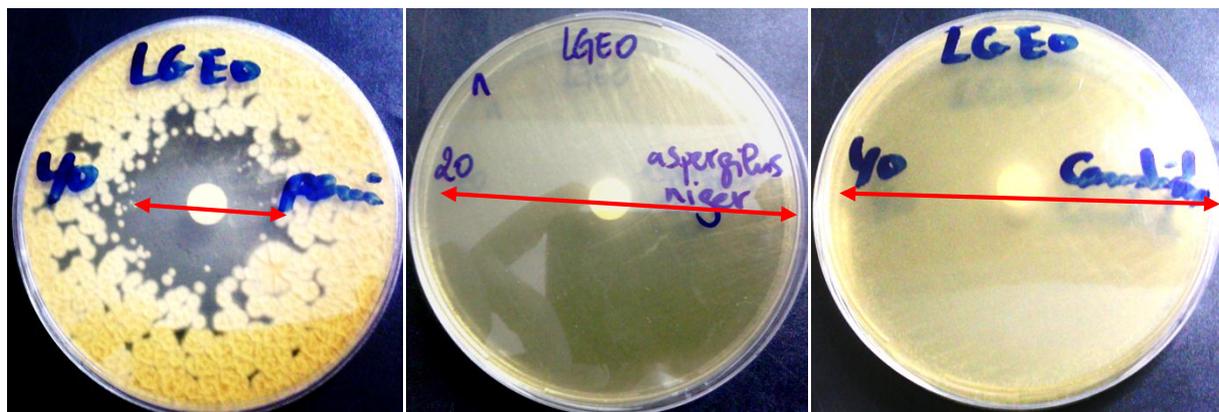
Souches fongiques	Méthodes utilisées								
	Aromatogramme			Microatmosphère			HEX		
	Quantité d'HE (µl / disque)						(µL/disque)		
	20	40	60	20	40	60	20	40	60
Levures									
<i>C. albicans</i>	85*	85	85	85	85	85	32	36	40
<i>C. parapsilosis</i>	65	78	85	67	85	85	29	36	47
<i>C. tropicalis</i>	85	85	85	85	85	85	36	39	43
<i>S. cerevisiae</i> (Sac 1)	85	85	85	57	85	85	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> (Sac 1)	85	85	85	85	85	85	-	-	-
Moisissures									
<i>A. niger</i>	85	85	85	85	85	85	30	35	42
<i>A. terreus</i>	85	85	85	85	85	85	32	38	45
<i>A. brasiliensis</i>	85	85	85	24	85	85	32	36	40

<i>Fusarium</i> sp.	85	85	85	50	85	85	12	15	20
<i>Verticillium</i> sp.	85	85	85	85	85	85	-	10	12
<i>Penicillium</i> sp.	36	48	78	85	85	85	-	-	-

HE : Huile Essentielle ; HEX : solution antiseptique d'Hexomédine (0.1%) ; * DZI (Diamètre de la Zone d'Inhibition) ; (-) : aucune zone d'inhibition ; nd : non déterminé.

Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Tyagi et Malik (2011)** et **Tyagi et Malik (2012)**. Hélas, par manque de moyens (milieux de culture), 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-.

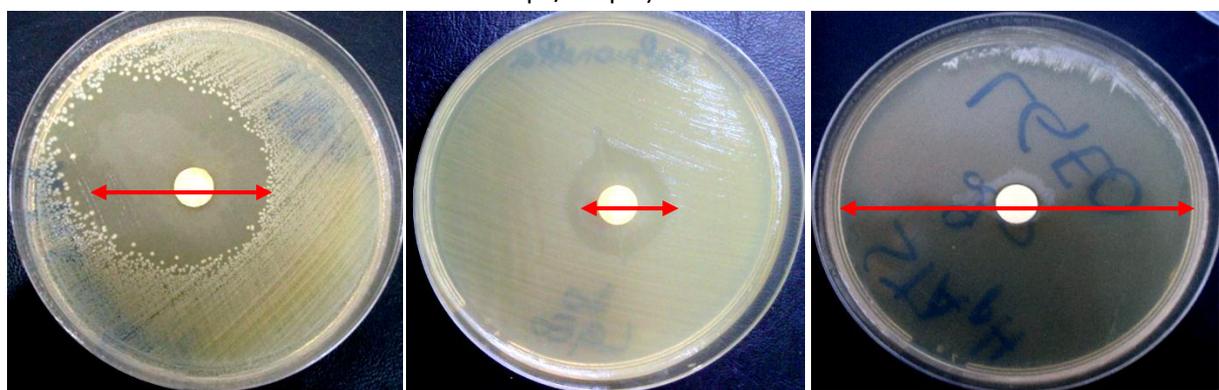
Par ailleurs, nous avons constaté que les valeurs des DZI obtenus sont largement supérieures à ceux des bactéries (**Figure 8.**). En effet et sur les germes bactériens, l'HE de citronnelle est douée d'une activité « bactériostatique » où nous avons noté la résistance de certaines souches alors qu'elle est « fongicide » sur les souches mycéliennes.



Penicillium sp. (40 µL/disque)

Aspergillus niger (20 µL/disque)

Candida albicans (40 µL/disque)



Klebsiella pneumoniae (20 µL)

Salmonella typhi (20 µL)

Staphylococcus aureus (Sa1) (20 µL)

Figure 8. Diamètre des zones d'inhibition (Aromatogramme) sur quelques espèces microbiennes (**Originale, 2017**).

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par plusieurs études. Dans le même sillage, **Sookkhee et al. (2003)** rapportent que l'HE de *C. citratus* a présenté l'activité anti-candidosique 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 (**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 de *Aspergillus niger* (**Joarder et Khatun, 1982**) et de *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 des 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) glucane sur la chitine 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 contenant le groupement SH dans leur site actif (**Celimene et al., 1999**). Plusieurs auteurs, notamment **De Billerberk et al. (2001)**, **Mares et al. (2004)**, **Rai et Mares (2003)** ; **Rasooli et Abyaneh (2004)** et **Sharma et Tripath (2008)**, 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.

Sur le plan phytochimique, 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 Géraniol, Néral et Géraniol, qui ont déjà prouvé leur fort pouvoir dans l'inhibition de la croissance des champignons (**Lee et al., 2008**). Un mélange naturel de Géraniol et de Néral (citral), a été signalé pour son activité antifongique (**Onawunmi, 1988**). Aussi, le Géraniol, un monoterpénol oxygéné, 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 » et dirigée par une équipe Togolaise en collaboration avec des laboratoires Européens, a été menée sur les HE de plusieurs variété de *Cymbopogon*, y compris *C. citratus*, et ce afin d'asseoir le bien fondé de leur propriétés mycocides. Les auteurs dudit travail, et au vu des résultats obtenus, recommandent l'essence de *C. citratus* et celle de *C. nardus* comme principes actifs dans des formulations galéniques (crèmes, lotions, etc.) contre les mycoses superficielles.

Les résultats que nous avons obtenus sont très prometteurs pour l'utilisation de la fraction aromatique de citronnelle comme principe actif dans des préparations pharmaceutiques 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*.

3.2.2. Technique 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 quantités croissantes en HE (20, 40 et 60 µL). Les résultats de cette étude sont rapportés dans les **Tableaux V.** et **VI.**

A la lecture de ces résultats, il apparait clairement qu'en microatmosphère, c'est toujours les bactéries à Gram + qui sont les plus sensibles à l'action inhibitrice de la phase vapeur avec des DZI variant entre 29 et 80 mm au faible dosage. Une inhibition totale (> 85 mm) a été rapportée pour les staphylocoques à coagulase positive responsables de certaines infections cutanées (suppurations). En revanche et comme ayant déjà été rapporté dans la méthode d'aromatogramme, c'est toujours le *P. aeruginosa* qui demeure le germe le moins sensible avec, cette fois-ci, une résistance totale à la vapeur d'essence. 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'à 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**).

Contrairement à l'aromatogramme, *E. coli* a été inhibée totalement à 40 et 60 µL/disque (**Figure 10.**). En outre, nous avons constaté une action antibactérienne de l'essence « dose-dépendante » et ce pour toutes les souches bactériennes étudiées (**Figure 9.**).

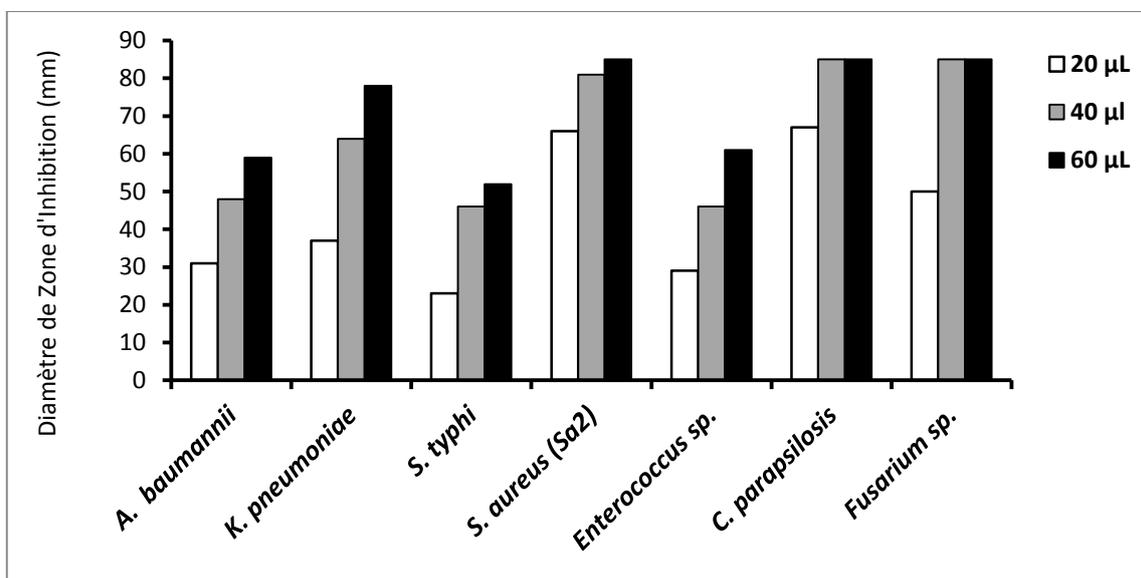


Figure 9. Action antimicrobienne « dose-dépendante » de l'essence de citronnelle *in vitro*.

Contrairement aux ATB qui sont des substances chimiques non volatiles, les essences aromatiques peuvent s'évaporer, même à température ambiante, et agir sur les germes infectieux en inhibant leur croissance. Cette particularité peut être exploitée dans l'assainissement des ambiances et la lutte contre les contaminations aéroportées.

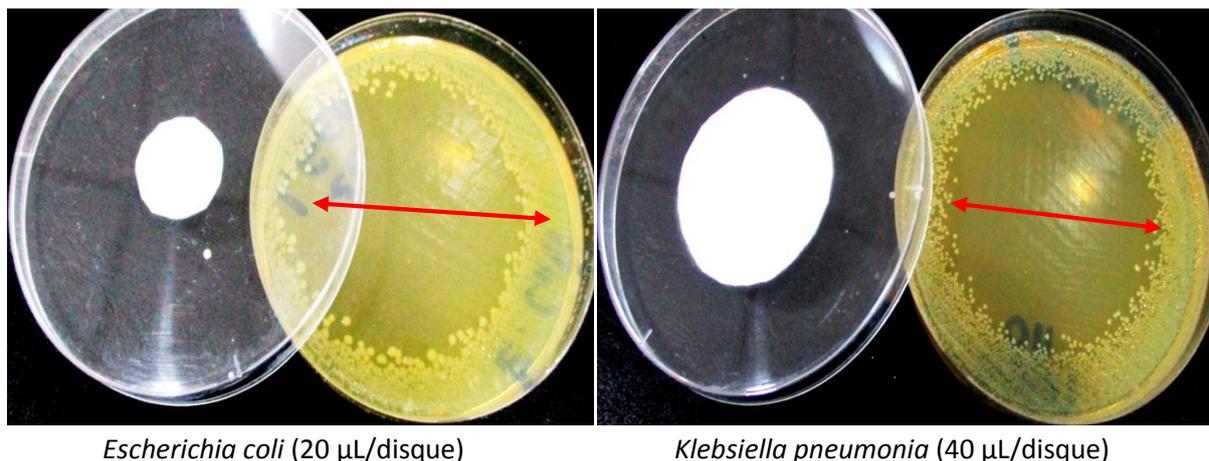


Figure 10. Zone d'inhibition (microatmosphère) de deux espèces bactériennes.(originale,2017)

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). 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 aromatoگرامme. 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.

Toutes les souches fongiques ont été inhibées totalement à la dose de 40 et 60 µL d'essence par disque. Pour la plus faible dose, une inhibition totale a été obtenue pour certaines souches (*C. albicans*, *A. niger*, *A. terreus*) et partielle pour d'autres (*C. parapsilosis*, *A. brasiliensis* et *Fusarium* sp.) avec des DZI qui s'échelonnent entre 24 et 67 mm. Contrairement aux résultats notés en phase liquide, *Penicillium* sp a été inhibée totalement en phase vapeur et c pour toute les doses utilisées.

Les résultats enregistrés en microatmosphère confirment, si besoin est, le pouvoir fongicide de la phase volatile de l'essence végétale *in vitro* et laissent présager pour d'éventuelles applications dans le domaine de la désinfection atmosphérique hospitalière.

En ce qui concerne l'activité antifongique des HE, il apparait 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 huiles aromatiques (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 composants joue un rôle important dans l'inhibition des champignons. Pour d'autres auteurs (**Meincken et al., 2005 ; Ebrahimabadi et al., 2010**), les monoterpènes (Citral), diffusent et endommagent les structures de 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 pourront être utilisées en tant qu'agents de préservation 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 XVI^{ème} siècle et jusqu'à la fin du XIX^{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 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 imitée 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 scientifique (**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 Méricilline (SARM). Les

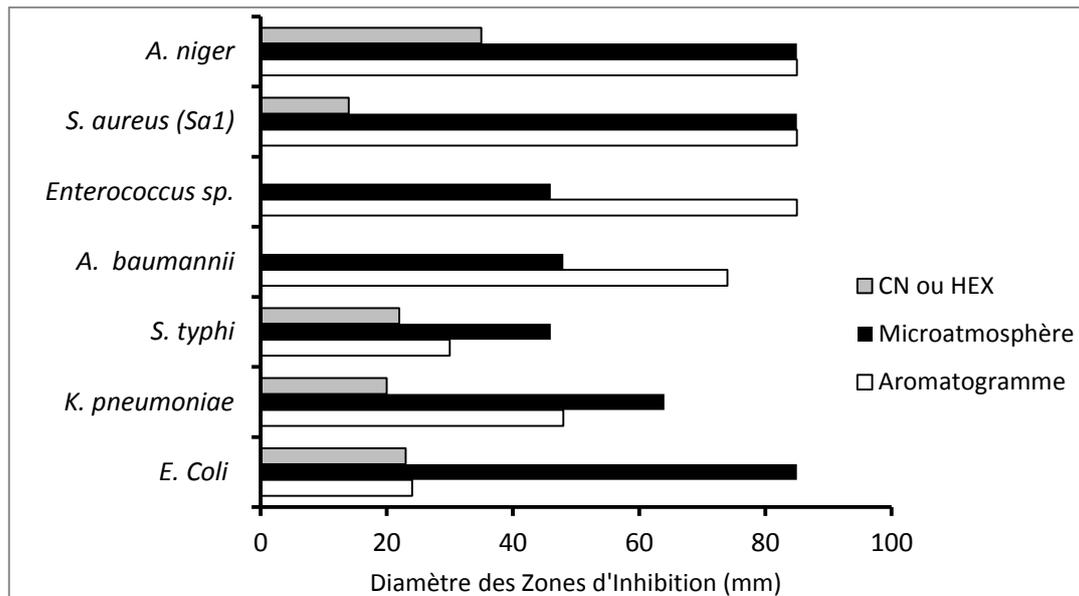
résultats de cette étude ont montré que la vapeur de l'HE a révélée une certaine activité inhibitrice sur la croissance de toutes les bactéries étudiées, mais qu'elle est variable et dépendante du temps d'exposition. De plus, d'autres souches ont été inhibées *in vitro* (*Acinetobacter baumannii*, *Clostridium 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'efficacité de l'essence de Citronnelle ainsi que son composé majoritaire (le citral) dans la réduction de la croissance mycélienne de *Candida albicans* et ce d'une façon significative. 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.

3.2.3. Etude comparative : Aromatogramme vs Microatmosphère

Au cours de notre travail et à la lecture comparative (Figure 11.) entre les résultats obtenus par les deux méthodes, aromatogramme et microatmosphère, il apparait clairement qu'il n'existe pas une différence notable entre les deux méthodes, excepté pour les espèces du genre *Pseudomonas* où une résistance totale a été constatée en microatmosphère. En revanche, cette dernière technique a présenté une action inhibitrice supérieure à celle de l'aromatogramme, en particulier avec *E. coli* et *K.pneumoniae*.

D'un autre coté et en ce qui concerne les champignons, aucune différence notable ne peut être dégagée pour les différentes souches fongiques étudiées sauf pour *Penicillium* sp. où les DZI en microatmosphère (85, 85 et 85 mm) sont largement supérieurs à ceux de l'aromatogramme (36, 48 et 78 mm) pour les différentes quantités (20, 40 et 60 µL) en HE utilisées, respectivement.



CN : Antibiogramme (Gentamycine 10 µg/disque) ; HE : Antifongigramme (Hexomedine 20µL/disque)

Figure 11. Etude comparative : Aromatogramme vs Microatmosphère (20µL) vs Antibiogramme.

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

3.2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI a été accomplie uniquement pour les germes microbiens ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action antimicrobienne de l'HE. Les germes résistants n'ont pas été inclus lors de cette étude.

Tableau VII. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) pour différentes souches microbiennes.

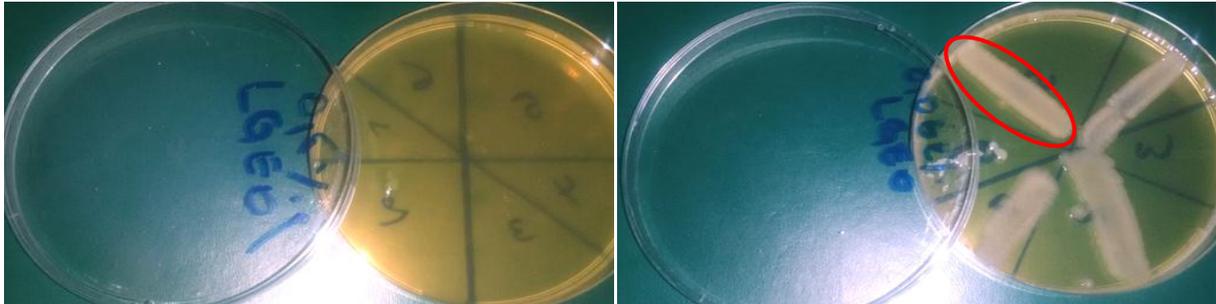
CMI (%) Bactéries		CMI (%) Levures	
<i>Escherichia coli</i>	0,5	<i>Candida albicans</i>	0,0625
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,25	<i>Candida parapsilosis</i>	0,031
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	<i>Candida tropicalis</i>	0,031
<i>Salmonella typhi</i>	0,5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sac 1)	0,0625
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa1)	0,0625	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sac 1)	< 0,007
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa2)	0,125		
<i>Enterococcus</i> sp.	0,125		

Du fait de la non miscibilité des HE dans la gélose, l'incorporation d'un dispersant (Tween 80) 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% à 0.007%. Les résultats de cette analyse sont rapportés dans le **Tableau VII** et **Figure 13**. 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 0.0625 et 0,125%. Loin d'être exhaustif, *S. aureus* (Sa1) a présenté la CMI la plus faible (0.0625%) alors que la plus forte valeur (0.5%) a été notée pour *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. typhi*.

Mais c'est principalement les souches levuriformes qui ont montré la plus grande sensibilité à l'HE de *Cymbopogon citratus* avec des CMI qui oscillent entre 0.0625% (*C. albicans*) à 0.007% (*S. cerevisiae*). Une concentration de 0.031 % d'HE était suffisante pour inhiber la croissance de *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, deux pathogènes opportunistes.

La sensibilité de *S. cerevisiae*, une levure impliquée dans les contaminations alimentaires et la l'altération de la qualité marchande des denrées alimentaires, en particulier les produits sucrés, laisse entrevoir une possibilité d'utilisation de cette fraction aromatique dans la préservation naturelle des aliments et des boissons. Cette thématique sera abordée ultérieurement dans lors de notre étude.



Gélose Muller-Hinton à 0.5% d'huile essentielle
(Aucune croissance bactérienne)

Gélose Muller-Hinton à 0.625% d'huile
essentielle
(Croissance de quatre espèces bactérienne)

Figure 12. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par macrodilution.
(Originale, 2017)

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 ; Singh et al., 2011 ; Sonker et al., 2014**). Aussi et d'un point de vue microbiologique, cette huile a été classée dans la catégorie des antimicrobiens les plus puissants (**Pattnaik et al., 1997 ; Zulfa et al., 2016**). 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 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ et 0,001 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivement.

En revanche, nos résultats semblent être en désaccord avec ceux obtenus par **Hammer et al. (1999)**. Ces derniers ont rapporté que, parmi les 52 HE, celle de citronnelle est la plus active sur *P. aeruginosa*. Par conséquent, il est difficile, voire problématique, de faire des comparaisons entre les valeurs des CMI de différentes publications. D'un coté, la composition chimique de l'huile varie considérablement, en quantité et en qualité, entre les différents travaux et, de l'autre, les méthodes utilisées pour asseoir cette activité *in vitro* et le choix des microorganismes étudiés 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 3.5**). Ces concentrations peuvent être exprimées en µg/mL (**Oussou et al., 2008**), en µL/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 VIII. Résultats des CMI de citronnelle de plusieurs équipes (in **Akhila, 2010**).

Souches	CMI	Auteurs (année)	Notre étude (2017)
<i>E. coli</i>	0,06% (v/v)	Hammer et al. (1999)	0,5% (ATCC)
	> 0,8%(v/v)	Inouye et al. (2001)	
<i>K. pneumoniae</i>	0,25% (v/v)	Hammer et al. (1999)	0.5%
<i>P. aeruginosa</i>	1% (v/v)	Hammer et al. (1999)	Résistante
	1,3% (v/v)	Kalembe et Kunicka (2003)	
<i>S. typhi</i>	0,25% (v/v)	Hammer et al. (1999)	0 ,5%
	0,8% (v/v)	Kalembe et Kunicka (2003)	
	1,6 µL/mL	Oussalah et al. (2007)	
<i>S. aureus</i>	0,06% (v/v)	Hammer et al. (1999)	0,0625% (ATCC)
	0,1% (v/v)	Inouye et al. (2001)	0,125%
	0,3% (v/v)	Kalembe et Kunicka (2003)	
<i>C. albicans</i>	0,06% (v/v)	Hammer et al. (1999)	0,0625%
	322 µg/mL	Devkatte et al. (2005)	

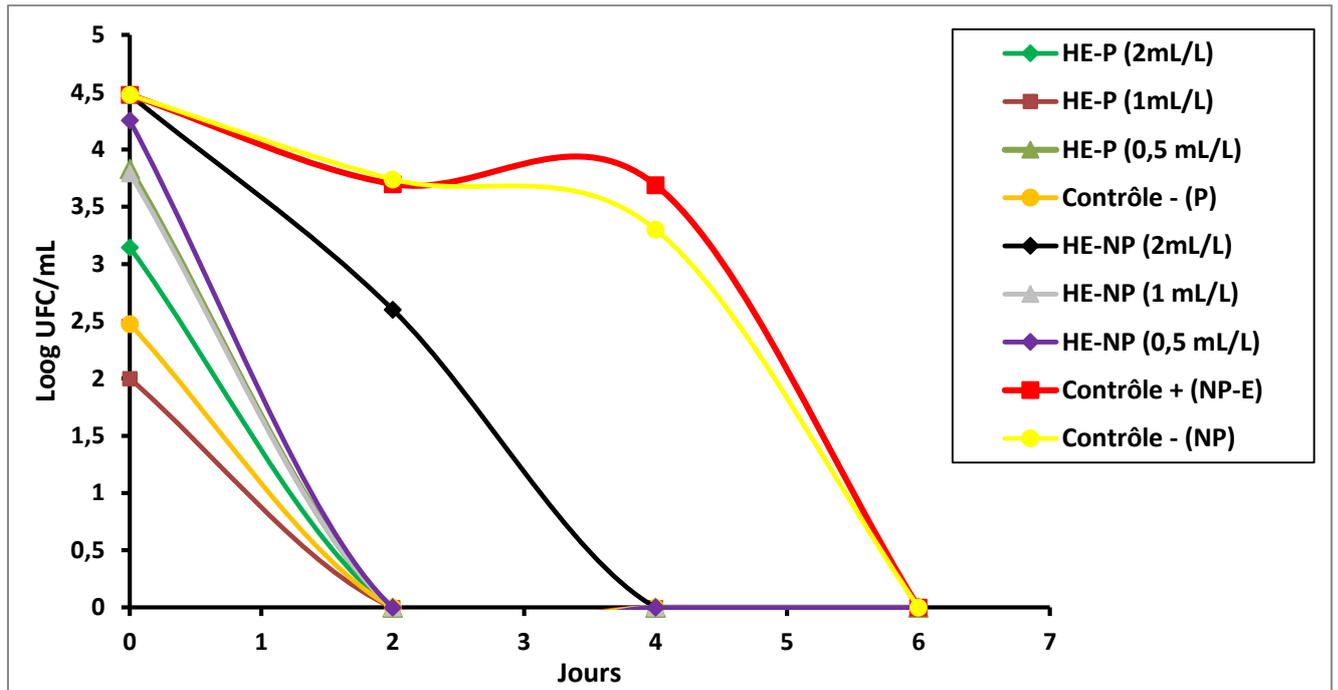
Le mode d'action des HE sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Burt, 2004**). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**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. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action (**Burt, 2004**).

3.3. Activité antifongique de l'huile essentielle dans une matrice alimentaire

L'efficacité de l'HE de la citronnelle a été vérifiée en incorporant cette huile dans une matrice alimentaire (boisson gazeuse sucrée et fruitée Orangina®). A cet effet, l'essence a été ajoutée au jus pour l'obtention, au final, de plusieurs concentrations de (2, 1, 0.5 mL/L). Et pour étudier la cinétique de la croissance fongique, nous avons inoculé chaque échantillon par une charge de *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, un 3^{ème} lot de boisson a été supplémenté en HE suivi par un faible traitement thermique (80°C pendant 2 min). Ceci a été réalisé pour apprécier l'efficacité d'une combinaison HE-traitement thermique sur l'inhibition de la croissance fongique, en comparaison avec du jus conservé uniquement avec de l'HE.

A J-0 et à la lecture des résultats obtenus, une croissance fongique est notée pour tous les échantillons traités avec l'HE où les valeurs de Log UFC/mL obtenus varient entre 3.1 et 3.9 pour les jus ayant subi une combinaison HE-Traitement thermique et entre 4.2 et 4.5 pour les lots traités uniquement avec HE (**Figure 14**). Cependant et à J-2, une inhibition totale de la croissance levuriforme a été notée pour les lots ayant subi un traitement thermique (**Figure 15**), en comparaison avec le jus conservés avec des produits de synthèse (benzoate de sodium et sorbate de potassium) où l'inhibition totale n'a été obtenue qu'au 6^{ème} jour de l'expérience.

En définitif, l'HE de citronnelle était apte à réduire totalement la croissance fongique à toutes les doses utilisées, seules ou en combinaison avec un traitement thermique. Elle a démontré le bien-fondé de son utilisation comme conservateur alimentaire naturel.



HE : Huile essentielle ; P : Pasteurisation ; HE-P : HE-Pasteurisation; HE-NP : Huile essentielle-Non pasteurisation ; E : Conservateurs de synthèse (Benzoate de sodium + Sorbate de Potassium). UFC : Unité Formant Colonie.

Figure 13. Cinétique de la croissance fongique dans une matrice alimentaire (boisson Orangina).

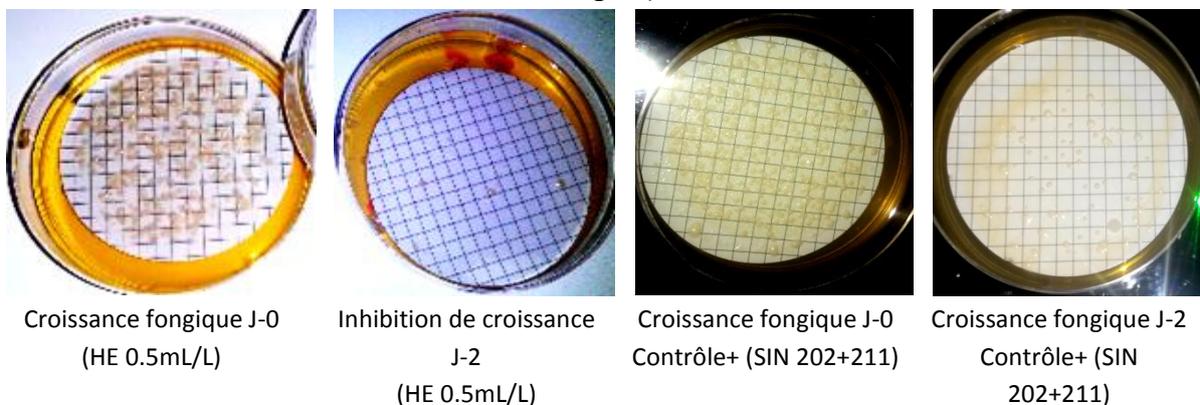


Figure 14. Résultats comparatifs de la cinétique d'inhibition de *S. cerevisiae* par filtration (Originale, 2017).

De nombreux produits d'origine végétale sont déjà utilisés dans l'alimentation. Il s'agit principalement de plantes ou d'extraits de plantes, d'épices et d'HE. Parmi tous les produits d'origine végétale, les HE semblent être les plus prometteuses. Pour garder l'image naturelle « green » des aliments, une des possibilités est l'utilisation des HE comme des additifs antimicrobiens. Elles stimulent d'une part l'appétit grâce à leur odeur typique. Elles ont aussi, selon les différentes huiles, des propriétés antimicrobiennes et antiseptiques, certainement dues à un changement de la solubilité des lipides membranaires bactériens. Il a également été

démontré *in vitro* que les constituants hydrophobes des HE sont capables de désintégrer les membranes d'*E. coli* ou de *S. typhimurium* (Hyldgaard *et al.*, 2012)

A nos jours, rares sont les travaux qui ont été consacré à l'étude de l'efficacité antimicrobienne des HE dans une matrice alimentaire (Burt, 2004). La majorité des études sont basées sur l'évaluation de cette activité *in vitro*. Dans notre travail et au vu des résultats obtenus, la fraction aromatique de citronnelle pourra être recommandée comme antimicrobien naturel, en substitution aux aditifs alimentaires chimiques, non dénudés d'effet indésirables. Cette approche est intéressante d'autant plus que cette essence est classée dans la liste des produits « généralement reconnus comme sains » (Generally Recognized As Safe, GRAS), et approuvée comme aditif alimentaire par la FDA.

Certains travaux ont confirmé la possibilité d'utiliser les HE pour prolonger la durée de la conservation des aliments. C'est l'exemple d'une étude récente (Tyagi *et al.*, 2013), publié dans « Food Chemistry », a rapporté que l'incorporation de l'essence de menthe verte, dans les jus de fruit de pomme, était capable réduire la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et que cette réduction serait totale en combinaison avec un traitement thermique de courte durée.

Sur le plan économique, la complexité des HE explique actuellement pourquoi les industriels agro-alimentaires ont toujours préféré les composés synthétiques. Ils sont principalement intéressés par la découverte des structures chimiques actives à partir desquelles ils peuvent développer et préparer des analogues synthétiques. Ce sont plus contrôlables du point de reproductibilité, brevetabilité, et sont plus économiquement viables. En conséquence, les différents composants d'HE sont actuellement sous la recherche spécifique pour élucider leur activité particulière (Hyldgaard *et al.*, 2012).

3.4. Evaluation des propriétés anti-inflammatoires de l'huile essentielle *in vivo*

3.4.1. Activité anti-inflammatoire aigue

En premier temps, l'activité anti-inflammatoire de l'essence de citronnelle a été effectuée, *in vivo*, par la méthode de l'œdème à la carraghénine. Les résultats de ce screening anti-inflammatoire, à travers la mesure du poids des pattes gauche et droite pour chaque souris sacrifiée des différents lots étudiés, sont présentés dans le **Tableau IX** et **Figure 15**.

Tableau IX. Résultats de l'activité anti-inflammatoire aigue *in vivo*.

Traitement (Dose)	Poids (g) PPG ± EM	Poids (g) PPD ± EM	DPP (g) ± EM	% Réduction œdème
HE (200 µg/Kg)	0,1569±0,0083	0,1201±0,0093	0,0368±0,0055 AB	18,90602056
HE (20 µg/Kg)	0,1741±0,0056	0,1333±0,0052	0,0407±0,0073 AB	10,24229075

HE (2 µg/Kg)	0,1708±0,0241	0,1265±0,0063	0,0443±0,021 B	2,31277533
AINS	0,1784±0,0122	0,1488±0,0039	0,0296±0,0087 A	34,69162996
Contrôle – (NaCl, 0.09%)	0,1717±0,0140	0,1263±0,0114	0,0454±0,0148 B	/

HE : Huile Essentielle ; PPG : Moyenne du Poids des Pattes Postérieures Gauches (grammes) ; PPD : Moyenne du Poids des Pattes Postérieures Droites ; DPP : Différence de Poids des Pattes ; AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien ; EM : Ecart-Moyen.

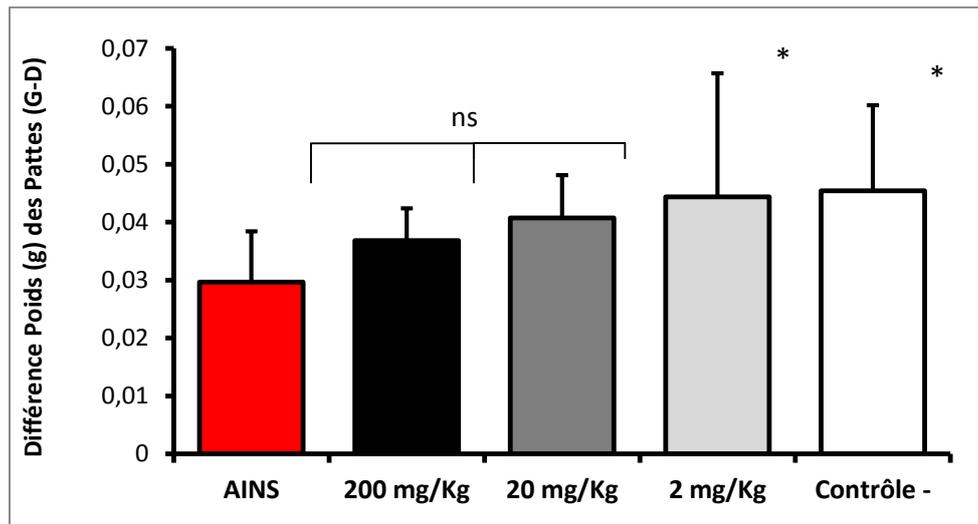
Les lettres alphabétiques identiques dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative au risque de 5% avec le test ANOVA à sens unique suivie par un test de Fisher LSD de comparaison par paire.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire, rapportés dans le Tableau 3.6, montrent les variations du pourcentage de réduction de l'œdème (PPG des souris) des différents essais (AINS et HE administrée à différentes doses), par rapport au contrôle négatif (eau physiologique). Le lot traité avec le médicament de synthèse (Indométacine) est celui qui a présenté un pourcentage de réduction de l'œdème le plus important avec un taux de 34.69%, suivie par le lot traité avec une dose de 200 µg/kg d'HE (18.9%).

Les médicaments anti-inflammatoires interviennent en général en s'opposant à l'effet de ces médiateurs chimiques : histamine, sérotonine, kinines et prostaglandines (**Kaloustian et Hadji Minaglou, 2012**).

Ces résultats corroborent avec ceux donnés par la DPP où le lot contrôle positif est celui qui a présenté un poids le plus faible (0.0296 g), suivie par le lot traité avec une dose de 200 µg/kg d'HE (0.0368 g).

L'étude statistique a confirmé cette tendance en indiquant qu'il n'existe aucune différence significative ($p > 0.05\%$) entre les lots contrôle positif - HE (200 µg/kg) - HE (20 µg/kg) au test de Fisher LSD de comparaison par paire. En revanche, une différence statistique ($p < 0.05\%$), avec le même test cité précédemment, a été enregistré entre le contrôle positive et le lot traité avec une dose 2 µg/kg. Ceci nous ramène à conclure que l'efficacité anti-inflammatoire de l'essence de citronnelle est avérée uniquement à forte dose avec un possible effet « dose-dépendant ». Cette constatation est à prendre avec précaution car elle doit être superposée aux données toxicologiques. Le naturel ne rime pas toujours avec innocuité. C'est pourquoi des études, tant pharmacologique que toxicologique, sont encore nécessaires.



AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien (Indométacine) ; Contrôle – (Eau physiologique, NaCl 0.09%) ;
 ns : différence non significative ($P>0.05$) au test ANOVA suivi par un test de comparaison par paire de Fisher ;
 * : Différence significative ($P<0.05$).

Figure 15. Pouvoir anti-inflammatoire par la mesure de différence de poids des pattes.

De nombreux végétaux sont connus pour leur activité anti-inflammatoire, c'est le cas en particulier de citronnelle (**Shah et al., 2011 ; Lawal et al., 2017**). Bien que les vertus thérapeutiques d'HE de citronnelle soient connues, très peu sont les publications scientifiques qui mettent en exergue cette activité.

Les HE sont utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes ou l'arthrite (**Maruyama et al., 2005**). Plusieurs études ont, par exemple, mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'HE de *Melaleuca alternifolia* (**Koh et al., 2002; Caldefie-Chézet et al., 2004; Caldefie-Chézet et al., 2006**) et de son composé principal, l'alpha-terpinéol (**Hart et al., 2000**). Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation.

Les HE, contenant en quantité importante des aldéhydes monoterpéniques aliphatiques, sont utilisées depuis longtemps, comme anti-inflammatoire par voie externe mais délaissées en tant qu'anti-inflammatoire *per os* alors qu'elles pourraient être facilement associées aux AINS afin d'en augmenter l'activité et d'en diminuer les effets néfastes sur les muqueuses. Si la mélisse et la verveine sont peu utilisées dans ce cadre à cause de leur prix, Lemongrass, eucalyptus citronné et citronnelle de Java font partie des classiques de l'aromathérapie antalgique et anti-inflammatoire (**De Cássia da Silveira et al., 2013**).

Seules quelques molécules et des HE plus ou moins étudiées « scientifiquement » ont été revues. Cependant, l'arsenal thérapeutique de l'aromathérapie est bien plus vaste et s'appuie,

non seulement sur ce que les anglo-saxons appellent « Evidence Based Medecine » mais aussi sur une tradition bientôt millénaire de l'utilisation des HE en thérapeutique.

Le citral, les HE de citronnelle et les aldéhydes monoterpéniques aliphatiques, d'une manière générale, possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Goetz et Ghedira, 2012) par :

- inhibition de la production de cytokines par inhibition du facteur de transcription NF- kappa B ;
- inhibition de la production de NO par la suppression de l'expression de l'iNOS et de l'activation du NF-kappa B ;
- inhibition de la COX-2.

L'administration orale chez l'homme de citral (100-800 mg/kg), composé majoritaire de citronnelle, a montré une activité anti-inflammatoire sans production de lésions gastriques. Ces résultats ont été comparés avec les effets anti-inflammatoires et les lésions gastriques produites par 30 mg/kg d'indométacine *per os*. L'association dans une même HE ou dans une même préparation, de citral et de citronellal pourrait augmenter les effets anti-inflammatoires des deux molécules, comme dans le cas de l'HE de fruit de *Cinnamomum insularimontanum* Hayata – citronellal 24,64 %, citral 35,89 % (Goetz et Ghedira, 2012 ; De Cássia da Silveira *et al.*, 2013).

L'autre recommandation à formuler consiste à utiliser un appareil spécifique pour la mesure de l'augmentation de l'œdème dans les pattes, en l'occurrence le Pléthysmomètre. Ce dernier permet d'obtenir des mesures exactes concernant le volume (en millilitre) de l'augmentation de l'œdème dans les PPG. En effet, la quasi-totalité des publications et des articles scientifiques mis en ligne mentionnent l'utilisation de cet instrument de mesure dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire (Maruyama *et al.*, 2006 ; Su *et al.*, 2010).

3.4.2. Activité anti-inflammatoire topique

Après avoir effectué le test à la carraghénine pour estimer l'action anti-inflammatoire aigue de l'essence de citronnelle, il nous a semblé nécessaire d'évaluer cette activité par d'autres méthodes. De ce fait et au vu que la majorité des HE sont administrées localement (voie cutanée), nous avons penché sur l'étude de cette activité par la méthode d'induction de l'inflammation par le xylène au niveau des oreilles des souris. L'application d'un agent irritant comme le xylène a provoqué des dommages aux cellules et des gonflements au niveau des oreilles gauches et un œdème dans ces derniers et ce dans tous les lots.

Les résultats de cette étude, à travers la mesure du poids des oreilles gauche-droite des animaux des différents lots, sont présentés dans le **Tableau X**.

Le lot traité avec un AIS (Bétaméthasone) est celui qui a le mieux répondu au traitement avec un taux de réduction de l'œdème le plus élevé (76.68%), suivi par le groupe traité avec la plus faible dose en HE (82 mg/kg) où nous avons noté une réduction d'œdème de l'ordre de 54%. Par ailleurs, un taux similaire (33.6%) a été constaté entre les groupe traité par AINS (Gel de Diclofenac de sodium) et celui avec une dose de 410 mg/kg d'HE.

Tableau X. Activité anti-inflammatoire topique *in vivo* mesurée par le taux de réduction de l'œdème.

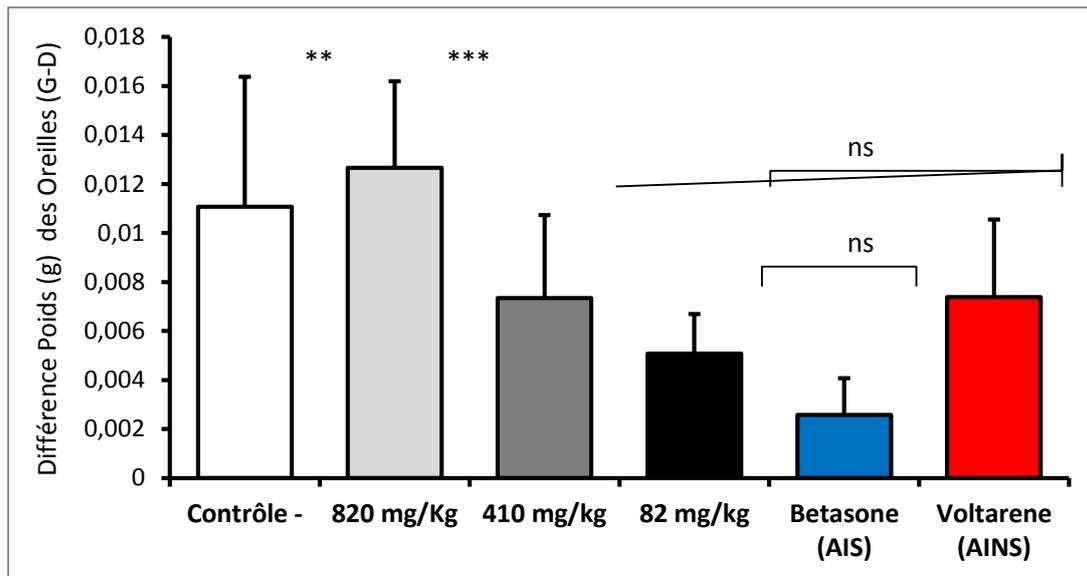
Traitement (Dose)	OG ± EM	OD ± EM	DPO ± EM	% Réduction Œdème
HE pure (820 mg/Kg)	0,0305±0,0027	0,0178±0,0015	0,0126±0,0053 D	-14,39759036
HE diluée 50% (410 mg/kg)	0,0237±0,0042	0,0164±0,0011	0,0073±0,0033 BC	33,6746988
HE diluée 10% (82 mg/kg)	0,0204±0,0035	0,0153±0,0020	0,0050±0,0016 AB	54,09638554
Betason® (AIS)	0,0180±0,0023	0,0155±0,0012	0,0025±0,0014 A	76,68674699
Voltarene® (AINS)	0,0207±0,0037	0,0133±0,0009	0,0073±0,0031 BC	33,31325301
Contrôle -	0,0304±0,0033	0,0193±0,0036	0,0110±0,0053 CD	

HE : Huile Essentielle ; OG : Moyenne du poids des Oreilles Gauches (grammes) ; OD : Moyenne du poids des Oreilles Droites (grammes) ; DPO : Moyenne de Différence des Poids des Oreilles G-D (grammes) ; EM : Ecart-Moyen ; AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien. AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien ; Contrôle - : Huile d'amande douce.

Les lettres alphabétiques identiques dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative au risque de 5% avec le test ANOVA à sens unique suivie par un test de Fisher LSD de comparaison par paire.

Une étude statistique a été menée pour vérifier l'efficacité des différents traitements dans la réduction de l'inflammation locale en mesurant la différence du poids des oreilles gauche et droite. Les résultats de cette étude sont consignés dans la **Figure 16**. Dans le même sillage des résultats révélés précédemment, l'étude statistique a confirmé l'efficacité de l'essence de citronnelle dans la réduction de l'inflammation locale uniquement aux faibles doses (82 mg/kg). Aucune différence statistique ($p > 0.05$) n'a été rapportée aussi bien pour le contrôle + AIS que l'AINS.

Cette approche méthodologique, consistant à comparer la différence de poids des oreilles pour chaque lot, est la plus adéquate et permet de mieux apprécier le pouvoir anti-inflammatoire d'une substance naturelle, comparativement à la méthode de calcul du taux de réduction de l'œdème.



AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien = Betasone® 0.05% (Bétaméthasone, Sidal, Algérie); AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdiens = Voltarène® (Diclofénac, Gel 50g, Novartis, France); G-D : Différence de poids des oreilles (gauche-droite) (g); Contrôle - : Huile d'amande douce. ns: différence non significative au risque de 5% au test ANOVA à sens unique suivie par *Tukey post-hoc* multi-comparaison ($p > 0.05$). ** : Différence hautement significative ($P < 0.01$); *** : Différence très hautement significative ($P < 0.001$)

Figure 16. Mesure de l'inflammation topique par la différence de poids des oreilles.

A ce jour et d'après la littérature scientifique, peu de travaux scientifiques qui mettent en exergue le pouvoir anti-inflammatoire topique de l'essence de citronnelle. Parallèlement, d'autres HE ont été testées pour la même activité. Nous citerons l'étude d'**Al-Reza et al. (2010)** sur les propriétés anti-inflammatoires des HE des graines de Jujubier (*Zizuphus jujuba*). Les auteurs de cette étude ont rapporté que le traitement à voie cutanée de l'essence à la concentration de 1 et 10% réduit d'une façon significative le gonflement des oreilles des souris de 0.3 et 0.35 mm respectivement. Ils ont démontrés aussi que cette activité est supérieure à celle d'un anti-inflammatoire de référence (Hydrocortisone). Aussi, il a été trouvé que la réduction d'œdème été de 51 et 53% pour les deux dilutions d'HE.

L'inflammation est une réponse naturelle de l'organisme à une agression physique, chimique ou biologique. Elle est utile lorsqu'elle ne s'installe pas dans la durée. Son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Mais elle favorise également différents processus pathologiques. De récentes études ont montré que les enzymes pro-inflammatoires lipoxigénases (LOX), en particulier la 5-LOX, ainsi que les Cyclo-oxygénases sont lourdement impliquées dans un certain nombre de maladies, incluant l'athérosclérose, le cancer et le diabète. Avec les années, l'inflammation est de plus en plus présente dans l'organisme et prépare le lit des pathologies qui accompagnent souvent le vieillissement (**Goetz et Ghedira, 2012**).

On recherche depuis de nombreuses années, dans l'industrie pharmaceutique, des substances permettant de traiter l'inflammation. A cet égard, nombreuses sont celles qui ont déjà été décrites, connue dans la littérature sous les appellations d'anti-inflammatoires stéroïdiens ou non-stéroïdiens (AIS ou AINS).

Outre que les anti-inflammatoires connus présentent souvent des effets secondaires non négligeables, il demeure intéressant de disposer de nouveaux produits à activité anti-inflammatoire.

3.4.3. Etude histopathologie

Afin de confirmer, à échelle cellulaire, l'activité anti-inflammatoire topique déjà explorée par le test de l'œdème aux oreilles induit par xylène, nous avons réalisé des coupes histopathologiques au niveau des oreilles gauche-droite de toutes les souris par la technique de coloration Hématoxyline-Eosine, en comparaison avec le contrôle négatif. Les observations, réalisées par microscopie photonique, sont illustrées dans la **Figure 17**.

Pour le lot contrôle+ traité par un gel AINS (Voltarène®), nous avons noté une faible présence d'œdème et une inflammation neutrophilique d'intensité minimale au niveau du derme superficiel (Fig. K-L). En revanche, chez le lot contrôle - traité par l'excipient (huile d'amande douce), un taux d'inflammation suppurée d'intensité sévère, représenté par des polynucléaires neutrophiles (PNN) dégénérés, a été constaté au niveau du derme, de l'épiderme, des tissus musculaire et cartilagineux (Fig. M-N) des oreilles gauches. Ceci démontre l'efficacité du médicament AINS (Diclofenac de sodium) dans la réduction de l'œdème et la diminution de l'infiltration cellulaire des PNN.

L'inflammation provoqué est un phénomène qui implique entre autres, une série de réactions cellulaires locales et la libération de cytokines et autres médiateurs tels que les prostaglandines, les leukotriènes, la bradykinine, l'histamine ou encore la sérotonine. Aussi, elle se manifeste par une modification du flux sanguin avec, au niveau du site agressé, une augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant une fuite de protéines plasmatiques vers le fluide extracellulaire, ainsi qu'une extravasation de cellules sanguines, notamment des leucocytes neutrophiles et des macrophages vers le site inflammatoire.

Par contre et concernant le second lot contrôle + traité par un AIS (Bétasone®) (Fig. I-J), nous avons noté une persistance de l'œdème inflammatoire avec un fort recrutement des PNN avec follicule pileux au niveau de l'épiderme, des tissus musculaire et cartilagineux des oreilles gauches. Ceci peut s'expliquer par la non-adéquation de cette thérapeutique (AIS) pour les

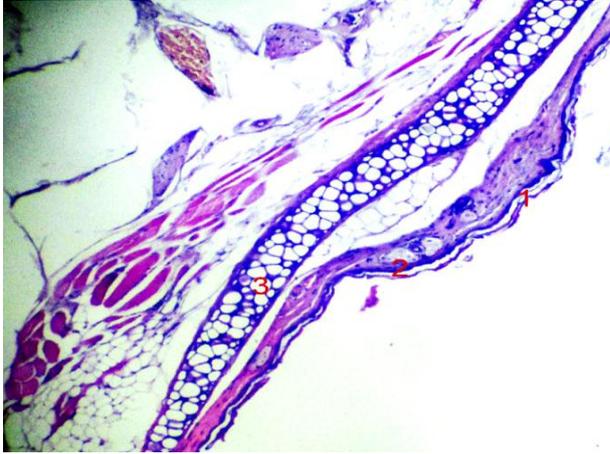
inflammations locales aiguës, comparativement au Diclofenac de sodium qui est le mieux adapté pour soulager les symptômes inflammatoires cutanés.

Concernant les lots traités avec l'essence de citronnelle (pure ou diluée dans l'huile d'amande), le meilleur résultat a été constaté avec le lot traité par une dose d'HE pure (820 mg/kg) où l'observation microscopique a dévoilé la présence d'une inflammation lympho-histiocytaire d'intensité très légère voire absente (Fig. C-D) concernant uniquement le derme supérieur avec un très faible recrutement des PNN. Par ailleurs, une inflammation suppurée (PNN), d'intensité minimale et concernant le derme ainsi que le tissu musculaire et cartilagineux (Fig. E), a été signalée chez le lot traité par l'HE de la citronnelle diluée à 50% (410 mg/kg) tandis qu'avec le lot traité avec l'HE diluée à 10% (82 mg/kg), l'étude histo-pathologique a révélé la présence d'une inflammation mixte à prédominance neutrophilique d'intensité plus au moins élevée (Fig. F), par rapport celle de la dose 50%, localisée au niveau du derme et du muscle sous-jacent. Ceci semble être en totale contradiction avec les résultats macroscopiques obtenus par le test de l'inflammation topique induite par le xylène.

D'une façon générale, les coupes histopathologique, réalisées au niveau des oreilles gauches des souris, ont dévoilé une diminution de l'œdème et un faible recrutement des PNN dans les lots traités avec l'essence de la citronnelle et ce uniquement pour les doses de 820 et 410 mg/kg d'HE. Aussi, l'intensité de l'inflammation augmente avec la réduction de la dose appliquée en HE.

En résumé, notre étude anatomo-pathologique a confirmé le pouvoir anti-inflammatoire topique de la fraction aromatique de la citronnelle au niveau cellulaire.

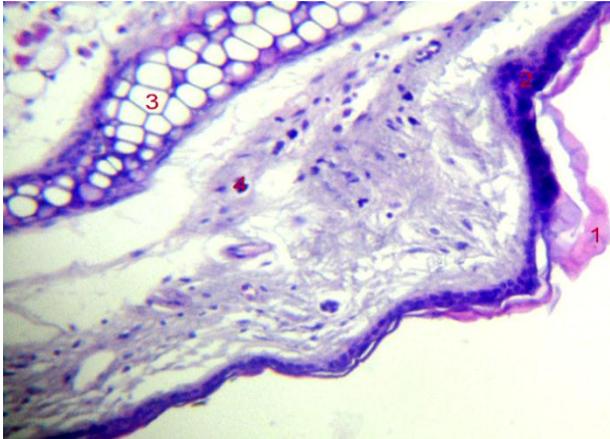
L'usage topique de l'essence de la citronnelle pourra trouver une place dans l'arsenal thérapeutique comme un ingrédient dans des préparations galéniques à visée anti-inflammatoire. Reste à confronter ces données avec une étude cyto-toxicologique approfondie. Seul l'avenir nous confirmera l'impact réel de ces nouvelles acquisitions.



A/ OD normale (sans traitement normale)(x10)

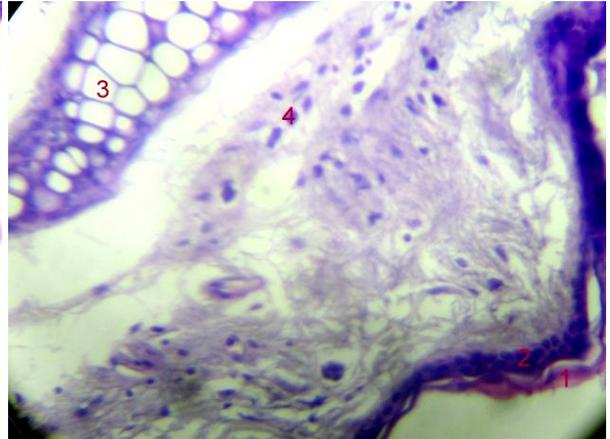


B/ OD normale (sans traitement normale) (x40)



C/ OG HE pure (820 mg/Kg)(x10)

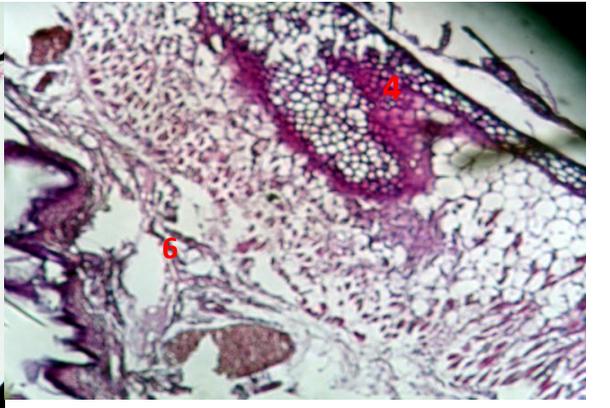
Inflammation lympho-histiocytaire d'intensité très minime (derme supérieur).



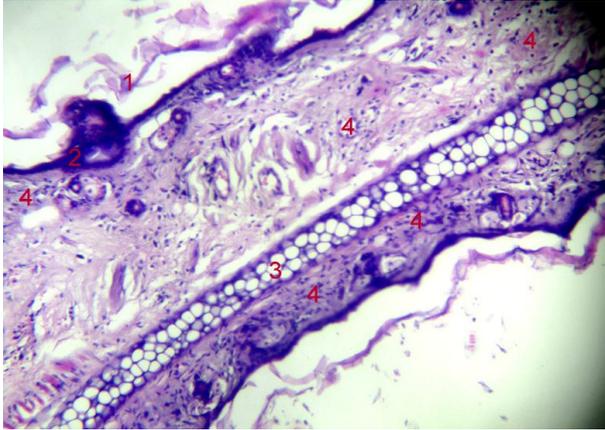
D/ OG HE pure (820 mg/Kg) (x40)



E/ OG HE 50 % (410 mg/Kg) (x10)

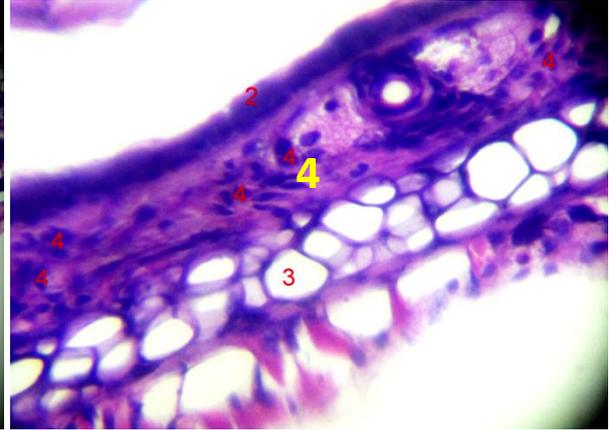


F/ OG HE 10 % (82 mg/Kg) (x10)

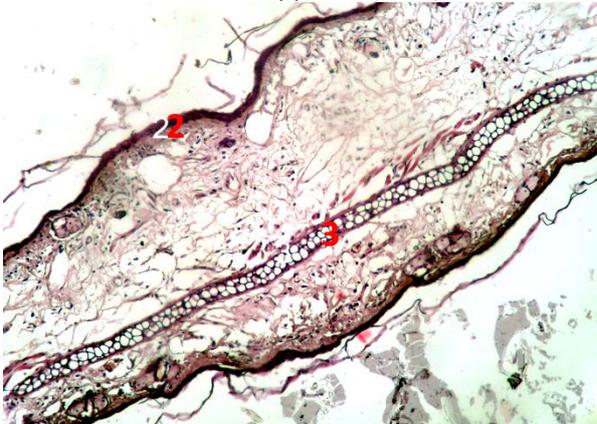


I/ OG Contrôle + : AIS = Bétasone® (x10)

Inflammation suppurée (PNN) d'intensité sévère (épiderme-derme-muscle-cartilage).

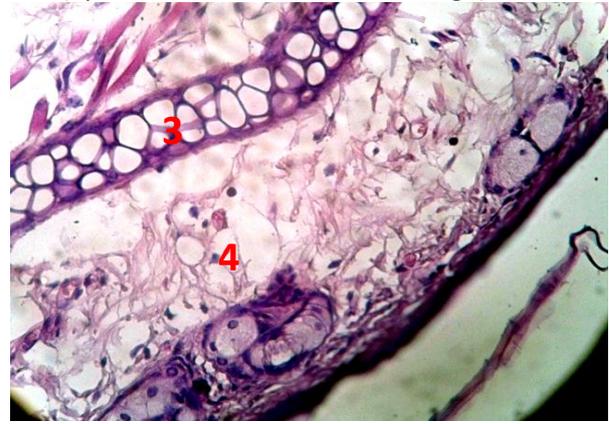


J/ OG Contrôle + : AIS = Bétasone® (x40)



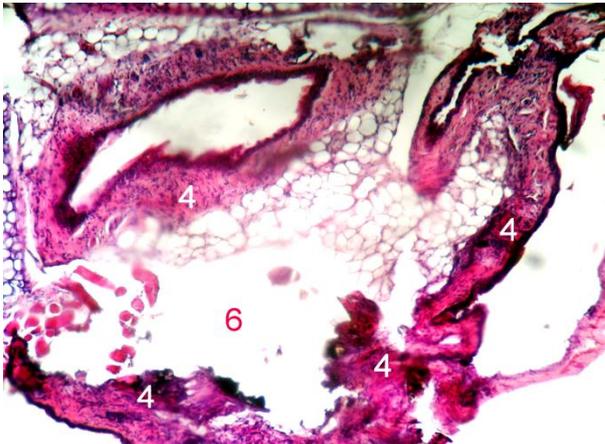
K/ OG Contrôle + : AINS = Voltarène® (x10)

Inflammation neutrophilique d'intensité minime (derme superficiel).



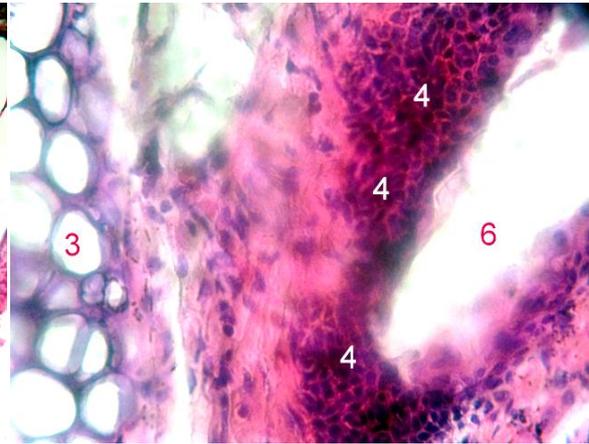
L/ OG Contrôle + : AINS = Voltarène® (x40)

Inflammation neutrophilique d'intensité minime (derme superficiel).



M/ OG Contrôle - (x40)

Inflammation suppurée (PNN) d'intensité sévère (épiderme-derme-muscle-cartilage).



N/ OG Contrôle - (x40)

Inflammation suppurée (PNN) d'intensité sévère (épiderme-derme-muscle-cartilage).

(1) Kératine ; (2) Epithélium ; (3) Cartilage ; (4) Polynucléaires Neutrophiles (PNN) ; (5) follicule pileux ; (6) œdème ; (7) muscle ; OD : Oreille Droite ; OG : Oreille Gauche ; AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien (Bétaméthasone) ; AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien (Diclofenac de Sodium).

Figure 17. Coupes histopathologiques au niveau des oreilles des souris (**Originale, 2017**).

Les plantes constituent une source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'études scientifiques rigoureuses pour leur éventuelle utilisation comme alternative, particulièrement pour le traitement des maladies anti-inflammatoires.

Une étude récente (**Al-Reza et al., 2010**) publiée dans la revue de « Food and Chemical Toxicology », a confirmé l'action anti-inflammatoire de la huile de Jojoba un niveau cellulaire à travers l'observation des coupes histopathologies réalisées sur model animal.

Les auteurs de cette même étude ont mesuré aussi la surface des tissus dermiques et hyperdermiques de l'oreille. Ils ont révélé aussi que l'épaisseur de la surface a diminué en comparaison avec le control négatif ce qui est en adéquation avec les résultats trouvés par une étude précédente (**Thakur et Pitre, 2009**). Aussi ils ont rapportés que le composé majoritaire de l'huile, à savoir l'eugénol, est doué d'une activité anti inflammatoire mais reste inférieure à celle de l'HE.

Mais l'inflammation serait réduite également par l'action de l'HE sur le système immunologique. En effet, les propriétés anti-inflammatoires des HE pourraient résulter aussi d'une action directe ou indirecte sur le système immunologique. L'action directe pourrait être due par exemple à l'activité conjuguée du cinéole et du linalool — des monoterpénols en général — contribuant à l'augmentation des gamma- et bêta-globulines, ainsi que des IgA (linalool) et donc à une immuno-stimulation. Mais ces mêmes composés réduiraient aussi l'inflammation et une augmentation exagérée des gammaglobulines par leur action antibactérienne (action indirecte).

3.5. Pouvoir cicatrisant de l'essence de citronnelle *in vivo*

L'efficacité du pouvoir cicatrisant de l'HE a été réalisée grâce à des observations macroscopiques avec recours à des techniques de planimétrie, complétées par des prélèvements histologiques. L'ensemble de ces techniques peut permettre une évaluation objective de l'effet cicatrisant des produits naturels.

3.5.1. Etude macroscopique et planimétrique

L'évolution de la cicatrisation des plaies a été étudiée par planimétrie digitale ; le principe général de cette méthode consiste en la prise d'empreintes des plaies à intervalle régulier, puis étudier l'évolution de leur surface par un logiciel de traitement d'image. Les méthodes de planimétrie digitales ont l'avantage d'être rapides, précises, et objectives (**Chang et al., 2011**).

Dans cette étude, l'activité cicatrisante de l'essence de citronnelle a été effectuée *in vivo* par application d'une crème (à base de 0.5% d'HE de citronnelle), en comparaison avec un produit de référence (Madécassol®) sur des plaies circulaires préalablement provoquées au niveau de la région dorso-cervicale des rats.

Les résultats du suivi cinétique de réduction des surfaces des plaies ainsi que les taux de rétraction, obtenus après application journalière des différents traitements sur des plaies et leur comparaison avec des plaies témoins non traitées, et sont illustrées dans les **Figures 18.** et **19**, respectivement.

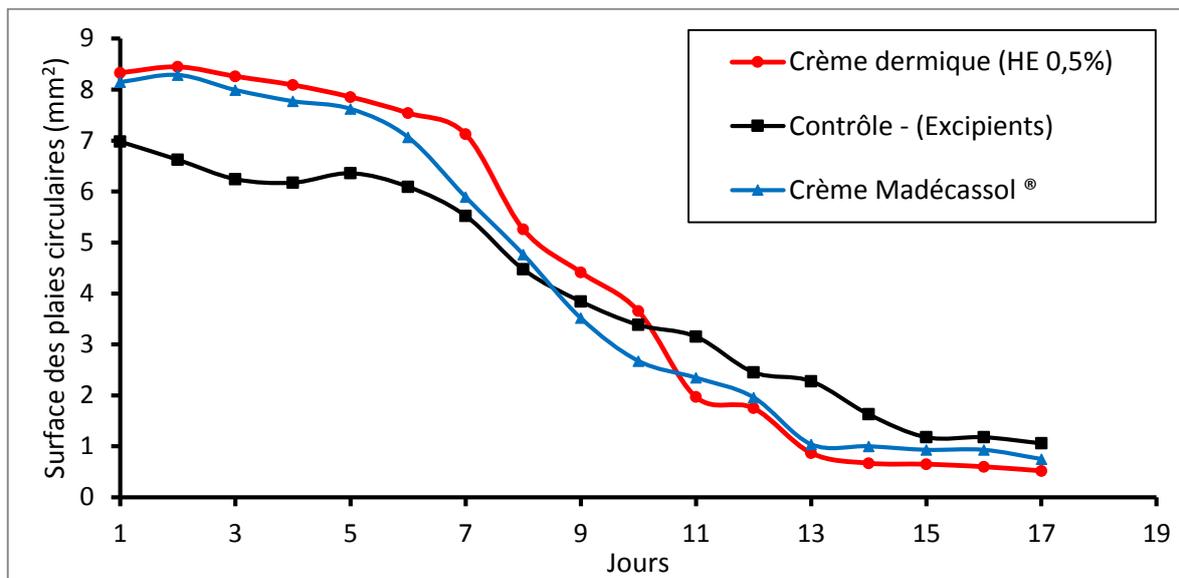


Figure 18. Cinétique de cicatrisation des plaies circulaires pour différents traitements.

Le suivi de la cicatrisation des plaies dorso-cervicales pour différents animaux a révélé que le lot traité avec la crème dermique à base d'essence de citronnelle a présenté une réduction importante de la surface de cicatrice, passant de 8.33 mm² (J-0) à 1.97 mm² de surface au 10^{ème} jour, alors qu'avec le contrôle +, une réduction de 8.14 mm² à 2.34 mm² a été notée dans cette même période. En revanche et pour les animaux traités avec les excipients (contrôle -), une cicatrisation lente a été constatée (de 6.98 mm² à J-0 jusqu'à 3.15 mm² à J-10). A j-16 et au terme de notre expérience, nous avons constaté que c'est toujours les rats traités avec l'essence de citronnelle qui ont présenté la plus grande réduction de surface des plaies (0.52 mm²), suivi ceux traités avec Madécassol (0.75 mm²) et enfin le contrôle - (1.06 mm²). En somme, une cicatrisation totale et rapide a été enregistrée au 16^{ème} jour après un traitement journalier avec la crème contenant l'essence aromatique de citronnelle (0.5%) alors qu'elle a été moins rapide et incomplète avec le contrôle -.

J-0

J-8

J-11

J-16



Crème dermique à base d'huile essentielle de citronnelle (0.5%)



Contrôle positif : Crème Madécassol[®] (asiaticoside 0.1%)



Contrôle négatif : Crème excipients

Figure 19. Suivi de la cicatrisation des plaies cutanées pour différents lots (Originale, 2017).

Cependant et malgré ces résultats très encourageants, aucune conclusion sérieuse ne peut être dégagée, lors de notre étude, quant à l'efficacité de notre crème dermique à cause de l'absence d'une étude statistique fiable pour confirmer l'existence d'une différence significative entre les différents traitements. Hélas, cette étude n'a pas été faite (animaux de laboratoire non disponibles).

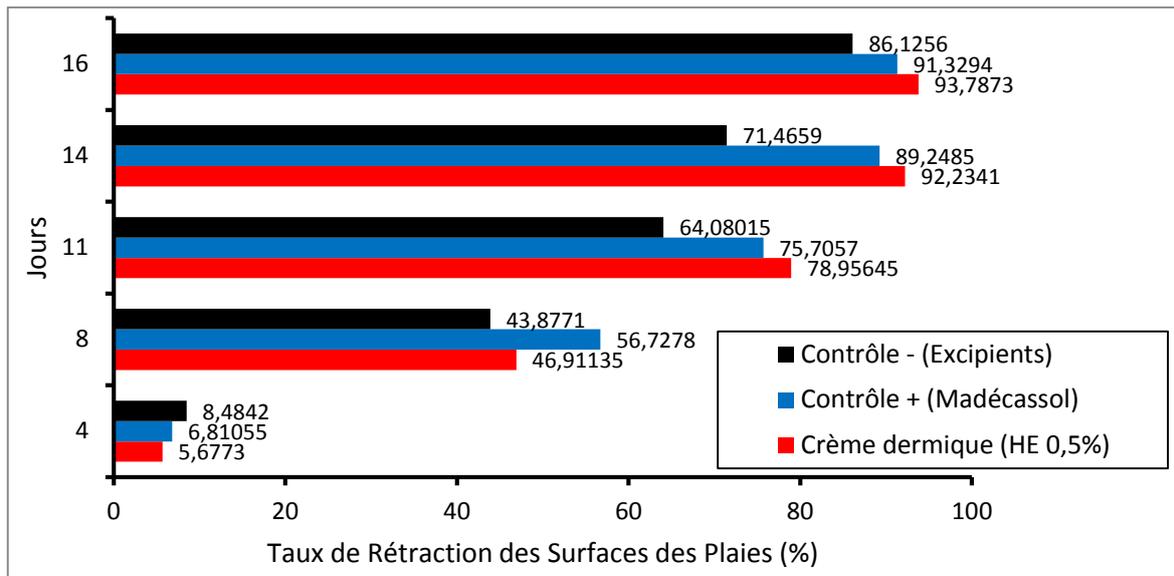
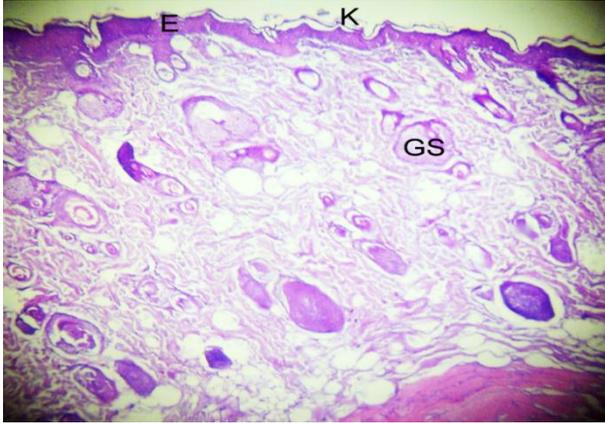


Figure 20. Cinétique du taux de rétraction des plaies circulaires pour différents traitements.

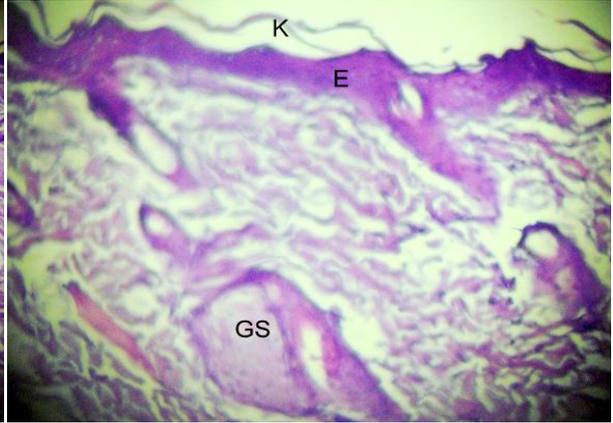
Dans le même sillage que les résultats obtenus lors de la cinétique de cicatrisation des plaies, le calcul du taux de rétraction des plaies durant toute la durée de l'expérience (16 jours) confortent les données sus-indiquées (**Figure 20.**). Le lot traité par la crème dermique à base d'HE a présenté un pourcentage de rétraction des plaies le plus élevé, comparativement aux autres traitements, à J-11, J-14 et J-16 avec des taux de 78.95%, 92,23% et 93.78%. A titre de comparaison, Madécassol a donné un taux de 91.32% alors qu'avec le contrôle – (excipients), nous avons enregistré une valeur de 86.12%.

3.5.2. Etude histopathologique

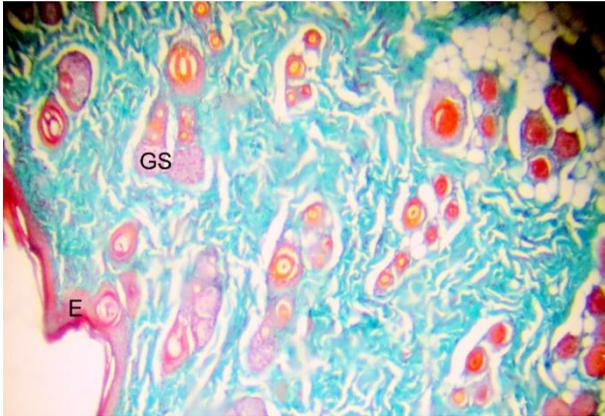
Les coupes histopathologiques ont été réalisées en utilisant la coloration Hématoxyline-Eosine sur des lambeaux de peaux prélevés à J-11 et J-16 après induction des plaies chez les rats des différents lots (**Figure 21.**). Avec le contrôle – et à J-11 (Fig. J), nous avons remarqué une ulcération épidermique avec une présence de débris tissulaires nécrosés entremêlés à des cellules inflammatoires polymorphes avec congestion et œdème du derme. Ceci démontre la non-cicatrisation des plaies traitées avec l'excipient. En revanche et avec les rats traités soit avec une crème dermique à base d'HE de citronnelle (Fig.G-H) ou encore un médicament de référence (Madécassol) (Fig. I), nous avons constaté une épithélialisation avec présence de fibroblastes à des degrés variables.



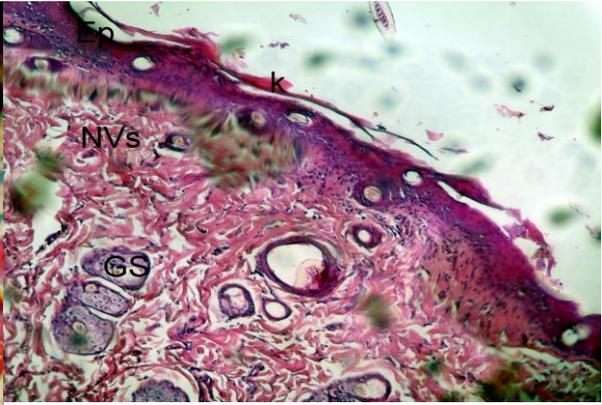
A/ Revêtement cutané normal (x10)



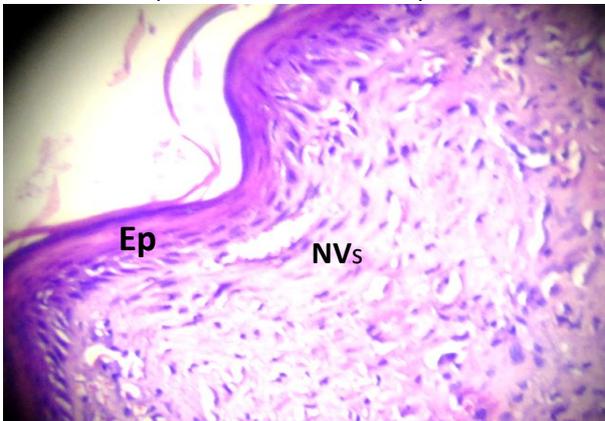
B/ Revêtement cutané normal (x40)



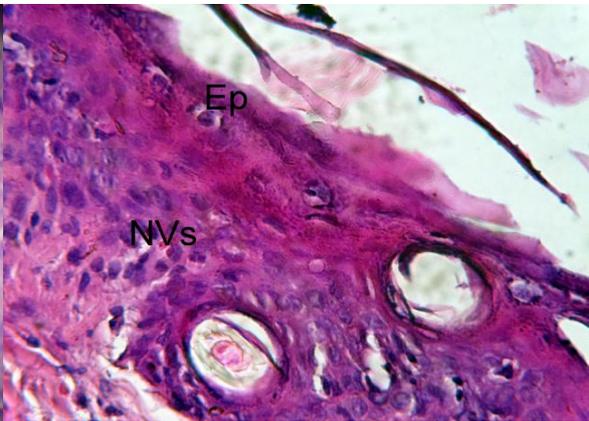
C/ Revêtement cutané normal (x10)
(trichrome de Masson)



D/ Crème dermique HE 0.5% : J-16 (x10)

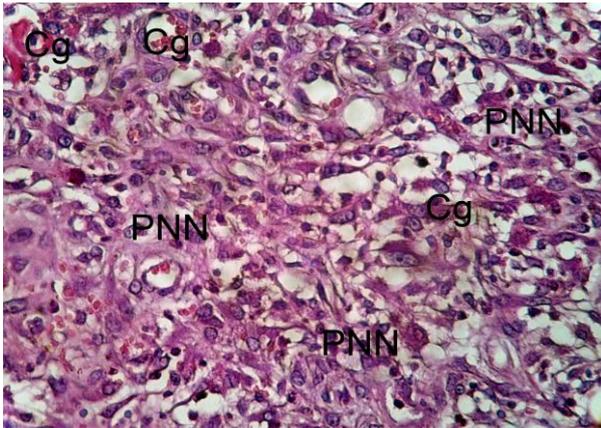


E/ Crème dermique HE 0.5% : J-16 (x20)

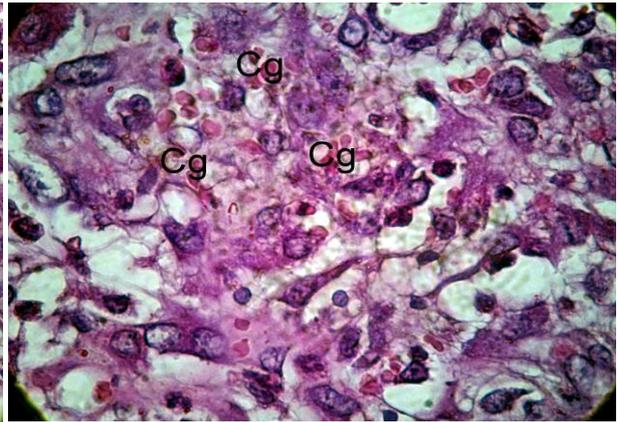


F/ Crème dermique HE 0.5% : J-16 (x40)

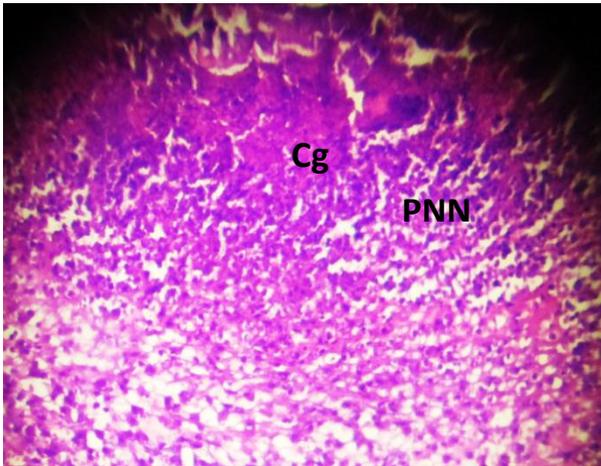
Ré-épithérialisation+ formation des nouveaux vaisseaux sanguins.



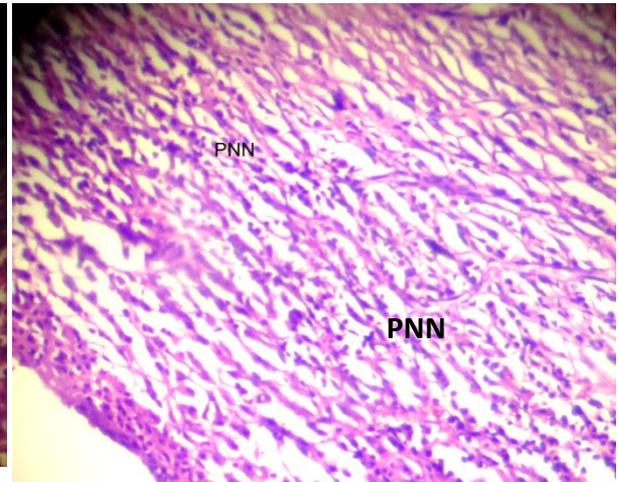
G /Crème dermique HE 0.5% : J-11 (x40)



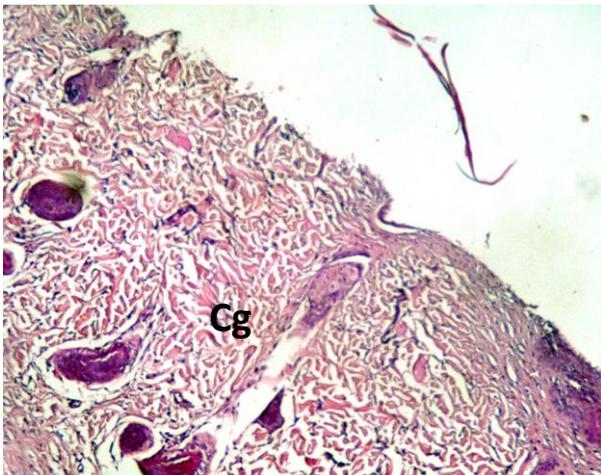
H /Crème dermique HE 0.5% : J-11 (x100)



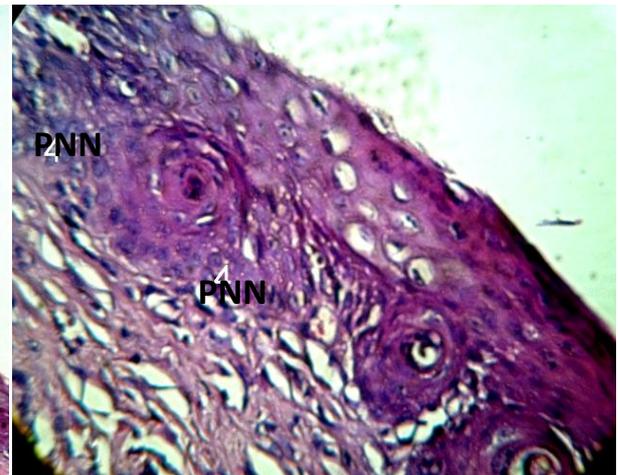
I/ Crème Madécassol : J-11 (x4)



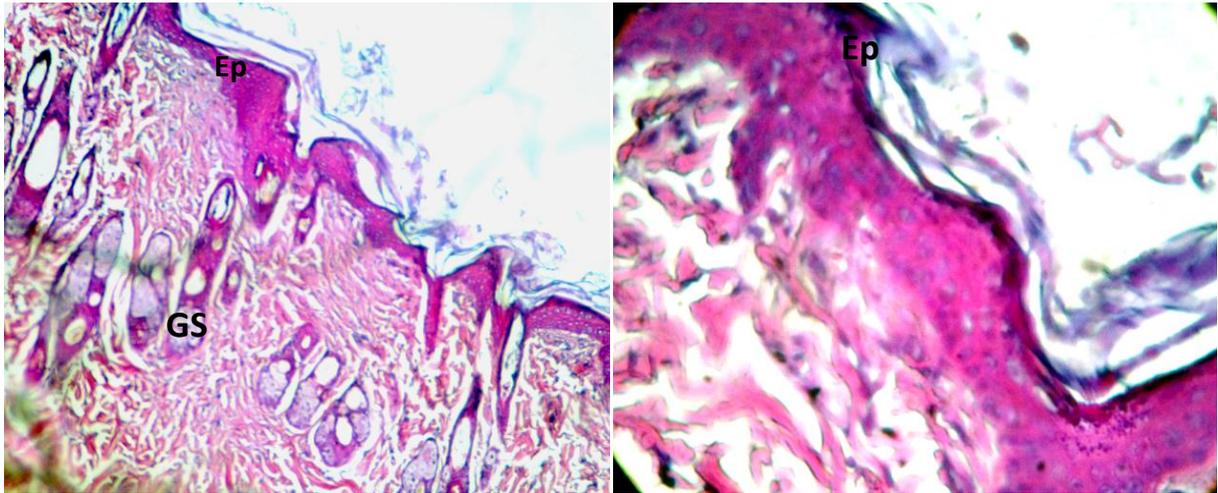
J/ Contrôle – (Excipients) : J-11 (x10)
PNN +++ avec infiltrat inflammatoire intense



K/ Contrôle – (Excipients) : J-16 (x10)



L/ Contrôle – (Excipients) : J-16 (x40)



M/ Crème Madécassol ; J-17 (x10)

N/ Crème Madécassol ; J-17 (x40)

E : Epithélium ; Ep : Epithélialisation ; Cg : Congestion ; K : kératine ; GS : Glande Sébacée ; NVs : Néo-
vaisseaux sanguins ; PNN : Polynucléaires Neutrophiles

Figure 21. Observation microscopique des coupes histopathologiques (Hématoxyline-Eosine) au niveau de la peau des rats à différents temps du processus de cicatrisation
(Originale, 2017).

A l'issue de l'expérience (J-16), l'observation microscopique des coupes histologiques pratiquées pour le contrôle – (Fig. K-L) avait révélé une ulcération épidermique moins importante avec la persistance de la présence d'un infiltrat inflammatoire polymorphe du derme accompagné d'un œdème, témoin d'une cicatrisation incomplète. Par contre chez les deux autres lots (Fig. E-F, M-N), nous avons observé une épithélialisation encore plus élaborée avec présence d'un plus grand nombre de fibroblastes et de follicule pileux, une diminution des cellules inflammatoires et l'absence de débris tissulaires nécrosés.

Les coupes histologiques ont montré un tissu de granulation plus élaboré et constitué de néo vaisseaux de type capillaires d'éléments fibroblastiques élaborant du collagène et de cellules mononuclées. Ces néo-vaisseaux de type capillaires favorisent l'arrivée de cellules inflammatoires ayant un rôle de détersion du foyer lésionnel (**Harding et al., 2002**).

La présente étude conclut que l'huile aromatique de *C. citratus* est efficace pour le processus de cicatrisation des plaies. Elle diminue la phase inflammatoire, favorise la contraction des plaies et raccourcit la période d'épithélialisation. En définitif, l'étude histopathologique a confirmé le bien-fondé de l'utilisation de l'essence de citronnelle comme ingrédient actif dans

des préparations galéniques pour accélérer et améliorer la cicatrisation des plaies chez les animaux de laboratoire. Cette action a été rendue possible aussi par l'effet antimicrobien de l'essence, démontré antérieurement, et qui jouait un rôle majeur dans la prévention des surinfections des plaies. En outre, l'action anti-inflammatoire topique de l'essence de citronnelle prouvée auparavant *in vivo*, permettait de limiter le recrutement des PNN et de résorber l'œdème pouvant être généré après l'induction des cicatrices.

Suite à une blessure, le processus inflammatoire se met en jeu avec recrutement des cellules inflammatoires du derme. Cependant la contraction de la plaie et l'épithélialisation sont des phénomènes indépendants et distincts. L'activité contractile des fibroblastes est responsable de la contraction de la plaie alors que l'épithélialisation fait intervenir la migration et la prolifération de cellules notamment des kératinocytes. Les médicaments utilisés pour la cicatrisation agissent donc par l'un ou l'autre de ces mécanismes ou encore par les deux mécanismes à la fois.

Pour traiter une **cicatrice en cours d'évolution** ou une **cicatrice plus ancienne**, de nombreuses solutions existent. Certaines reposent sur des **traitements médicaux classiques** comme les **crèmes pharmaceutiques cicatrisantes**, le **traitement occlusif** à base de pansements de silicone, les **traitements compressifs**, **injections decorticoïdes**, la **cryothérapie** ou encore les **lasers** et enfin la **chirurgie**.

Pour autant, des **solutions naturelles** existent. Plutôt méconnues, elles sont pourtant **très efficaces**. C'est ici qu'interviennent les **HE** qui, par leurs **propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires** ou **cicatrisantes**, permettront soit de **favoriser** une **bonne cicatrisation**, soit **d'améliorer l'aspect** d'une **cicatrice installée**.

Les aldéhydes et alcools monoterpéniques aident à la régénération cutanée. Les deux huiles incontournables sont ici l'hélichryse italienne et le ciste ladanifère (**Voinchet et Giraud-Robert, 2007**). En outre, l'HE citronnelle est riche aussi en aldéhydes monoterpéniques (géraniol et néral) qui vont agir en stimulant la synthèse des cellules de la peau appelées kératinocytes pour les régénérer, favorisant leur prolifération et ainsi aider à la cicatrisation. La cicatrisation sera donc facilitée et accélérée.

Une étude clinique conduite par des praticiens hospitaliers (**Voinchet et Giraud-Robert, 2007**) a confirmé que l'HE d'hélichryse italienne (Immortelle) associée à l'huile végétale de rose musquée, favoriserait les suites opératoires immédiates en offrant une évolution et une

maturation cicatricielle rapide et optimale grâce à leurs propriétés vasculaires et cicatrisantes. L'étude a porté sur deux séries de patients de chirurgie plastique et esthétique :

– 25 patients de chirurgie esthétique du visage et du cou ont bénéficié d'un protocole postopératoire immédiat (dès le lendemain de l'opération) par voie générale (orale) d'HE d'Hélichryse italienne à raison de 2 gouttes, 2 fois/jour pendant dix jours;

– 25 patients de chirurgie plastique et esthétique du thorax ont bénéficié d'un protocole postopératoire immédiat par voie générale d'HE d'Hélichryse italienne et d'un protocole retardé (de trois semaines à un mois) en application percutanée. Le mélange d'HE d'Hélichryse diluée à 10 % dans de l'huile végétale de Rose musquée a été appliqué en massage 1 fois/jour sur les cicatrices, à la fin du premier mois postopératoire et pendant une période de deux à trois mois.

Les auteurs concluent que l'HE de l'Hélichryse italienne et l'huile végétale de Rose musquée font partie des traitements de choix dans l'arsenal thérapeutique postopératoire immédiat, en permettant de retarder des interventions de chirurgie esthétique et plastique grâce à une réelle efficacité, une bonne tolérance et une réduction des délais d'éviction sociale à une population dont la pression sociale et les critères d'exigence sont de plus en plus marqués.

CONCLUSION

CONCLUSION

En égard de l'importance, sans cesse croissante, des huiles aromatiques en phytothérapie, il nous a semblé nécessaire de leur consacrer une étude complète pour asseoir le bienfondé de leur utilisation industrielle ou thérapeutique. La présente étude avait pour objectif la mise en évidence des propriétés antimicrobienne (*in vitro*), anti-inflammatoire et cicatrisante (*in vivo*) de la fraction aromatique de citronnelle pour une éventuelle utilisation en dermocosmétique ou comme ingrédient nutraceutique.

Le profil chromatographique de l'huile aromatique de citronnelle est caractérisé par la prédominance des aldéhydes monoterpéniques, à l'exemple du géraniol et néral, communément appelé citral. Aussi, les monoterpènes oxygénés est la fraction majoritaire.

En phase liquide, l'essence de citronnelle est douée d'une puissante action fongicide sur les souches mycéliennes, uni et pluricellulaire. Elle est aussi bactériostatique sur les bactéries à Gram+ mais serait sans effet sur les *Pseudomonas*. En phase vapeur, de meilleurs résultats ont été obtenus notamment avec les espèces du 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. En dilution en milieu gélosé (macrodilution), 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.

Et afin de valider ces résultats très encourageants, l'efficacité antifongique de l'essence a été appréciée dans une matrice alimentaire (boisson Orangina) seule ou en association avec un traitement thermique.

Sur le plan pharmacologique, le pouvoir anti-inflammatoire de l'huile a été exploré *in vivo* par le test de l'œdème des pattes (carraghénine) et des oreilles (xylène). Cette huile a prouvé son efficacité, aussi similaire que celle du médicament, dans la réduction de l'inflammation, avec confirmation histologique.

L'efficacité du pouvoir cicatrisant de l'huile a été évaluée grâce à des observations macroscopiques avec recours à des techniques de planimétrie, complétées par des prélèvements histologiques. L'ensemble de ces techniques a permis de conclure que l'essence de citronnelle

a agit positivement dans le processus de cicatrisation des plaies. Elle diminue la phase inflammatoire, favorise la contraction de la plaie et raccourcit la période d'épithélialisation.

Néanmoins la recherche devrait continuer pour trouver des sources prometteuses des antimicrobiens/anti-inflammatoires ou effectuer des investigations détaillées, sur l'optimisation des techniques d'isolement, sur des études biochimiques vers la sûreté des sources nouvellement découvertes, et la disponibilité biologique des composés actifs.

Indépendamment des questions ou préoccupations mentionnées tout en recherchant de nouvelles sources de conservateurs naturels pour les aliments traditionnels ou fonctionnels, la culture des plantes ou les conditions climatiques devrait être prises en considération. Ces facteurs influencent la composition des plantes et donc ses propriétés.

Faire des études toxicologiques est une nécessité, quoique ce type de recherche soit coûteux. Les composés complexes peuvent donner un éventail d'interactions avec le l'organisme humain, et ceci devrait être pris en compte. Il faut également tenir du compte du fait que les études menées sur les nutraceutiques n'en sont qu'au stade préliminaire.

Au final, l'objectif premier de notre travail a été atteint puisque nous avons contribué à la valorisation de la fraction aromatique de citronnelle comme source potentielle de conservateur naturel alimentaire ou encore comme principe actif dans des préparations dermo-pharmaceutiques. Ces molécules terpéniques apparaissent comme une solution naturelle et efficace pour faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique ou nutraceutique. En plus de cet apport thérapeutique, le gain économique ne serait pas négligeable puis qu'il s'agit de valoriser le patrimoine végétal de notre pays et promouvoir la culture et l'exploitation industrielle des plantes à parfum. Seul l'avenir nous dira l'impact réel de ces nouvelles acquisitions.

REFERENCES 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. Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 4^{ème} édition, Pennsylvanie, USA.
3. 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.
4. Akhila, A. (2010). Essential oil-bearing grasses: the genus *Cymbopogon*. CRC Press, Taylor & Francis, New York, USA.
5. Al-Reza, S. M., Yoon, J. I., Kim, H. J., Kim, J. S., & Kang, S. C. (2010). Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 639-643.
6. Amara, N., Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kaibouche, N., Laissaoui, O., & Boufridi, A. (2017). Applications potentielles de l'huile essentielle de lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) comme conservateur alimentaire naturel. *Phytothérapie*, 1-9.
7. Bang, K. H., Lee, D. W., Park, H. M., & Rhee, Y. H. (2000). Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(5), 1061-1063.
8. 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.
9. Bard, M., Albrecht, 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.
10. Bardeau, F. (2009). Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Fernand Lanore, Paris, France
11. Bensegueni, A., Belkhir, A., Boulebd, N., & Keck, G. (2007). Evaluation de l'activité cicatrisante d'un onguent traditionnel de la région de Constantine sur les plaies d'excision chez le rat. *Sciences & Technologie C*, (26), 83-87.
12. 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.
13. Boullard, B. (2001). Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. De Boeck Secundair.
14. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
15. Caldefie-Chézet, F., Fusillier, C., Jarde, T., Laroye, H., Damez, M., Vasson, M. P., & Guillot, J. (2006). Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytotherapy Research*, 20(5), 364-370.
16. 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.
17. 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.

18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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 konishii*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 31(3), 204-217.
23. Chiasson, H., & Beloin, N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides" Nouveau genre. *Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec*, 14(1), 3-6.
24. 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.
25. Costa, G., Ferreira, J. P., Vitorino, C., Pina, M. E., Sousa, J. J., Figueiredo, I. V., & Batista, M. T. (2016). Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *Journal of ethnopharmacology*, 178, 222-228.
26. Cox, S. D., Mann, 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.
27. 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.
28. De Billerbeck, V. G. (2002). Essais d'utilisation d'huiles essentielles en traitement de l'air. *Les contaminants biologiques des biens culturels*, 2, 345.
29. De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
30. De Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L. N., & de Sousa, D. P. (2013). A Review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18(1), 1227-1254.
31. 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.
32. Derbré, S. (2010). Tour d'horizon des compléments alimentaires à base de plantes. *Actualités pharmaceutiques*, 49(496), 20-31.
33. Devkotte, A. N., Zore, G. B., & Karuppayil, S. M. (2005). Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 867-873.
34. Doran, A. L., Morden, W. E., Dunn, K., & Edwards-Jones, V. (2009). Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 387-392.
35. Druilles, J., Chantefort, A., & Huet, M. (1995). La désinfection chimique de l'air: mythe ou réalité?. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 15(8), 421-429.

36. 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.
37. Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
38. 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.
39. Ekpenyong, C. E., Akpan, E. E., & Daniel, N. E. (2014). Phytochemical Constituents, Therapeutic Applications and Toxicological Profile of *Cymbopogon citratus* (DC) Leaf Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1).
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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), 483-487.
44. Fleurette, J., Freney, J., & Reverdy, M. E. (1995). *Antiseptie et désinfection*, éditions ESKA.
45. 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.
46. Gilly, G. (1997). *Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché*. Editions L'Harmattan, Paris, France.
47. Giordani, R., Hadeff, Y., & Kaloustian, J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79(3), 199-203.
48. Goeb P. (1995). La diffusion atmosphérique d'huiles essentielles : bien-être olfactif, purification de l'air et bienfaits thérapeutiques. *Infections Dent.* 41, 3371-3374.
49. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). Introduction à la phytothérapie anti-infectieuse. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 3-14). Springer Paris.
50. 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.
51. Grosjean N. (2007). *L'aromathérapie tout simplement*. Editions eyrolles, Belgique.
52. Guinoiseau, E. (2010a). *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action*. Thèse de Doctorat, Université de Corse, France.
53. 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.
54. 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.
55. Harding, K. G., Morris, H. L., & Patel, G. K. (2002). Science, medicine, and the future: healing chronic wounds. *BMJ: British Medical Journal*, 324(7330), 160.

56. Hart, P. H., Brand, C., Carson, C. F., Riley, T. V., Prager, R. H., & Finlay-Jones, J. J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, 49(11), 619-626.
57. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3.
58. Ibrahim, D. (1992). Antimicrobial activity of the essential oil of the local serai, *Cymbopogon citratus*. *Journal of Bioscience*, 3(1-2), 87-90.
59. Il Idrissi, A., Bellakhdar, J., Canigual, 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. Koba, K., Sanda, K., Raynaud, C., Mandin, D., Millet, J., & Chaumont, J. P. (2003). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* L.(DC) stapf., *C. nardus* L. rendle et *C. schoenanthus* L. spreng. *Journal de Mycologie Médicale*, 13(4), 175-180.
70. Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene 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.
71. 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*, 4(1), 29-34.
72. Koh, H. L. (2009). *A Guide to Medicinal Plants: An Illustrated Scientific and Medicinal Approach*. World Scientific.
73. Koh, K. J., Pearce, A. L., Marshman, G., Finlay-Jones, J. J., & Hart, P. H. (2002). Tea tree oil reduces histamine- induced skin inflammation. *British Journal of Dermatology*, 147(6), 1212-1217.

74. Kouame, N. M., Kamagate, M., Koffi, C., Die-Kakou, H. M., Yao, N. A. R., & Kakou, A. (2016). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: ethnopharmacologie, phytochimie, activités pharmacologiques et toxicologie. *Phytothérapie*, 14(6), 384-392.
75. Lawal, O. A., Ogundajo, A. L., Avoseh, N. O., & Ogunwande, I. A. (2017). *Cymbopogon citratus*. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, Academic Press, 397-423.
76. Le Minor, L., & Véron, M. (1982). *Bactériologie médicale*. Flammarion médecine-sciences, Paris, France.
77. 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.
78. Malik, T., Singh, P., Pant, S., Chauhan, N., & Lohani, H. (2011). Potentiation of antimicrobial activity of ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* essential oil against selected uropathogens. *Phytotherapy Research*, 25(8), 1225-1228.
79. Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004). Antifungal activity of *Tagetespatula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythiummultimum*. *Microbiological Research*, 159(3), 295-304.
80. Martoja, R., Martoja-Pierson, M., & Grassé, P. P. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale* (Vol. 345). Masson, Paris, France.
81. Maruyama, N., Sekimoto, Y., Ishibashi, H., Inouye, S., Oshima, H., Yamaguchi, H., & Abe, S. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation* 2, 1-11.
82. 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.
83. McVicar, J. (2006). *Le grand livre des herbes: jardin, santé, cuisine, maison*. Editions de Borée.
84. 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.
85. 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.
86. 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;
87. Neffati, M., & Sghaier, M. (2014). Développement et valorisation des plantes aromatiques et médicinales (PAM) au niveau des zones désertiques de la région MENA (Algérie, Egypte, Jordanie, Maroc et Tunisie). *Projet MENA-DELP, Observatoire du Sahara et du Sahel*.
88. 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
89. 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.
90. 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.
91. 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.

92. Onawunmi, G. O. (1988). *In vitro* studies on the antibacterial activity of phenoxyethanol in combination with lemon grass oil. *Die Pharmazie*, 43(1), 42.
93. Oussou, K. R., Yolou, S., Boti, J. B., Guessenn, K. N., Kanko, C., Ahibo, C., & Casanova, J. (2008). Étude chimique et activité anti-diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la Pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24(1), 94-103.
94. Paranagama, P. A., Abeysekera, K. H. 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.
95. Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89(358), 39-46.
96. Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., & Moretti, M. D. L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, (8), 721-726.
97. 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).
98. Pousset, J. L. (2004). Plantes médicinales d'Afrique: comment les reconnaître et les utiliser. Secum/Edisud.
99. Rai, M. K., & Mares, D. (Eds.). (2003). Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects. Psychology Press.
100. 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.
101. 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.
102. Salle JL. (1991). Le totum en phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie. Edition Frison-Roche, Paris, pp: 12-35.
103. Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., 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.
104. Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. S. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 2(1), 3.
105. 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.
106. 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.
107. Sonker, N., Pandey, A. K., Singh, P., & Tripathi, N. N. (2014). Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil as herbal preservatives based on antifungal, anti-aflatoxin, and anti-ochratoxin activities and *in vivo* efficacy during storage. *Journal of food science*, 79(4).
108. Sookhee S., Krisanaprakornkij S., Chatmahamongkol W., Muttarak W., Wattanarat C., Somjittra 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.

109. Sosa, S., Altinier, G., Politi, M., Braca, A., Morelli, I., & Della Loggia, R. (2005). Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 12(4), 271-277.
110. Soylu, E. M., Tok, F. M., Soylu, 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.
111. 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.
112. Su, Y. W., Chao, S. H., Lee, M. H., Ou T. Y., & Tsai, Y. C. (2010). Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E2 production in macrophages. *Planta Medica*, 76, 1666-71.
113. 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.
114. 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.
115. Tchoumboungang, 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*, 13(1), 77-84.
116. Tennstedt, D. (2004). *Peau et moustiques. Progrès en dermato-allergologie: Lille 2004.*
117. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333-340.
118. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333-340.
119. Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles. Tec et Doc.*
120. Thakur, K., & Pitre, K. S. (2009). Anti-inflammatory activity of extracted eugenol from *Ocimum sanctum* L. leaves. *RASA YAN Journal of Chemistry*, 2, 472-474.
121. Tisserand, R. (1988). *Essential oils as psychotherapeutic agents. In Perfumery (pp. 167-181). Springer-Verlag, Pays-Bas.*
122. 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.
123. 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.
124. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2012). Bactericidal action of lemongrass oil vapors and negative air ions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 169-177.
125. Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M. E. (2013). Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through *in vitro* and *in vivo* (real fruit juices) assays. *Food chemistry*, 134(15), 1-4.
126. 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.

127. Voinchet, V., & Giraud-Robert, A. M. (2007). Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytothérapie*, 5(2), 67-72.
128. Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., & Cavanagh, H. M. (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 76-81.
129. Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Experimental Biology and Medicine*, 111(3), 544-547.
130. Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
131. 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.
132. Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique. Édition Inspir Development, Luxembourg.
133. Zulfa, Z., Chia, C. T., & Rukayadi, Y. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) extracts against selected foodborne pathogens. *International Food Research Journal*, 23(3).

ANNEXE 1

Etapes de la technique de coloration « Hématoxyline-Eosine »

1. Fixation :

- La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion dans un grand volume de liquide fixateur (formol).
- La fixation est la plus importante dans les techniques de préparation des échantillons histologiques.

2. Déshydratation et Eclaircissement :

- La déshydratation a pour but de faire sortir l'eau contenue dans les tissus pour les préparer à l'inclusion. On utilise généralement un automate muni (Leica TP 1020, V2.3 Français-03 /2008) de plusieurs bacs contenant par ordre :

Réactifs	Temps (h)	Température (°C)
Formol	2	< 40
Ethanol 50%	2	45
Ethanol 50%	1	45
Ethanol 60%	1	45
Ethanol 70%	1	45
Ethanol 90%	1	45
Ethanol 98%	1	45
Xylène 50%	1	45
Xylène 60%	1	45
Paraffine 50%	2	60
Paraffine 60%	2	60

- L'inclusion dans la paraffine nécessite au préalable la déshydratation des pièces histologiques (bains successifs d'éthanol de degrés croissants, jusqu'à l'absolu).
- L'élimination complète des traces d'éthanol et l'imprégnation par le xylène.
- L'élimination de xylène et le remplacement par la paraffine. Les pièces sont placées successivement dans deux bains chacun, d'une durée de deux heures à une température de 60°C.

Mode opératoire :

- On met les pièces des oreilles dans des cassettes en plastique (Leica Micro Systems 39 LC – 550-2 J et Routine VI) qui se placent en vrac dans le panier. Chaque cassette porte toutes les indications utiles de Chaque pièce. On met le panier dans l'automate d'infiltration qui va effectuer automatiquement toutes les opérations de traitement des prélèvements tissulaires : fixation, déshydratation, et éclaircissement des spécimens dans les solvants pour finir par l'inclusion dans la paraffine liquide.
- Le panier est transporté d'un poste à l'autre, le déplacement s'effectue dans le sens des aiguilles d'une montre. Un mouvement de va et vient est imprimé au panier immergé. Ce mouvement a pour but de faciliter et d'accélérer l'infiltration.
- Avant de quitter un poste, le panier est maintenu pendant 60 secondes au-dessus du récipient pour laisser au produit le temps de s'égoutter (on réduit ainsi au minimum le risque de contamination de solvants.).
- Enlever le panier et prendre les cassettes pour l'enrobage.

3. L'inclusion :

- L'inclusion consiste à enfermer l'organe dans une cassette en plastique qui la pénètre intimement. On obtient alors un bloc de consistance homogène que l'on coupera au microtome. Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes histologiques fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Il existe différentes qualités de paraffine qui se différencient par leur point de fusion. La durée de l'inclusion dépend de la taille de la pièce, et elle se fera dans des moules permettant les confections de blocs qui se montent ensuite sur le microtome.

Mode opératoire :

- On utilise pour cette étape une station d'enrobage tissu-TEK 111, (Réf.74588), contenant : console thermique, console d'enrobage et console réfrigérante.
 - Placer les moules en Acier inoxydable (tissus-TEK111) dans le bac de préchauffage.
 - Retirer les cassettes de la paraffine liquide à l'aide des pinces préchauffées et les placer sur la plate-forme chaude de travail.
 - Après avoir rempli le moule de paraffine, le placer sur la plate-forme chaude, positionner le tissu au centre et au fond du moule.
 - Déplacer le moule de la «région chaude» à la «région froide». Le refroidissement de la base du moule fait que le tissu est maintenu exactement dans la position choisie.
 - La cassette d'enrobage est alors enlevée de la plate-forme de travail chauffée, puis placée au-dessus du moule : la température de la cassette et la paraffine liquide permettent une soudure immédiate. La cassette et le moule sont alors de nouveau placés sous le système de distribution, la paraffine est ajoutée jusqu'à ce que la cassette soit à moitié remplie. Placer la cassette et le moule ainsi remplis sur la grande plaque réfrigérée pour refroidissement définitif.
 - Après quelques minutes de refroidissement, les blocs ainsi réalisés, avec précision, peuvent donc être stockés dans le tiroir réfrigéré en attendant d'être coupés.

4. Réalisation des coupes au microtome :

- Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 µm d'épaisseur.
- Les rubans obtenus sont étalés sur les lames (CITOGLAS® 217105-1 Super GRADE) et mises à sécher 1h à 60°C. Les indications de l'organe sont préalablement gravées sur la lame correspondante à l'aide d'un diamant.

5. Coloration :

- Elle est procédée par séchage des lames à 90°C pendant 10 min à l'étuve dans le but d'éliminer la paraffine du prélèvement et d'augmenter l'adhérence des coupes.

Les différentes étapes de la coloration Hématoxyline-Eosine sont:

- Déparaffinage (Xylène).
- Hydratation (Ethanol).
- Coloration.
- Déshydratation (Ethanol).
- Eclaircissement (Xylène).

L'automate de coloration (Sakura Finetechnical Co., Ltd.) utilisé comprend les bacs suivants :

	Durée (minute)
Xylène	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Eau distillé	2
Hématoxyline de Groat	6
Eau courante	3
HCl 1%	2 secondes
Alcool pur (éthanol 98%)	3
Eau lithiné	2
Eau courante	2
Eosine	12
Eau courante	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Xylène	3

6. Montage et observation

Le montage est l'opération qui consiste à fixer, à l'aide d'une substance appropriée (Eukit) au colorant utilisé une lamelle de verre sur l'échantillon histologique, cette étape a comme but de protéger les coupes contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent facilement à l'air libre. Les lames ensuite nettoyées au xylène et enfin observées au microscope photonique **OPTIKA** et à différents grossissement (G×10, G×20, G×40 et 100) Les photographies figurant dans ce mémoire ont été prises par un appareil photo numérique (**CANON**).



Automate de déshydratation



Station d'enrobage



Une plaque réfrigérante



Microtome



Une plaque chauffante