



**Université de Limoges**  
**Faculté de Pharmacie**

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour obtenir le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 18/12/2017

par

**Hervé Chabenat**

né le 28/09/1991, à Issoudun

**Potentialité *in vitro* de 10 huiles essentielles, seules ou en association, dans le traitement des infections bactériennes cutanées.**

Examineurs de la thèse :

M. BUXERAUD Jacques, Professeur émérite

Président

Mme DELEBASSEE Sylvie, Maître de conférences des universités

Juge

Mme MILLOT Marion, Maître de conférences des universités

Juge

Mme COUIC MARINIER Françoise, Docteur en Pharmacie

Juge





Université de Limoges  
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour obtenir le diplôme d'Etat de docteur en pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 18/12/2017

par

**Hervé Chabenat**

né le 28/09/1991, à Issoudun

**Potentialité *in vitro* de 10 huiles essentielles, seules ou en association, dans le traitement des infections bactériennes cutanées.**

Examineurs de la thèse :

M. BUXERAUD Jacques, Professeur émérite

Président

Mme DELEBASSEE Sylvie, Maître de conférences des universités

Juge

Mme MILLOT Marion, Maître de conférences des universités

Juge

Mme COUIC MARINIER Françoise, Docteur en Pharmacie

Juge

## Liste des enseignants

---

### PROFESSEURS :

<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MAMBU</b> Lengo	PHARMACOGNOSIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOSTATISTIQUE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
<b>PICARD</b> Nicolas	PHARMACOLOGIE
<b>ROGEZ</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
<b>SAINT-MARCOUX</b> Franck	TOXICOLOGIE

### ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

<b>CHAUZEIX</b> Jasmine	HEMATOLOGIE
-------------------------	-------------

### MAITRES DE CONFERENCES :

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE

<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>GRIMAUD</b> Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MERCIER</b> Aurélien	PARASITOLOGIE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
<b>MUSUAMBA TSHINANU</b> Flora	PHARMACOLOGIE
<b>PASCAUD</b> Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

**ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :**

<b>FABRE</b> Gabin	(01.09.2016 au 31.08.2017) CHIMIE PHYSIQUE – PHYSIQUE
<b>LAVERDET</b> Betty	(1.09.2016 au 31.08.2017) PHARMACIE GALENIQUE
<b>PHAM</b> Thanh Nhat	(1.09.2016 au 31.08.2017) CHIMIE ORGANIQUE - BIOCHIMIE

**PROFESSEURS EMERITES :**

**BUXERAUD** Jacques  
**DREYFUSS** Gilles  
**LOUDART** Nicole

*À l'Oisiveté qui offre le temps d'avoir le temps.*

*Qui maîtrisait les odeurs, maîtrisait le cœur de l'Humanité.*

**Le parfum – Patrick Süskind (1949- )**

*Il ne sert de rien à l'Homme de gagner la Lune s'il vient à perdre la Terre.*

**François Mauriac (1885-1970)**

*C'est la beauté qui sauvera le monde.*

**Mychkine / L'Idiot – Fiodor Dostoïevski (1821-1881)**

*Un seul être vous manque, et tout est dépeuplé !*

**L'Isolement – Alphonse de Lamartine (1790-1869)**

## Remerciements

---

À tous les membres de l'équipe du laboratoire de bactériologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de LIMOGES (et des autres services) qui m'ont épaulé de près ou de loin, ainsi que leur cafetière salvatrice. Cela ne serait sans vous. Je citerai Roselyne en particulier pour m'avoir fait partager cette conscience gracieuse qui lui sied tant, et Sylvie pour sa patience et son entrain dynamique. Merci !

Aux honorables professeurs et pharmaciens de mon jury, auxquels je porte un hommage respectueux.

Mme MILLOT, pour avoir accepté mon sujet de thèse, si simple et si complexe pourtant. Merci.

Mme DELEBASSEE, pour ceux qui vous connaissent, je vous ai déjà remercié. Pour les autres, je vous remercie d'avoir transformé ces moments passés au labo en de paisibles et excitants souvenirs ; personnellement, je vous souhaite encore une longue carrière dans le *baby-sitting*.

Mme COUIC MARINIER, pour m'avoir orienté, même quand tout était flou, pour vous comme pour moi. J'espère seulement avoir pu porter ce travail à la hauteur de vos attentes.

Mr BUXERAUD, professeur émérite... Pardon Djack, je devrais au moins te faire un poème ! Mais tu me dois toujours un morceau de musique, alors on est quitte sur ce point... Mais pour la passion et l'attachement dont tu as fait preuve, pour plus de sensibilité que je ne pourrais jamais te rendre, et pour m'avoir considéré comme plus que ce que je pense : je garde une partie de toi dont j'espère être digne un jour. Je te souhaite la sérénité et la douceur de cette existence que tu as mérité, et de modeler encore bien des vies comme tu as su le faire avec moi. Un merci serait bien trop loin du compte. Je ne le murmurerai même pas.

À ces étudiants que j'ai regardé traverser ces longues années avec passion et non sans heurts :

Caro, je commence par toi quel honneur ! Merci pour ces moments complices, d'avoir fait passer le temps si vite entre les cours et en dehors (et si long pendant... Quoique les critiques et les commérages ça a du bon finalement). Je n'imaginai pas tomber sur quelqu'un d'aussi... Toi. Je te souhaite tout ce dont tu sais que tu auras besoin, et que Sylvain pense tout ce que tu m'as caché de toi. Je ne sais toujours pas pourquoi tu as voulu m'adopter, j'espère juste que ce ne fût pas par pure distraction. A bientôt maman. On t'enverra des cartes postales de Gially.

Vincent, si brillant, si sensible. Tout est torture en dehors. On se cache toujours trop bien dans une coquille (dans ce monde et dans les autres). Tu l'as compris très tôt. Je me suis senti proche de toi. Je te souhaite d'avoir trouvé la personne ou la voie qui te permettra de tout partager, car c'est aussi une mission à accomplir ici. J'ai apprécié d'évoluer aux côtés de quelqu'un d'aussi doué que toi. Un jour prochain, j'espère, je te reverrai, et on ne parlera pas de chèvres.

Camille, je ne t'ai connu que si peu, ai passé si peu de temps avec toi. Je ne sais rien de toi en fait. Je veux que tu gardes toujours cet esprit que tu crois tordu, parce qu'il n'y a que toi



qui saches déjà quoi faire avec : la musique, le dessin... Et ma foi pourquoi pas, d'autres choses que tu nous as caché. Je souhaite que tu restes en meilleure santé que possible. Chante-nous quelque-chose à l'occasion !

Laetitia, on dit toujours de toi que tu es parfaite, studieuse, acharnée au travail. Ce ne sont pas des compliments pour moi. Ta vie professionnelle est toute tracée, maintenant vient la vraie vie. Tu cherches toujours le pourquoi des choses et ne laisse rien au hasard. Et c'est au plus profond des choses que l'on trouve leur sens. Tu es méticuleuse, ça fait de toi quelqu'un de sensible. Et ça, je le vois comme un compliment. J'espère que tu prendras au moins autant de plaisir à construire ta vie personnelle que j'en ai eu à passer du temps avec toi. Je te souhaite une belle vie remplie de danse, d'escrime, de randonnée et de famille.

Sébastien, un grand merci pour les commérages, les déconnades et la flemme de se lever le matin pour aller en cours. C'était instructif de passer du temps avec toi. J'espère que tu pourras un jour trouver/créer un environnement digne de ta personnalité.

Sylvain, toi tu nous a bien séchés ! Mais tu en avais besoin. Je sais que tu t'épanouiras là-bas plus librement qu'à Limoges. J'ai hâte de voir la personnalité que tu vas devenir. A bientôt peut-être.

À l'équipe du CHU : Sophie, Vincent, Margaux. J'ai apprécié l'ambiance de cette équipe du tonnerre, et les parties de hand à l'hôpital. Merci de votre compagnie. Je vous retrouverai toujours avec grand plaisir.

Aurore, on a presque les mêmes racines et des traumatismes dans les mêmes pharmacies, alors ça rapproche ! J'espère que tu pourras t'installer où tu le souhaitais. Peut-être qu'on se croisera.

Élise, où que tu sois j'espère que tu trouveras dans tes marathons un jour une raison de t'ancrer quelque part, car il n'y a rien de plus frustrant qu'un voyage inachevé. Et quand tu l'auras trouvé, commencera un nouveau voyage. Je te souhaite bon vent, mais dans le sens aimable du terme. Nous nous reverrons peut-être.

Quentin, tout à la fois très responsable et irresponsable. Tu es devenu un grand monsieur. Si l'on doit travailler ensemble un jour, j'aurai des choses à apprendre de toi.

Marie et Virginie, inséparables, même ici ! Merci pour m'avoir coaché quand j'étais paumé dans la fac. Je ne me fais pas de tracas pour vous pour la suite. Bonne continuation.

Émilie, tu as déjà commencé une vie d'adulte, tu es en avance sur moi ! Je suis content que tout se soit bien passé pour toi. Je te souhaite beaucoup de bonheur.

Jérôme, je n'ai pas vraiment la prétention de t'avoir connu, mais du peu que j'ai vu, je ne me fais pas de souci pour toi non-plus. Tu mérites ce que tu as acquis. Bonne continuation.

Pierre, je ne t'ai pas vu depuis longtemps mais tu as souvent été sur la même longueur d'onde que moi ; je te souhaite une bonne fin d'études, et de pouvoir faire ce que tu désires. Reste optimiste surtout !

Lauriane, que je n'ai pas connu autant que je l'aurai souhaité. Tu as un cœur sincère, c'est une qualité touchante. Je te souhaite toutes les bonnes choses.

Sarah, Lucie, Anne, les Alexandre, Adrien, Etienne, Coralie, Elodie, Adeline, Marjorie : pour les heures de TP et d'exos interminables, qui sont passées bien plus vite avec vous.

À PapyPat', pour son charisme et son humanité. On ne rencontre pas quelqu'un d'aussi exceptionnel tous les jours. Je crois que je n'ai rien à t'apporter, mais merci pour ton



enseignement. Je prendrai toujours autant de plaisir à te revoir. Surtout ne te laisse pas aller une fois à la retraite ! Ou je serai obligé de venir te secouer les puces...

À Prisca, je ne souhaite rien qu'elle n'ait déjà, simplement de le garder le plus longtemps possible.

À Florence, pour m'avoir ouvert ses portes et pour le temps passé à tes côtés. Merci.

À Fabienne, Martine, Marielle et Guillaume. Gardez cet esprit d'équipe qui vous lie. C'est un trésor précieux.

À Shawn, je te souhaite de pouvoir brouter encore longtemps dans tes verts pâturages !! (Pardon Anne, je le devais !).

À tous les membres de la (grande maintenant) Pharmacie levrousaine, je souhaite une bonne continuation et de travailler toujours dans la bonne humeur. Merci notamment à Thierry, mon premier maître, pour m'avoir donné le goût de ce métier, Cécile pour son aide et son implication, et Valérie pour son soutien. Je pense très fort à vous.

Ambroise, j'ai toujours ton cadeau d'anniversaire. J'espère te revoir un jour, bien que tu n'en aies ni le besoin ni l'envie.

Mailys, où que tu sois je te souhaite d'avoir trouvé un endroit où tu puisses te sentir chez toi, enfin.

Manue et Chloé, pour être resté attachées inexplicablement à moi, comme moi à vous. Je vous souhaite les meilleures choses, surtout Manue parce que Chloé là c'est du gâteau (après le mariage, tout est si doux !). On se reverra encore.

Clément, à celui qui fut, à cette incroyable personne que tu es devenu. J'espère te revoir, de tout cœur, et que tu trouves la place qui te revient.

Steve, je suis content que tu sois arrivé jusque-là. Ta lourde tâche est de veiller à ce que les nouveaux fassent mieux que nous. Bon courage !

Dany, à celui que j'ai perdu. Je garde un œil sur toi de loin. Prends bien soin de ta fille.

Anaïs, tu prenais les photos comme personne. J'espère un jour pouvoir contempler tes dons et ce que tu es devenue. Je te souhaite une vie agréable et enrichissante.

À Claire et Guilhem, pour m'avoir enseigné comment marcher comme un homme et danser comme une folle. Vous avez changé ma vie. Merci de tout cœur.

Aux bénévoles de Tango à vivre (Josy, Sophinette, Fred, Christophe & Laurence, Sylvaine & Florent, Perrine & Gael, et les autres), pour nous avoir accompagné dans ce challenge. Bonne continuation !

Aux potes de l'escalade José, Asmik, Maryna, Hervé (l'autre), Florian, Grégoire et Rachel pour votre amitié et votre complicité ; ce sont des instants chers à mon cœur. Et à Bruno, pour m'avoir fait partager les expériences de ta vie. Je te suis reconnaissant.

À ma famille :

Magalie (eh oui tu es là toi maintenant). Je n'ai pas les mots, j'ai les sons. Et qui sonne à mes oreilles la symphonie du renouveau, brûle en mon âme des deux bouts. Donne-moi la vie, je te donnerai tout. Voyons un peu si l'on fait des étincelles tous les deux.



Maxence, tu as encore tout à faire. Nous t'avons montré que tu étais capable de tout et de rien, mais c'est à toi de choisir ce que tu en feras.

À ma mère : tu m'as donné la vie, la sensibilité et du temps. Il est temps pour ce qui reste de moi d'essayer de vivre. Je ne te promets rien, je ferai de mon mieux comme toujours. Je suis riche d'être né ici, même si rien ne s'est bien passé dès le départ. Je ne sais pas si la réciproque est vraie, mais moi, je suis fier de toi.

À mon père : tu m'as au moins donné deux choses : savoir rire de tout, et la passion des choses qui grandissent moins vite que nous. Je ferai en sorte que ces dons ne se perdent pas.

À mon frère : tu m'en voudras toujours un peu d'être né. Il est temps que je te pardonne d'avoir joué ton rôle. J'espère que tu prendras un jour conscience de tout ce que tu es. Je te souhaite l'épanouissement.

À mémé et aux tatas, une bouffée de fraîcheur pendant les vacances de mon enfance ; l'odeur de la menthe et de la lavande, l'ombre du majestueux saule qui ne pleurera plus. Les parties de pêche avec pépé et les cousins, les chiens qui aboient et les chats qui paressent plus que le Temps lui-même.

À mon parrain et ma marraine, que je n'oublie pas même de si loin.

À mes cousins et cousines, je vous suis du coin de l'œil ; j'espère que tout ira bien pour vous.

À Folkly et Natty, Doudou et Nounours, Belle et Lady, Sissi et Filou : je vous rendrai visite.

À Siska, j'espère que tu ne t'ennuies pas trop sans moi. Tu me manques. Je t'espérerai apaisée jusqu'à la fin.



## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



L'auteur de cette thèse déclare n'avoir aucun conflit d'intérêt.



## Table des matières

Liste des abréviations.....	18
Introduction.....	19
I. Étude bibliographique.....	21
I.1. Bactéries pathogènes cutanées.....	21
I.1.1. Les germes impliqués.....	21
I.1.1.1. Staphylococcus aureus.....	21
I.1.1.2. Staphylococcus epidermidis.....	24
I.1.1.3. Streptococcus pyogenes.....	25
I.1.2. Antibiothérapie.....	26
I.1.2.1. Mécanismes de l'activité antibactérienne.....	26
I.1.2.2. Antibiorésistance.....	28
I.1.2.3. Stratégies de lutte contre l'antibiorésistance.....	32
I.2. Aromathérapie.....	34
I.2.1. Découverte et évolution des pratiques.....	34
I.2.2. Obtention et qualité.....	37
I.2.3. Composition chimique.....	45
I.2.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	47
I.2.4.1. Molécules responsables de l'activité.....	47
I.2.4.2. Mécanisme d'action.....	48
I.2.4.3. Influence des facteurs extrinsèques.....	51
I.2.4.4. Relation entre structure moléculaire et activité antibactérienne.....	52
I.2.4.5. Interactions entre les huiles essentielles ou leurs constituants.....	56
I.2.5. Toxicité des huiles essentielles.....	57
I.2.5.1. Toxicité cutanéomuqueuse.....	57
I.2.5.2. Autres toxicités organiques et cellulaires.....	58
I.2.5.3. Précautions d'emploi des huiles essentielles.....	59
I.2.6. Association avec des antibiotiques.....	60
I.2.7. Méthodes de détermination in vitro de l'activité des huiles essentielles sur les bactéries.....	63
I.2.7.1. Méthode de diffusion en milieu solide.....	64
I.2.7.2. Macrométhode de dilution en milieu liquide.....	65
I.2.7.3. Méthode de réensemencement en milieu solide.....	66
II. Travaux personnels : tests de l'activité antibactérienne in vitro.....	68
II.1. Matériel et méthodes.....	68
II.1.1. Souches bactériennes et milieux de culture.....	68
II.1.2. Huiles essentielles utilisées [53].....	69
II.1.2.1. Huiles essentielles phénolées.....	70
II.1.2.1.1. Girofle (clou).....	71
II.1.2.1.2. Origan.....	72
II.1.2.1.3. Thym à thymol.....	73
II.1.2.2. Autres huiles essentielles.....	74
II.1.2.2.1. Arbre à thé.....	74
II.1.2.2.2. Cannelle.....	75
II.1.2.2.3. Ciste ladanifère.....	76
II.1.2.2.4. Eucalyptus radié.....	77
II.1.2.2.5. Marjolaine.....	77
II.1.2.2.6. Niaouli.....	78
II.1.2.2.7. Orange amère / Petit grain bigaradier.....	79
II.1.3. Mise au point des protocoles.....	80
II.1.3.1. Préparation des souches bactériennes.....	80
II.1.3.2. Préparation des huiles essentielles.....	81
II.1.3.3. Préparation des témoins positifs.....	81



II.1.3.4. Préparation des témoins négatifs.....	81
II.1.4. Protocole en milieu solide.....	81
II.1.5. Protocole en milieu liquide.....	82
II.1.6. Représentation graphique des résultats en milieu liquide.....	82
II.1.7. Protocole de réensemencement en milieu solide.....	83
II.2. Résultats et interprétations.....	85
II.2.1. Tests préliminaires.....	85
II.2.1.1. Effet du DMSO sur les bactéries.....	85
II.2.1.2. Effet de la gentamycine.....	85
II.2.1.3. Étapes majeures des protocoles.....	85
II.2.2. Effets des huiles essentielles seules.....	86
II.2.2.1. Aromatogrammes sur les staphylocoques.....	86
II.2.2.2. Aromatogrammes sur le streptocoque.....	90
II.2.2.3. Détermination des concentrations inhibitrices.....	91
II.2.2.4. Données de la littérature sur les concentrations inhibitrices.....	98
II.2.2.5. Détermination des concentrations minimales bactéricides sur <i>S. aureus</i> sauvage.....	100
II.2.3. Effets des mélanges d'huiles essentielles.....	103
II.2.3.1. Aromatogrammes.....	103
II.2.3.1.1. Mélange thym - origan 1:1.....	103
II.2.3.1.2. Mélange arbre à thé - eucalyptus radié 1:1.....	104
II.2.3.1.3. Mélange girofle - niaouli 1:1.....	104
II.2.3.2. Détermination des valeurs de concentrations inhibitrices.....	104
II.2.3.2.1. Mélange des huiles essentielles d'arbre à thé et d'eucalyptus radié 1:1.....	105
II.2.3.2.2. Mélange des huiles essentielles de cannelle et de girofle 1:2.....	106
II.2.3.2.3. Mélange des huiles essentielles de cannelle, girofle et niaouli 1:1:1.....	106
II.2.4. Discussion.....	107
Conclusion.....	114
Références bibliographiques et sitographiques.....	116
Serment de Galien.....	137



## Table des illustrations

Illustration 1: Résumé du mode d'action des antibiotiques (Singh & Barrett, 2006) [226].....	28
Illustration 2: Efflux, destruction et modification des antibiotiques comme modes de résistance [227].....	30
Illustration 3: Différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries [227].....	31
Illustration 4: Schéma de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau [53].....	40
Illustration 5: Chromatogramme issu d'une chromatographie en phase gazeuse d'une huile essentielle [53].....	42
Illustration 6: Structure isoprénique [228].....	46
Illustration 7: Structure du carvacrol [228].....	52
Illustration 8: Structure du para-cymène [228].....	52
Illustration 9: Structure du carvacrol-méthyl-éther [228].....	52
Illustration 10: Structure du menthol [228].....	53
Illustration 11: Structure du 3-isopropylphénol [228].....	55
Illustration 12: Structure de l'ortho-crésol [228].....	55
Illustration 13: Structure de l'eugénol [228].....	55
Illustration 14: Structure de l'iso-eugénol [228].....	55
Illustration 15: Mécanismes de synergie entre antibiotiques et composants d'huiles essentielles [52].....	63
Illustration 16: Halo d'inhibition de croissance bactérienne sur gélose (antibiogramme) [71]	65
Illustration 17: Schéma de la dilution en cascade de la solution témoin positif et du réensemencement sur gélose.....	67
Illustration 18: Planche descriptive du giroflier [229].....	71
Illustration 19: Structure de l'eugénol.....	72
Illustration 20: Planche descriptive de l'origan [229].....	72
Illustration 21: Structure du carvacrol.....	73
Illustration 22: Photographie de thym [229].....	74
Illustration 23: Structure du thymol [228].....	74
Illustration 24: Photographie de cannelle de Ceylan [229].....	75
Illustration 25: Structure du cinnamaldéhyde [228].....	76
Illustration 26: Structure du 1,8-cinéole [228].....	77
Illustration 27: Photographie de marjolaine à coquilles [229].....	78
Illustration 28: Photographie du niaouli [229].....	79
Illustration 29: Planche descriptive de l'oranger amer [229].....	80
Illustration 30: Divers résultats d'aromatogrammes.....	86
Illustration 31: Diamètres d'inhibition en fonction de la dilution d'huile essentielle d'origan..	88
Illustration 32: Activité antibactérienne des 10 huiles essentielles sur les 3 staphylocoques.	90
Illustration 33: Gamme de dilution en bouillon Mueller-Hinton après incubation.....	91
Illustration 34: Bouillons ensemencés, après incubation : absence de croissance bactérienne à gauche, croissance bactérienne à droite.....	92
Illustration 35: Gélose des dilutions du témoin positif (B') réensemencées, après incubation.....	101
Illustration 36: Valeurs de concentrations minimales bactéricides déterminées sur <i>S. aureus</i> sauvage (mg/mL).....	101

## Table des tableaux

---

Tableau 1: Exemples d'interactions entre antibiotiques et huiles essentielles.....	61
Tableau 2: Liste, composition et origine des huiles essentielles testées au laboratoire.....	70
Tableau 3: Récapitulatif des tests menés au laboratoire.....	84
Tableau 4: Valeurs des diamètres d'inhibition sur les Staphylococci.....	87
Tableau 5: Valeurs des diamètres d'inhibition sur Streptococcus pyogenes.....	90
Tableau 6: Valeurs des concentrations inhibitrices en milieu liquide.....	93
Tableau 7: Huiles essentielles classées selon les intervalles de concentrations inhibitrices, et détail des principaux constituants moléculaires.....	96
Tableau 8: Valeurs des diamètres d'inhibition en milieu solide.....	103
Tableau 9: Valeurs des concentrations inhibitrices des mélanges en milieu liquide.....	105



## Liste des abréviations

---

ADN : Acide Désoxyribonucléique

*alpha* :  $\alpha$

ATP : Adénosine Triphosphate

*bêta* :  $\beta$

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

*ct.* : chimiotype

*delta* :  $\delta$

DMSO : Diméthylsulfoxyde

*gamma* :  $\gamma$

gtt : goutte(s)

ISO : *International Organization for Standardisation*

LPS : Lipopolysaccharide(s)

MH : Mueller-Hinton

min : minute(s)

mL : millilitre(s)

mM : millimolaire(s)

mm : millimètre(s)

ND : Non-Déterminé

nm : nanomètre(s)

pH : Potentiel Hydrogène

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

tr/min : tours par minute

UI : Unité Internationale

UV : Ultra-Violet(s)

var. : Variété

$\mu$ L : microlitre(s)

$\mu$ g : microgramme(s)

%Lt : pourcentage de lumière transmise (600 nm)

## Introduction

---

À l'aube du XX<sup>e</sup> siècle, la découverte des antibiotiques a permis une réduction massive de la mortalité imputable aux infections autrefois incurables, et contribué à révolutionner la médecine moderne. Mais à l'heure actuelle le corps médical se trouve confronté à une augmentation critique de l'antibiorésistance bactérienne, consécutive à la multi-exposition fréquente des germes à différents antibiotiques à usage thérapeutique (en partie par des prescriptions inappropriées), agro-alimentaire ou environnemental, qui devient un problème sanitaire majeur du XXI<sup>e</sup> siècle [1].

La résistance se généralise quelle que soit l'espèce bactérienne concernée. Cependant, certaines bactéries sont devenues multirésistantes, comme c'est le cas des *Staphylococci* (l'espèce *S. aureus* notamment) capables de provoquer des symptômes variés, de l'atteinte localisée bénigne à la septicémie potentiellement létale. Ces bactéries sont devenues insensibles à plusieurs antibiotiques, y compris la vancomycine, considérée jusqu'à récemment comme le traitement de dernier recours. On considère qu'actuellement neuf souches sur dix de *S. aureus* dans le monde sont pénicilline-résistantes, et la majorité de celles-ci sont méticilline-résistantes dans les pays asiatiques [2]. De plus, une étude de 2000 à 2005 a révélé une augmentation du nombre d'hospitalisations pour cause d'infection des tissus mous et de la peau due aux *S. aureus* méticilline-résistants (SARM) de 62 % aux États-Unis [3]. La situation est devenue mondialement alarmante car les infections causées par ces bactéries entraînent une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité [4].

La synthèse industrielle médicamenteuse révèle aujourd'hui sa principale limite : le développement bien trop lent de nouvelles molécules thérapeutiques par rapport aux capacités d'adaptation bactérienne. Pour sortir de ce cercle vicieux, la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques devient indispensable. La biodiversité étant la plus grande et variée des sources de substances actives, l'exploitation des ressources naturelles semble une alternative prometteuse [4]. Bien qu'il ne soit pas innovant, le recours aux huiles essentielles dans un cadre thérapeutique, nommé aromathérapie, fait partie des stratégies en développement, encouragé par la lassitude des patients envers les médicaments de synthèse et surfant sur la mode actuelle d'un retour à une médecine plus naturelle. Bien que décrit dans de nombreuses publications scientifiques, le potentiel anti-infectieux des huiles essentielles reste peu connu et peu utilisé par le corps médical pour diverses raisons dont le manque de posologie précise, le risque de toxicité et le peu de formes galéniques existantes. Afin de pallier ce problème, des monographies sur les huiles essentielles commencent à être éditées par le comité HMPC (*Committee on Herbal Medicinal Products*) notamment, donnant accès à des données précises issues de l'usage traditionnel des huiles essentielles [5].

Le but de cette thèse est de montrer l'intérêt que peut prendre le traitement aromathérapique dans le soin des pathologies cutanées d'origine bactérienne, qu'elles soient utilisées seules ou en association et intégrées dans une prise en charge pluri-thérapeutique du patient ou non.

Nous débuterons cette thèse par un rappel sur quelques généralités inhérentes aux principales bactéries pathogènes cutanées, puis sur les traitements antibiotiques et enfin sur les huiles essentielles en nous attardant sur les molécules à fonction phénol. Nous présenterons ensuite nos travaux sur l'étude de l'activité antibactérienne *in vitro* de plusieurs huiles essentielles ainsi que de quelques mélanges réalisés en laboratoire sur trois germes disponibles au laboratoire : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Streptococcus pyogenes*. Nous terminerons par une comparaison de ces résultats entre eux et à ceux des autres publications trouvées dans la littérature.



## I. Étude bibliographique

---

### I.1. Bactéries pathogènes cutanées

Notre sujet de thèse porte sur l'atteinte de la sphère cutanée humaine, saine ou lésée, à partir d'une contamination bactérienne de ces tissus.

#### I.1.1. Les germes impliqués<sup>1</sup>

Dans cette partie, nous étudierons la source de ces atteintes, à savoir les bactéries responsables des infections nosocomiales cutanées humaines, et pouvant devenir multirésistantes [4], [6]–[9]. On trouve parmi elles : [10], [11]

- les ***Staphylococci***, dont *S. aureus*, responsable de folliculites et d'impétigo, mais aussi *S. epidermidis* ;
- le ***Streptococcus pyogenes***, qui peut causer un érysipèle.

Le principal genre bactérien concerné se trouve être le genre *Staphylococcus*. Il fait partie de la famille des *Micrococcaceae*, des *Cocci* (forme sphérique) Gram+ découverts par Louis Pasteur en 1880. Leur nom a pour racine grecque *staphylos* : la grappe de raisin, et *kokkos* : les grains, car elles ont l'habitude de se grouper en grappes. Les bactéries classées dans ce genre sont immobiles, asporulées, rondes et mesurent environ 1 micromètre (µm) de diamètre. Elles sont catalase+ et chémo-organotrophes<sup>2</sup>. Ces bactéries sont très résistantes dans l'environnement. Le genre se subdivise en deux grands groupes représentés par trois espèces prééminentes chez l'humain : le groupe des coagulase+, où se situe le staphylocoque doré soit *S. aureus*, et le groupe des coagulase- dont font partie les staphylocoques blancs comme *S. epidermidis* [12].

##### I.1.1.1. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est un germe ubiquitaire, commensal de la peau et des muqueuses d'humains et d'animaux à sang chaud, qu'ils soient sauvages ou domestiques (notamment les bovins). Les agences de santé estiment à 20 % le nombre de porteurs persistants dans la population (plus souvent les enfants), et 60 % le nombre de porteurs intermittents. Sur l'humain, il se loge au niveau des fosses nasales, des aisselles, du cuir chevelu et de la zone périnéale. Faisant partie intégrante de la flore bactérienne cutanéomuqueuse et très bien

---

1 source : cours de bactériologie, DELEBASSEE, 2017

2 organisme utilisant l'énergie produite par l'oxydation de composés organiques comme principale source d'énergie

adapté à l'humain, il existe de nombreux porteurs asymptomatiques de *S. aureus*, qui peut jouer un rôle de protection contre la colonisation d'autres bactéries. Cependant, il est aussi responsable d'auto-infections et peut contaminer d'autres individus (par manuportage) qui, eux, auront un portage symptomatique de la bactérie (transmission nosocomiale) [12].

Ces bactéries sont capables de survivre longtemps dans l'environnement (y compris la nourriture) où elles sont très répandues : la transmission, interhumaine ou non, peut donc être directe (contact avec une lésion purulente ou un porteur) ou indirecte, l'accroissement de la population et les mauvaises conditions d'hygiène augmentant encore le risque d'exposition [12].

La bactérie est opportuniste et devient pathogène au moment où elle pénètre dans l'organisme, suite à la rupture de la barrière cutanée ou au niveau d'un follicule pileux. Il peut aussi y avoir une rupture de l'équilibre hôte-bactérie suivi d'une multiplication anarchique et la production d'enzymes et de toxines. Deux types de syndromes peuvent se manifester :

**Les toxémies** apparaissent à cause de toxines produites par la souche bactérienne. Ces toxines sont stables et peuvent donc être trouvées dans l'environnement (alimentation) sans la présence de la bactérie. Leur seule présence suffit à provoquer différents syndromes : les entérococolites staphylococciques (toxi-infections staphylococciques collectives ou TIAC), dont les symptômes sont l'absence de fièvre, des diarrhées, crampes et douleurs abdominales, des nausées et vomissements dans les trois heures après l'ingestion d'aliments contaminés, et qui disparaissent spontanément après 24 heures. Ces TIAC sont des maladies à déclaration obligatoire. *S. aureus* est responsable de 75 % des cas de syndrome de choc toxique (TSS) caractérisés par de la fièvre, des vomissements, une diarrhée, des myalgies, des rougeurs et desquamations, une hypotension et au moins trois atteintes viscérales (la mortalité est possible en deux heures). Cette bactérie est aussi prédominante chez les patients atteints de la maladie de Kawasaki, dont certaines toxines pourraient être en cause dans la symptomatologie. Elle peut encore causer le syndrome de la peau ébouillantée ou érythrodermie bulleuse avec épidermolyse, affection aiguë caractérisée par un rougeur autour de la zone infectée en un jour, suivi d'un syndrome d'exfoliation généralisé due à une toxine nommée exfoliatine (surtout chez les nouveau-nés). Les sujets immunodéficients peuvent aussi être atteints de fasciite nécrosante dans de rares cas [12].

**Les infections suppuratives et nécrotiques**, elles, impliquent toujours l'invasion bactérienne, la prolifération et la destruction des tissus de l'hôte ainsi qu'une réponse inflammatoire. Elles peuvent apparaître spontanément ou à la suite d'une morsure d'animal par exemple. Elles sont causées par la présence de staphylocoques cutanés ou sous-cutanés. Ce sont des bactéries pyogènes qui provoquent donc des suppurations pouvant mener à l'abcès. Les pathologies les plus fréquemment rencontrées sont superficielles. Selon leur localisation, on trouve les panaris (doigts / orteils), onyxis (ongles), orgelets (paupières), impétigos (peau), folliculites (follicules pileux), hidrosadénites (glandes sudoripares [13]). Des pathologies moins courantes sont les affections profondes : les furoncles (follicules pileux), anthrax (glandes pilo-sébacées et multiples furoncles), hidrosadénites (glandes sudorales), cellulites et érythème (derme), ou staphylococcie

maligne de la face dans les cas plus graves (infection septicémique suite à une tentative d'extraction d'un furoncle sur le visage). D'ailleurs, toute lésion infectée par cette bactérie peut dégénérer en sepsis (syndrome d'infection généralisée aigu potentiellement fatal). L'infection peut aussi atteindre les muqueuses et provoquer des otites, sinusites, phlegmons de l'amygdale... Des staphylococcies cutanéomuqueuses répétitives peuvent être symptomatologiques d'un terrain diabétique. Des infections internes sont aussi possibles : quelles soient osseuses et musculaires (ostéomyélites aiguës ou chroniques, arthrites septiques, possiblement sur les prothèses), respiratoires (pneumonies, surtout pour les nourrissons), cardiaques (endocardites), uro-génitales ou neuro-méningées [4], [12].

*S. aureus* possède un grand pouvoir pathogène, car il est doté de grandes capacités de survie et de multiples facteurs de virulence directement responsables du développement et de l'expression de la maladie. Ce sont :

- **des toxines** : les hémolysines (dénaturent les globules rouges et les plaquettes), les leucocidines de Panton-Valentine (globules blancs et macrophages), les exfoliatines (responsables du syndrome de la peau ébouillantée), la toxine superantigénique du syndrome de choc toxique TSST-1 ou entéro-F, des entérotoxines causant les TIAC... Toutes ont une activité membranaire ; [12]
- **des enzymes** : elles facilitent l'extension de l'infection tissulaire. Ce sont les coagulases libres ou staphylocoagulases (exo-enzymes coagulant le plasma sanguin), la fibrinolyse, la désoxyribonucléase, la hyaluronidase, les estérases, les protéases, les  $\beta$ -lactamases, le lysozyme, les phosphatases et la gélatinase ;
- **des facteurs d'adhésion** comme la protéine A, la protéine de liaison à la fibronectine, la protéine de liaison à l'élastine, la protéine de liaison au fibrinogène ou coagulase liée adhérent au corps microbien ou *clumping factor*. Mais aussi des structures particulières au niveau de la paroi (capsule, peptidoglycane, acides teichoïques) ;
- **des sidérophores**.

Le diagnostic biologique est direct : il faut effectuer un prélèvement avant la mise en place de l'antibiothérapie, réaliser des hémocultures, et examiner les restes alimentaires en cas de TIAC. La culture donne des colonies pigmentées en 24 heures. Le germe est résistant et se cultive aussi bien sur gélose ordinaire que gélose au sang (hémolyse présente) ou sur milieu spécifique. L'identification est faite par le diagnostic de genre (aspect des colonies, aspect au Gram, capacité aéro-anaérobie facultative, catalase+, Chapman+), le diagnostic d'espèce (coagulase libre, facteur agglutinant = *clumping factor*, protéine A), et si le staphylocoque est atypique, l'utilisation d'une galerie d'identification biochimique. Le diagnostic différentiel se fait par la couleur (*S. aureus* est doré) la croissance sur Chapman montre une acidification. Des recherches particulières sont faites sur les entérotoxines par des techniques immuno-enzymatiques. Le diagnostic indirect est possible mais n'a que peu d'intérêt, hormis en cas de culture négative ou lorsque le prélèvement est impossible, en dosant les antistaphylolysines  $\alpha$ .

Le traitement antibiotique peut être compliqué à cause des excréctions de pénicillinases bactériennes extracellulaires (qui concernent la grande majorité des souches) dont le phénomène est connu depuis les années 1950 : ce sont des enzymes inductibles,

plasmidiques, qui rompent le cycle actif  $\beta$ -lactame des pénicillines G, V, des amino-, carboxy-, et uréido- pénicillines. Certains antibiotiques sont insensibles à ces enzymes, comme les pénicillines M (mécilline, oxacilline, cloxacilline), et les céphalosporines. Il est possible de récupérer l'activité des pénicillines grâce à l'adjonction d'un traitement inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam, avibactam). Les antibiotiques aminosides, synergistines, macrolides, fluoroquinolones restent efficaces. La détection de sensibilité se fait par antibiogramme standard. Le traitement des SARM, apparus dans les années 1980 en milieu hospitalier, pose beaucoup plus de problèmes car elle représente une des plus importantes et courantes des infections nosocomiales. Elle se manifeste grâce à la synthèse d'une protéine PBP2a (*Penicillin Binding Protein*) mutée d'affinité réduite pour les  $\beta$ -lactamines et cause cette fois une résistance à toutes les molécules de cette classe (des pénicillines aux céphalosporines) ainsi qu'aux aminosides, macrolides, tétracyclines, fluoroquinolones et représente 40 % des souches hospitalières. Les bactéries restent toujours sensibles aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine). La détection est délicate puisque seule une faible proportion de ces bactéries expriment la résistance *in vitro*. Il est impératif de traiter les infections systémiques à *S. aureus* par une antibiothérapie bactéricide : pénicilline M + autre famille (aminoside) ; s'il y a résistance aux  $\beta$ -lactamines, remplacer par la vancomycine ou teicoplanine + aminoside (antibiotiques moins rapidement bactéricides et plus coûteux). Il faut étudier le pouvoir bactéricide des associations *in vitro* sur la souche. En dernier recours et si ce traitement n'est pas suffisant, le thérapeute utilisera la pristinamycine. Aujourd'hui le problème est l'apparition de SARV (*S. aureus* résistants à la vancomycine).

La prophylaxie s'effectue par les CClin (Centre de Coordination de la Lutte contre les INfections associées aux soins) nouvellement rebaptisés CPias (Centre d'appui pour la Prévention des Infections Associées aux Soins [14]) qui proposent de nombreuses fiches récapitulatives, et promeuvent les gestes d'hygiène et de soin indispensables (asepsie individuelle et collective en hôpital, lavage des mains). Ils facilitent le dépistage des porteurs en détectant les facteurs de risque (restauration collective), offrent des solutions de décontamination contre le portage nasal (toilette antiseptique et mupirocine = Bactroban®), permettent l'isolation des malades contaminés par les SARM, et proposent une antibioprofylaxie en chirurgie orthopédique par des céphalosporines de première génération.

### 1.1.1.2. *Staphylococcus epidermidis*

*S. epidermidis* est un staphylocoque à coagulase négative, ubiquitaire et commensal de la peau et des muqueuses des animaux à sang chaud.

Si le *S. aureus* est responsable d'infections pyogènes graves, les *S. epidermidis* sont responsables d'infections opportunistes et se développent préférentiellement sur des terrains fragiles (affection sous-jacente comme l'aplasie, le SIDA ou syndrome d'immunodéficience acquise, les suites de radiothérapie ou de chimiothérapie, les prématurés, les suites d'opération comme les prothèses, sondes et cathéters). Il fait partie des bactéries



responsables d'infections nosocomiales et iatrogéniques (suite à un acte médical). Elle fait aussi partie, avec *Propionibacterium acnes*, des principales bactéries responsables de l'apparition de l'acné [8].

Le diagnostic biologique se fait par prélèvement aseptique, isolement et identification. Le diagnostic différentiel se fait par la couleur des colonies (blanches), la croissance sur Chapman crée une alcalinisation du milieu, et le test à la coagulase est négatif.

En ce qui concerne le traitement, la sensibilité aux antibiotiques est similaire à celle de *S. aureus*. Le traitement antibiotique de l'acné peut s'accompagner de l'administration de zinc ou parfois d'un traitement hormonal [15].

### **1.1.1.3. *Streptococcus pyogenes***

Le genre *Streptococcus* appartient aux *Cocci* Gram+, dans la famille des *Streptococcaceae*. Les bactéries ont un diamètre d'environ 2 µm ; elles sont non-sporulées, immobiles et se groupent en chaînettes. Elles sont aéro-anaérobies, catalase- et possèdent un métabolisme fermentatif. Il existe soixante espèces et sous-espèces : l'identification est faite par rapport au type d'hémolyse autour des colonies sur gélose au sang, due à des lécithinases ( $\beta$ -hémolytique), au groupage de Lancefield (A, B, C, F, G, D et non-groupables) et aux propriétés physiologiques ou biochimiques de la bactérie. Les porteurs peuvent être humains ou bovins [16].

*S. pyogenes* est un germe ubiquitaire thermosensible (au froid et à la dessiccation) strictement adapté à l'humain : commensal des téguments et des muqueuses, il se retrouve à l'état latent sur les zones naso-pharyngée, cutanée, vaginale, périnéale et rectale. La transmission est interhumaine directe, mais bien que tout contact avec les zones anatomiques puisse être contaminant, la transmission est rarement manuportée ; elle a lieu parfois par la mise en contact cutané avec des lésions d'impétigo, mais est surtout indirecte par l'alimentation (sur les légumes, les œufs ou bien à partir des bovins, porteurs asymptomatiques, au lait cru) et par la dissémination des gouttelettes de Pflügge<sup>3</sup> [16].

Ce germe est responsable d'infections aiguës et suppuratives (les fièvres puerpérales). Les infections peuvent rester non-invasives sur la peau, comme l'impétigo (préférentiellement dans les pays à climat chaud et humide), les surinfections de plaies, les brûlures et ulcères, ou dans la sphère ORL. Il cause annuellement plus de 600 millions de pharyngites et au moins 15 % des enfants sont des porteurs nasopharyngés : beaucoup dégénèrent en angine chez l'enfant entre 5 à 10 ans, ainsi que les angines érythémateuses ou érythémato-pultacées ou provoquer une scarlatine. Les infections invasives restent les plus graves, avec différentes atteintes cutanées, de l'érysipèle (derme) à la cellulite (tissu sous-cutané) voire la dermo-hypodermite nécrosante ou myonécrose (en cas de streptocoque mangeur de chair) ou la fasciite nécrosante (après contamination de plaies).

---

3 les postillons

D'autres phénomènes peuvent là encore se manifester, comme le syndrome de choc toxique streptococcique, un *sepsis*, des infections profondes (ostéo-articulaires, pleuro-pulmonaires). Une particularité de ces suites infectieuses est qu'il est possible d'observer l'apparition de symptômes chez le patient plusieurs semaines après l'infection alors que la bactérie n'est plus présente dans son organisme : c'est la complication post-streptococcique. Les manifestations peuvent varier selon le(s) organe(s) atteints, du rhumatisme articulaire aigu (polyarthrite aiguë, atteintes cardiaque et neurologique) à la glomérulonéphrite aiguë ou à l'érythème noueux [16].

Les facteurs de virulence de cette bactérie sont son encapsulation lui permettant d'échapper à la phagocytose, et une couche externe exprimant la protéine M à grand pouvoir invasif et d'une variabilité de plus de 80 types antigéniques (on la trouve surtout sur les souches rhumatogènes et néphritogènes). Elle produit aussi diverses toxines (érythrogènes superantigéniques augmentant les cytokines et médiateurs inflammatoires, streptolysines hémolytiques) ainsi que des enzymes antigéniques (streptokinase, streptodornases, hyaluronidase, C5a peptidase).

Le diagnostic est principalement direct et s'effectue par prélèvements et examen direct. Un prélèvement pharyngé est effectué par test rapide (s'il est positif : traitement antibiotique immédiat ; s'il est négatif : mise en culture). La culture se fait préférentiellement avec du CO<sub>2</sub> sur des milieux gélosés enrichis au sang et des milieux sélectifs. S'ensuivent le groupage de Lancefield, et les galeries de tests biochimiques si besoin [16].

Le traitement antibiotique consiste à tirer avantage de la sensibilité constante du germe aux pénicillines G, V ou A : l'amoxicilline reste le traitement de première intention. Les céphalosporines peuvent se montrer utiles mais sont moins efficaces (traitement 10 jours). Le thérapeute utilisera l'érythromycine en cas d'allergie, et des associations avec des aminosides au besoin (synergiques avec la pénicilline sur cette bactérie).

## **I.1.2. Antibiothérapie**

Les antibiotiques sont des molécules chimiques naturelles ou de synthèse ; exploitées très fréquemment en thérapeutique pour leur fort pouvoir antibactérien.

### **I.1.2.1. Mécanismes de l'activité antibactérienne**

Les antibiotiques agissent grâce à leurs structures variées sur différents processus ou différents degrés de métabolisation, que nous allons développer dans cette partie [17], [18].

**Interférence avec la synthèse de la paroi externe** : les antibiotiques  $\beta$ -lactamines

pénètrent par les porines de la paroi externe des Gram- ou diffusent directement à travers la membrane des Gram+. Ils se lient ensuite aux PBP, les enzymes requises pour la synthèse du peptidoglycane qui se voit inhibée, menant à la déféctuosité des membranes et le blocage de la croissance bactérienne généralement suivie de la lyse et/ou la mort cellulaire (bactéricidie) [17]–[19].

**Interférence avec la membrane cytoplasmique (perméabilité létale) :** les polymyxines diffusent à travers la paroi externe jusqu'à la membrane cytoplasmique. Elles vont alors interagir avec les phospholipides membranaires et désorganiser la structure globale, provoquant la fuite du cytoplasme dans le milieu extracellulaire et la mort cellulaire (bactéricidie) [17], [18].

**Interférence avec la synthèse protéique au niveau de la sous-unité ribosomale 30 S :** cela fait partie du mode d'action des tétracyclines (tétra-, mino- et doxy- cyclines) se lient à la sous-unité 30 S et empêchent la fixation de l'acide ribonucléique (ARN) de transfert entrant dans le ribosome, ce qui inhibe la synthèse protéique (bactériostase). Les aminosides (genta-, tobra-, strepto- mycines, amikacine) peuvent aussi inhiber la synthèse de cette façon, mais causent simultanément l'insertion du mauvais acide aminé dans la chaîne protéique. L'accumulation de ces protéines aberrantes et l'absence de protéines fonctionnelles mènent à la mort cellulaire (bactéricidie) [17], [18], [20].

**Interférence avec la synthèse protéique au niveau de la sous-unité ribosomale 50 S :** cela correspond au mode d'action des macrolides (érythro-, azithro-, clarithro- mycines) et des lincosamides (clindamycine) qui se lient à cette sous-unité et mettent fin à la croissance de la chaîne protéique, ce qui cause là encore une inhibition de synthèse protéique. Le chloramphénicol entrainé dans cette catégorie en interférant avec la liaison des acides aminés de la chaîne protéique, mais n'est plus utilisé aujourd'hui compte tenu de son hématotoxicité (principalement bactériostatique) [17], [18].

**Interférence avec la synthèse protéique au niveau du complexe d'initiation 70 S :** les oxazolidinones (linézolide) sont capables de se lier à un site sur l'ARN ribosomal 23 S de la sous-unité 50 S, rendant la formation du complexe d'initiation 70 S fonctionnel impossible, de même que la synthèse protéique. Seuls les Gram+ y sont sensibles (principalement bactériostatique) [17], [18].

**Interférence avec l'action des topo-isomérases II et IV :** les fluoroquinolones (acide nalidixique, cipro-, levo-, gemi- floxacines) interfèrent avec la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ils se lient irréversiblement au complexe ADNgyrase - brin d'ADN et bloquent l'action de cette enzyme nécessaire à l'enroulement et au déroulement du brin d'ADN durant l'étape de réplication. Le brin d'ADN va ensuite sortir de la cellule, menant à l'apoptose (bactéricidie) [17], [18].

**Interférence avec la synthèse d'acides nucléiques :** il est possible d'inhiber les voies métaboliques de synthèse d'acide folique par l'action des sulfonamides et du triméthoprime. Les sulfonamides sont des analogues structurels de l'acide *para-*

aminobenzoïque et entrent en compétition avec ce dernier dans la chaîne de synthèse en faisant intervenir l'enzyme dihydroptéroate synthétase. Le triméthoprim agit de façon similaire mais au niveau de l'enzyme dihydrofolate réductase (bactériostase) [17], [18].

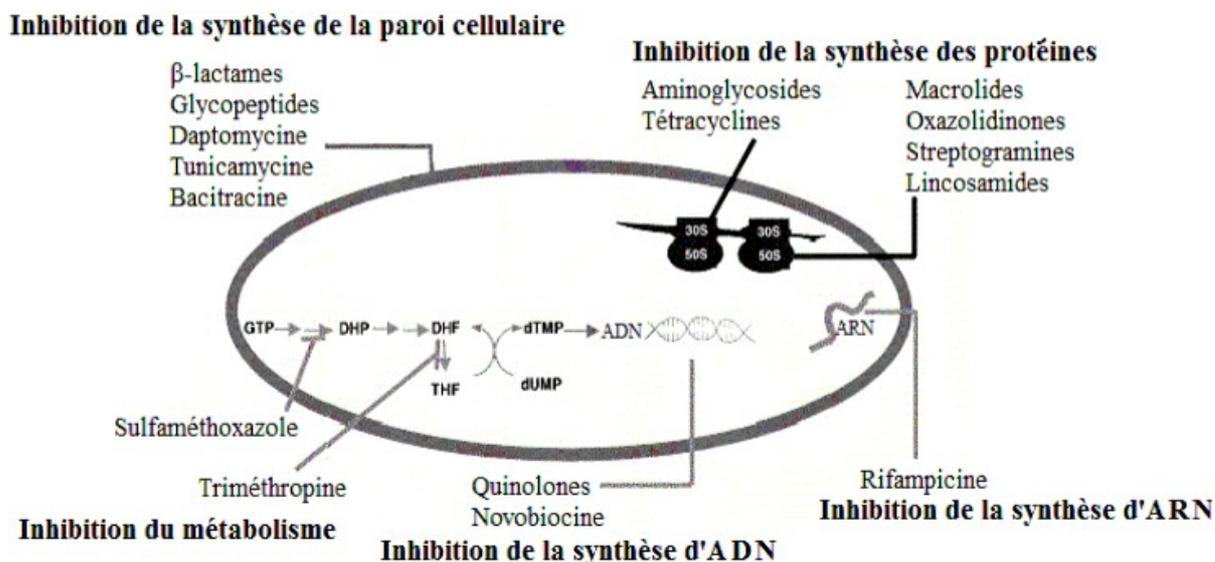


Illustration 1: Résumé du mode d'action des antibiotiques (Singh & Barrett, 2006) [226]

Légende : DHP = dihydroptéroate, DHF = dihydrofolate, THF = tétrahydrofolate

*erratum* : triméthropine = triméthoprim

### I.1.2.2. Antibiorésistance

Le problème majeur posé par les antibiotiques est que les bactéries possèdent des capacités d'adaptation importantes. La preuve en est faite deux ans seulement après le début de l'utilisation de la pénicilline : le premier cas de *S. aureus* pénicilline-résistant est déclaré, la bactérie produisant une enzyme pénicillinase qui provoque l'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame responsable de l'efficacité de cet antibiotique. En 2005, dans plusieurs régions de France, ce type de résistance se retrouvait dans plus de 90 % des cas. L'industrie pharmaceutique a tenté de pallier ce problème en produisant de nouvelles molécules antibiotiques, dont l'oxacilline et la méticilline, pénicillines semi-synthétiques stables en présence de  $\beta$ -lactamases staphylococciques. Mais bientôt une résistance survint, puis contre les lincosamides [18]. Des instituts comme l'InVS (Institut de Veille Sanitaire, aujourd'hui Santé Publique France) sont en charge de regrouper des données sur ces cas à partir des CClin des diverses régions de France, et de mener des études de veille sanitaire comme l'étude GISA de 2000 à 2001 dans le but de surveiller le développement de ces résistances [21]. La Nouvelle Aquitaine voit aujourd'hui son CClin évoluer en CPias-NA (Centre d'appui pour la Prévention des Infections Associées aux Soins de Nouvelle Aquitaine) chargé de « l'expertise et l'appui aux professionnels de santé, la coordination ou l'animation de réseaux et enfin l'investigation et le suivi des déclarations. » [14].

### I.1.2.3.1. Antibiorésistance naturelle

Une bactérie peut posséder une résistance naturelle à un antibiotique, c'est-à-dire que cette résistance est propre à cette bactérie. Par exemple, la résistance à la vancomycine d'*E.coli* lui est naturelle car ses porines sont trop étroites pour permettre son passage [18], [22].

La sensibilité bactérienne à un antibiotique est très variable selon la bactérie. Des différences apparaissent conséquemment aux variations structurales : les bactéries Gram+ sont pourvues d'une paroi cellulaire épaisse et résistante composée de peptidoglycane en association avec des polysides : les acides (lipo)teichoïques ; les molécules de petite taille comme les antibiotiques diffusent aisément à travers. À l'inverse, les bactéries Gram- sont pourvues d'une couche de peptidoglycane plus fine et se protègent à l'aide d'une membrane externe, bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, protéines (formant notamment des porines) et de lipopolysaccharides (LPS). Les LPS sont eux-mêmes composés d'acides gras saturés et contiennent plus de liaisons covalentes avec les chaînes d'acides gras. Ces deux phénomènes réduisent la fluidité de la bicouche, qui est bien moins perméable aux molécules hydrophobes que les bicouches usuelles (d'un ratio de 1/50 à 1/100). L'espace périplasmique entre les deux membranes peut aussi contenir des enzymes préservant les bactéries contre diverses substances qu'elles vont neutraliser (dont les métaux lourds et autres molécules toxiques) [23], [24].

Les mécanismes d'antibiorésistance sont connus et documentés depuis de nombreuses années. Ils sont multiples : [18], [22], [25]

- **production et excrétion d'enzymes détruisant ou modifiant l'antibiotique** avant qu'il n'agisse sur sa cible. C'est le principe des  $\beta$ -lactamases produites dans l'espace périplasmique ou extracellulaire. Il existe également des enzymes dénaturant les aminosides : les Gram- en produisent plusieurs sortes, dont des enzymes adénylantes, phosphorylantes et acétylantes. Elles peuvent aussi produire des acétyl-transférases (inhibant le chloramphénicol notamment) ;
- **impermeabilisation de la paroi cellulaire à l'antibiotique** par l'altération des porines qui ne permettent plus l'accès des antibiotiques au milieu intracellulaire ;
- **éjection de l'antibiotique** dans le milieu extracellulaire par un mécanisme de pompes à efflux : [26] un transport actif de l'antibiotique survient immédiatement après sa pénétration intracellulaire (comme c'est le cas des fluoroquinolones, tétracyclines et macrolides chez les *S. aureus* résistants). Ce procédé varie selon la bactérie ; il peut par exemple être activé par des protéines trans-membranaires insérées dans la membrane cytoplasmique et/ou la paroi externe ;
- **altération de la cible de l'antibiotique**, ne permettant plus la liaison au site actif ni l'initiation de sa cascade réactionnelle. Ainsi les PBP peuvent muter et ne plus permettre la fixation du noyau  $\beta$ -lactame. Ce procédé est à l'origine de la résistance aux macrolides pour les bactéries qui possèdent un ARN ribosomal méthylé, mais également de la résistance aux quinolones à celles possédant une mutation génique de l'ADN-gyrase et de la topoisomérase IV ;

- **altération des voies métaboliques spécifiques au mode d'action de l'antibiotique** : la bactérie mutante possède des voies métaboliques secondaires lui permettant de rendre caduque l'inhibition par l'antibiotique. C'est le cas lorsque la bactérie parvient à re-synthétiser de l'acide folique grâce à de la thymine externe, ou lorsqu'elle produit une cible alternative résistante à l'antibiotique comme la surproduction de l'enzyme triméthoprimine-résistante chez *Escherichia coli* [27] ;

- **association bactérienne sous forme de biofilms**, composés de matrice extracellulaire enveloppant une haute densité de bactéries (en particulier les staphylocoques). La structure et la composition du biofilm sont propres à la bactérie qui le produit et aux conditions environnementales. Le biofilm crée des difficultés dans le traitement antibiotique car il instaure un facteur de diffusion décroissant des antibiotiques à travers la matrice (pour des bactéries qui vont en général supporter des concentrations bien plus élevées d'antibiotiques), permet l'accumulation d'enzymes de résistance aux antibiotiques, ou l'activation de la réponse au stress des bactéries. *S. epidermidis* peut, grâce à la production de biofilms, résister aux glycopeptides [25].

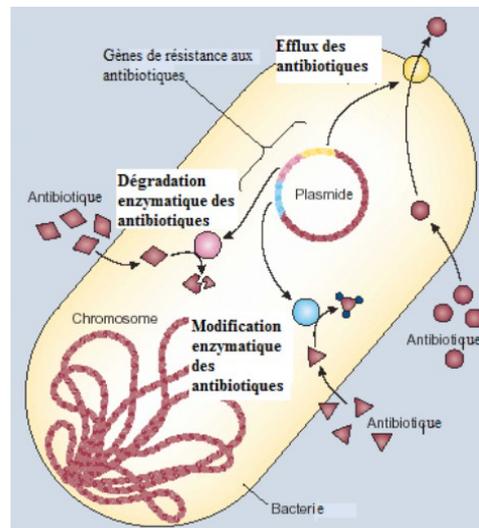


Illustration 2: Efflux, destruction et modification des antibiotiques comme modes de résistance [227]

### I.1.2.3.2. Antibiorésistance acquise

Des résistances extrinsèques/acquises peuvent aussi survenir, par différentes voies génétiques décrites ci-dessous<sup>4</sup> : [18], [22]

- **la conjugaison** : met en œuvre des éléments extra-chromosomiques porteurs d'information génétique, appelés plasmides, qui peuvent donc porter des gènes de résistance aux antibiotiques. Lorsque deux cellules bactériennes sont proches, l'une d'elles peut projeter sur l'autre un *pilus* et lui transférer par contact direct une copie du plasmide que la seconde bactérie pourra à son tour exprimer. La résistance de *S. aureus* aux pénicillines

4 cours de bactériologie, ROGEZ, 2011

est due à un gène plasmidique producteur d'enzymes  $\beta$ -lactamases ;

- **la mutation chromosomique spontanée** : modification fortuite de la séquence nucléotidique d'un gène bactérien. Elle peut survenir sur un gène responsable de la sensibilité à un antibiotique. Peu fréquente, elle permet cependant la sélection et le développement rapide d'une population résistante à cet antibiotique. Ce genre de mutation survient aussi dans les plasmides bactériens (comme lors d'un transfert de résistance plasmidique aux  $\beta$ -lactamases) ;
- **la transformation** : survient au moment où des fragments nus d'ADN porteurs de gènes d'antibiorésistance ayant pénétré dans la bactérie s'intègrent à son matériel chromosomique lors d'une recombinaison. Le pneumocoque et le méningocoque acquièrent une résistance à la pénicilline de cette façon ;
- **la transduction** : peut se produire si un virus bactériophage porteur de fragments d'ADN bactériens (plasmidiques ou chromosomiques) transfère ces fragments dans une nouvelle bactérie hôte. Si le processus est complet, au moins un fragment est échangé avec un fragment homologue par recombinaison. Sinon, le processus est abortif ;
- **la transposition** : s'effectue après la migration d'un transposon (séquence génétique spécifique chromosomique ou plasmidique) dans un chromosome, un plasmide ou un ADN de bactériophage. Dans certains cas, ils peuvent même passer d'une bactérie à l'autre sans incorporation préalable, chromosomique ou plasmidique.

Lorsque les modifications génétiques surviennent ou s'intègrent dans l'ADN chromosomique, les descendants deviennent naturellement insensibles à l'antibiotique : la résistance devient pour eux innée. Ces modifications peuvent être transmises à la même espèce ou bien à d'autres.

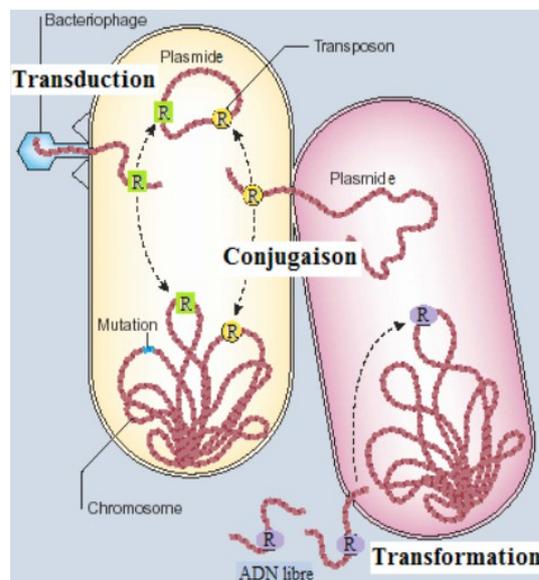


Illustration 3: Différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries [227]

Les travaux de Guerin et al. montrent qu'en présence d'antibiotiques, les bactéries

Gram- synthétisent une enzyme de réagencement génique sur les intégrons, qui s'exprimeront selon un ordre de priorité différent. Les premiers, plus exprimés, confèrent à la bactérie hôte les résistances correspondantes, et les derniers restent en latence jusqu'au prochain réagencement après la prise d'un nouvel antibiotique [28], [29]. D'autres travaux ont révélé que des bactéries en état de stress pouvaient échanger spontanément des gènes de résistance par transmission horizontale [17]. Ces échanges permettent à une population bactérienne de maintenir son potentiel de multirésistance.

Ces nouvelles données devront absolument être prises en considération dans les prochaines réformes de santé publique afin d'adapter et de mettre en pratique de nouvelles stratégies pour lutter contre la résistance bactérienne aux antibiotiques.

### I.1.2.3. Stratégies de lutte contre l'antibiorésistance

Dans la plupart des cas, le but est d'induire la mort cellulaire par le biais simultanément de plusieurs modes d'action antibactériens [1], [30]. Les nouvelles stratégies de lutte contre la résistance bactérienne suivent deux axes majeurs : soit la recherche de nouvelles cibles permettant d'inhiber les mécanismes de résistance bactériens, soit la réduction de la virulence bactérienne. Ces phénomènes pourraient limiter l'adaptation environnementale et la survenue de nouvelles résistances [30]. Depuis l'apparition des antibiotiques, ces molécules ne cessent de montrer leurs limites : effets secondaires et/ou toxicité organique, tolérance puis résistance des bactéries en hausse constante et donc difficulté à détruire les germes de patients immunodéprimés. Ces avancées thérapeutiques sont devenues une nécessité intemporelle [17], [31].

Les recherches sont poussées depuis quelques années dans le domaine de la poly-antibiothérapie [17]. La grande spécificité d'action d'un antibiotique avec sa cible bactérienne permet de limiter les effets indésirables sur les cellules eucaryotes pour un grand nombre d'antibiotiques, mais présente néanmoins l'inconvénient majeur de faciliter le travail de sélection de mutants résistants [30]. L'usage actuel des associations d'antibiotiques peut être comparé à l'association de composés à multiples sites d'action que sont naturellement les huiles essentielles. Les avantages d'associer des principes actifs sont certains à trois niveaux : afin d'obtenir un spectre d'action plus large (pour contrer une infection polymicrobienne ou en cas d'urgence médicale), de prévenir l'apparition de mutants résistants (la probabilité de sélection est proche du produit des probabilités de mutation de chaque actif seul), ou bien d'augmenter la vitesse de bactéricidie par une synergie d'action (pour les patients au système immunitaire dépassé ou inexistant) [32]. Les associations n'ont pas pour seul but la synergie, mais celle-ci est préférable afin de maîtriser rapidement et efficacement la pathologie.

Cependant, une association ne sera pas systématiquement synergique. Il existe 4 types d'interactions : [32]

- **synergique**, qui correspond à une association dont l'effet est bien supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique seul à la même concentration que dans l'association :

$$\text{effet}_{[A]+[B]} \gg \text{effet}_{[A]} + \text{effet}_{[B]} ;$$

- **additive**, qui correspond à une association dont l'effet est égal à la somme des effets de chaque antibiotique seul à la même concentration que dans l'association :

$$\text{effet}_{[A]+[B]} = \text{effet}_{[A]} + \text{effet}_{[B]} ;$$

- **indifférente**, où l'antibiotique le plus efficace n'est pas affecté par la présence du second : cela correspond à une association dont l'effet est égal à celui du plus efficace des antibiotiques seul :

$$\text{effet}_{[A]+[B]} = \text{effet}_{[A]} \text{ OU } \text{effet}_{[B]} ;$$

- **antagoniste**, qui correspond à une association dont l'effet est bien inférieur à la somme des effets de chaque antibiotique seul à la même concentration que dans l'association :

$$\text{effet}_{[A]+[B]} \ll \text{effet}_{[A]} + \text{effet}_{[B]}.$$

Des alternatives thérapeutiques bactéricides apparaissent aussi grâce aux recherches sur des groupes de virus bactériophages [17].

On peut utiliser dans cette même optique des substances bioactives à propriétés antimicrobiennes différentes des antibiotiques mais toujours capables d'agir à de multiples niveaux, [17] qui ont l'avantage d'être bactériostatiques et/ou bactéricides. Dans ce cadre, l'aromathérapie est une autre stratégie thérapeutique intéressante.



## I.2. Aromathérapie

Nous aborderons dans cette partie les éléments primordiaux de la pratique aromathérapique, de la confection des huiles essentielles à leur place dans la thérapeutique antibactérienne cutanée.

### I.2.1. Découverte et évolution des pratiques

Les notions d'huile essentielle et d'aromathérapie sont issues de la phytothérapie par des méthodes particulières d'extraction de plantes médicinales aromatiques. Ces plantes font partie intégrante des médecines traditionnelles de toutes les peuplades à travers le monde. Elles sont propres à une zone géographique où se développent des plantes autochtones utilisées de façon spécifiques pour le soin du corps et/ou de l'esprit ou encore pour la vénération des déités. Ainsi, nous savons de nos aïeux que l'ail (*Allium sativum*) possède des propriétés germicides, que le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) est très utile pour soulager les douleurs dentaires, ou que la lavande (*Lavandula angustifolia*) est utilisée depuis l'époque gréco-romaine pour ses propriétés relaxantes, ou encore pour assainir le linge (d'où est tiré le nom des lavandières de l'ancienne époque) [33]–[36]. Certains noms moléculaires sont d'ailleurs issus historiquement de propriétés que l'on attribuait à ces plantes, comme l'eugénol dont le nom est inspiré de Sainte Eugénie, patronne des accoucheuses [37].

Des plus anciennes et isolées des civilisations, comme celle des aborigènes d'Australie 30 000 ans avant notre ère qui utilisaient déjà la fumigation [38], jusqu'aux plus récentes ces derniers millénaires dans les civilisations antiques d'Orient, d'Égypte, de Mésopotamie (avec la chimiste Tapputi) et d'Arabie, l'humain a utilisé des techniques toujours plus élaborées afin de décupler l'effet des plantes sauvages à sa disposition. Ces civilisations pousseront le plus loin les applications de ces plantes, allant jusqu'à développer des techniques très avancées de conservation des momies grâce aux extraits de plantes à propriétés antiputrides en Égypte, qui servaient à accompagner l'âme du défunt vers l'autre monde. Les peuples d'Arabie procédaient déjà à l'extraction des composés de plantes ou parties de plantes par la vapeur d'eau, ou hydro-distillation, à l'aide d'alambics : le plus vieux retrouvé, composé de terre cuite, date de 5000 ans avant notre ère. Les conquêtes arabes en Afrique du Nord et en Espagne, puis les croisades au Moyen-Âge, répandirent ce savoir-faire jusqu'en Occident à partir des côtes méditerranéennes [33], [39], [40]. Ce domaine d'activité donne son essor à la parfumerie, avec des plantes facilitant l'attrait et la séduction entre les Hommes. Les domaines de la relaxation ou de la gastronomie se développent avec l'aromatisation des bains et la fabrication de boissons aromatiques, qui peuvent aussi servir le domaine thérapeutique. À cette époque, des onguents servant à la désinfection des plaies sont déjà connus. Nous avons conservé en partie l'usage de ces plantes aromatiques en héritage dans ces divers domaines (culinaire, cosmétique ou parfumerie) [33], [40]–[42].



Il est important d'apprécier la place de la femme à sa juste valeur dans l'histoire de l'aromathérapie. En effet, la célèbre chimiste d'Alexandrie Maria, dite « la juive » qui donna son nom au bain-marie, inventa plus d'un siècle avant Jésus-Christ une technique d'extraction de qualité supérieure à celle de l'alambic. Pourtant, ce dernier n'est inventé que près de mille ans plus tard par Geber (721-825) et perfectionné par Avicenne (930-1037) qui y adjoint à cette période un réfrigérant et parvient à distiller le premier la molécule d'éthanol. Nous ne saurons que très peu de choses sur les techniques qu'elle parvint à mettre au point. Ces méthodes n'intéressant pas les marchands de l'époque, son savoir ne sera pas diffusé. La décantation dans le vase florentin ne sera inventée qu'entre 1500 et 1600 par Giovanni Battista Della Porta [42].

En 1834, à l'aube de la révolution industrielle, le chimiste allemand Runge découvre le premier antiseptique, isolé dans le goudron de houille par distillation du charbon : il s'agit du phénol. D'autres ont ensuite été extraits de la distillation du goudron de pin ou du genévrier. Depuis, de nombreux dérivés phénoliques ont été développés, moins toxiques, plus actifs et plus commodément synthétisables [33].

Il faut attendre 1881 pour voir apparaître les premières recherches expérimentales sur les huiles essentielles grâce à De La Croix. À cette date, le docteur Koch mène également les premiers travaux d'étude sur les propriétés antiseptiques d'essences de plantes sur le bacille auquel il donnera son nom (*Mycobacterium tuberculosis*) [33], [42].

En 1910, Martindale révèle l'huile essentielle d'origan en tant que plus grand antiseptique du règne végétal, 25 fois plus actif que le phénol pur sur le colibacille. Gattefossé tente alors, en 1926, de définir l'action bactéricide des huiles essentielles comme « antitoxique » dans le sens où les huiles essentielles provoquent une dysfonction globale du métabolisme cellulaire (bactériostase) aboutissant à la cytolyse (bactéricidie) [13].

Le néologisme « aromathérapie » (du latin *aroma* = l'arôme et du grec *therapia* = le soin, la cure) a été suggéré pour la première fois par René-Maurice Gattefossé, qui étudie avec passion les huiles essentielles suite à un incident dans son laboratoire lui ayant valu une grave brûlure, en 1930. Les soins classiques étant inefficaces, la gangrène gazeuse se propage. En dernier recours lui vient l'idée d'appliquer sur ses plaies de l'huile essentielle de lavande : selon la légende s'ensuivit un soulagement immédiat et une cicatrisation rapide. Ce chimiste lyonnais pionnier de la parfumerie consacrera après-guerre de nombreux travaux de recherche aux grandes propriétés des huiles essentielles, sur lesquelles il écrira un traité. Dès lors, l'aromathérapie désignera l'emploi des huiles essentielles dans le but de traiter une ou plusieurs affections [33], [41].

À cette époque, les scientifiques commencent à rechercher différentes méthodes de quantification de l'effet antibactérien d'une substance. Rideal et Walker utilisent le coefficient phénol afin de mesurer l'activité de ces molécules : la technique, toujours utilisée, consiste à tester la dilution de phénol active en 2,5, 5, 7, 10, 12 et 15 minutes sur le filtrat d'une culture de bacille typhique. La dilution active de phénol est celle qui en 2,5 minutes empêche la



croissance du germe après repiquage d'une anse de liquide dans un bouillon. La technique peut être extrapolée aux huiles essentielles en définissant le coefficient phénol par le rapport : [dilution active de l'huile essentielle] / [dilution active du phénol]. En 1939, Bose établit une corrélation entre la formule chimique moléculaire et l'activité antiseptique. En 1949, Schroeder et Messing utilisent une nouvelle technique : ils mesurent les zones d'inhibition autour de disques de papier filtre préalablement imprégnés d'huiles essentielles, qui est le principe de l'aromatogramme moderne, même si le néologisme « aromatogramme » ne fut proposé qu'en 1971 par le docteur Maurice Girault. Cette nouvelle technique deviendra la plus utilisée en routine car rapide et simple de mise en œuvre [13], [33].

En 1964, le docteur Valnet, chirurgien militaire français, connaît une grande renommée grâce à ses travaux avec des huiles essentielles sur le terrain dans le soin des blessures de guerre, permettant un regain d'intérêt pour la phytothérapie et l'aromathérapie, dont les connaissances ne cessent de s'engranger depuis [13], [33], [41].

Une dizaine d'années plus tard, Pierre Franchomme, aromatologue, introduit la notion de « chimiotype » (*ct.*) qui se définit à l'heure actuelle selon le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie comme : [43]

*« désignant au sein d'une espèce végétale un ensemble d'individus qui ne diffèrent des autres individus que par leur contenu en un ou plusieurs métabolites secondaires, sans différence morphologique entre eux. Ce phénomène existe chez de nombreuses plantes médicinales, en particulier celles à huiles essentielles par exemple le thym. Le terme chimiotype est préférable à chémotype, directement issu de l'anglais. ».*

Le *ct.* vient donc compléter la dénomination internationale : il permet à la fois d'utiliser des traitements d'une reproductibilité fidèle, d'activité spécifique bien déterminée, et de réduire la fréquence des effets indésirables du soin aromatologique [33], [41].

En 1977, le docteur Belaiche définit un indice aromatique relatif à la plus active des huiles essentielles testées jusqu'alors : l'huile essentielle de *Thymus capitatus*, afin d'établir un nouveau classement du pouvoir bactéricide des huiles essentielles, et dégage un classement en trois catégories principales : les huiles essentielles antiseptiques majeures, intermédiaires, et faibles. Un an plus tard débutent les premiers aromatogrammes en milieu liquide [13].

Durant toutes ces décennies, la France n'est pas le seul pays à se spécialiser dans l'étude des propriétés thérapeutiques des huiles essentielles. Parallèlement aux soins pratiqués par l'école française, très axée sur la thérapeutique par voie orale, l'aromathérapie pratiquée en Grande Bretagne est principalement exercée par voie externe et à plus faible dose, pour des propriétés relaxantes et l'évaluation de leur impact psychologique [41].

À l'heure actuelle, la Pharmacopée européenne définit législativement les huiles essentielles comme suit : [44]

*« produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une*

*matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».*

Aujourd'hui, à la vue de l'impuissance de l'industrie pharmaceutique face au problème causé par les multirésistances bactériennes aux antibiotiques, un engouement pour les huiles essentielles se manifeste : de nombreuses études sont réalisées *in vitro* et *in vivo* afin de valider les propriétés des huiles essentielles déjà réputées, et d'affiner nos connaissances sur leur composition, leurs modes d'action et leur toxicité [41], [45].

## I.2.2. Obtention et qualité

Cette partie développe les techniques utilisées à l'heure actuelle pour la fabrication d'une huile essentielle de qualité thérapeutique, et les certifications auxquelles elles doivent répondre.

Quelle que soit la technique utilisée, tout travail d'extraction correctement mené s'effectue sur une matière première identifiée de façon formelle, c'est-à-dire la plante ou partie de plante concernée. Étape indispensable assurant la traçabilité de l'huile essentielle, l'identité de la plante est assurée par des certificats et engagements du producteur et peut être vérifiée selon les méthodes de la Pharmacopée européenne (ou française à défaut). L'identité se décline à partir : [46]

- **des caractères botaniques macroscopiques**, avec une description de la plante et de ses différentes parties ;

- **des caractères botaniques microscopiques**, avec l'examen microscopique de la drogue végétale permettant d'identifier les spécificités dominantes de la drogue, et de repérer d'éventuels éléments étrangers ou une falsification.

Ces deux premières étapes nous renseignent sur l'identité botanique exacte de la plante par la nomenclature binominale de Linné (ordre, famille, genre et espèce voire sous-espèce, variété ou clone [42]). De cette façon, il est plus facile de faire la distinction entre l'huile essentielle issue du cannelier de Chine (*Cinnamomum cassia*) et celle issue du cannelier de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*) qui possèdent des propriétés différentes [47].

Une fois la plante identifiée se pose la question de la matière première sujette à l'extraction. Comme nos prédécesseurs l'avaient compris, tout n'est pas forcément « bon à prendre » dans une plante à essence pour en extraire une huile essentielle de qualité. Elles synthétisent les constituants des huiles essentielles puis les conservent dans des appareils sécréteurs (poches glandulaires schizogènes, canaux schizolysigènes ou poils glandulaires épidermiques) situés dans un ou plusieurs organes propres à chaque plante. Donc certains organes peuvent en être totalement dépourvus, tandis que, d'un organe à l'autre de la même plante, la composition et la quantité de l'huile essentielle qui en sera extraite varieront de façon importante, *a fortiori* son indication, son efficacité et sa toxicité. Une bonne

démonstration en est faite par les trois types d'huiles essentielles de cannelle de Ceylan : [37]

- celle issue de son **écorce**, riche en cinnamaldéhyde ;
- celle issue de ses **feuilles**, riche en eugénoles ;
- celle issue de ses **racines**, plus riche en bornéol (camphre).

Il est capital de déterminer à l'avance quelle partie de la plante sera utilisée pour obtenir une huile essentielle d'intérêt spécifique. Ces différentes parties peuvent être : [26], [33], [36], [41], [48]

- **la plante entière** (toutes parties) ;
- **les parties souterraines** : le rhizome, la racine ;
- **les parties aériennes**, ou l'une d'entre-elles : le bois, l'écorce, les oléorésines, les bourgeons, les feuilles, les boutons floraux ou fleurs / sommités fleuries épanouies, les pétales, les fruits ou péricarpes de fruits, ou les graines.

Notons au passage que seules 10 % des espèces végétales sont dotées d'un appareil sécréteur d'essences aromatiques, et sont plutôt propres à une famille botanique. Elles se trouvent parmi : [26], [33], [36], [41], [48]

- **les Cupressacées** (cyprès, genévriers) ;
- **les Abiétacées** (pins, sapins, épicéas, épinettes, cèdres) ;
- **les Rutacées** (citron, orange douce, combava, citron vert, limette, pamplemousse, mandarine, orange amère, bergamote) ;
- **les Myrtacées** (eucalyptus, girofliers, myrtes, mélaleuques dont niaouli / arbre à thé / cajepout) ;
- **les Lamiacées** (lavandes, thym, romarins, menthes, origans, marjolaines, sarriettes, basilics) ;
- **les Burséracées** (encens, myrrhe) ;
- **les Lauracées** (cannelles, lauriers, bois de rose, ravintsaras, litsées) ;
- **les Poacées** (citronnelles, palmarosas, vétivers) ;
- **les Zingibéracées** (gingembre, cardamome) ;
- **les Astéracées** (hélichryses, camomilles, tanaïses, armoises, achillées) ;
- **les Apiacées** (anis, fenouils, carottes, ajowans, céleris, angéliques, coriandres).

Cependant, l'identification botanique stricte et la sélection de l'organe à extraire ne sont pas des critères suffisants : des différences entre les composants chimiques ainsi que leur concentration apparaissent selon l'espèce / sous-espèce / variété de plante, le stress de la dessiccation, le stade végétatif et l'âge de la plante à la récolte ainsi que son biotope : l'année de récolte, la saison, la période de la journée, les conditions de croissance comme l'hygrométrie, la composition et le type de sol, l'altitude et la température / l'ensoleillement / la luminosité (rayonnement infrarouge dominant en bord de mer, ultraviolets en altitude) voire les populations végétales avoisinantes. Les producteurs prêtent attention à ces facteurs, ce qui leur permet de récolter une huile essentielle de différente qualité selon le moment et le lieu de récolte : le thym vulgaire à géraniol produira une huile essentielle riche en géraniol l'été et riche en acétate de géranyle l'hiver. Pour la rose de Damas, les pétales doivent être

récoltées après la rosée du matin, tandis que les parties aériennes du thym *cf.* thujanol seront récoltées dans l'après-midi. Les fertilisants utilisés et la procédure d'extraction, ainsi que l'état sauvage ou de culture de la plante font aussi partie des éléments à prendre en compte [40], [48]–[54]. L'exemple de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est très parlant : le *cf.* thymol est le plus répandu, mais sous un climat chaud et sec, nous obtiendrons le *cf.* carvacrol. En zone humide, nous récolterons un *cf.* thujanol-4 +  $\alpha$ -terpinéol, tandis que le *cf.* géraniol sera plus souvent obtenu en montagne [55]. L'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) possède aussi de multiples *cf.* : terpinèn-4-ol, 1,8-cinéole, terpinolène et trois de leurs mélanges [46]. Il convient de toujours vérifier l'ensemble des informations fournies par le fabricant avant d'utiliser une huile essentielle.

Selon l'organe et le produit que l'on souhaite obtenir, différentes méthodes sont utilisées aujourd'hui pour l'extraction à partir de parties de plantes mais toutes ne produiront pas une huile essentielle. Par exemple, la technique d'enfleurage ou de macération de fleurs donne une pommade florale. L'extraction par solvants lipophiles s'utilise notamment en parfumerie pour les fleurs fragiles, mais laisse des impuretés dans le produit d'extraction. L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique permet d'éviter de laisser ces traces. Cependant, ces méthodes extraient d'autres molécules que les composés volatiles (triglycérides, cires) et donneront des subtilités aromatiques différentes : ce sont les concrètes et les résinoïdes [42], [56]. Une absolue s'obtient par lavage (pour l'enfleurage ou macération) ou extraction (pour les concrètes et résinoïdes) éthanoliques des produits d'extraction précédemment cités [42]. Concernant l'extraction des huiles essentielles utilisées en thérapeutique, les trois techniques reconnues par la Pharmacopée européenne sont l'entraînement à la vapeur d'eau, le processus mécanique (expression à froid) et la distillation sèche. Nous allons décrire plus précisément ces dernières : [26], [39], [44], [52]

**La distillation sèche** est une technique assez peu utilisée. Elle ne concerne que les organes durs comme les racines, bois ou écorces (par exemple cade ou bouleau). Les substances sont extraites sans utiliser d'eau. Cependant une rectification est parfois nécessaire à cause des composés toxiques qui peuvent s'y former [41].

**L'expression à froid** consiste en une dilacération par abrasion mécanique à température ambiante des parties externes des péricarpes (zestes) de fruits. Cette méthode est réservée aux agrumes (*Citrus* ou Hespéridées : par exemple bergamote, orange, citron). Un courant d'eau va entraîner le broyat puis les substances seront séparées de la phase aqueuse par décantation ou par centrifugation. En effet, la méthode classique de distillation chauffe et oxyde leurs molécules aromatiques, principalement terpéniques et aldéhydiques, thermosensibles. Avec cette technique, les poches sécrétrices des péricarpes vont se briser et libérer les molécules sans qu'elles ne subissent de transformation. Cette technique conserve aussi les antioxydants naturels de la fraction non-volatile qui n'auraient pas été entraînés par distillation : le produit obtenu n'est donc pas une huile essentielle à proprement parler, il est appelé « essence » car considéré identique au produit sécrété directement par la plante, bien que des hydrolyses et des contaminations microbiennes puissent l'avoir altéré [33], [41], [42], [53], [56], [57].

Pour la **distillation par entraînement à la vapeur d'eau**, il faut placer la matière

première dans un alambic fait de matériaux inertes : acier inoxydable de préférence, sinon en cuivre. À partir de la chaudière est injecté un courant de vapeur d'eau à travers la masse végétale (sans contact direct entre l'eau bouillante et la matière première). Le phénomène de co-distillation eau / composés volatils est mis à contribution : chaque constituant volatil possédant son propre seuil de volatilité, le phénomène physique d'azéotropisme apparaît, permettant de conserver un équilibre des proportions entre la composition de la phase vapeur créée et la phase liquide dont elle est issue. L'eau dont la température d'ébullition est de 100°C, contribue donc à entraîner les composés volatils qui devraient se vaporiser uniquement à partir de 150°C car la somme des tensions de vapeur du mélange sera réduite. L'ensemble des vapeurs se condense ensuite dans un serpentin réfrigéré et s'écoule goutte à goutte dans l'essencier ou vase florentin. La dernière étape est la décantation durant laquelle deux phases se dissocient par immiscibilité (partielle ou totale) des condensats hydrophiles et lipophiles, mais aussi par écart de densité (dans la plupart des cas l'huile essentielle possède une densité plus faible que l'eau et va surnager). Les producteurs obtiennent ainsi l'huile essentielle lipophile d'une part, et de l'autre la phase aqueuse qui est l'hydrolat aromatique / eau florale chargée des parties hydrosolubles. La distillation se fait lentement sous basse pression (< 0,05 bar) et à la température la plus faible possible, avec de l'eau de source non-calcaire. Elle peut s'effectuer avec ou sans cohobage<sup>5</sup>. La distillation par entraînement est davantage utilisée pour l'extraction d'huile essentielle à partir des fleurs de plantes (rose, oranger, ylang-ylang) [33], [41], [42], [48], [53], [56].

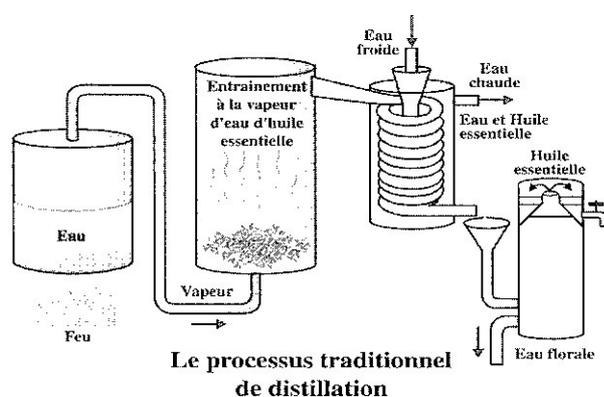


Illustration 4: Schéma de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau [53]

La différence avec l'**hydro-distillation** est que, lors de ce processus-ci, la matière première entre en contact direct avec l'eau et c'est l'ensemble qui est chauffé à ébullition : cette technique ajoute donc un procédé à l'extraction, celui de l'hydro-diffusion<sup>6</sup>. Cette technique est moins avantageuse car, à de telles températures, des artefacts chimiques peuvent se former dans l'huile essentielle suite à l'hydrolyse des esters de la plante. Cependant il est plus pratique pour des charges végétales élevées car il évite leur agglutination le temps du procédé et permet d'augmenter le rendement [33], [41], [42], [56].

5 réinjection de la partie aqueuse du distillat dans la cuve.

6 relargage des composés volatils de la plante dans le milieu aqueux.

La technique de distillation est toujours en voie de perfectionnement. Bien que non-reconnues comme officielles, de nouvelles méthodes d'extraction pourront éviter l'ajout d'eau et la dégradation des produits thermosensibles, comme la technique par micro-ondes, la technique par ultrasons ou celle des champs électromagnétiques pulsés, qui font l'objet d'autres thèses [33], [41], [42], [53], [56], [58].

Les rendements varient d'une technique à l'autre, mais surtout selon la plante ou l'organe utilisés. Ainsi, il suffit de 7 kilogrammes (kg) de clous de girofle desséchés pour obtenir 1 kg de son huile essentielle, mais produire la même quantité d'huile essentielle de rose de Damas nécessitera 4000 kg de ses pétales [41] ! Les huiles essentielles sont produites sur presque tous les continents. Les productions mondiales sont tributaires de nombreux facteurs et varient annuellement. Elles varient aussi lors de la même année selon l'huile essentielle : de quelques kg pour l'une à 50 000 tonnes pour une autre, et sur le principe de l'offre et la demande, les prix s'adaptent en conséquence : de 1,80 \$<sub>(US)</sub>/kg pour une huile essentielle d'orange à 120 000,00 \$<sub>(US)</sub>/kg pour celle d'iris en 2004 [40].

Les huiles essentielles ne sont pas déterminées uniquement d'après leur mode d'obtention, mais aussi par des caractéristiques physico-chimiques. À température ambiante, elles sont : [33], [37], [41], [57]

- **à l'état liquide** (ou plus rarement solide comme l'huile essentielle de rose) ;
- **incolores ou colorées**. Souvent, elles sont incolores à l'obtention et se colorent au contact de l'air en prenant des teintes variant du jaune à l'orange la plupart du temps. Notons toutefois une teinte naturellement rougeâtre pour certaines cannelles, bleue pour la camomille romaine et verte pour l'absinthe ;
- **volatiles (et odorantes)**, en fonction de la composition chimique : une huile essentielle riche en composés monoterpéniques est davantage volatile qu'une huile essentielle constituée majoritairement de sesquiterpènes. Cette caractéristique les différencie notamment des huiles fixes ou huiles végétales, qui sont grasses et tachent le papier de façon indélébile ;
- **inflammables** ;
- **solubles dans l'alcool, les huiles végétales et la plupart des solvants organiques** ;
- **insolubles dans l'eau** ;
- **sensibles à l'oxydation** ;
- caractérisées par d'autres **propriétés physicochimiques** mesurables, dont l'indice de réfraction souvent élevé et la déviation de la lumière polarisée due à la présence d'énantiomères ;
- caractérisées par un **point d'ébullition** situé entre 160 et 240°C ;
- d'une **densité** comprise entre 0,759 et 1,096 (presque systématiquement inférieure à 1), hormis pour les huiles essentielles d'ail, de saffras, de clou de girofle, de bouleau, de gaulthérie ou de cannelle de Ceylan.

La détermination de la qualité d'une huile essentielle commence, comme nous venons de le voir, par l'identification botanique stricte de la plante et de son biotope, de son *cf.* et de l'organe extrait, ainsi que la technique d'extraction mise en œuvre, qui font partie



intégrante de la traçabilité des lots d'huiles essentielles produits par le fabricant. Cependant, d'autres critères doivent nécessairement être validés pour s'assurer de la qualité de l'huile essentielle (ou de l'essence) définitive qui sera commercialisée [42], [44]. La vérification de toutes ces données étant parfois négligée, le traitement par les huiles essentielles est souvent vu comme dangereux car non-reproductible d'un lot à un autre [40], [48], [54].

Il existe pourtant des techniques permettant de déterminer précisément la composition moléculaire d'une huile essentielle : les chromatographies. La chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse peuvent être utilisées dans ce but : le chromatogramme du produit à examiner obtenu par extraction est comparé à des témoins. Ces techniques sont des étapes obligatoires et importantes pour la détermination de la qualité du produit obtenu car ils permettent de caractériser son *ct.* en identifiant les constituants actifs majoritaires de l'huile essentielle produite [59]. Le bulletin d'analyse fourni par le producteur de l'huile essentielle mentionne l'ensemble des informations nécessaires à la comparaison entre les lots et entre laboratoires afin de trouver l'huile essentielle la plus adaptée à la pratique thérapeutique et répondant aux spécifications en vigueur [60].

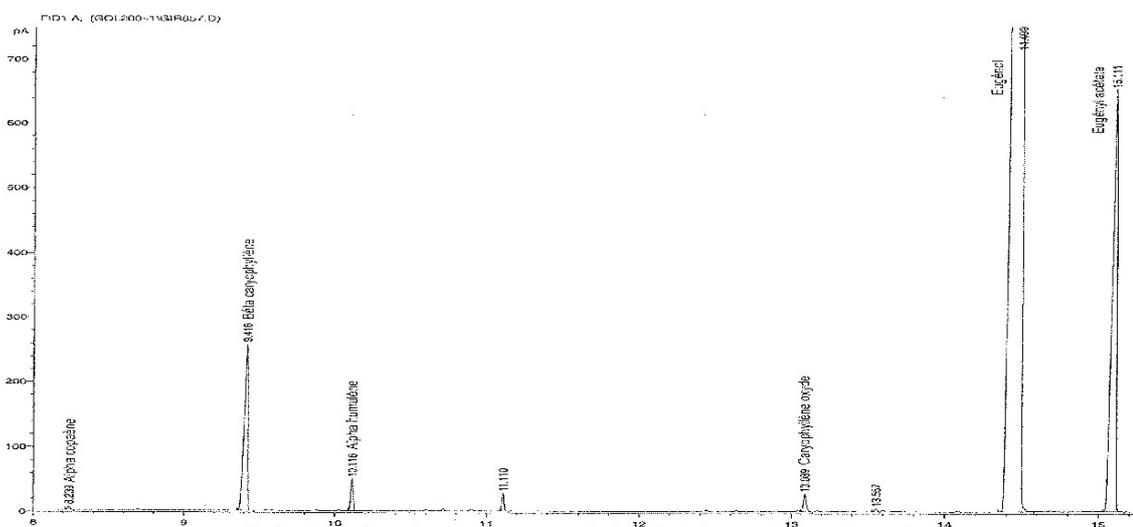


Illustration 5: Chromatogramme issu d'une chromatographie en phase gazeuse d'une huile essentielle [53]

Ces spécifications sont détaillées dans les Pharmacopées européenne [44] ou à défaut française [61] ainsi que les organismes AFNOR (Association Française de NORmalisation) et les normes ISO (*International Organization for Standardization*) et du CEN (Comité Européen de Normalisation) vont codifier les critères de qualité qu'une huile essentielle doit posséder pour être utilisée avec le maximum de sécurité et d'efficacité. Des labels de production ont aussi fait leur apparition, dont l'actuel plus connu est la certification BIO®, qui peut être délivrée lorsque le produit transformé est issu d'au moins 95 % de ses produits agricoles certifiés BIO® donc issus de l'agriculture biologique (le pourcentage de produit biologique réel est affiché sur l'étiquetage, les produits de synthèse présents appartiennent tous à une liste restrictive, les produits finis ne sont pas testés sur les animaux

[62]). Ce label ne peut être délivré qu'après que le système de production ait subi divers contrôles, réalisés annuellement par des organismes certificateurs indépendants agréés par l'INAO (Institut National de l'Origine et de la qualité). Ils sont neuf à l'heure actuelle en France : [63]

- ECOCERT France (FR-BIO-01) ;
- AGROCERT (FR-BIO-07) ;
- CERTIPAQ BIO (FR-BIO-09) ;
- BUREAU VERITAS Certification - QUALITE FRANCE (FR-BIO-10) ;
- CERTISUD (FR-BIO-12) ;
- CERTIS (FR-BIO-13) ;
- BUREAU ALPES CONTROLES (FR-BIO-15) ;
- QUALISUD (FR-BIO-16) ;
- BIOTEK Agriculture (FR-BIO-17).

Le logo européen Eurofeuille® du CEN est quant à lui présent sur les produits alimentaires préemballés dans l'Union Européenne depuis 2010 et mentionne si le produit est issu de l'agriculture UE, non-UE ou des deux [64]. Ces deux labels sont décernés aux produits à usage alimentaire dont font partie les huiles essentielles, mais il en existe bien d'autres pour les cosmétiques où certaines huiles essentielles peuvent être utilisées.

Des mentions sont aussi délivrées par les laboratoires eux-mêmes en gage de qualité :

- « **la garantie H.E.B.B.D.** » (*Phytosun arômes*) : huile essentielle botaniquement et biochimiquement définie : espèce botanique exacte en latin, organe producteur, *ct.*, extraite par distillation à la vapeur ou expression à froid, contrôle par CPG-SM, possédant un bulletin d'analyse du CNRS (Centre National de Recherche Scientifique) conforme aux spécifications en vigueur [41], [65] ;
- **la mention H.E.C.T.**® (*Pranarôm*) : huile essentielle chémotypée : à activité et toxicité bien établie, de par sa composition propre à un terroir donné [66] ;
- **le label H.E.S.D.**® (*Eona*) : huile essentielle scientifiquement définie : le laboratoire emploie ici le terme de « label H.E.S.D. » sur son site internet, mais ne précise nulle part son cahier des charges ni l'organisme certificateur. Créé en 2006, il est sensé regrouper les caractéristiques des deux pré-cités, en précisant le mode de culture (A.B.® ou non) et un emballage adapté aux huiles essentielles, ainsi que des critères qualitatifs supérieurs à ceux des normes AFNOR [67] ;
- **la mention E.O.B.B.D.**® (*Panacea pharma*) : *essential oil botanically and biochemically defined* : créée en 1998, elle assure la dénomination et la variété de l'espèce utilisée (selon la nomenclature binominale internationale), l'origine géographique (biotope), le stade de développement et/ou l'organe distillé de la plante, son mode de culture, la spécificité biochimique / *ct.*, et le numéro de lot nécessaire à la traçabilité [68] ;
- **la charte Q.B.I.**® (*Osmobiose*) : pour la pratique de l'aromathérapie quantique. La sélection des huiles essentielles est basée sur 7 critères (botanique, écologique, géographique, développement durable, biochimique, physique et physique quantique) et sur la notion de sécurité intrinsèque, c'est-à-dire les moins irritantes possible et ayant prouvé leur efficacité et leur tolérance respiratoire ou cutanée chez les personnes sensibles et les enfants [69].

Toutes ces mentions et chartes ne sont cependant pas garanties par un cahier des charges vérifié par un organisme indépendant comme c'est le cas des labels BIO<sup>®</sup>, ce ne sont donc pas des labels à proprement parler. Ils ne font que mettre en avant les normes déjà définies par l'AFNOR et les normes ISO [60] à savoir une huile essentielle 100 % pure, c'est-à-dire non-diluée, non-allongée et non-coupée par d'autres huiles, et 100 % naturelle, c'est-à-dire qui n'a subi aucun traitement pouvant altérer ou modifier sa composition originelle : non-reconstituée chimiquement, non-dénaturée par des essences minérales, des molécules de synthèse ou d'hémisynthèse, par des émulsifiants ou des diluants donc ni rectifiée, ni décolorée ou recolorée, ni déterpénée (bien que ce procédé permette une plus grande solubilité dans les alcools et diminue l'irritation de l'huile essentielle), ni peroxydée et qui ne contient pas de conservateurs, de traces de solvants ou d'autres produits chimiques. Une huile essentielle pure est aussi totale, ce qui signifie qu'elle contient toutes les fractions aromatiques de distillation issues de l'organe végétal, ni plus ni moins (y compris la fraction de queue). Pour réaliser une huile essentielle totale, les temps de distillation doivent donc être respectés (ils ne doivent pas être trop longs non-plus, au risque de réduire la concentration de composés actifs du *totum* d'huile essentielle [48], [70]) [33], [53].

Le mode de conservation et de stockage d'une huile essentielle, produit fragile et aisément oxydable, est capital : les produits d'extraction doivent être conservés dans des flacons propres et secs en aluminium vernissé, acier inoxydable ou verre teinté anti-actinique car la lumière (rayonnements UV) est une cause majeure de dégradation. Les contenants doivent être inertes vis-à-vis du contenu (tout récipient en plastique est à proscrire car les substances aromatiques y opèrent une micro-dissolution). Il faut aussi les préserver de la chaleur (< 20°C si possible, au réfrigérateur pour les essences d'agrumes) et du contact avec l'air (obturation hermétique) car leur volatilité va réduire la quantité de molécules actives au cours du temps et l'oxygène altère les constituants des huiles essentielles. Certaines sources préconisent d'ailleurs d'ajouter des billes de verre dans les flacons entamés fermés hermétiquement pour limiter l'oxydation due à l'air. Les altérations physico-chimiques peuvent résulter en une thermo-isomérisation, une photocyclisation, une coupure oxydative, une peroxydation (et décomposition en cétones et alcools), une hydrolyse, une trans-estérification qui peuvent altérer les propriétés thérapeutiques et/ou remettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle. Dans les conditions optimales de stockage, les huiles essentielles se conservent trois ans (un an seulement pour les essences, plus sensibles). Il existe de nombreuses normes réglementant notamment l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (AFNOR NF T 75-001 : 1996) ou encore l'étiquetage et le marquage des récipients les contenant (AFNOR NF T 75-002 : 1996) [33], [48], [53], [57], [71].

La législation des huiles essentielles devient de plus en plus obscure. Elles sont actuellement considérées comme des compléments alimentaires en Belgique, arômes alimentaires en France pour certaines et parfois cosmétiques (comme l'autorise l'article L4211-1 du Code de la Santé publique [72]) ou parfums d'ambiance [60] (avec des mentions sur l'emballage externe, comme des pictogrammes de danger inflammable, caustique, nocif pour l'environnement par exemple) et vendues en accès libre dans les parapharmacies, magasins bio ou parfois des grandes surfaces. Seules quelques-unes sont réglementées par des lois plus restrictives, comme une vente au public réservée aux pharmaciens, dont l'article D4211-13 du CSP nous donne la liste fixée par décret (Annexe 3) [73]. Devant le vide

juridique et le manque de réglementations et de normes qui s'installent, l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) a décidé en 2004 de mettre en place un groupe de travail « *chargé de préparer les avis et les délibérations de la commission de cosmétologie, et notamment de mettre en place des recommandations pour le bon usage des huiles essentielles dans les produits cosmétiques* ». Le comité technique placé auprès du directeur général de l'Agence nationale de santé publique fut créé le 28 juillet 2016 et les élections des membres ont été faites récemment [56], [74].

L'attention particulière accordée aux huiles essentielles et essences se justifie car elles peuvent contenir certaines substances présentant des potentiels allergisants sur la sphère cutanée contenues dans certains cosmétiques. Ainsi, l'annexe III, partie I de la directive 76-768-EEC du 7<sup>e</sup> amendement de l'UNITIS (*European organization of cosmetic ingredients industries and services*) fixe la liste de ces 26 substances [53], [75].

Les huiles essentielles sont donc des ensembles de composés aromatiques volatiles et lipophiles d'origine végétale naturellement présents dans une/des partie(s) de la plante dont ils sont extraits par hydro-distillation, procédé mécanique ou distillation sèche [33], [42]. Leurs propriétés sont ensuite précisément déterminées par la catégorisation de leur *cf.* par CPG-SM et la correspondance aux normes des Pharmacopées en vigueur, des autorités sanitaires du pays de commercialisation (WHO, AFNOR), auxquelles viennent s'ajouter des labellisations particulières [39].

### **I.2.3. Composition chimique**

Les premiers avis scientifiques prêtaient aux essences des caractéristiques protectrices et répulsives, en les rendant désagréables ou immangeables pour la majorité des insectes et herbivores. Mais lorsqu'on étudie davantage la période d'apparition des plantes à fleurs, au début du Crétacé, nous observons plutôt en parallèle diverses adaptations physiologiques et morphologiques de nombreux insectes (comportements, dont alimentation) et plantes à fleurs (forme, couleur, parfum) qui caractérisent l'interdépendance entre ces deux branches phylogénétiques. Ce raisonnement force à admettre que les pigments et arômes développés par les fleurs n'existent que pour interagir avec les insectes. Dans le domaine agricole s'observe parfois l'apparition d'une préférence d'hôte, lorsque par sélection génétique une espèce surpasse l'effet répulsif et gagne une nouvelle source de nourriture, créant un genre requérant le répulsif comme attractif pour induire le repas [76]. Ce genre de phénomène reflète la complexité des interactions entre les plantes et les insectes. Les huiles essentielles de girofle et d'arbre à thé ont d'ailleurs de grandes potentialités dans divers domaines, dont celui des insecticides [77].

Les molécules actives constituant les huiles essentielles possèdent deux origines biosynthétiques distinctes : il y a d'un côté la voie des mévalonates conduisant aux terpénoïdes, et de l'autre celle des phénylpropanoïdes conduisant aux composés aromatiques volatiles. L'ensemble des molécules actives d'huiles essentielles possèdent

toutes un faible poids moléculaire (PM) [33].

**Les terpènes** sont des chaînes de monomères pentacarbonés isopréniques ( $C_5H_8$ )<sub>n</sub> assemblées enzymatiquement dans le cytoplasme des cellules de plantes à essences. L'unité de base de cette biosynthèse est l'isopentényl-diphosphate (et le diméthylallyl-diphosphate). Les terpénoïdes sont des terpènes modifiés par l'ajout d'au moins un groupement oxygéné, mais d'autres groupements peuvent aussi se greffer sur la chaîne principale. La classe moléculaire des terpènes peut aussi subir des réorganisations structurales enzymatiques par des cyclases, provoquant des mono- ou bi-cyclisations (la variété des possibilités augmentant avec la longueur de la chaîne carbonée) [43], [54], [78]–[80]. Les terpènes obtenus sont :

- **des monoterpènes** ( $C_{10}$ ), soient 2 unités isopréniques. Ils représentent 90 % des molécules trouvées dans les huiles essentielles, et ont des structures très diversifiées. Les monoterpénoïdes phénoliques que sont le thymol et le carvacrol font partie de cette classe : à partir du  $\gamma$ -terpinène est synthétisé le *para*-cymène, précurseur du carvacrol et du thymol. On trouve aussi le linalol, le terpinène-4-ol et le 1,8-cinéole, ainsi que le bornéol [30], [53] ;
- **des sesquiterpènes** ( $C_{15}$ ), soient 3 unités isopréniques ;
- **des diterpènes** ( $C_{20}$ ) plus rarement.

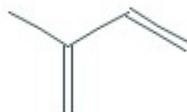


Illustration 6: Structure isoprénique [228]

**Les composés aromatiques** contenant au moins un cycle benzénique ( $C_6H_6$ ), sont eux issus de la voie des phénylpropanoïdes. Cette chaîne réactionnelle débute par un métabolite du fructose : le phospho-énol-pyruvate (PEP) et permet la synthèse de nombreux acides (dont les acides shikimique, salicylique, benzoïque et cinnamique) et leurs esters (salicylate de méthyle, cinnamates, benzoates). Une sous-famille issue de cette voie de biosynthèse est celle des phénylpropènes<sup>7</sup> : ils sont synthétisés dans la plante par un acide aminé précurseur, la phénylalanine. L'eugénol, l'iso-eugénol, le cinnamaldéhyde, la vanilline et le safrôle appartiennent à cette sous-famille [78]. Cette voie permet aussi la biosynthèse de plusieurs phénols (dont eugénol, chavicol et gaïacol) et leurs dérivés, mais également de composés azotés ou sulfurés comme l'isothiocyanate (huile essentielle d'ail et de moutarde). La chaîne réactionnelle permet aussi la synthèse de molécules non-volatiles (par exemple les tannoïdes et les flavonoïdes) qui ne se retrouveront donc pas dans les huiles essentielles [54].

Ces deux voies de biosynthèse sont le plus souvent isolées dans les plantes à essences, mais sont capables de coexister, l'une des deux voies étant majoritaire. C'est ce

<sup>7</sup> étymologiquement issue du cycle benzénique  $C_6$  des phénols et de la chaîne propène  $C_3$  de l'acide cinnamique, elle-même produite au début de la chaîne réactionnelle.

qui se produit par exemple dans l'huile essentielle de basilic (*Ocimum basilicum* ct. méthyl-chavicol), où le méthyl-chavicol majoritaire cohabite avec le 1,8-cinéole minoritaire) [39], [53].

Dans le cas de molécules optiquement actives, les auteurs constatent parfois que le racémique est le type de mélange caractéristique de l'huile essentielle d'une plante ou d'un organe donné, tandis que l'un des énantiomères peut prévaloir dans d'autres plantes. Par exemple, le racémique ( $\pm$ ) du citronellol est assez répandu, mais la forme (+ dextrogyre) est propre à l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora*, et la forme (- lévogyre) est commune aux huiles essentielles de géranium et de rose [39].

L'ensemble de ces caractéristiques forme la composition physico-chimique propre à une huile essentielle, avec des constituants spécifiques possédant des propriétés uniques et présents dans des proportions particulières. Voyons à présent de quelle façon elles agissent sur des populations bactériennes.

#### 1.2.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles

De nos jours, de multiples techniques sont utilisées dans la détection et l'observation des altérations physiologiques ou physico-chimiques produites par les huiles essentielles sur les bactéries. La microscopie électronique est la principale utilisée, car elle a l'avantage de révéler les altérations morphologiques et ultra-structurelles dans les divers compartiments (nucléaire, ou cytoplasmique dans lequel s'observent des gonflements, des flétrissures, des vacuolisations ou des fuites de contenu) ainsi que l'état des membranes [50], [81], [82]. Les huiles essentielles peuvent être classées en fonction de leur pouvoir anti-infectieux. Ce classement fait la distinction entre les huiles essentielles d'activité antibactérienne majeure, modérée ou faible [13].

##### 1.2.4.1. Molécules responsables de l'activité

Les huiles essentielles sont constituées de très nombreuses molécules, et seulement quelques-unes d'entre-elles exercent un effet antibactérien avéré. Elles appartiennent à différentes familles chimiques que nous allons présenter ici [41].

Les molécules de **carvacrol**, **thymol**, **eugénol**, et **chavicol** appartiennent à la famille des **phénols** : anti-infectieux puissants à large spectre d'action, ils sont aussi immunostimulants, toniques et non-irritants pour les voies aériennes des asthmatiques.

**Le linalol**, **le terpinèn-4-ol** et **le terpinéol** sont des **alcools terpéniques** : anti-infectieux puissants à large spectre d'action et immunostimulants, ils sont neurotoniques.



**Le cinnamaldéhyde** est un **aldéhyde aromatique** : anti-infectieux puissant à large spectre d'action, immunostimulant et tonique.

**Le 1,8-cinéole** est un oxyde terpénique : il est expectorant, immunostimulant, antiviral, décongestionnant respiratoire et mucolytique. Cependant il irrite les voies respiratoires et est par conséquent contre-indiqué aux asthmatiques.

**L'acétate de linalyle** porte une fonction ester. Ce terpène est anti-inflammatoire, antispasmodique, calmant sédatif, antalgique et ré-équilibrant nerveux.

#### I.2.4.2. Mécanisme d'action

##### I.2.4.2.1. Au niveau physiologique

Il est important de signaler que, non contents d'altérer les structures indispensables à la survie bactérienne, les composés d'huiles essentielles sont capables de ralentir ou d'inhiber certaines de leurs fonctions physiologiques, comme :

- **la formation de colonies** bactériennes [83] ;
- **la multiplication** bactérienne (division cellulaire / capacité de réplication et croissance [84]–[87]) ;
- **la sporulation** [88], [89] ;
- **la synthèse des toxines** [88], [89] ;
- **la production de biofilms** (observé sur *S. epidermidis*), même à des concentrations très inférieures au seuil inhibiteur (concentrations sub-inhibitrices) pour les huiles essentielles de thym, d'arbre à thé, d'eucalyptus et les extraits d'ail [6]. L'eugénol inhibe aussi la production de biofilms de nombreuses bactéries (*E.coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *Lactobacillus sakei*, *Herlicobacter pylori*, bactéries buccales) [90], [91] ;
- **l'activité métabolique** globale [87].

Ces fonctions sont inhibées bien avant le stade de mort cellulaire, prouvant que ce stade terminal n'est pas nécessairement le but recherché lors d'un traitement aromathérapique. Une bactérie dont le métabolisme a été suffisamment ralenti sera bien plus facile à éliminer par le système immunitaire du patient.

##### I.2.4.2.2. Au niveau cellulaire

Devant la diversité des constituants chimiques et structures moléculaires impliqués dans le mécanisme d'action des huiles essentielles sur les bactéries, force est de constater

que les cibles cellulaires de leur bioactivité et les mécanismes qui en émanent sont multiples [4], [39], [50] et l'ensemble de ces mécanismes peut conduire à l'apoptose et/ou la nécrose bactérienne [92].

Les phénols, qu'ils soient d'origine terpénoïdique (thymol et carvacrol) ou aromatique (eugénol) ainsi que d'autres principaux constituants d'huiles essentielles sont capables de mener à l'apoptose ou à la nécrose certaines bactéries [17], [89], [93] de façon non-spécifique [91], qu'elles soient Gram+ ou Gram- [82] par différents effets, dont nous allons présenter une liste non-exhaustive. Ces altérations semblent s'articuler en trois phases [89].

**La première est la perméabilisation membranaire** [22], [89] : elle consiste en des altérations de la fluidité et de la perméabilité des membranes, alors incapables de compartimenter et contenir les différents constituants cellulaires [91]. En effet, par lipophilie, les constituants d'huiles essentielles se fixent et/ou traversent la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. La paroi externe additionnelle des Gram-, constituée de LPS anioniques qui leur sert de barrière imperméabilisante contre de multiples agents hydrophobes, n'échappe pas à cette règle. Cet effet provoque diverses perturbations membranaires : [17], [23], [78], [90], [94]–[96]

- **des aberrations structurelles**, telles que des distorsions ou des désorganisations des différentes couches de polysaccharides, acides gras et phospholipides ;
- **une modification des fractions lipidiques** propres à l'enveloppe cellulaire et à la membrane plasmique respectivement, dont une forte décroissance de la concentration en acides gras insaturés et une croissance des saturés (pour l'eugénol ou le cinnamaldéhyde par exemple). Ceci est dû à une réaction de la bactérie qui tente de compenser la fluidification membranaire que la présence de ces composés provoque.

Certains auteurs ont mis en évidence que ces altérations provoquent :

- **une déplétion** en radicaux, protéines, calcium, cytochrome C, qui fuient dans le milieu extracellulaire comme lors d'un stress oxydatif [93] ;
- **la synthèse de protéines de stress** (dont celles liées au stress thermique) au contact de thymol [97] ;
- **l'altération des canaux calciques** (perturbation du cycle calcique) qui amplifie ce phénomène d'extrusion ionique (dont le potassium et le phosphate) [4], [36], [50], [82], [87], [88], [91], [98], [99] et la fuite de molécules comme le glutamate [26], [39], [50], [93], [96], [98]–[105].

**La seconde étape correspond aux perturbations homéostatiques** [89]. Les composants d'huiles essentielles peuvent venir affecter directement certains composés cellulaires et vont provoquer l'enchaînement de réactions suivantes :

- **décarboxylation** des acides aminés [4], [99] ;
- **coagulation** des éléments cytoplasmiques [87], [101], [106] ;
- **perturbation des chaînes ioniques** (cycle calcique comme vu ci-dessus, mais aussi le métabolisme du citrate) [4], [99], [103] ;
- **inhibitions enzymatiques** (lipases, coagulases pour *Origanum vulgare* [83]) ;

- **dénaturation des protéines et enzymes** essentielles (les constituants huileux des huiles essentielles jouant le rôle de solvant et de déshydratant [107]) [26], [93], [96], [100] ;
- **modification des forces proton-motrices** (aussi nécessaire à la motilité, inhibée par l'eugénol à 10mM chez *E. coli* [108]). Due à la défaillance des pompes à proton et aux fuites de constituants, elles causent une modification du potentiel hydrogène (pH) et une réduction du potentiel électrique membranaire [26], [39], [50], [78], [93], [96], [99], [100], [109]. La modification du pH influe de plus sur la synthèse de composants de structure [89] ;
- **blocage bioénergétique** par deux mécanismes : premièrement la dénaturation des enzymes impliquées dans la synthèse d'adénosine-triphosphate (ATP) [97]. Deuxièmement, l'interférence avec les protéines membranaires (et enzymes périplasmiques [102]) telle que l'enzyme ATPase (pour le carvacrol, l'eugénol ou le cinnamaldéhyde [110]), qui s'effectue de deux façons : par action indirecte sur la partie hydrophobe de la protéine, ou par inhibition de la synthèse d'ATP (par interférence de translocation protonique dans la membrane, prévenant la phosphorylation de l'adénosine-diphosphate ou ADP) [4], [111].

Les auteurs ont pu observer plus précisément dans certains cas (comme pour l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* par l'action du terpinèn-4-ol) que c'est l'inhibition de la respiration cellulaire glucose-dépendante qui est affectée [36], [50], [82], [98], [105], et que cette activité est concentration-dépendante [33], [70]. Il est à signaler que le terpinèn-4-ol, l' $\alpha$ -terpinéol, le 1,8-cinéole, le bornéol (alcools) ainsi que l'acétate de bornyle (ester) peuvent mener à la mort cellulaire sans induire de lyse bactérienne [30], [112]. L'huile essentielle d'arbre à thé, constituée de ces molécules, provoque une modification immédiate du métabolisme respiratoire [113].

Le cinnamaldéhyde présente également des particularités vis-à-vis des autres molécules antibactériennes : selon Feron et al. en 1991, il pourrait former des liaisons covalentes avec l'ADN et des protéines par leurs groupes aminés [78], [114]. Wendakoon & Sakaguchi en 1993 abondent dans ce sens en supposant que le groupement carbonyle serait le point d'adhérence avec les protéines, prévenant l'action des décarboxylases [109], [115]. L'acide cinnamique, aussi contenu dans les huiles essentielles de cannelle, provoque davantage de dommages membranaires que plusieurs autres phénylpropanoïdes, prouvant la redoutable efficacité de ces huiles essentielles [116]. Cependant, les auteurs remarquent des réactions différentes sur certains points :

- pas de fuite de protéines importante ;
- pas de réduction de l'ATP intracellulaire ;
- l'inhibition de l'ATPase trans-membranaire n'est pas retenue comme cause première de la mort cellulaire car la concentration nécessaire à cette inhibition provoque la rupture membranaire de certaines bactéries [84]–[86] ;
- à des concentrations létales, si l'on retrouve la rupture du potentiel membranaire puis l'inhibition de la respiration cellulaire [87] les auteurs ont pu observer la mort cellulaire sans lyse membranaire [84] (seul *S. aureus* présente une rupture de la membrane cellulaire [78], [87], [94]). Cette observation suggère que la fonction membranaire, bien qu'altérée (fuites ioniques présentes), est conservée dans une certaine mesure.

Pour *Origanum vulgare* à doses sub-inhibitrices, ou bien le terpinèn-4-ol, l' $\alpha$ -terpinéol

et le 1,8-cinéole, certains auteurs ont mis en évidence la réduction de la tolérance de certaines bactéries à l'eau salée / chlorure de sodium [83], [112].

**La phase la plus avancée est celle de l'altération de l'intégrité génétique [89] :** lorsque le matériel génétique est atteint, les auteurs ont constaté l'inhibition de la synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines et de polysaccharides [4], [99]. Les composants d'huiles essentielles sont donc capables d'inactiver ou détériorer le matériel génétique [117]. L'eugénol peut affecter la transcription de certains gènes bactériens [118] et le carvacrol provoque l'hyper-régulation de certains gènes [119].

### I.2.4.3. Influence des facteurs extrinsèques

Pour affirmer qu'une bactérie possède une susceptibilité à une molécule d'huile essentielle, il est important de prendre en considération les conditions dans lesquelles elles sont testées, et donc d'éliminer les facteurs extrinsèques susceptibles de moduler l'activité de ces molécules et de provoquer des écarts de résultats entre l'*in vitro* et l'*in vivo*. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer :

**Le pH**, ou potentiel hydrogène, qui influence l'hydrophobicité moléculaire. Ainsi, certains constituants d'huiles essentielles dont le thym et l'origan sont plus efficaces à pH = 5 que 6 ou 7 : un milieu acide plutôt que neutre divise leurs concentrations inhibitrices d'un facteur 2 à 3 [120]. En effet, ils restent à l'état indissocié et sont donc plus hydrophobes : ils se lient plus aisément aux aires hydrophobes présents sur les protéines et se dissolvent mieux dans les membranes [121] [102].

**La température** : les températures basses (20-25°C au lieu de 30°C) décuplent aussi le pouvoir antibactérien des huiles essentielles [122], [123]. Le ralentissement métabolique de nombreuses bactéries pathogènes à plus basse température intervient sûrement dans le phénomène, cependant il existe des exceptions : l'huile essentielle d'arbre à thé possède une activité bactéricide supérieure à 37°C qu'à 30°C sur *E.coli* [124] et les publications montrent une grande réduction de l'efficacité de l'huile essentielle de thym à 4°C alors qu'elle élimine la même population bactérienne en moins de 4 heures à 37°C [42].

**La présence d'autres composés** organiques : la présence de protéines alimentaires par exemple décuple l'activité des huiles essentielles de thym et d'origan [121], et des taux élevés de sel facilitent leur action. À l'inverse, un fort pourcentage de graisses réduit la dégradation des membranes bactériennes. Pour des structures gélatineuses comme l'agar, les publications montrent des résultats paradoxaux : l'agar semble limiter leur activité (huile essentielle de clou de girofle et d'origan [93]), tandis que d'autres études montrent qu'une concentration de 0,05 % divise les valeurs inhibitrices et bactéricides par un facteur 4. La lécithine, elle, augmente clairement ces valeurs donc réduit leur efficacité [123]. Il faudra tenir compte de ces informations lors d'une prise orale.

#### I.2.4.4. Relation entre structure moléculaire et activité antibactérienne

L'étude des relations structure-activité permet de donner une idée de l'activité générale attribuable à une molécule, et par conséquent à l'huile essentielle qui la contient en grandes proportions [33].

##### I.2.4.4.1. Influence de la famille chimique et des groupements fonctionnels

La détermination des structures chimiques les plus actives s'est faite par comparaison de l'efficacité antibactérienne des molécules. Par exemple le limonène, l' $\alpha$ - et le  $\beta$ - pinène, le  $\delta$ -3-carène, le sabinène, l' $\alpha$ -terpinène [107], le  $\gamma$ -terpinène [111], le *para*-cymène [125], et le carvacrol-méthyl-éther ont une activité antimicrobienne très faible contre différents genres de bactéries. Étant donné le peu de différences structurales de ces deux dernières molécules avec le carvacrol qui, lui, est extrêmement actif sur de nombreuses bactéries, nous pourrions penser que le groupe hydroxyle et la présence d'électrons délocalisables grâce au noyau aromatique sont des facteurs déterminants dans la mise en œuvre de l'activité antibactérienne, et font partie intégrante du pharmacophore des phénols terpénoïdiques [43], [107], [126].

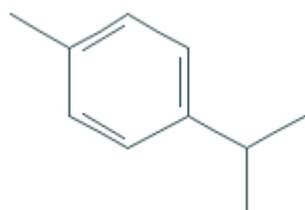


Illustration 8: Structure du para-cymène [228]

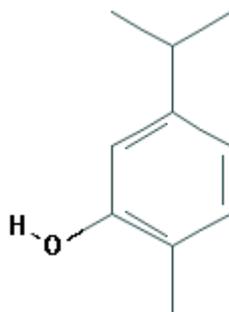


Illustration 7: Structure du carvacrol [228]

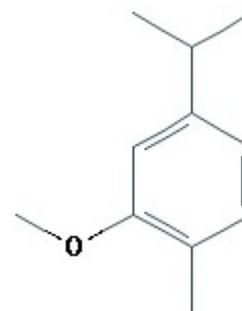


Illustration 9: Structure du carvacrol-méthyl-éther [228]

La comparaison de l'efficacité des différentes molécules ou familles de composés chimiques peut se faire selon le point de vue quantitatif (large spectre d'activité) ou qualitatif (activité antibactérienne puissante). Ainsi, les auteurs ont remarqué que les aldéhydes cinnamiques comme le cinnamaldéhyde possèdent un spectre d'activité couvrant un plus grand nombre de bactéries (qu'elles soient Gram+ ou Gram-) que les phénols terpénoïdiques (alcools aromatiques : thymol et carvacrol) [26]. Du point de vue qualitatif, les composés carbonylés (tels que le cinnamaldéhyde là encore, ou la verbénone) sont très actifs [33], [127].

Il a été démontré que l'acétate de géranyle est plus efficace que le géraniol contre un

grand nombre de bactéries, et que l'acétate de bornyle a une activité supérieure au bornéol [107]. En se basant sur cette observation, la fonction ester semble conférer à la molécule une activité antibactérienne plus importante.

De nombreux travaux montrent que le cinnamaldéhyde, le thymol et le carvacrol possèdent une efficacité supérieure à l'eugénol, elle-même plus efficace que les terpènes substitués par des fonctions alcool, comme le linalol. L'activité du géraniol, du citronellol, et de l'anéthole a aussi été démontrée [26], [30]. Ainsi, on obtient le classement d'efficacité décroissante :  $\alpha$ -terpinéol > terpinèn-4-ol > 1,8-cinéole/eucalyptol > hydrocarbures ( $\alpha$ -terpinène,  $\gamma$ -terpinène, *para*-cymène et terpinolène) sur *S. aureus* [33], [127].

#### 1.2.4.4.2. Influence du noyau aromatique

L'importance du noyau aromatique peut se remarquer en jugeant de l'efficacité du menthol (2-isopropyl-5-méthylcyclohexanol, dont le noyau est exempt d'électrons délocalisés) qui reste bien inférieure à celle du carvacrol [126], [128].

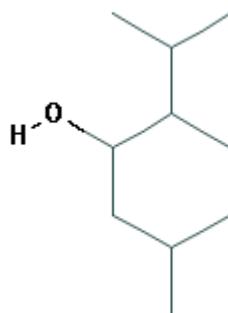


Illustration 10: Structure du menthol [228]

#### 1.2.4.4.3. Influence du groupement hydroxyle

Des tests approfondis ont été menés sur le carvacrol : en lui retirant sa fonction hydroxyle (donc en testant le *para*-cymène) les auteurs remarquent la perte de la majeure partie de l'activité antibactérienne. Mais le *para*-cymène et le carvacrol-méthyl-éther sont non-miscibles à l'eau. Il faut comparer l'effet du carvacrol à une molécule dont l'hydrophobicité structurelle est similaire : le 2-amino-*para*-cymène. La microscopie électronique révèle dans ce cas des similitudes dans les atteintes membranaires contrairement à l'étude des deux molécules précédentes, et une activité antibactérienne bien plus forte pour le 2-amino-*para*-cymène que pour le *para*-cymène et le carvacrol-méthyl-éther. Le groupe hydroxyle du carvacrol n'est donc pas inhérent à l'activité antibactérienne de la structure. Toutefois, les publications révèlent une activité antibactérienne trois fois plus faible pour le 2-amino-*para*-cymène que pour le carvacrol : les auteurs en ont déduit qu'un groupe hydrophile est utile à l'activité, et que le substituant hydroxyle possède des

fonctionnalités particulières préférables au groupement amine [126], [128].

En effet, il est aussi responsable des propriétés acides des phénols et forme plus volontiers des ponts hydrogène, qui, selon certaines théories, seraient responsables de son activité [95] en influençant l'insertion dans et/ou à travers les membranes : ce substituant est supposé déstabiliser la membrane et agir en tant que transporteur trans-membranaire, faisant entrer les ions H<sup>+</sup> dans le cytoplasme et rejetant les ions K<sup>+</sup> dans le milieu externe, réduisant le gradient de pH membranaire [78], [126]. Wendakoon & Sakaguchi en 1993 émettent une autre hypothèse en étudiant l'eugénol : le groupe hydroxyle pourrait se combiner aux protéines, provoquant des inhibitions enzymatiques (ATPase, histidine décarboxylase, amylase, protéase) [78], [109], [115].

Les auteurs ont conclu que la fonction hydroxyle n'est pas nécessaire à l'activité mais possède une fonctionnalité adjuvante au mode d'action du noyau aromatique du carvacrol, qui décuple son potentiel antibactérien [126], [128].

Par l'étude du thymol et du carvacrol, isomères<sup>8</sup> phénoliques [129] uniquement différents par la position de ce groupement hydroxyle sur le noyau benzénique (en *ortho*- ou *méta*-) et dont l'activité est similaire sur de nombreuses bactéries (incluant *S. aureus*), nous en concluons que la position du groupement hydroxyle sur le noyau benzénique n'influence que faiblement l'efficacité de la molécule [99].

Certains auteurs ont tout de même tenté de différencier les propriétés du thymol et du carvacrol. Le carvacrol est moins hydrophobe que le thymol, le *para*-cymène et le  $\gamma$ -terpinène : il peut migrer plus facilement à travers la phase aqueuse et interagir rapidement avec les différentes couches lipidiques, ce qui le rend légèrement plus efficace contre les bactéries Gram- (tout comme le *para*-cymène). Cependant le thymol possède une plus grande propension à augmenter la perméabilité de la membrane plasmique, et est plus efficace que le carvacrol sur le *S. aureus* référencé 6538p [95].

#### 1.2.4.4.4. Influence des chaînes alkylées

Des tests ont été menés sur le carvacrol : en ôtant l'un de ses groupes secondaires (soit le méthyle, soit l'isopropyle) l'activité antimicrobienne est divisée par deux [126], [128]. La présence des deux groupements secondaires est donc nécessaire pour obtenir une efficacité optimale.

---

8 « nom de deux entités chimiques différentes possédant la même formule moléculaire (formule brute) » [43].

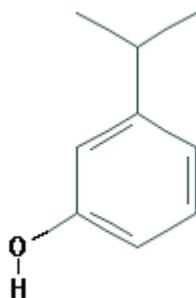


Illustration 11:  
Structure du 3-  
isopropylphénol [228]

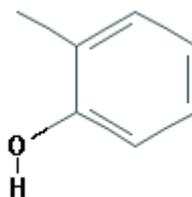


Illustration 12:  
Structure de l'ortho-  
crésol [228]

L'activité antimicrobienne des phénols alkylés par rapport aux phénols non-alkylés fut soulignée en 1988 par Pelczar et al. dont les données montraient qu'une chaîne secondaire allylique semble augmenter l'effet inhibiteur, principalement sur les bactéries Gram-. Des études montrent aussi que le type de substituant détermine l'activité antibactérienne, y compris dans une structure à noyau non-aromatique. Par exemple pour le limonène et le *para*-cymène : le substituant alkényle (1-méthyléthényle) du limonène montre une efficacité supérieure au substituant alkyle (1-méthyléthyle) du *para*-cymène. Donc l'inclusion d'une double-liaison augmente l'efficacité du limonène davantage que la chaîne secondaire du *para*-cymène. Les bactéries sensibles étant surtout des Gram-, l'expérience suggère que la susceptibilité par l'alkylation est Gram-dépendante [107].

Une étude portant sur l'eugénole et l'iso-eugénole va également dans ce sens : l'iso-eugénole possède un plus grand effet antibactérien que l'eugénole. La présence d'une double-liaison sur la chaîne secondaire et du groupe méthyle en queue de chaîne augmentent l'activité de la structure aromatique (la délocalisation électronique s'en trouve simplifiée) [130].

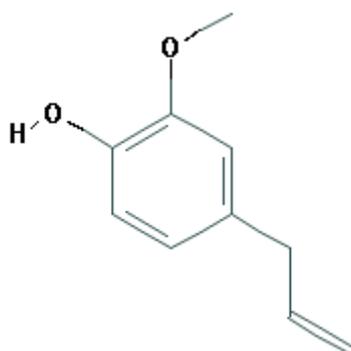


Illustration 13: Structure de  
l'eugénole [228]

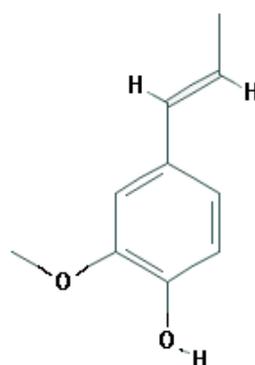


Illustration 14: Structure  
de l'iso-eugénole [228]

#### I.2.4.4.5. Influence de la stéréochimie

Des études ont été menées en 1989 par Hinou et al. sur différents isomères et en retirent que les  $\alpha$ -isomères sont souvent inactifs par rapport aux  $\beta$ -isomères (comme pour l' $\alpha$ -pinène). Également les *cis*-isomères sont inactifs, contrairement aux *trans*-isomères (comme le nérol et le géraniol) [107]. Mais ceci n'est pas une règle générale : les auteurs constatent que pour le cinnamaldéhyde, l'activité antituberculeuse de la forme *cis*- est environ 120 fois supérieure à celle de la forme *trans*-, notamment par des dommages membranaires révélés sous microscopie électronique [131].

Une autre étude portant sur l'évaluation antibactérienne des deux énantiomères<sup>9</sup> du limonène montre que les solutions de (+), de (-) et le racémique possèdent toutes des activités antibactériennes sur de multiples bactéries variant de façon importante, et ont des rapports synergiques très différents avec le 1,8-cinéole (sur *S. aureus*, une synergie n'est décelée qu'en proportions équivalentes de 1,8-cinéole et du (+)-limonène). Les auteurs en ont déduit que la stéréochimie avait une grande influence sur la bioactivité des molécules, et qu'elle était pathogène-spécifique [132].

L'ensemble de ces éléments nous prouve que l'activité antibactérienne des monoterpènes se caractérise par une relation structure-activité extrêmement spécifique, y compris au point de vue stéréochimique. Les délocalisations électroniques dues aux insaturations du noyau aromatique et des double-liaisons aident à exercer les principales activités antibactériennes [116] tandis que des groupements fonctionnels et des chaînes secondaires intelligemment sélectionnés et positionnés peuvent décupler son efficacité.

#### I.2.4.5. Interactions entre les huiles essentielles ou leurs constituants

Il est possible d'extrapoler les notions d'effet synergique, indifférent, additif et antagoniste pour qualifier les interactions entre huiles essentielles ou entre constituants d'une même huile essentielle.

Quelques exemples de synergie moléculaire ont déjà été démontrés, y compris au sein d'une même huile essentielle : ainsi le *para*-cymène et le carvacrol à 1:2 respectivement (v/v) possèdent une synergie : le *para*-cymène, peu actif, s'accumule dans les membranes et les distord, augmentant la sensibilité au carvacrol sans affecter le gradient de pH ni le stock d'ATP [126], [133].

L'eugénol exprime une synergie ou un effet additif avec le linalol ou le menthol sur diverses bactéries, prouvant qu'associer un phénol et un alcool monoterpéniques permet d'obtenir des mélanges efficaces [134].

---

9 « qualifie ou désigne chacune des deux molécules à structure chirale de configuration opposée » [43].

L'huile essentielle de *Lavandula angustifolia*, efficace contre les SARM et *S. aureus* ATCC 6538p (concentration minimale inhibitrice ou CMI = 2,00 mg/mL), montre une synergie avec l'huile essentielle de *Cinnamomum zeylanicum* au ratio de 3:7 et un effet additif avec de nombreuses autres huiles essentielles [35]. Il serait intéressant d'approfondir les tests à son sujet et de déterminer précisément son mode d'action.

Un autre exemple est la découverte d'une synergie entre l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* et d'arbre à thé contre *S. aureus*, mais il y a un effet antagoniste entre elles sur les SARM [135]. Ceci montre l'importance de choisir un mélange déjà testé et efficace sur la bactérie ciblée, car utiliser des huiles essentielles réputées puissantes et à large spectre ne suffit pas toujours et n'est pas dénué d'effets indésirables : ce sont souvent les associations synergiques qui causent l'apparition chez le patient de tels effets, leur efficacité étant décuplée. Une interaction de type additive peut parfois être plus prudente, ou une simple action indifférente élargissant le spectre d'activité du mélange.

La notion d'effet antagoniste est moins bien décrite. On suppose qu'elle se manifeste lors de l'association d'un composé bactéricide et d'un bactériostatique : une compétition sur le site d'action pourrait survenir, réduisant l'effet bactéricide d'autant plus que le composé bactériostatique possède une affinité supérieure sur les sites d'action [78]. Ainsi, le camphre et le 1,8-cinéole sont antagonistes entre eux [136].

Après l'étude des huiles essentielles sur les micro-organismes bactériens, nous allons nous pencher sur leurs effets délétères sur les macro-organismes, en l'occurrence les mammifères et notamment l'humain.

## **1.2.5. Toxicité des huiles essentielles**

Les huiles essentielles ne sont pas dénués d'effets indésirables. La dose faisant le poison, des cas d'intoxication sont rapportés chaque année, mettant en exergue la mauvaise utilisation d'une ou plusieurs huiles essentielles. Les plus incriminées sont l'arbre à thé, les eucalyptus globuleux, la cannelle ou la girofle [56]. Nous allons développer ici les effets indésirables que peuvent provoquer les huiles essentielles ou essences lorsqu'elles sont mises en contact avec différentes parties du corps ou des organes, dont la peau qui nous intéresse particulièrement dans cette thèse.

### **1.2.5.1. Toxicité cutané-muqueuse**

Il existe une grande variété de réactions cutanées suivant la mise en contact de la peau avec une huile essentielle. Nous allons développer ici les plus représentatives d'entre-elles.



**La dermocausticité** : c'est la cytotoxicité directe. Les huiles essentielles riches en molécules phénolées, aldéhydes aromatiques et terpéniques sont corrosifs et irritent la peau et les muqueuses ; le phénomène est rapide et peut s'aggraver de façon concentration-dépendante (comme pour l'arbre à thé [56]). L'atteinte la plus grave et irréversible est la nécrose des tissus exposés. Le conseil est de les utiliser sur une période la plus courte possible et de les diluer fortement : en général elles ne dépassent pas les 10-20 % *maximum* dans une huile végétale [33], [41], [57].

**Les hypersensibilités**<sup>10</sup> sont la conséquence d'une réponse immune spécifique inappropriée ou excessive contre un antigène. Dans notre situation, les antigènes sont les molécules constitutives de l'huile essentielle. Celles provoquant une réaction avec le plus de récurrence sont les lactones sesquiterpéniques, le cinnamaldéhyde, l'eugénol, le 1,8-cinéole et le géraniol, entre autres. L' $\alpha$ -terpinène présent dans l'huile essentielle d'arbre à thé peut aussi être en cause (1 % des cas) [33], [57]. Se distinguent :

- **l'hypersensibilité de type I** : c'est la réaction allergique classique survenant immédiatement après la mise en contact avec un antigène appelé ici allergène ;
- **l'hypersensibilité de type IV** : elle correspond à toute hypersensibilité retardée (qui met plus de douze heures pour se développer).

Il faut déconseiller l'exposition prolongée à ces molécules, et les contre-indiquer aux patients à terrain allergique connu comme les asthmatiques.

**La photosensibilisation** est généralement liée au type de molécule synthétisée par la plante. Toute essence extraite de zestes de la famille des *Citrus* contient des molécules photo-actives, telles les furanocoumarines ou furocoumarines, et les pyrocoumarines [33] : celle de *Citrus bergamia* par exemple est constituée de psoralènes. La photosensibilisation peut aboutir à deux types de réactions cutanées :

- la phototoxicité (réaction immédiate) [57], [137] ;
- la photo-allergie (réaction retardée) [33].

Pour faire disparaître cet effet indésirable, quelques laboratoires commencent à produire non pas des essences d'agrumes, mais de véritables huiles essentielles d'agrumes (comme Naturactive® par exemple), afin de ne pas retenir dans le distillat les coumarines phototoxiques qui sont non-volatiles [57]. Il arrive qu'une huile essentielle phototoxique puisse aussi être cytotoxique (comme pour *Cymbopogon citratus* qui est phototoxique à partir de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et cytotoxique dès 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [138]).

### 1.2.5.2. Autres toxicités organiques et cellulaires

Les molécules appliquées par voie cutanée qui traversent cette barrière d'une part, mais aussi et surtout celles qui sont utilisées par voie orale ou sublinguale, vont avoir accès à l'ensemble des organes du corps humain et pourront y exercer des effets délétères. Ainsi, il est possible que l'utilisation d'une huile essentielle provoque les atteintes suivantes.

---

10 référence bibliographique : cours Les hypersensibilités, FILLoux, 2013



### Des toxicités organiques :

- **une néphrotoxicité** : le thymol et le carvacrol présentent un risque d'inflammation et de détérioration des néphrons lors d'une utilisation prolongée, particulièrement chez les insuffisants rénaux [33], [57] ;
- **une hépatotoxicité** : l'effet a été observé pour les huiles essentielles phénolées à doses moyennes ou hautes au long cours, ainsi que sur l'eugénol et l'iso-eugénol sur des rongeurs [139]. Il est connu que 10 mL d'eugénol provoquent une insuffisance hépatique fatale aux enfants (les praticiens contre-indiquent souvent ces huiles essentielles sous douze ans). Des hépatotoxicités chroniques sont possibles [140] ;
- **une hématotoxicité** : le phénomène est décrit pour l'eugénol et l'iso-eugénol à de fortes concentrations [91] ;
- **une neurotoxicité** : le camphre, la menthone ou l'eucalyptol sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique. Par leur action lipolytique, ils détruisent les gaines de myéline, provoquant un dysfonctionnement neuronal qui se traduit par différents états, allant de l'excitation à la stupéfaction, la dépression voire le coma [57]. Les molécules phénolées sont potentiellement spasmophiliques. [141]

### Des toxicités cellulaires :

- **la mutagénicité** : les publications sont paradoxales. Certaines montrent des propriétés antimutagéniques d'huiles essentielles ou de leurs constituants sur divers organismes [39], [142]–[147] comme l'eugénol [148]. Au contraire, d'autres publications montrent la survenue d'aberrations chromosomiques et l'inhibition de l'activité des topo-isomérases II avec cette molécule [149]. Le thymol et le carvacrol multiplie par 1,5 le nombre de mutations réverses à doses non-cytotoxiques [150]. La carcinogénicité de certaines huiles essentielles comme *Salvia sclarea* ou *Melaleuca quinquenervia* peut aussi se révéler par leur activité *œstrogène-like*, qui induit des cancers œstrogéno-dépendants à long terme. Les données de la littérature sont contradictoires sur le D-limonène (*Citrus*) présent dans certaines huiles essentielles qui posséderait des propriétés anti-tumorales [151] sur certains rongeurs et pro-tumorales sur d'autres [152]. Des tests sur les humains devraient être menés afin de clarifier le sujet ;
- **l'activité radicalaire** : de la même façon, certaines études démontrent l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et de leurs composés [39], [144], [153], [154] alors que d'autres font état d'une oxydation au contact de radicaux, permettant la production de radicaux très réactifs sur les phospholipides (ainsi, les phénols deviennent des radicaux phénoxyles) [155]. Ces pro-oxydants vont déclencher des réactions cytotoxiques et peuvent mener à la mort cellulaire [39]. Il s'avère que ces phénomènes de mutagénicité et d'anti-oxydation/pro-oxydation sont concentration-dépendants [149] : des tests montrent que des concentrations non-cytotoxiques de thymol, carvacrol et  $\gamma$ -terpinène protègent de la rupture des brins d'ADN induits par des radicaux oxygénés dans les lymphocytes, tandis que de plus hautes concentrations accentuent ces dommages cellulaires [156] ;
- **l'embryotoxicité** a été décrite chez le rat pour l' $\alpha$ -terpinène [56].

### I.2.5.3. Précautions d'emploi des huiles essentielles

Ces toxicités ont abouti aux précautions d'emploi que nous leur connaissons aujourd'hui : [53], [54]

- n'utiliser que des huiles essentielles possédant une **traçabilité** complète, et non-modifiée après l'extraction ;
- **conserver / stocker** les flacons dans un lieu approprié et hors de portée des enfants ;
- **ne jamais injecter** par voie intraveineuse ou intramusculaire ;
- si besoin, **diluer** dans un corps gras (huile végétale par exemple) ;
- **éviter l'exposition solaire** pour les huiles essentielles photosensibilisantes et les essences ;
- prendre garde aux **réactions allergiques**, pouvant survenir même après plusieurs applications ;
- prendre garde aux huiles essentielles **irritantes** et aux huiles essentielles **neurotoxiques** ;
- prendre garde aux **posologies** : respecter la prescription de l'aromathérapeute adaptée au patient et à la pathologie, la dose journalière recommandée et la durée de prise (la plus courte possible) ;
- prendre garde aux **patients sensibles ou fragiles** : enfants de moins de 8 ans, femmes enceintes / allaitantes, personnes âgées, terrains allergiques, insuffisants rénaux ou hépatiques ;
- en cas d'**absorption accidentelle** : ingérer 1 à 3 cuillères à soupe d'huile végétale (olive par exemple), ne pas boire d'eau et consulter rapidement un médecin.

La prise en compte de l'ensemble de ces précautions permet au personnel soignant d'utiliser un traitement approprié pour le patient avec un rapport bénéfice/risque maîtrisé.

### I.2.6. Association avec des antibiotiques

L'ensemble des effets des huiles essentielles augmente la perméabilité non-spécifique des bactéries aux antibiotiques, décuplant leur potentiel antibactérien et prouvant la véritable action bénéfique des huiles essentielles dans la lutte contre l'antibiorésistance [26], [91], [93], [96], [100].

De très nombreuses publications existent prouvant cette action par l'augmentation significative de l'efficacité d'antibiotiques utilisés dans le traitement des affections bactériennes cutanées selon les recommandations actuelles [157] lorsqu'ils sont associés à des huiles essentielles [26], [91], [93], [96], [100], [108], [158], [159]. Par exemple, de multiples études montrent que la présence de différentes huiles essentielles en quantité suffisante module l'activité des antibiotiques aminosides et des quinolones contre *S. aureus* [26], [93], [96], [100]. Les aminosides sont en plus utilisés en pratique courante contre les SARM, les huiles essentielles peuvent alors être utilisées comme traitement complémentaire

pour limiter la survenue de résistances aux aminosides. Il a été montré que la ciprofloxacine en association avec les huiles essentielles de *Melaleuca alternifolia* et *Thymus vulgaris* sur *S. aureus* présentent souvent un effet antagoniste, ce qui permet d'orienter le prescripteur vers l'utilisation d'huiles essentielles plus adaptées à certains antibiotiques [160].



Tableau 1: Exemples d'interactions entre antibiotiques et huiles essentielles

Huile essentielle ou composé	Antibiotiques	Bactéries	Interactions	Références
arbre à thé	rifampicine	<i>S. aureus</i> et SARM	synergique	[52]
	tobramycine	<i>S. aureus</i>		[82]
	ciprofloxacine		antagoniste	[52], [160]
	vancomycine	SARM		[161]
arbre à thé, cannelle	$\beta$ -lactamines	bactéries sensibles aux $\beta$ -lactamines	pas antagonistes	[162]
<i>Origanum vulgare</i>		bactéries productrices de $\beta$ -lactamases	rétablissement de l'efficacité de l'antibiotique	
carvacrol, thymol, cinnamaldéhyde	pénicilline <sup>++</sup> , ampicilline <sup>+</sup> , bacitracine	<i>S. aureus blaZ</i>	synergique	[163]
carvacrol, thymol	érythromycine	<i>S. pyogenes ermB</i>		
<i>Thymus vulgaris</i>	ciprofloxacine	<i>S. aureus</i>	antagoniste	[160]
<i>Lippia sidoides</i> ct. thymol ou thymol pur	aminosides : gentamycine, néomycine, amikacine	<i>S. aureus</i> ATCC 12624	augmentation de l'activité de l'antibiotique (plus forte avec le <i>totum</i> d'huile essentielle)	[100]
acide cinnamique	amikacine, ampicilline	<i>S. aureus</i>	synergique	[116]
eugénol	pénicilline, oxacilline, érythromycine, ampicilline <sup>++</sup> , gentamycine <sup>++</sup> , norfloxacine <sup>++</sup> , tétracycline <sup>++</sup> , vancomycine <sup>++</sup> , rifampicine <sup>++</sup> , polymyxine B <sup>++</sup>	SARM	synergique ou additive	[91]
	ampicilline, pénicilline <sup>++</sup>	<i>S. aureus blaZ</i>	synergique	[163]

Nous observons sur ce tableau que les associations d'antibiotiques et d'huiles essentielles possèdent des interactions variant selon l'antibiotique utilisé, l'huile essentielle associée à ce traitement et le type de bactéries testées, qui produiront des interactions

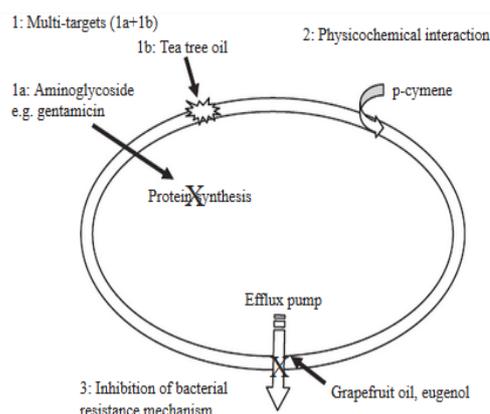


totallement différentes en fonction de ces paramètres.

L'étude du thymol et de l'huile essentielle correspondante montre que les composés minoritaires jouent aussi un rôle fondamental dans l'augmentation de l'activité des aminosides de façon dépendante du germe testé (ici le carvacrol, le *para*-cymène, le  $\beta$ -caryophyllène et le 1,8-cinéole minoritaires semblent agir en synergie sur *S. aureus* mais pas sur d'autres bactéries) [100]. Cet exemple illustre aussi le fait qu'il n'y a pas d'association [antibiotique + huile essentielle] qui soit toujours synergique d'une bactérie à l'autre [160], d'où la nécessité de procéder au cas par cas en administrant des dosages et associations déjà prouvés efficaces contre un pathogène spécifique.

L'eugénol fait preuve d'une potentialité importante à l'induction de synergies avec une palette très large d'antibiotiques. Ces antibiotiques possèdent pourtant des modes d'action très différents les uns des autres. La synergie semble donc être présente lors de la combinaison de substances possédant des cibles cellulaires différentes à divers niveaux de la chaîne métabolique [91].

Les études sur *Origanum vulgare*, sur *S. aureus blaZ* (résistant à la pénicilline, l'ampicilline et la bacitracine) et sur le *S. pyogenes ermB* (résistant à l'érythromycine) nous prouvent que les huiles essentielles sont capables d'inhiber des résistances aux antibiotiques acquises par les bactéries. Ces inhibitions de résistances sont parfois propres à un mécanisme de résistance donné, comme l'huile essentielle de *Mentha x piperita* qui possède un effet anti-plasmidique, et semble affecter plus fortement les bactéries sujettes à la résistance plasmidique acquise aux antibiotiques [164]. Le mécanisme exact de la régression de l'antibiorésistance est en général mal connu, mais la plupart du temps l'action consiste à faciliter la pénétration de l'antibiotique à travers les membranes ou interférer avec certaines cibles métaboliques de l'antibiotique (dont les enzymes bactériennes, ou la compétition avec l'antibiotique pour le mécanisme d'efflux) [163], [165].



Mechanisms which may contribute to synergy between EO components and antibiotics (Hemaiswarya et al., 2008) with examples from this review: 1, multi-target effects: tea tree oil and aminoglycosides (D'Arrigo et al., 2010; Rosato et al., 2010); 2, physicochemically active adjuvants: p-cymene (Ultee et al., 2002); 3, inhibitors of bacterial resistance mechanisms: grapefruit oil, eugenol and thyme (Abulrob et al., 2004; Hemaiswarya & Doble, 2009).

Illustration 15: Mécanismes de synergie entre antibiotiques et composants d'huiles essentielles [52]

Une étude sur des *S. aureus* sensibles ou non à la méticilline et exposés sur trois jours à des concentrations sub-inhibitrices d'huile essentielle d'arbre à thé provoque une hausse des CMI de nombreux antibiotiques et de l'huile essentielle [166]. L'adaptation à des concentrations sublétales d'huiles essentielles d'arbre à thé (<5 %) va donc réduire la prédisposition des bactéries aux antibiotiques. Les hypothèses retenues sont l'adaptation membranaire et/ou la résistance plasmidique [167]. Un traitement mal adapté en huile essentielle peut donc être préjudiciable à l'efficacité d'un traitement antibiotique et accélérer le processus de sélection de mutants résistants.

### **I.2.7. Méthodes de détermination *in vitro* de l'activité des huiles essentielles sur les bactéries**

Les tests réalisés pour déterminer l'activité des huiles essentielles sur les bactéries consistent à étudier les capacités de croissance de ces bactéries dans un milieu additionné d'huile essentielle, notamment avec l'étude de l'activité antioxydante [168], l'étude de la cinétique de bactéricidie des courbes de « *time-kill* » (la vitesse à laquelle les bactéries réagissent à la présence des substances à tester) [90]. Malheureusement, la grande variété des méthodes de détection et de quantification de l'activité antibactérienne des huiles essentielles limite les capacités à comparer les études entre-elles [93].

Les tests menés sur les huiles essentielles s'inspirent de ceux menés sur les antibiotiques. Ces derniers permettent de déterminer une ou plusieurs des valeurs suivantes, permettant de comparer l'efficacité entre différents antibiotiques<sup>11</sup> : [43]

- **la concentration minimale inhibitrice (CMI)** donnée par le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie et utilisée par le Ca-SFM (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) est définie par :

*« la concentration d'antibiotique la plus faible capable d'inhiber, en 24 heures, toute culture visible d'une population initiale bactérienne (inoculum) ».*

C'est donc la concentration qui inhibe totalement la multiplication d'une population bactérienne en 24 heures. Cette concentration correspond à la valeur de la bactériostase ;

- **la concentration minimale bactéricide (CMB)** est, de façon analogue, définie par :

*« la plus petite concentration d'antibiotique qui ne laisse survivre, après 24 heures de contact, que 0,01 % de l'inoculum initial ».*

C'est donc celle qui entraîne la mort de 99,99 % de la population bactérienne initiale en 24 heures. Cette concentration correspond à la valeur de la bactéricidie ;

---

11 référence bibliographique : cours bactériologie, DELEBASSEE, 2017

- la **concentration inhibitrice à 50 %** ( $CI_{50}$ ) est la concentration d'antibiotique réduisant la croissance bactérienne de l'échantillon de 50 % ;

- la **concentration inhibitrice à 90 %** ( $CI_{90}$ ) est la concentration d'antibiotique réduisant la croissance bactérienne de l'échantillon de 90 %.

Les substances testées sont classées comme bactéricides lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur à 2, et bactériostatiques s'il est très supérieur à ce seuil. Si la CMB/CMI est supérieure à 32, la souche bactérienne est qualifiée de tolérante à l'antibiotique.

Il est indéniable que les antibiotiques soient des armes de lutte efficaces dans le traitement antibactérien, d'autant que l'on peut commodément quantifier leurs effets et classer leurs modes d'action (et ainsi anticiper les éventuels effets indésirables ou échecs thérapeutiques). Ils ne sont malheureusement pas toujours suffisants pour traiter les infections bactériennes.

#### **1.2.7.1. Méthode de diffusion en milieu solide**

Cette méthode est l'une des plus régulièrement utilisées afin de déterminer la sensibilité *in vitro* des bactéries à différentes substances [13], [93]. Ce procédé se réfère à l'antibiogramme, test de routine décrit par le Ca-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) [169] où la substance testée est systématiquement un antibiotique. L'antibiogramme consiste à tester la capacité d'une bactérie à croître dans un milieu imprégné de différents antibiotiques à tester pour déterminer son spectre antimicrobien. Un milieu gélosé en boîte de Pétri est inoculé avec une suspension bactérienne calibrée. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, qui consiste à prélever un volume donné d'*inoculum* et l'étaler à trois reprises uniformément à l'aide de l'écouvillon en coton sur toute la surface de la gélose avec une rotation de 60° entre chaque passage [1]. À sa surface sont ensuite placés un ou plusieurs disques imprégnés chacun d'un antibiotique à tester : ils vont diffuser radialement à partir du disque en formant sur leur passage un gradient de concentration décroissant dont le maximum se situe au niveau du disque. L'ensemble est incubé durant 18-24 heures à 37°C. Lorsque la concentration d'un antibiotique est suffisante pour inhiber la croissance bactérienne apparaît autour du disque une zone sans croissance bactérienne, que l'on nomme halo d'inhibition. Plus cette zone est étendue, moins la quantité d'antibiotique nécessaire à l'inhibition bactérienne est élevée, et donc plus la souche bactérienne y est sensible [1], [170]. Il faut alors mesurer les diamètres d'inhibition de croissance bactérienne propres à chaque antibiotique pour confronter leur efficacité sur la souche bactérienne. Ces diamètres sont reportés sur les abaques de lecture fournis par le fabricant d'antibiotiques afin de déterminer la catégorie clinique à laquelle la bactérie appartient : bactérie sensible, intermédiaire ou résistante à chacun des antibiotiques testés. Ce test sert à démontrer une inhibition de croissance bactérienne due à un antibiotique (bactériostase), qui ne préjuge en rien de son pouvoir bactéricide.

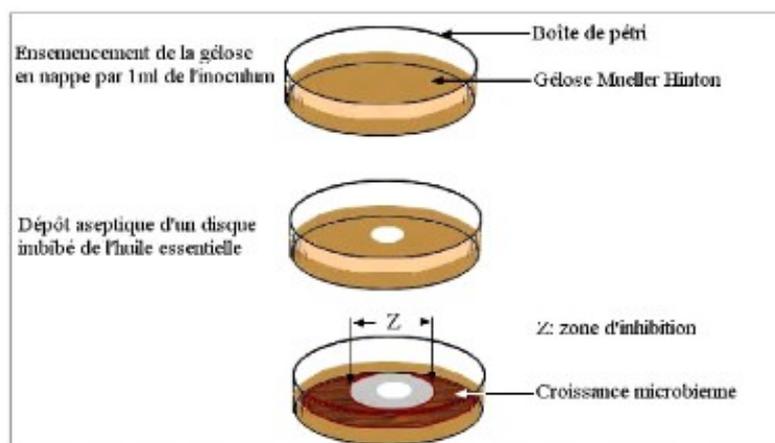


Illustration 16: Halo d'inhibition de croissance bactérienne sur gélose (antibiogramme) [71]

La méthode décrite ci-dessus peut être mise à profit dans l'étude du potentiel bactériostatique des huiles essentielles en pratique quotidienne, car elle est plutôt simple et facilement accessible : on parle d'aromatogramme. De principe identique à la technique de l'antibiogramme, beaucoup la considèrent comme un point de repère de l'efficacité des huiles essentielles [4]. Cependant, la lecture des résultats ne s'effectue qu'à titre indicatif, car il n'existe pas d'abaque de lecture pour les huiles essentielles.

### 1.2.7.2. Macrométhode de dilution en milieu liquide

Cette technique est davantage quantitative et permet de déterminer les concentrations de substance nécessaires à l'activité antibactérienne. Elle est aussi issue de la technique décrite par le Ca-SFM pour les antibiotiques, qui est transposée aux huiles essentielles [169]. Des concentrations différentes d'huiles essentielles sont inoculés dans une série de tubes contenant la même quantité de bouillon et d'*inoculum* bactérien. Cette série de dilution sera mise à incuber au bain-marie à 37°C sous agitation pendant 18 à 24 heures [4], [93].

La définition des CI concernant les antibiotiques peut être extrapolée aux huiles essentielles ; ainsi, la CMI est déterminée par différentes méthodes selon les auteurs. Certains la déterminent à l'œil nu par le premier bouillon incubé dans lequel aucune croissance (aucun trouble) n'est visible [90], [163]. D'autres utilisent la méthode colorimétrique en ajoutant des indicateurs de pH au milieu, dans le but de détecter le premier bouillon incubé dont la concentration en huile essentielle inhibe totalement l'activité métabolique des bactéries (donc l'absence de changement de coloration) [35], [158], [163], [171]. Certains enfin ont effectué des mesures de l'absorption à 600 nm, donc une mesure de la turbidité, qui est une méthode bien plus sensible [93], [120], [172], [173].

### I.2.7.3. Méthode de réensemencement en milieu solide

La méthode précédente peut servir comme première étape de la détermination de la CMB si des réensemencements des bouillons incubés sur gélose montrent une certaine croissance bactérienne car le réensemencement met en évidence les bactéries qui n'ont pas été tuées par l'huile essentielle. On peut ainsi différencier le pouvoir bactéricide par la mesure de la CMB par méthode semi-quantitative, comme nous le ferions pour un antibiotique : un réensemencement des bouillons à différentes concentrations d'huiles essentielles incubées en milieu solide comparativement au réensemencement des dilutions du bouillon-témoin incubé (la CMB correspond à la concentration d'huile essentielle laissant 0,01 % de survivants, soit une dilution  $10^{-4}$ ). Simultanément, une boîte de Pétri avec les mêmes types de prélèvements, mais à partir des bouillons incubés avec différentes concentrations d'huiles essentielles cette fois, est ensemencée et incubée dans les mêmes conditions [4], [93].

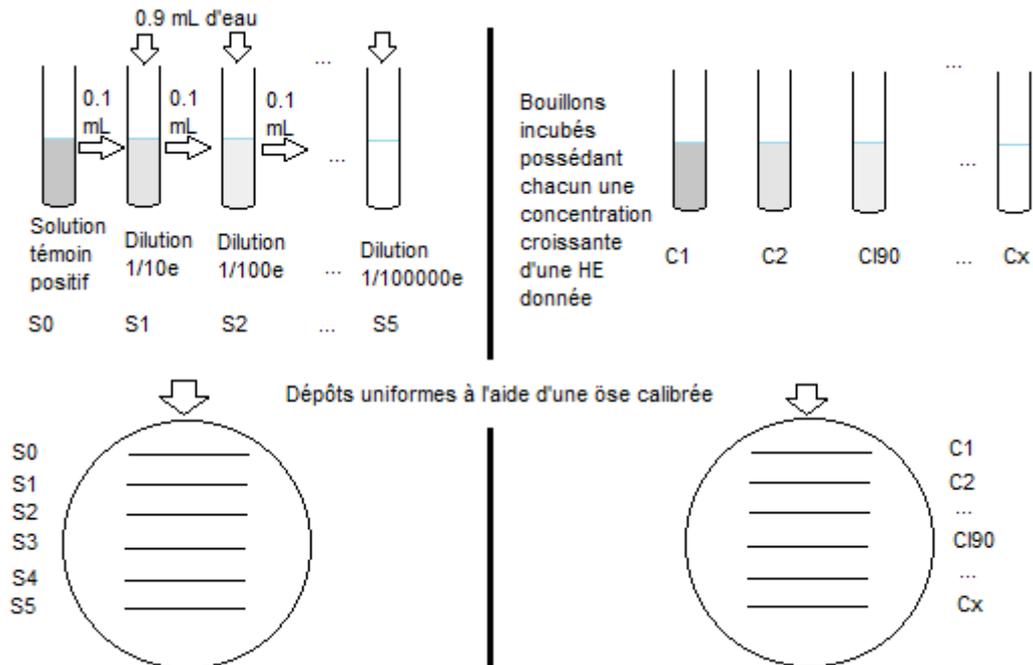


Illustration 17: Schéma de la dilution en cascade de la solution témoin positif et du réensemencement sur gélose

Les bactéries se développent le long de la strie proportionnellement à la quantité de germes survivants. En comparant les stries issues de chaque échantillon et ceux des dilutions du témoin positif, nous parvenons à visualiser le pourcentage de bactéries survivantes et en déduire si ce nombre correspond ou non à la dilution  $10^{-4}$  du témoin positif, c'est-à-dire la valeur de la CMB correspondant à la mort de 99,99 % des bactéries du milieu.

## II. Travaux personnels : tests de l'activité antibactérienne *in vitro*

---

Nous exposerons dans cette partie les éléments techniques nécessaires à la réalisation des tests antimicrobiens, puis nous présenterons les résultats de ces tests. Dans un premier temps, nous avons choisi d'effectuer le test le plus couramment utilisé pour le diagnostic de sensibilité bactérienne en milieu solide, soit l'aromatogramme (procédé qualitatif) [1]. Dans un second temps, nous avons approfondi les tests grâce à la macrométhode de dilution en milieu liquide (procédé quantitatif) afin d'obtenir des précisions sur leur activité, notamment les valeurs de CI. Puis dans un troisième temps nous avons effectué des réensemencements en milieu solide pour déterminer les CMB. Des associations ont ensuite été testées afin de déceler d'éventuelles interactions synergiques.

### II.1. Matériel et méthodes

Cette partie renseigne sur la liste des éléments nécessaires à la réalisation des tests, ainsi que les méthodologies mises en place permettant leur reproductibilité. Chacun des tests menés a été réalisé au moins deux fois.

#### II.1.1. Souches bactériennes et milieux de culture

Nous avons étudié les bactéries *cocci* Gram+ cutanées suivantes :

- *Staphylococcus aureus* : deux souches différentes sont testées : une souche de la collection ATCC (*American Type Culture Collection*) référencée 6538p, parfaitement identifiée par des tests de détermination de ses propriétés notifiées et renseignées, conservée dans des centres de ressources biologiques. L'autre souche, elle, est sauvage, c'est-à-dire issue d'un prélèvement dans l'environnement ;
- *Staphylococcus epidermidis*, souche sauvage ;
- *Streptococcus pyogenes* de groupe A, souche sauvage.

Le fait de tester ces deux souches de *S. aureus* nous permet d'avoir un référentiel de résultats concernant une bactérie parfaitement connue et déterminée, ainsi qu'un point de comparaison avec les *S. aureus* sauvages en évolution constante dans l'environnement, représentée par la souche non-référencée.

Le milieu de culture utilisé est celui de Mueller-Hinton (MH) : c'est un milieu nutritif de composition, volume et conservation maîtrisés (présence de cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) permettant une bonne croissance de la plupart des bactéries non-exigeantes (aérobie rapide ou facultative), il est le milieu de référence défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le Ca-SFM et l'EUCAST (*European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

pour les tests de susceptibilité en agar, bouillons et dilutions. Un contrôle de la qualité est notamment effectué (comme le pH qui doit se situer entre 7,2 et 7,4 à 25°C). Pour les organismes fastidieux comme le *S. pyogenes*, le bouillon MH est supplémenté de 2 à 5 % de sang de cheval [18], [169], [173].

## II.1.2. Huiles essentielles utilisées [53]

Nous allons présenter dans cette partie les huiles essentielles que nous avons choisi d'étudier dans ce travail, classées selon leurs constituants chimiques principaux (huiles essentielles phénolées ou non) puis par ordre alphabétique selon la dénomination vernaculaire française. Les références bibliographiques qui nous ont décidé à tester ces huiles essentielles sont spécifiées dans chaque sous-partie correspondante.

Toutes ces huiles essentielles sont produites par le laboratoire Ladrôme, qui garantit une agriculture biologique et la qualité du processus de distillation traditionnel par entraînement à la vapeur d'eau.

Le tableau suivant introduit les dix huiles essentielles utilisés pour les tests, en indiquant la classification binominale de la plante extraite, son origine géographique et ses constituants majoritaires.

Tableau 2: Liste, composition et origine des huiles essentielles testées au laboratoire

Huile essentielle	Nom latin	Famille et Ordre	Organe	Provenance	Principales molécules actives (%)
girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtacées, Myrtales	clous <sup>12</sup>	Madagascar	eugnéol (75-87), acétate d'eugényle (8-15), $\beta$ -caryophyllène (2-12)
origan compact	<i>Origanum compactum</i>	Lamiacées, Lamiales	feuilles	Maroc	carvacrol (25-50), thymol (10-30)
thym à thymol	<i>Thymus zygis</i> <i>ct. thymol</i>	Lamiacées, Lamiales	parties aériennes fleuries	Espagne	thymol (37-55), <i>para</i> -cymène (14-28), carvacrol (0,5-5,5)
arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i> <i>ct. terpinen-4-ol</i>	Myrtacées, Myrtales	feuilles	Australie, Afrique du Sud, Kenya	terpinèn-4-ol (>30), $\gamma$ -terpinène (10-28), 1,8-cinéole (<15)
cannelle	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> , <i>C. verum</i>	Lauracées, Laurales	écorce	Madagascar, Sri Lanka,	<i>trans</i> -cinnamaldéhyde (40-70), acétate de cinnamyle (<15)
ciste ladanifère	<i>Cistus ladaniferus</i>	Cistacées, Violales	rameaux feuillés	Maroc	camphène, $\alpha$ -pinène, acétate de bornyle (sans normes)
eucalyptus radié	<i>Eucalyptus radiata</i> <i>var. radiata</i>	Myrtacées, Myrtales	feuilles	Australie	1,8-cinéole (70), $\alpha$ -terpinéol (6-10), limonène (5-10)
marjolaine	<i>Origanum majorana</i>	Lamiacées, Lamiales	parties aériennes	Égypte	terpinèn-1-ol-4 (18-30), $\gamma$ -terpinène (10-20), $\alpha$ -terpinène (5-12), sabinène (3-10)
niaouli	<i>Melaleuca quinquenervia</i> <i>ct. cineole</i> , <i>M. viridiflora</i>	Myrtacées, Myrtales	feuilles	Madagascar	1,8-cinéole (45-65), $\alpha$ -pinène 6-15), $\alpha$ -terpinéol (5-10)
orange amère / petit grain bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> <i>var. amara</i>	Rutacées, Sapindales	rameaux feuillés	Paraguay	acétate de linalyle (40-55), linalol (15-30), $\alpha$ -terpinéol (3,5-7,5)

### II.1.2.1. Huiles essentielles phénolées

<sup>12</sup> clous = boutons floraux séchés à l'air

### II.1.2.1.1. Girofle (clou)

Description botanique : le giroflier est un arbre au port pyramidal de 10 à 20 mètres (m) de haut, au tronc lisse et gris clair, poussant sur des sols tropicaux maritimes chauds et bien drainés. Les feuilles, de 10 cm de long et 4 de large, sont opposées, persistantes, coriaces et odorantes, formant un feuillage touffu. Ses fleurs à corolle blanc-rosé et à calice rouge carmin sont groupées en cymes compactes et subdivisées en trois parties. Le bouton floral avant épanouissement ou clou, est caractéristique (tête quadrangulaire globuleuse entourée de quatre sépales) et ramassé en même temps que le pédoncule floral ou griffe. Le fruit, aussi nommé anthofle, est une baie rouge allongée contenant une à deux graines [42], [57], [174].



Illustration 18: Planche descriptive du giroflier [229]

L'extraction peut durer jusqu'à 20 heures [60], avec un rendement de l'ordre de 17 % [42] et produit une huile essentielle liquide limpide jaune, virant au brun lorsqu'elle est exposée à l'air, miscible au chlorure de méthylène, toluène et aux huiles grasses. Elle possède une monographie à la Pharmacopée européenne [44]. Sa densité relative varie entre 1,042 et 1,063.

Le laboratoire la promeut en tant qu'antiseptique, antibactérienne buccodentaire à spectre d'action large et immunostimulante. Elle est utilisée en médecine, parfumerie et alimentaire [3]. Elle fait partie des huiles essentielles reconnues comme sûres par la *Food & Drug Administration* (FDA) [175].

Sa principale molécule active, l'eugénol, est un composé aromatique à structure phénolique [45] utilisé couramment comme antibactérien buccal et des infections cutanéomuqueuses [42], anti-inflammatoire (support pour le traitement des alvéolites et du vitiligo), cytotoxique, anesthésique local (applications topiques) par blocage du circuit de la douleur [48], [90], [91], [176]. L'huile essentielle posséderait également des propriétés anti-agrégantes plaquettaires aux doses thérapeutiques [60].

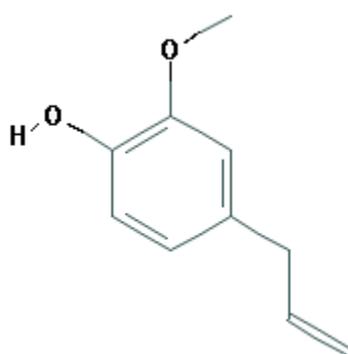


Illustration 19: Structure de l'eugéno

Précautions d'emploi : il faut réaliser un test de tolérance cutané avant la première utilisation car elle peut causer des irritations locales.

#### II.1.2.1.2. Origan

Description botanique : c'est une plante à tige rougeâtre de 20 à 80 cm, couverte de poils mous. Ses feuilles odorantes sont vert foncé ovales et pointues au goût piquant. Elle pousse dans les zones méditerranéennes sèches et ensoleillées. Comme son nom l'indique, ses fleurs roses ou blanches sont groupées en glomérules quadrangulaires compacts et odorants. Appartenant aux labiées, sa corolle possède deux lèvres développées (même si la lèvre supérieure est plutôt plane), quatre étamines visibles, un calice à cinq dents équivalentes [57], [174], [177], [178]. Ses feuilles et fleurs sont décrites à la Pharmacopée européenne [44].



Illustration 20: Planche descriptive de l'origan [229]

Le rendement de l'extraction est supérieur à 2 %, et la densité relative de l'huile essentielle obtenue est comprise entre 0,92 et 0,95. Elle ne possède pas de monographie à la Pharmacopée européenne ni à la française [44], [61].

Le laboratoire la promeut en tant qu'anti-infectieuse puissante à large spectre d'action et immunostimulante.

La bibliographie en fait aussi un anti-infectieux puissant à large spectre, y compris sur la sphère cutanée (acné, furoncle) [47], [48], notamment par la présence de carvacrol (hydroxy-2-*para*-cymène). L'huile essentielle d'origan est dite non-sélective car elle inhibe aussi bien des bactéries Gram+ que Gram- [179].

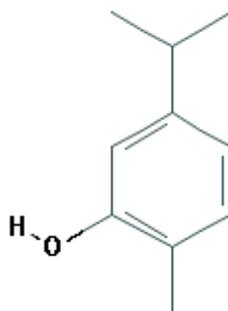


Illustration 21: Structure du carvacrol

Précaution d'emploi : elle est dermocaustique et doit être utilisée uniquement très fortement diluée et de manière localisée.

### II.1.2.1.3. Thym à thymol

Description botanique : c'est sous-arbrisseau vivace croissant en touffes de tiges ligneuses ramifiées de 20 à 30 cm. Elles portent de petites feuilles persistantes vert-gris très aromatiques semblables à des aiguilles (longueur de 3 à 12 mm) dont le côté exposé est glabre. Les fleurs sont petites et nombreuses, roses ou blanches. Il se trouve préférentiellement en milieu méditerranéen, dans un sol sec type garrigue, rocaille ou maquis (sol calcaire ou argileux). De multiples *ct.* ont été recensés, une grande prudence est donc requise au niveau de la traçabilité [42], [57], [177].



Illustration 22: Photographie de thym [229]

Le rendement de l'extraction est supérieur à 1 % et l'huile essentielle obtenue est un liquide mobile, limpide, jaune ou brun-rouge très foncé, à l'odeur rappelant celle du thymol, miscible à l'éthanol anhydre et à l'éther de pétrole. Elle possède une monographie à la Pharmacopée européenne [44]. Sa densité relative est comprise entre 0,910 et 0,937.

Le laboratoire la promeut en tant qu'antiseptique puissant à large spectre d'action.

La bibliographie la catégorise comme anti-infectieuse puissante (y compris pour les suppurations telles que les abcès [180]), stimulante générale mais aussi révulsive et rubéfiante [47], [48], notamment par la présence de thymol (méthyl-1-isopropyl-4-hydroxy-3-benzène).

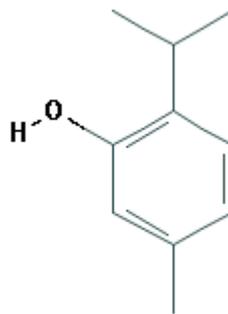


Illustration 23: Structure du thymol [228]

## II.1.2.2. Autres huiles essentielles

### II.1.2.2.1. Arbre à thé

Description botanique : c'est un arbuste robuste et touffu de 3 à 10 m au tronc droit et

à l'écorce stratifiée se détachant en lanières ; il est fait d'un bois très dur réputé imputrescible. Les petites feuilles épineuses sont persistantes, alternes, lancéolées et glabres, de couleur vert clair, ponctuées de glandes à huiles essentielles leur conférant leur forte odeur. Les fleurs pourpres, jaunes ou blanches, aromatiques, sont dispersées sur l'épi floral. Elles possèdent cinq pétales et portent de nombreuses étamines. Le fruit est une petite capsule renfermant les graines allongées qui peuvent germer même après plus de trois années. La zone de croissance à l'état sauvage est de type marécageuse [42], [57], [174], [178], [181]. La dénomination d'« arbre à thé » a été attribuée à l'époque des expéditions du capitaine Cook (vers 1770) lorsque ses marins anglais utilisèrent ses feuilles à la place de celles de théier [42].

L'extraction s'effectue en 2 heures, avec un rendement autour de 1,5 % [42], et donne une huile essentielle liquide limpide, mobile, incolore ou jaune pâle, à odeur caractéristique. Elle possède une monographie à la Pharmacopée européenne [44]. Sa densité relative varie entre 0,885 et 0,906.

Le laboratoire la promeut en tant qu'immunostimulante, désinfectante à large spectre d'action, et permettant d'assainir les peaux à problèmes. Elle est pourvue d'une bonne tolérance cutanée.

La bibliographie la décrit comme antimicrobienne (dont antiacnéique et antifuronculeuse [180], elle se révèle plus efficace que la chlorhexidine pour éliminer le SARM sur la peau et les plaies. [6], [182]), stimulante lymphatique, décongestionnante et radioprotectrice [141]. Elle semble plus efficace sur les *S. aureus* sensibles à méticilline que les SARM [183] mais permet tout de même de réduire le portage du SARM sur peau saine ou lésée [33], [184].

#### II.1.2.2.2. Cannelle

Description botanique : arbre de 5 à 20 m de haut, il possède une écorce épaisse et rugueuse. Les feuilles coriaces et persistantes sont opposées, luisantes et entières, ayant chacune trois nervures principales. Les inflorescences sont réunies en panicules de petites fleurs blanchâtres à l'aspect soyeux, et donnent un fruit de type drupe, couleur lilas. Les régions tropicales aux sols riches et très irrigués lui sont naturellement propices [57], [181].



Illustration 24: Photographie de cannelle de Ceylan [229]

L'extraction se fait en 5 heures, avec un rendement de 0,5 à 1 % [42] et donne une huile essentielle liquide limpide, mobile, jaune clair devenant rougeâtre en vieillissant, à odeur caractéristique rappelant celle de l'aldéhyde cinnamique. Elle possède une monographie à la Pharmacopée européenne [44]. Sa densité relative est comprise entre 0,99 et 1,025.

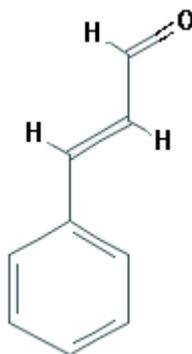


Illustration 25:  
Structure du  
cinnamaldéhyde  
[228]

Le laboratoire la promeut en tant qu'antibactérien à spectre d'action large, stimulante générale.

La bibliographie en fait un puissant antibactérien, anticoagulant [141], très utilisé contre les atteintes dentaires, post-chirurgicales ou urinaires et les maladies tropicales [47].

### II.1.2.2.3. Ciste ladanifère

Description botanique : arbrisseau vivace de 1 à 2 m. Ses tiges, rameaux et feuilles sont souvent visqueux et fortement odorants. Les longues feuilles pérennes sont étroites, vert-gris et glabres sur la face supérieure et plus ternes veloutées sur la face inférieure. Elles exsudent la gomme-résine labdanum de mai à juillet. Les fleurs sont solitaires et larges (jusqu'à 10 cm), constituées de grandes corolles à cinq pétales blanches parées d'un cœur pourpre à auréole dorée, qui ne persiste qu'une journée. La plante se complaît en terrain sec (garrigues méditerranéennes), dans les bois de résineux, et dans un sol siliceux (Espagne). L'origine Corse fournit une huile essentielle de qualité [42], [174], [177].

Le rendement de l'extraction est faible (environ 0,1 % [42]) et produit une huile essentielle dont les caractères ne sont pas recensés à la Pharmacopée européenne [44] ni française [61]. Sa densité relative oscille entre 0,890 et 0,935.

Le laboratoire la promeut en tant que désinfectante, tonique cutané, favorisant la cicatrisation des peaux abîmées et des boutons.

Les références bibliographiques la montrent antiseptique [42], aidant à la coagulation des petites plaies, au traitement de la couperose et de l'eczéma suintant [48].

Précautions d'emploi : elle ne doit pas être utilisée sur une large plaie ouverte et suppurante ni en cas de traitement anticoagulant. Sa prise par voie orale est réservée au conseil par un professionnel de santé habitué.

#### II.1.2.2.4. *Eucalyptus radié*

Description botanique : c'est un arbre d'une trentaine de mètres au tronc gris-bleu, feuilles juvéniles arrondies devenant lancéolées. Les fleurs sont blanches et le fruit est dur, hémisphérique et ligneux. Un sol drainé est idéal à la pousse, en climat relativement chaud et humide. De très nombreuses espèces et variétés sont recensées, et de multiples *ct.* mis en évidence (prendre garde à la traçabilité) [42], [178].

L'extraction dure une heure [42] et produit une huile essentielle liquide incolore ou jaune pâle, à odeur rappelant celle du 1,8-cinéole. La Pharmacopée européenne décrit les caractères des huiles essentielles d'*Eucalyptus sp.*, bien que les espèces *E. globulus*, *polybractea* et *smithii* soient les plus utilisées [44]. Sa densité relative se situe entre 0,89 et 0,92.

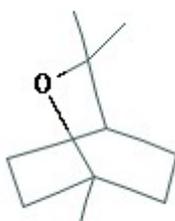


Illustration 26:  
Structure du 1,8-cinéole [228]

Le laboratoire la promeut en tant qu'antibactérienne des voies respiratoires et immunostimulante.

La bibliographie décrit ses molécules actives terpinèn-4-ol et pipéritone comme efficaces sur *S. aureus* [185].

#### II.1.2.2.5. Marjolaine

Dans l'Égypte antique, elle est la plante d'Osiris et servait aux fumigations. Il faut la distinguer de la marjolaine sauvage = origan (*Origanum vulgare*) et de la marjolaine d'Espagne (*Thymus mastichina*) [42].

Description botanique : c'est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle possédant une tige velue mesurant jusqu'à 60 cm de hauteur et poussant dans un sol drainé, léger et chaud. Les feuilles sont simples, ovales, opposées, duveteuses, couleur gris-vert à vert foncé et dégagent un arôme puissant, sucré, épicé. Ses bractées sont en forme de petites coquilles lui donnant son surnom, et ses petites fleurs blanches à mauves, veloutées, sont réunies en inflorescences compactes. Ses bractées sont en forme de coquilles. Les fruits sont des akènes [42], [174], [178].



Illustration 27: Photographie de marjolaine à coquilles [229]

L'extraction se fait pendant 3 heures, avec rendement de 0,1 à 0,2 % [42] et donne une huile essentielle dont les caractères ne sont pas décrits dans la Pharmacopée européenne [44] (la plante est cependant inscrite à la Pharmacopée française [61]). La densité relative se situe entre 0,880 et 0,905.

Le laboratoire la promeut en tant que stimulante immunitaire de l'organisme.

Elle est décrite par la bibliographie comme antibactérienne [186] ayant prouvé son efficacité anti-staphylococcique [178].

#### II.1.2.2.6. Niaouli

Description botanique : cet arbre toujours vert mesurant jusqu'à 15 m de hauteur possède un tronc tortueux et une écorce épaisse, molle et blanche se détachant facilement du tronc. Les rameaux feuillés sont retombants. Les feuilles persistantes et odorantes sont orientées dans un plan vertical et sont tri- ou penta-nervées, d'un gris-vert foncé sont alternes, effilées et lancéolées dégageant une odeur de camphre au froissement, et ses fleurs plutôt jaunâtres et regroupées en épi possèdent de nombreuses étamines jaunes filiformes. Il existe de très nombreuses espèces et autant de *ct.*, il convient de rester prudents sur la traçabilité de l'huile essentielle utilisée [42], [57], [174], [181].



Illustration 28:  
Photographie du niaouli  
[229]

L'extraction dure six heures [42] et produit une huile essentielle liquide incolore ou jaune pâle, à odeur aromatique de cinéole. Elle possède une monographie à la Pharmacopée européenne [44]. Sa densité relative est comprise entre 0,90 et 0,92.

Le laboratoire la promeut en tant qu'antiseptique à très large spectre d'action, protectrice et purifiante cutanée.

La bibliographie la décrit comme antibactérienne puissante par inhalation ou massage [186].

#### **II.1.2.2.7. Orange amère / Petit grain bigaradier**

Description botanique : le bigaradier est un petit arbuste de 5 à 10 m de hauteur. Ses feuilles abondantes et d'un vert brillant sont amères et aromatiques et possèdent un pétiole large (1 cm) bordé par des ailettes. Les fleurs sont blanches et charnues, à cinq pétales très parfumées. Les fruits de taille moyenne, sont de couleur rouge-orangée à l'écorce rugueuse, et au mésocarpe épais. La chair du fruit est très amère et ne se consomme pas telle quelle [177]. L'huile essentielle de petit-grain s'obtient à partir des feuilles, ramilles et fruits naissants de l'arbre lorsqu'ils ont la taille de « petits grains » [42].



Illustration 29: Planche descriptive de l'oranger amer [229]

L'extraction se fait au rendement de 0,4 à 0,6 % [42] et produit une huile essentielle aux caractères non-décrits à la Pharmacopée européenne (il y a seulement le néroli issu des fleurs et l'épicarpe et le mésocarpe séchés du fruit mûr [44]), la feuille séchée seule (sans rameaux ni fruits) est décrite à la Pharmacopée française [61]. La densité relative de l'huile essentielle obtenue est comprise entre 0,880 et 0,893.

Le laboratoire la promeut en tant que nettoyante et régénérante cutanée, soulageant les problèmes de peau.

La bibliographie trouvée la caractérise d'anti-furonculeuse [180].

Précautions d'emploi : une photosensibilisation reste possible avec cette huile essentielle.

### II.1.3. Mise au point des protocoles

#### II.1.3.1. Préparation des souches bactériennes

La standardisation de l'*inoculum* bactérien se déroule comme suit : les bactéries sont repiquées la veille et mises à incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin de toujours utiliser des cultures jeunes. Les colonies sont ensuite émulsionnées dans de l'eau distillée stérile et le pourcentage de lumière transmise à 600 nm (%Lt) est adapté au spectrophotomètre entre 63 et 65, correspondant à environ  $2 \cdot 10^8$  germes/mL, soit environ 0,5 MacFarland de turbidité. L'*inoculum* sera ensuite dilué dans le milieu selon le protocole



choisi.

### **II.1.3.2. Préparation des huiles essentielles**

Les dilutions dans le DMSO sont préparées extemporanément, et les proportions sont exprimées en volume/volume (v/v). Ainsi, les dilutions d'huiles essentielles à 9:1 dans le DMSO seront réalisées avec 9 volumes d'huile essentielle + 1 volume de DMSO (dilution au 9/10<sup>e</sup>).

Les mélanges entre huiles essentielles sont préparés extemporanément, ce qui permet d'éviter la dégradation des composés fragiles comme l'aldéhyde cinnamique en acide cinnamique [13]. Les proportions sont exprimées en v/v. Pour les mélanges d'huiles essentielles, 2:1 correspond donc à 2 volumes de la première huile essentielle pour 1 volume de la seconde (à volumes équivalents, nous noterons 1:1).

### **II.1.3.3. Préparation des témoins positifs**

Nous avons choisi comme témoin positif un antibiotique aminoside : la gentamycine dosé à 15 µg = 10 UI/disque, car cette famille moléculaire se révèle très efficace dans la lutte anti-staphylococcique, y compris pour les résistants à la méticilline, ce qui nous assure l'inhibition bactérienne [187].

### **II.1.3.4. Préparation des témoins négatifs**

Les témoins négatifs sont les tubes dans lesquels sont placés le bouillon puis l'huile essentielle, sans *inoculum*. Il n'y a donc pas de croissance bactérienne : après incubation, le témoin négatif donnera une valeur de %Lt au spectrophotomètre correspondant au blanc qui sera utilisé pour la détermination des valeurs de %Lt de la gamme de dilution de l'huile essentielle correspondante.

Certaines huiles essentielles comme celle de thym sont colorées et absorbent à 600 nm, ce qui pose un problème de lecture de %Lt à cette valeur de détection (de grandes variations de %Lt peuvent être perçus).

## **II.1.4. Protocole en milieu solide**

Les aromatoigrammes sont réalisés selon le protocole suivant :

- préparer l'*inoculum* bactérien à 65 %Lt ;
- diluer cet *inoculum* :
  - *S. epidermidis* : 0,6 mL d'*inoculum* / 10 mL d'eau distillée stérile ;
  - les deux *S. aureus* : 0,4 mL d'*inoculum* / 10 mL d'eau distillée stérile ;
  - *S. pyogenes* : 2 mL d'*inoculum* / 10 mL d'eau distillée stérile ;
- ensemencer en surface de la gélose MH par écouvillonnage avec l'*inoculum* bactérien dilué et laisser évaporer l'excédent si besoin ;
- imbiber un à un avec les huiles essentielles ou mélanges à tester les disques de papier filtre stériles de 9 mm de diamètre avec 8  $\mu$ L d'huile essentielle ;
- laisser reposer la boîte de Pétri 15 min couvercle entrouvert pour permettre la diffusion des composés et la dissipation des vapeurs qui fausseraient les résultats ;
- incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures ;
- lire les résultats en appréciant la largeur du halo d'inhibition (en mm) taille du disque incluse, avec un lecteur de zone, permettant une lecture précise du diamètre d'inhibition de croissance.

### II.1.5. Protocole en milieu liquide

Les CI (concentrations inhibitrices) ont été obtenues par la mesure de la turbidité [13]. Les approximations techniques et de manipulation ne nous permettent pas de visualiser la totale absence de croissance des germes dans les bouillons (CMI), nous ne calculerons donc que les valeurs de  $CI_{50}$  et  $CI_{90}$ .

La turbidité est mesurée à partir du %Lt à 600 nm de chaque tube en fonction de celui du témoin négatif (bouillon + huile essentielle). Ainsi, plus la solution est limpide, plus le %Lt est grand et moins les bactéries se sont développées dans le milieu. Nous procéderons comme suit en introduisant dans cet ordre, pour chaque tube :

- l'*inoculum* bactérien : 0,1 mL à 65 %Lt pour les *S. aureus* et 0,2 mL à 65 %Lt pour le *S. epidermidis* ;
- rajouter 10 mL de bouillon MH stérile ;
- rajouter l'huile essentielle ou le mélange à tester en dernier, ainsi l'*inoculum* y est dilué de façon homogène. Pour chaque test est effectué un témoin positif sans huile essentielle et un témoin négatif sans *inoculum* bactérien ;
- incuber les tubes au bain-marie à 37°C pendant 18 à 24 heures sous agitation. La lecture des résultats se fait à 600nm avec un spectrophotomètre.

### II.1.6. Représentation graphique des résultats en milieu liquide

Dans le but d'obtenir les valeurs de  $CI_{50}$  et  $CI_{90}$  nous avons réalisé des gammes de

dilution pour une huile essentielle sur une bactérie spécifique, car le %Lt est inversement proportionnel à la croissance bactérienne (voir Annexes 1 & 2). La représentation graphique a été traitée de la façon suivante :

- l'axe des abscisses correspond à la dilution d'huile essentielle finale (v/v) dans chaque tube ;
- l'axe des ordonnées correspond au %Lt lu au spectrophotomètre.

On établit une corrélation entre les concentrations et l'inhibition de la croissance bactérienne. Afin de lire les concentrations sur ces graphiques, il faut délimiter les bornes d'étude :

- 100 % d'inhibition de croissance bactérienne correspondent à la valeur de lumière transmise obtenue s'il n'y avait pas de bactéries, donc celle du tube témoin négatif (sans bactérie) pour chaque gamme soit 100 %Lt ;
- 0 % d'inhibition de croissance bactérienne correspond à la valeur de lumière transmise obtenue si les bactéries se développent au *maximum*, donc celle du tube témoin positif (sans huile essentielle) : la variation de %Lt due à l'huile essentielle est considérée comme nulle pour chaque gamme. La valeur du témoin positif est, dans la majorité des cas, 20 %Lt (cette valeur a été adaptée pour chaque gamme).

L'échelle d'inhibition de croissance bactérienne s'étend donc de 20 à 100 %Lt, soit une variation de 80 %Lt qui s'opère le long de cette échelle. Il se déduit qu'une variation de 0,8 %Lt correspond à une variation de 1 % d'inhibition de croissance bactérienne, donc 50 % d'inhibition de croissance correspond à 40 %Lt de plus que la base de 20 %Lt, et 90 % d'inhibition de croissance correspondent à 72 %Lt de plus que la base de 20 %Lt.

Dans ces conditions, nous avons :

- $CI_{50}$  = concentration d'huile essentielle qui inhibe à 50 %, soit 60%Lt ;
- $CI_{90}$  = concentration d'huile essentielle qui inhibe à 90 %, soit 92 %Lt.

Cette échelle a été adaptée pour chaque gamme en fonction de la valeur exacte de %Lt du témoin positif obtenu.

Enfin, pour obtenir des graphiques plus lisibles, nous avons opté pour l'affichage de la croissance bactérienne en ordonnées plutôt que l'inhibition : les ordonnées correspondent donc à  $100 - \%Lt$  : la  $CI_{50}$  vaut donc  $100 - 60 = 40$  %Lt, et la  $CI_{90}$  vaut  $100 - 92 = 8$  %Lt.

### II.1.7. Protocole de réensemencement en milieu solide

La procédure suivante a été réalisée pour déterminer les valeurs de CMB :

- préparation de dilutions décimales à partir de la solution « témoin positif » (incubée sans huile essentielle) de la gamme de dilution dont les tubes sont issus, jusqu'à la dilution  $1/100000^e$  soit  $10^{-5}$  ;



- dépôt de ces dilutions sur une gélose dans une boîte de Pétri, en stries parallèles à l'aide d'une öse calibrée ;
- dépôt sur une autre gélose des prélèvements issus des tubes de la gamme de dilution incubée, de façon identique (en stries parallèles de même longueur, à l'aide d'une öse de même calibre) ;
- incubation de toutes les géloses à l'étuve à 37°C pendant 18-24 heures ;
- lecture des valeurs de CMB sur la gélose des dépôts de la gamme de dilution incubée, correspondant à la concentration d'huile essentielle de la strie qui montre autant (ou moins) de croissance bactérienne que la strie de la dilution 10<sup>-4</sup> du témoin positif.

Nous présentons ci-dessous le tableau synthétique des tests menés au laboratoire :

Tableau 3: Récapitulatif des tests menés au laboratoire

	Milieu	Solide			Liquide		
		1	2	3	1	2	3
	bactérie <sup>13</sup> :						
huiles essentielles phénolées	girofle ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	+	+	+	+	+	
	origan ( <i>Origanum compactum</i> )	+	+	+		+	
	thym ( <i>Thymus zygis ct. thymol</i> )	+	+	+	+	+	
autres huiles essentielles	arbre à thé ( <i>Melaleuca alternifolia ct. terpinèn-4-ol</i> )	+	+	+	+	+	
	cannelle ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	+	+	+		+	
	ciste ladanifère ( <i>Cistus ladaniferus</i> )	+	+	+		+	
	eucalyptus radié ( <i>Eucalyptus radiata var. radiata</i> )	+	+	+	+	+	
	marjolaine ( <i>Origanum majorana</i> )	+	+	+		+	
	niaouli ( <i>Melaleuca quinquenervia ct. cinéole</i> )	+	+	+		+	+
	orange amère / petit grain bigaradier ( <i>Citrus aurantium var. amara</i> )	+	+	+		+	
mélanges d'huiles essentielles	thym - origan 1:1		+				
	arbre à thé - eucalyptus radié 1:1		+		+		
	girofle - cannelle 2:1					+	
	cannelle - niaouli - girofle 1:1:1					+	

13 légende : 1 : *S. epidermidis* ; 2 : *S. aureus* sauvage ; 3 : *S. aureus* ATCC 6538p

## II.2. Résultats et interprétations

### II.2.1. Tests préliminaires

#### II.2.1.1. Effet du DMSO sur les bactéries

Les huiles essentielles ont été solubilisées à 9:1 dans du DMSO. Aucune formation d'un précipité n'a été observée : la solution obtenue était translucide et homogène.

Aucun effet antibactérien du DMSO à ce pourcentage n'a été mis en évidence dans nos conditions expérimentales contrairement à ce qu'indiquent certains auteurs [188].

#### II.2.1.2. Effet de la gentamycine

En milieu solide, la gentamycine donne des diamètres d'inhibition similaires pour les trois staphylocoques testés : 35 mm pour *S. epidermidis* qui est légèrement plus sensible, 30 mm pour *S. aureus* sauvage et 31 mm pour *S. aureus* ATCC 6538p qui semblent avoir la même sensibilité pour cet antibiotique. Il n'a évidemment aucun effet sur le *S. pyogenes* qui est résistant à la gentamycine (9 mm de diamètre d'inhibition, correspondant au diamètre du disque).

#### II.2.1.3. Étapes majeures des protocoles

L'absence de protocole établi et de normalisation est l'un des inconvénients majeurs posés par l'étude des huiles essentielles, limitant la capacité à comparer les résultats de certaines études ou confrontant parfois des résultats paradoxaux. Dans le but d'obtenir un protocole reproductible au laboratoire, plusieurs étapes se sont révélées nécessaires, à savoir :

**Pour l'aromatogramme : une étape de volatilisation** est nécessaire. En effet, de par la composition de certaines huiles essentielles, nous avons constaté que des vapeurs aromatiques se répartissaient sur l'ensemble de la gélose de la boîte de Pétri et qu'aucune croissance n'était observée après 24 heures d'incubation (les vapeurs contenant la grande partie des composés actifs des huiles essentielles, qui sont volatiles). Pour pallier ce phénomène, nous avons intégré un temps de volatilisation de 15 minutes préliminaire à notre

protocole. Pour cela, nous avons laissé entrouvert la boîte de Pétri près du bec de gaz. Nous obtenons alors un halo d'inhibition aux contours nets, sans que la croissance bactérienne ne soit visiblement affectée en dehors de cette zone.

**Pour les dilutions en milieu liquide : une agitation** des tubes au bain-marie à 120 tr/min est nécessaire lors de l'incubation. Elle permet la bonne répartition de la charge bactérienne dans le bouillon MH, un contact suffisant entre les bactéries et la faible quantité d'huile essentielle étudiée, et surtout une oxygénation homogène indispensable. Sans cette agitation, les résultats ne sont plus reproductibles.

## II.2.2. Effets des huiles essentielles seules

### II.2.2.1. Aromatogrammes sur les staphylocoques

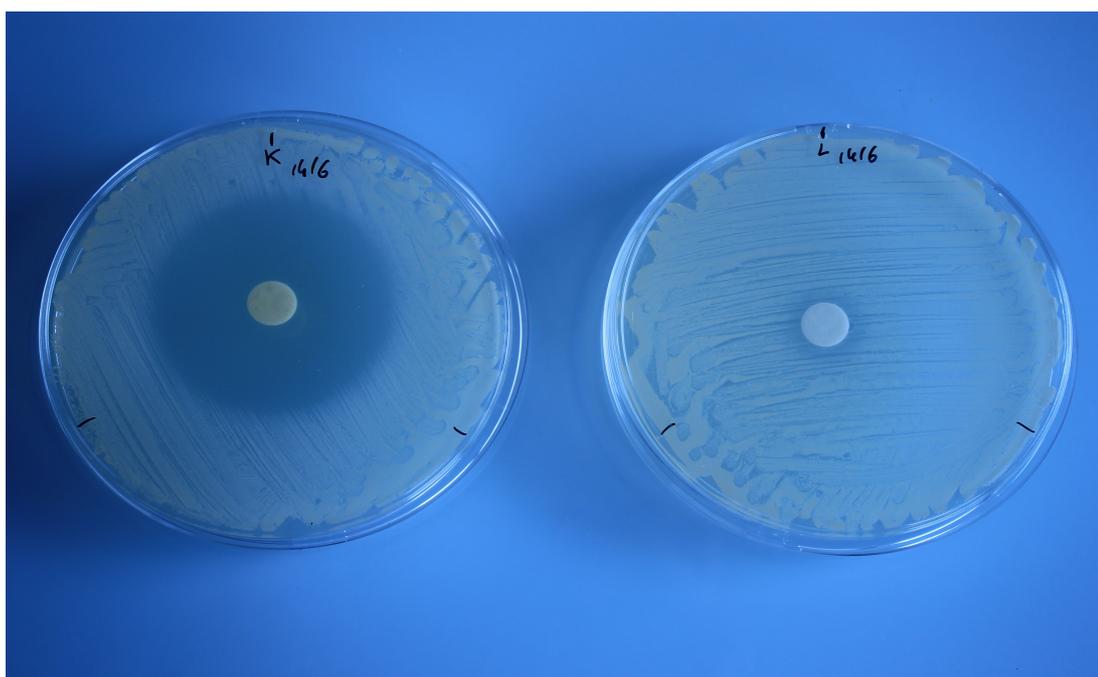


Illustration 30: Divers résultats d'aromatogrammes

Les boîtes de Pétri ensemencées et incubées montrent des halos d'inhibition de différentes tailles comme nous pouvons le voir sur cette photographie. Nous avons ensuite mesuré les diamètres d'inhibition comme mentionné dans le protocole.

Les valeurs des diamètres d'inhibition relevés par chaque huile essentielle testée sont reportées dans le tableau suivant.

Tableau 4: Valeurs des diamètres d'inhibition sur les *Staphylococci*<sup>14</sup>

Huile essentielle	Souche	Diamètre d'inhibition (mm)
girofle	<i>S. epidermidis</i>	19
	<i>S. aureus</i> sauvage	22
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	21
origan	<i>S. epidermidis</i>	43
	<i>S. aureus</i> sauvage	50
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	48
thym	<i>S. epidermidis</i>	48
	<i>S. aureus</i> sauvage	52
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	48
arbre à thé	<i>S. epidermidis</i>	10
	<i>S. aureus</i> sauvage	∅
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	10
cannelle	<i>S. epidermidis</i>	42
	<i>S. aureus</i> sauvage	46
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	45
ciste ladanifère	<i>S. epidermidis</i>	10
	<i>S. aureus</i> sauvage	10
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	10
eucalyptus radié	<i>S. epidermidis</i>	10
	<i>S. aureus</i> sauvage	∅
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	10
marjolaine	<i>S. epidermidis</i>	10
	<i>S. aureus</i> sauvage	∅
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	10
niaouli	<i>S. epidermidis</i>	10
	<i>S. aureus</i> sauvage	10
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	13
orange amère / petit grain bigaradier	<i>S. epidermidis</i>	10
	<i>S. aureus</i> sauvage	∅
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	10

En ce qui concerne la littérature :

- une huile essentielle de *C.cassia* (seule la molécule de cinnamaldéhyde est en commun avec la nôtre) induit un diamètre de 40 mm [49] ce qui est assez proche de nos valeurs : on

14 légende : ∅ = pas d'inhibition observée

peut supposer que c'est cette molécule active qui provoque majoritairement l'inhibition de croissance bactérienne dans ces huiles essentielles ;

- 10  $\mu\text{L}$  d'une huile essentielle d'origan induisent 22 mm [129]. Notre huile essentielle est dotée d'une inhibition beaucoup plus importante. Un test sur *S. aureus* ATCC 29213 avec 20  $\mu\text{L}$  donne 40 mm [49] avec une composition en thymol en plus faibles quantités que le nôtre ;
- une huile essentielle de *Thymus schimperi* induit 23 mm avec 50  $\mu\text{L}$  sur disques de 6 mm, ce qui est beaucoup plus faible que pour notre huile essentielle [189]. Une étude portant sur le thym blanc ( $\gamma$ -terpinène plus concentré) avec 20  $\mu\text{L}$  fait 65 mm sur *S. aureus* ATCC 29123. Soit cette souche est plus sensible que la nôtre, soit la concentration en  $\gamma$ -terpinène peut moduler l'activité de l'huile essentielle [49] ;
- une huile essentielle d'arbre à thé (15 à 30  $\mu\text{L}$ ) donne des diamètres d'inhibition [127] de 14 mm [30], [164] à 29 mm [49]. De même pour l'huile essentielle de ciste ladanifère de Corse : 15  $\mu\text{L}$  donnent 18 mm. [30] Pour l'*Eucalyptus sideroxylon* dont la composition est proche de notre *E. radiata*, l'auteur obtient  $14 \pm 4$  mm, ce qui laisse une grande marge d'erreur. Les compositions avec davantage de *para*-cymène montrent de plus grands diamètres d'inhibition (comme *E. odorata*) [190].

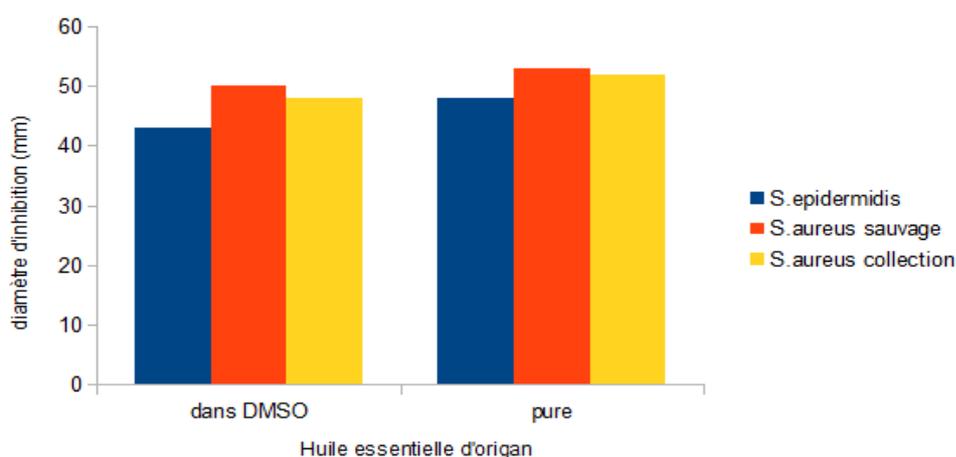


Illustration 31: Diamètres d'inhibition en fonction de la dilution d'huile essentielle d'origan

Nous constatons que 8  $\mu\text{L}$  d'huile essentielle pure ou diluée à 9:1 dans le DMSO sur le disque sont suffisants pour obtenir des résultats interprétables et reproductibles pour nos tests.

Les diamètres d'inhibition du témoin positif à la gentamycine sont similaires pour les deux *S. aureus* (environ 30 mm) et un peu plus élevés pour *S. epidermidis* (35 mm), mais restent malgré tout dans le même ordre de grandeur. Nous pouvons alors établir notre propre échelle de classement des résultats en différenciant trois groupes majoritaires d'huiles essentielles selon leur diamètre d'inhibition :

- < 11 mm = sans effet : les diamètres d'inhibition sont très proches du diamètre du disque, il n'y a donc aucune zone d'inhibition visible ;

- de 11 à 30 mm = efficacité moyenne : les diamètres sont intermédiaires (sous la valeur du diamètre d'inhibition du témoin positif ayant la plus faible valeur) ;
- > 30 mm = très efficace : les diamètres sont plus grands que ceux du témoin positif ayant la plus faible valeur).

L'absence de halo d'inhibition signifie l'absence d'activité antibactérienne ou l'absence de migration des huiles essentielles à travers la gélose. Cependant, nous avons vu que ce sont les molécules de haut PM qui sont retenues par la gélose, et la molécule active au plus grand PM parmi toutes les huiles essentielles testées est celle de l'acétate de linalyle de l'huile essentielle d'orange amère. Cependant, elle ne dépasse pas les 200 g/mol [191], ce qui est très léger : la non-migration des constituants n'est pas justifiée par leur PM.

Les huiles essentielles de niaouli, eucalyptus radié, arbre à thé, marjolaine, ciste ladanifère et orange amère ne génèrent pas de halo d'inhibition : elles sont jugées sans effet en milieu solide vis-à-vis des trois germes testés.

Les diamètres d'inhibition les plus grands (> 30 mm) sont obtenus avec les huiles essentielles de thym, d'origan et de cannelle, et l'huile essentielle de girofle donne des diamètres entre 11 et 30 mm, là encore sur les trois germes testés. Toutes ces huiles essentielles inhibent donc de façon efficace la croissance bactérienne des trois germes.

Les diamètres d'inhibition sont légèrement supérieurs pour les *S. aureus*, qu'ils soient sauvage ou ATCC 6538p, par rapport au *S. epidermidis*, tandis que le témoin à la gentamycine donne un diamètre supérieur pour ce dernier germe. Les tests ne différant que par la bactérie testée, on peut en déduire que les *S. aureus* sont légèrement plus sensibles aux huiles essentielles testées.

Les résultats entre les huiles essentielles pures et diluées dans le DMSO sont comparables et du même ordre de grandeur, à l'exception de *S. aureus* ATCC 6538p avec l'huile essentielle de niaouli : un très faible diamètre d'inhibition est visible avec la dilution au DMSO tandis que l'huile essentielle pure n'en montre aucun. L'huile essentielle semble avoir diffusé davantage à travers la gélose avec le DMSO, qui remplit sa fonction d'adjuvant de solubilisation uniquement dans ce cas.

La littérature pour les huiles essentielles d'arbre à thé, ciste ladanifère et eucalyptus montre qu'un diamètre d'inhibition est visible. Cela signifie que les conditions de nos tests ne permettent pas de créer un gradient de concentration suffisant pour faire apparaître le halo d'inhibition pour ces huiles essentielles (molécules alcooliques et terpéniques).

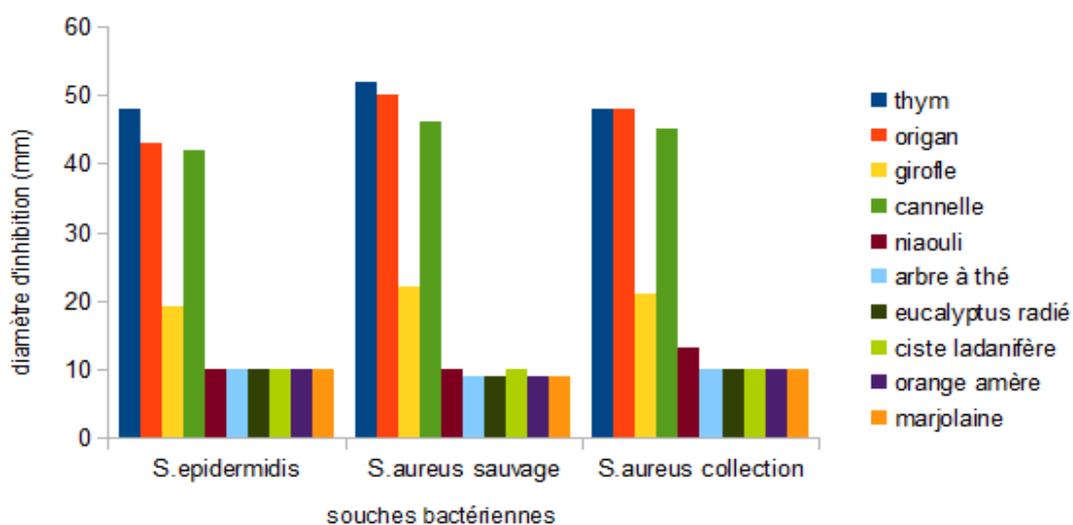


Illustration 32: Activité antibactérienne des 10 huiles essentielles sur les 3 staphylocoques

Avec ce diagramme, nous mettons en avant que nous pouvons scinder les huiles essentielles testées en milieu solide en deux groupes majeurs : les huiles essentielles très efficaces sur toutes les bactéries testées, qui comprennent les huiles essentielles phénolées (thym, organ, girofle) ainsi que la cannelle, et les huiles essentielles sans effet sur toutes les bactéries testées, qui regroupent le niaouli (à l'exception d'une très faible activité sur *S. aureus* ATCC 6538p), l'arbre à thé, l'eucalyptus radié, le ciste ladanifère, l'orange amère et la marjolaine.

### II.2.2.2. Aromatogrammes sur le streptocoque

Tableau 5: Valeurs des diamètres d'inhibition sur *Streptococcus pyogenes*

Huile essentielle	Diamètre d'inhibition (mm)
thym	28
organ	23
girofle	16
cannelle	35
niaouli	∅
arbre à thé	∅
eucalyptus radié	∅
ciste ladanifère	∅
marjolaine	∅
orange amère	∅

Nous ne pouvons avancer d'interprétations de ces résultats de façon certaine, car les halos d'inhibitions n'étaient pas caractéristiques : bien que le témoin soit translucide, la plupart des géloses présentait des double halos d'inhibition aux contours flous avec une hémolyse incomplète, y compris lorsque les boîtes étaient ré-incubées pour 24 heures supplémentaires, ce qui n'est pas un résultat caractéristique de *S. pyogenes* sur gélose au sang. Nous constatons simplement que les huiles essentielles phénolées et la cannelle pourraient exercer sur cette bactérie un effet antibactérien moindre que sur les *Staphylococci* et que l'huile essentielle de cannelle, cette fois-ci, se démarque nettement des huiles essentielles phénolées : *S. pyogenes* serait davantage sensible au cinnamaldéhyde qu'aux dérivés phénoliques (ce qui reste à démontrer par des tests approfondis en milieu liquide).

### II.2.2.3. Détermination des concentrations inhibitrices

Les CI se déterminent au spectrophotomètre en fonction du %Lt à 600 nm, qui est inversement proportionnel à la croissance bactérienne : plus les bactéries se sont multipliées, plus le bouillon devient opaque et moins la valeur de %Lt sera élevée.

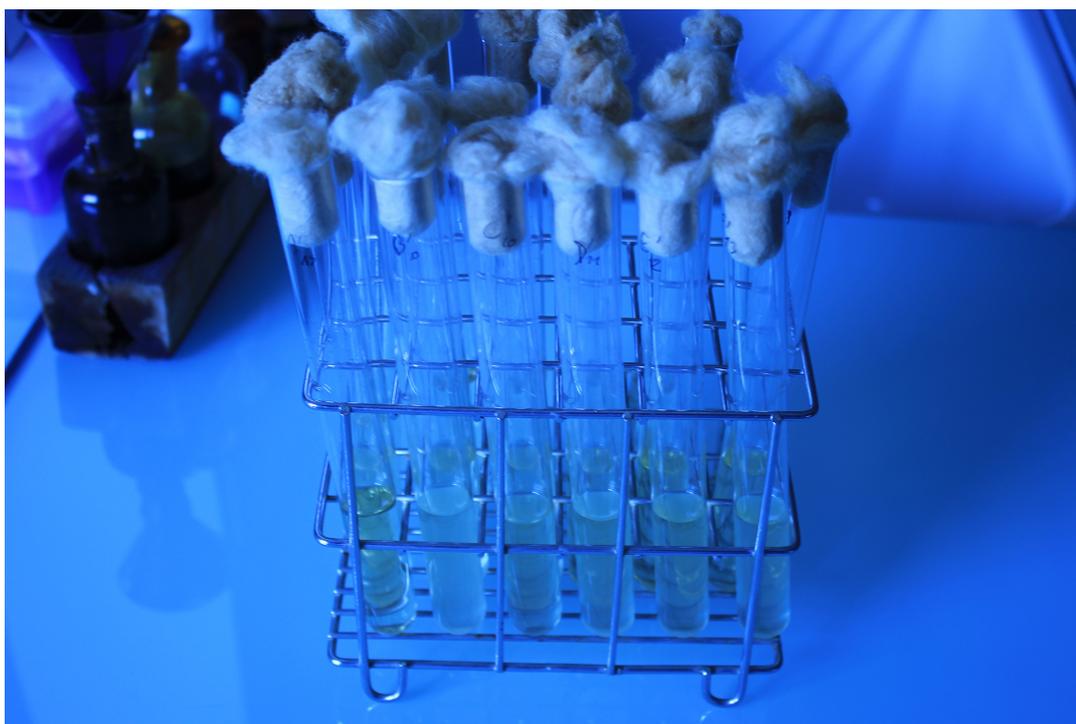


Illustration 33: Gamme de dilution en bouillon Mueller-Hinton après incubation

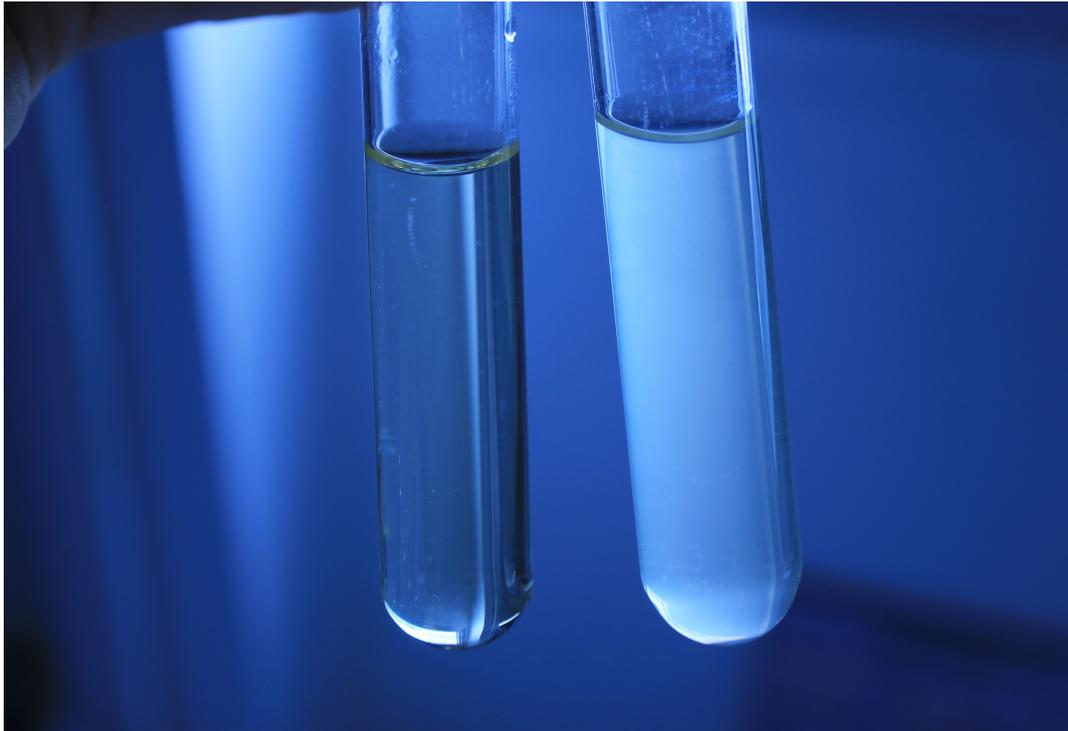


Illustration 34: Bouillonsensemencés, après incubation : absence de croissance bactérienne à gauche, croissance bactérienne à droite

Les valeurs des concentrations caractéristiques sont tirées de la courbe de régression correspondante et exprimées en dilution (% v/v), mais ont pu être converties en g/mL grâce aux densités des huiles essentielles. Nous avons donné un ordre de grandeur pour leurs CI (inférieur ou supérieur à la concentration testée).

D'après les résultats des tests en milieu solide et ceux en milieu liquide réalisés pour le niaouli, nous voyons qu'il n'y a pas de différences significatives entre les résultats obtenus pour *S. aureus* sauvage et *S. aureus* ATCC 6538p. Nous avons donc choisi de poursuivre les tests avec *S. aureus* sauvage seulement.

Les tests menés sur les huiles essentielles de thym et d'origan nous montrent que leur efficacité antibactérienne est similaire, nous avons donc choisi de ne pas mener de tests supplémentaires sur *S. epidermidis*.

Le tableau suivant présente les CI obtenues lors des tests en milieu liquide. Nous y avons adjoint une dernière colonne affichant ce que nous avons choisi d'appeler le rapport d'inhibition = RI, qui correspond au rapport entre la  $CI_{90}$  et la  $CI_{50}$ . Cette valeur n'a pas été calculée dans les autres publications, mais met en évidence l'écart entre les deux valeurs de CI. Ainsi, nous pouvons dire si les valeurs de CI sont très proches que le RI est très faible (très proche de 1), et déterminer le type d'activité antibactérienne de l'huile essentielle (effet palier « tout-ou-rien » avec une très forte inhibition, ou effet concentration-dépendant). Cependant, ce rapport ne prend pas en considération la concentration nécessaire à l'inhibition. Il ne peut donc être utilisé qu'en complément des valeurs de CI (une huile essentielle à  $CI_{50}$  très faible mais RI élevé peut avoir une  $CI_{90}$  bien plus faible qu'une autre

huile essentielle à  $CI_{50}$  plus élevée mais RI très faible). Selon ce raisonnement, de la même façon qu'une huile essentielle dont le rapport CMB/CMI est faible sera plus efficace ( $< 2 =$  bactéricide) qu'une autre au rapport élevé ( $> 2 =$  bactériostatique), une huile essentielle au RI proche de 1 sera caractérisée comme exerçant un effet antibactérien supérieur à une autre au RI très supérieur à 1 pour des  $CI_{50}$  du même ordre de grandeur.

Tableau 6: Valeurs des concentrations inhibitrices en milieu liquide<sup>15</sup>

Huile essentielle	Souche	$CI_{50}$ (mg/mL)	$CI_{90}$ (mg/mL)	$RI = CI_{90}/CI_{50}$
girofle	<i>S. epidermidis</i>	1,7	1,8	1,06
	<i>S. aureus</i>	1,6	1,8	1,13
origan	<i>S. aureus</i>	0,23	0,31	1,35
thym	<i>S. epidermidis</i>	0,32	0,46	1,44
	<i>S. aureus</i>	0,23	0,27	1,17
arbre à thé	<i>S. epidermidis</i>	1,8	3,2	1,8
	<i>S. aureus</i>	$> 2,2$	$> 2,7$	∅
cannelle	<i>S. epidermidis</i>	$0,1 < CI_{50} < CI_{90} < 0,5$		∅
	<i>S. aureus</i>	0,21	0,39	1,86
ciste ladanifère	<i>S. epidermidis</i>	$> 0,46$		∅
	<i>S. aureus</i>	$< 2,3$	$> 2,7$	∅
eucalyptus radié	<i>S. epidermidis</i>	1,5	2,4	1,6
	<i>S. aureus</i>	$< 2,3$	2,7	∅
marjolaine	<i>S. aureus</i>	$< 2,2$	$> 2,7$	∅
niaouli	<i>S. aureus</i>	0,46	1,0	2,17
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	0,54	1,2	2,22
orange amère	<i>S. epidermidis</i>	$> 0,44$		∅
	<i>S. aureus</i>	3,1	$> 3,1$	∅

Le tableau ci-dessus nous montre que les valeurs les plus faibles de  $CI_{50}$  et  $CI_{90}$  sont obtenues avec les huiles essentielles de thym, d'origan et de cannelle (toutes inférieures à 0,5 mg/mL) et ce indépendamment du germe testé. De plus, les  $CI_{90}$  sont atteintes très rapidement (elles valent moins de deux fois la  $CI_{50}$  pour les huiles essentielles à phénols terpénoïdiques, et exactement le double de la  $CI_{50}$  pour l'huile essentielle de cannelle), signifiant une grande sensibilité des germes pour ces huiles essentielles. Ces éléments nous prouvent que ces huiles essentielles sont celles qui exercent le plus d'effet antibactérien parmi celles testées, même à de faibles concentrations (malgré un RI élevé pour l'huile essentielle de cannelle). Cet effet est bien visible sur leurs courbes de dilution, avec des droites de régression à coefficient élevé pour tous les germes et des allures de courbes semblables (Annexes 1.1, 1.2 & 2.1). Ces résultats sont corrélés avec ceux en milieu solide,

15 légende : ∅ = valeur non-calculable

où ces huiles essentielles montrent les plus grands diamètres d'inhibition. Des différences notables surviennent pour les autres huiles essentielles.

En comparant les germes testés, on remarque que *S. aureus* est plus sensible à l'huile essentielle de thym que *S. epidermidis*, car pour des  $CI_{50}$  comparables, le RI de la courbe de l'huile essentielle de thym sur *S. aureus* est plus faible que celui sur *S. epidermidis*, montrant que la  $CI_{90}$  sera atteinte plus rapidement à des concentrations identiques, et montre donc une activité supérieure sur *S. aureus*. Sur cette même bactérie, l'huile essentielle d'origan pour une  $CI_{50}$  identique possède un RI supérieur, elle est donc légèrement moins efficace aux mêmes concentrations.

En ce qui concerne l'huile essentielle de girofle, nous remarquons que l'activation de l'effet antibactérien se manifeste à des concentrations 3 à 5 fois plus élevées que pour les huiles essentielles précédentes, ces dernières restent donc plus efficaces que celle de girofle. Ces résultats sont corrélés avec ceux en milieu solide, où l'on observe un diamètre d'inhibition modéré. De plus, nous observons un phénomène particulier sur *S. epidermidis* : le RI est très proche de 1. Les valeurs de  $CI_{50}$  et  $CI_{90}$  sont donc pratiquement identiques : cela signifie que l'huile essentielle possède un seuil critique d'efficacité antibactérienne selon la règle du « tout-ou-rien » (où aucune inhibition n'existe sous cette valeur), qui ne se retrouve pas chez *S. aureus*, ce qui est bien illustré par les courbes de dilution de cette huile essentielle avec une droite de régression linéaire de pente quasiment verticale pour *S. epidermidis*, et une mauvaise régression linéaire pour *S. aureus* (Annexes 1.3 & 2.1). Il semblerait donc que les deux bactéries réagissent de façon différente à la présence d'huile essentielle de girofle dans le milieu de croissance.

Les résultats montrent que l'huile essentielle de niaouli possède des CI plus basses que les autres huiles essentielles testées, hormis celles d'origan, de thym et de cannelle (ses CI sont proches du double des leurs, elle reste donc moins efficace que ces trois huiles essentielles en milieu liquide). Cependant, les résultats en milieu liquide ne sont pas comparables à ceux obtenus avec les aromagrammes, où l'on observe peu ou pas de halos d'inhibition, peu importe l'huile essentielle et la bactérie testées. Nous pouvons aussi écarter l'hypothèse que le gradient de concentration créé avec les 8  $\mu$ L déposés sur le disque ne soit pas suffisant pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de cette huile essentielle en milieu solide, car l'huile essentielle de clou de girofle nécessite une concentration bien plus importante pour montrer son activité en milieu liquide, mais montre systématiquement un halo d'inhibition (de taille moyenne) en milieu solide. L'apparition du halo d'inhibition serait donc aussi conditionnée par le type de constituants de l'huile essentielle (les phénols induisent systématiquement un halo d'inhibition, mais pas le 1,8-cinéole). Cependant, l'aromatogramme testant l'huile essentielle de niaouli avec du DMSO révèle un petit halo d'inhibition de 13 mm de diamètre sur *S. aureus* ATCC 6538p uniquement, alors qu'aucun halo n'est trouvé sans DMSO (*data not shown*) et que l'activité en milieu liquide des deux staphylocoques est du même ordre de grandeur (leur  $CI_{50}$  est comparable). L'utilisation du DMSO comme adjuvant de solubilisation ne permet donc pas la corrélation de tous les résultats en milieu solide et en milieu liquide, et la méthode de l'aromatogramme ne permet pas de mettre en évidence les effets antibactériens de certaines huiles essentielles dans ces conditions. Nous voyons qu'en milieu liquide, la  $CI_{90}$  de l'huile



essentielle de niaouli est proche de sa  $CI_{50}$ , donc on peut supposer qu'à des concentrations suffisantes, l'activité antibactérienne atteint rapidement son *maximum*, de façon similaire à l'huile essentielle de cannelle. De plus, les RI sont très élevés et de valeur proche pour les deux germes testés, avec des allures de courbes identiques : le mode d'action semble être le même sur tous les staphylocoques (Annexe 1.4).

Les concentrations inhibitrices de l'huile essentielle de niaouli sont plus faibles que celles des huiles essentielles d'eucalyptus radié et d'arbre à thé. En effet, pour les deux staphylocoques, leurs  $CI_{50}$  sont du même ordre de grandeur que celles de l'huile essentielle de girofle. Cependant, la différence est que cette fois-ci, leurs  $CI_{90}$  sont éloignées de leurs  $CI_{50}$  : leurs courbes de dilution à régression linéaire ou logarithmique (témoins d'un coefficient de proportionnalité entre quantité d'huile essentielle et inhibition de croissance bactérienne) et leur  $RI > 1,5$  illustrent bien cette lente croissance (Annexe 2.2). Nous avons donc ici un profil concentration-dépendant de l'activité antibactérienne de ces deux huiles essentielles, indépendamment du type de staphylocoque testé, qui nécessitent des concentrations supérieures à toutes les huiles essentielles commentées jusqu'ici pour atteindre 90 % de l'inhibition du développement bactérien. Pour *S. aureus*, nous n'avons pas pu déterminer exactement les CI mais l'activité semble supérieure sur cette bactérie que sur *S. epidermidis*. Aussi, l'huile essentielle d'eucalyptus radié semble globalement plus efficace que celle de l'huile essentielle d'arbre à thé sur les staphylocoques.

Les huiles essentielles de ciste ladanifère, de marjolaine et d'orange amère ont des valeurs de  $CI_{90}$  supérieures aux concentrations testées, et n'ont donc pas été déterminées. Nous pouvons simplement dire que leur  $CI_{50}$  est élevée et doit se situer dans le même ordre de grandeur que la girofle (sauf dans le cas de l'orange amère), mais possèdent des  $CI_{90}$  éloignées de leurs  $CI_{50}$ , tout comme les huiles essentielles d'arbre à thé et d'eucalyptus radié. Cela signifie que la concentration nécessaire à leur activité est bien supérieure à celle des autres huiles essentielles. Dans la pratique courante, les huiles essentielles de ciste ladanifère et d'orange amère peuvent s'utiliser pures et donc très concentrées. Cependant, il est nécessaire de déterminer si cette concentration nécessaire à l'activité antibactérienne est applicable à *in vivo* dans la pratique thérapeutique (donc si ces huiles essentielles ne seraient pas inefficaces, la concentration nécessaire à leur activité étant très élevée), et qu'elle se provoque pas d'effets indésirables. Les résultats obtenus pour ces trois huiles essentielles ne varient pas selon la méthodologie employée (milieu solide ou milieu liquide).



Tableau 7: Huiles essentielles classées selon les intervalles de concentrations inhibitrices, et détail des principaux constituants moléculaires<sup>16</sup>

huile essentielle et CI (mg/mL)		Molécules antibactériennes en proportions décroissantes (%)	Principales familles chimiques et origines biosynthétiques
CI <sub>90</sub> >> 3,1	orange amère / petit grain bigaradier	<b>acétate de linalyle</b> (40-55), <b>linalol</b> (15-30), <b>α-terpinéol</b> (3,5-7,5)	<b>ester monoterpénique, monoterpénol</b>
CI <sub>90</sub> > 2,7	ciste ladanifère	camphène, α-pinène, acétate de bornyle (ND)	<b>monoterpènes</b>
	marjolaine	<b>terpinène-4-ol</b> (18-30), <b>γ-terpinène</b> (10-20), α-terpinène (5-12), sabinène (3-10)	<b>monoterpénol, monoterpène</b>
	arbre à thé	<b>terpinène-4-ol</b> (> 30), <b>γ-terpinène</b> (10-28), 1,8-cinéole (< 15)	<b>monoterpénol, monoterpène</b>
1,5 < CI <sub>50</sub> < CI <sub>90</sub> < 2,7	eucalyptus radié	<b>1,8-cinéole</b> (70), α-terpinéol (6-10), limonène (5-10)	<b>éther cyclique monoterpénique</b>
1,5 < CI <sub>50</sub> < CI <sub>90</sub> < 1,8	girofle (clou)	<b>eugénol</b> (75-87), acétate d'eugényle (8-15), β-caryophyllène (2-12)	<b>phénol aromatique</b>
0,4 < CI <sub>50</sub> < CI <sub>90</sub> < 1,2	niaouli	<b>1,8-cinéole</b> (45-65), α-pinène (6-15), α-terpinéol (5-10)	<b>éther cyclique monoterpénique</b>
0,1 < CI <sub>50</sub> < CI <sub>90</sub> < 0,5	origan	<b>carvacrol</b> (25-50), <b>thymol</b> (10-30), <b>γ-terpinène</b> (10-25)	<b>phénols monoterpéniques, monoterpène</b>
	thym	<b>thymol</b> (33-55), <b>para-cymène</b> (14-28), linalol (3-6,5), carvacrol (0,5-5,5)	<b>phénol monoterpénique, monoterpène</b>
	cannelle	<b>trans-cinnamaldéhyde</b> (40-70), acétate de cinnamyle (< 15)	<b>aldéhyde aromatique</b>

Ce tableau illustre bien la grande efficacité des huiles essentielles de thym et d'origan contenant une grande proportion de thymol et de carvacrol. La similarité observée entre les concentrations inhibitrices du thym et de l'origan nous indique que ce sont essentiellement les molécules actives phénolées qui déterminent leur activité, et non les composés minoritaires (le γ-terpinène, le *para*-cymène et le linalol notamment). Ces derniers possèdent donc une activité antibactérienne bien plus faible que les molécules majoritaires (thymol et carvacrol).

<sup>16</sup> gras : > 15 % ; gras souligné : >50 %

Comme vu précédemment, les constituants principaux des huiles essentielles de thym, origan et cannelle leur confèrent la plus grande partie de leur activité antibactérienne. Le fait que l'huile essentielle de cannelle, malgré son RI élevé, possède une activité comparable à celle des huiles essentielles de thym et d'origan sur tous les germes testés, ce qui signifie que l'activité antibactérienne des phénols terpénoïdiques peut être concurrencée par celle du *trans*-cinnamaldéhyde.

La sensibilité staphylococcique à l'huile essentielle de girofle étant principalement due à l'eugénol, l'efficacité de ce phénol aromatique est moindre que celle des phénols terpénoïdiques et du *trans*-cinnamaldéhyde.

Il est intéressant de noter que des différences d'activité antibactérienne sont mis en évidence entre les huiles essentielles de niaouli, d'eucalyptus radié et d'arbre à thé. Ces huiles essentielles contiennent toutes trois du 1,8-cinéole, mais en proportions variables : celles de niaouli et d'eucalyptus radié en grandes proportions, et celle d'arbre à thé en faibles proportions. Nous pouvons supposer que, contrairement aux huiles essentielles à phénols terpénoïdiques, les constituants minoritaires de ces huiles essentielles jouent un rôle non-négligeable dans la réaction anti-staphylococcique. Les deux premières possèdent des quantités équivalentes d' $\alpha$ -terpinéol (monoterpénol), donc nous pouvons dire que ce sont les autres molécules qui modulent leur activité. Nous concluons que l' $\alpha$ -pinène (monoterpène bicyclique) et les autres constituants contenus dans l'huile essentielle de niaouli exercent une activité antibactérienne et/ou une activité synergique avec le 1,8-cinéole et/ou l' $\alpha$ -terpinéol expliquant cette forte activité. À l'inverse, le limonène et les autres constituants minoritaires de l'huile essentielle d'eucalyptus radié n'exercent que peu ou pas d'effet antibactérien en de telles proportions et/ou modulent peu ou pas l'activité antibactérienne du 1,8-cinéole et/ou de l' $\alpha$ -terpinéol sur les bactéries testées. Nous observons une nouvelle fois que pour les huiles essentielles à 1,8-cinéole, les halos d'inhibition en aromatogramme sont inexistantes dans les conditions de nos tests.

En ce qui concerne l'huile essentielle d'arbre à thé, il est intéressant de comparer son activité avec celle de l'huile essentielle de marjolaine car ils contiennent en quantités comparables leurs deux constituants majoritaires : le terpinèn-4-ol et le  $\gamma$ -terpinène. L'huile essentielle de marjolaine possède une  $CI_{50}$  sur *S. aureus* légèrement inférieure à celle de l'arbre à thé, mais leur courbe de CI semble évoluer de façon assez équivalente, et atteindrait sûrement la  $CI_{90}$  à une valeur proche de celle de l'arbre à thé sur *S. epidermidis*. Nous pouvons dire que ces deux huiles essentielles sensibilisent les staphylocoques testés de façon équivalente. Le profil concentration-dépendant de l'activité antibactérienne des huiles essentielles n'avait été démontré dans la littérature que pour le terpinèn-4-ol [33], [70] (constituant majoritaire de ces deux huiles essentielles) mais pas pour certaines huiles essentielles constituées de 1,8-cinéole comme celle d'eucalyptus radié dans notre cas. Cet effet est également modulable par les constituants minoritaires puisque ce n'est pas le cas de l'huile essentielle de niaouli, pourtant aussi constituée d'une proportion semblable de 1,8-cinéole. Ainsi, le limonène permet de révéler cet effet, contrairement à l' $\alpha$ -pinène, lorsqu'ils sont associés au terpinèn-4-ol et à l' $\alpha$ -terpinéol. Cependant, les allures des courbes des huiles essentielles de niaouli et d'eucalyptus radié sont très similaires, prouvant que ces



deux dernières molécules exercent un effet capital dans le mode d'action antibactérien. Nous observons aussi pour les huiles essentielles à molécules alcooliques que les halos d'inhibition en aromatogramme sont inexistantes dans les conditions de nos tests.

Enfin, l'huile essentielle d'orange amère est riche en acétate de linalyle et linalol, ester et alcool monoterpéniques issus de la même voie de biosynthèse. Nous pouvons dire que l'ensemble des constituants de cette huile essentielle ne sensibilisent les staphylocoques qu'à des concentrations bien supérieures à celles de toutes les autres huiles essentielles testées. Cette huile essentielle devra donc être utilisée à des concentrations bien supérieures pour provoquer une inhibition de croissance bactérienne efficace en pratique thérapeutique.

#### II.2.2.4. Données de la littérature sur les concentrations inhibitrices

La CMI est une inhibition totale et la  $CI_{90}$  est une inhibition à 90 %, donc elles sont du même ordre de grandeur. Bien que nous n'ayons pas déterminé les CMI dans notre thèse, nous allons comparer nos valeurs avec les CMI trouvées dans la littérature (données en % v/v ou en mg/mL selon les sources) afin de déterminer si nos huiles essentielles sont aussi efficaces que d'autres huiles essentielles testées.

En ce qui concerne l'huile essentielle d'arbre à thé, nous trouvons des CMI sur *S. aureus* variant de 0,1 % [36] 0,25 % [192] à 0,5 % [82], [167], [193] voire 1,25 % (v/v) [112]. Notre valeur de  $CI_{90} = 0,32\%$  (v/v) = 2,9 mg/mL est donc tout-à-fait comparable aux CMI trouvées, l'écart de valeurs entre les données de la littérature étant important. Sur *S. epidermidis*, nous obtenons une  $CI_{90} = 0,39\%$  (v/v) = 3,5 mg/mL qui est comparable aux valeurs basses de CMI trouvées dans la littérature (0,45-1,25 % [112]). Sur d'autres bactéries Gram+ la  $CI_{90}$  est atteinte à 1,88 % donc à des valeurs supérieures à celles sur *S. aureus*, qui est donc plus sensible à cette huile essentielle que d'autres bactéries [33].

Par rapport à l'huile essentielle de cannelle de Ceylan, les CMI sur *S. aureus* vont de 0,025 % (v/v) [89] à 0,33 mg/mL [163]. Notre valeur sur *S. aureus* est  $CI_{90} = 0,039\%$  = 0,39 mg/mL. Nous sommes dans le même ordre de grandeur que les autres huiles essentielles, même si l'huile essentielle d'origine Sri Lanka semble plus intéressante de ce point de vue. L'explication pourrait être sa proportion en cinnamaldéhyde qui est légèrement supérieure à celle de notre huile essentielle. Sur des streptocoques les auteurs obtiennent 0,063 % [194] et sur divers Gram+ une  $CI_{90}$  de 0,16 % (v/v) [33] donc *S. aureus* est plus sensible à cette huile essentielle que ces autres bactéries. Sur *Listeria*, des salmonelles et *E.coli* la CMI est de 0,1 % (v/v) [26] ou 0,4 mg/mL sur *E.coli* [109], montrant une grande sensibilité bactérienne (avec un large spectre) qui n'est pas Gram-dépendante.

Concernant l'huile essentielle de ciste ladanifère, une huile essentielle d'origine Corse donne une CMI sur *S. aureus* de 0,2 mg/mL [30] donc fortement active (la nôtre est *a minima* dix fois moins active que celle-ci). Une étude sur les différentes fractions de molécules

actives montre que l' $\alpha$ -pinène est peu actif et que le camphène, le *para*-cymène, l'allo-aromadendrène et le lédène sont sans effet. Les fractions actives sont constituées des molécules oxygénées : le viridiflorol, le lédol (alcools sesquiterpéniques), et le *trans*-pinocarvéol (alcool monoterpénique), ainsi que le bornéol dans une moindre mesure. Il serait donc intéressant que des normes de Pharmacopée soient instaurées sur ces dernières molécules actives concernant cette huile essentielle, d'autant plus qu'au moins trois variétés de *Cistus ladaniferus* ont été recensées à ce jour (*var. albiflorus*,  $\beta$ -*maculatus* ou  $\gamma$ -*stenaphyllus*) même si le *maculatus* semble le plus utilisé [42].

Nous n'avons pas trouvé d'études sur l'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata*, l'*E.globulus* semblant plus étudié. Par contre, l'eucalyptol pur a une CMI de 0,70 mg/mL sur le *S. aureus* ATCC 6538p [189]. La valeur obtenue sur *S. epidermidis* est de  $CI_{90} = 0,26 \%$  (v/v) = 2,4 mg/mL, donc bien moins efficace que la principale molécule active seule sur *S. aureus*. Une étude sur *S. aureus* utilisant l'*E dives* montre des CMI de 0,04 à 0,43 % (v/v) selon la fraction d'huile essentielle utilisée : [185] certaines fractions isolées sont donc plus efficaces (notamment celle contenant la pipéritone). Une dernière étude sur l'huile essentielle des fruits d'*E.globulus* (aromadendrène 31 %, 1,8-cinéole 15 %, globulol 11%) se montre très efficace sur *S. pyogenes* avec une CMI de 0,06 mg/mL et sur un SARM, avec un effet synergique (1 % d'aromadendrène pour 99% de 1,8-cinéole) ou un effet additif (tous autres dosages) entre aromadendrène et 1,8-cinéole, montrant que des molécules en quantités extrêmement faibles (aromadendrène 1 % v/v) sont aussi capables d'influencer l'activité antibactérienne [195].

Les valeurs de CMI sur *S. aureus* pour la molécule d'eugénol trouvées dans la littérature sont bien plus faibles que notre valeur de  $CI_{90}$  du *totum* d'huile essentielle de clou de girofle : elles sont de 0,04 % (v/v) [36], 0,13 à 0,5 mg/mL [118], [163] alors que notre valeur est de  $CI_{90} = 0,17 \%$  (v/v) = 1,8 mg/mL. L'eugénol pur est donc plus efficace que notre *totum* d'huile essentielle de clou de girofle. L'observation d'autres huiles essentielles entières montrent les mêmes résultats : des CMI entre 0,05 % [89] (Madagascar, 78 % eugénol [196]) et 0,25 % (v/v) [93]. Malheureusement, seule une source détaille la composition ou l'origine géographique de leurs huiles essentielles, nous ne pouvons donc pas pousser la comparaison des résultats plus avant avec les autres. Cela dit, cette source utilise aussi une huile essentielle issue de Madagascar, mais la partie utilisée est la feuille et non le bouton floral séché : ainsi la composition est différente car si leur huile essentielle contient des proportions équivalentes d'eugénol, elle est dépourvue d'acétate d'eugényle. En se basant sur cette observation, nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence d'acétate d'eugényle soit préjudiciable à l'effet antibactérien de notre huile essentielle de clou de girofle. Une étude d'eugénol sur la bactérie Gram- *E.coli* donne une CMI de 1,6 mg/mL [109], une étude du *totum* d'huile essentielle sur des Gram+ donne une  $CI_{90}$  de 0,62 % (v/v) [33], et une troisième une CMI sur *Listeria*, salmonelles et *E.coli* < 0,1 % (v/v) [26] qui restent des dilutions similaires à la nôtre, nous faisant supposer que l'huile essentielle de clou de girofle ne possède pas une activité antibactérienne Gram-dépendante.

Nous n'avons pas trouvé d'études sur l'huile essentielle de marjolaine, niaouli et orange amère menée dans les mêmes conditions que nos tests, nous n'avons donc pas pu comparer les valeurs avec la littérature. Rappelons simplement que l'huile essentielle

d'orange amère est sensée être d'efficacité faible ou moyenne contre les staphylocoques blancs et dorés [13] contre lesquelles elle pourra être utilisée peu diluée. Nous avons trouvé une étude menée sur *Citrus limon* qui donne une CMI de 0,25 % (v/v) sur des streptocoques [194] ce qui est très efficace comparativement l'huile essentielle d'orange amère utilisée lors de nos tests.

La plupart des études montrent que l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'origan est perçu sous les 0,05 % (v/v) sur de nombreuses bactéries (*Listeria*, salmonelles et *E.coli* [26], [109]) dont *S. aureus* [105], montrant une action qui n'est pas Gram-dépendante. Même pour les huiles essentielles possédant très peu de thymol dans leur composition, nous obtenons 0,06 % (v/v) [83] mais certaines publications montrent des CMI de 0,05 à 0,12 % (v/v) [93] ou des  $CI_{90}$  jusqu'à 0,31% [33]. Notre  $CI_{90}$  est de 0,033 % = 0,3 mg/mL sur *S. aureus*, ce qui est dans le même ordre de grandeur que les huiles essentielles d'origan les plus efficaces. Une étude montre la même efficacité d'un *Thymus ct. carvacrol* sur des SARM avec des CMI de 0,03 % et 0,06 % (v/v) [2]. Des tests sur *S. aureus* montrent des CMI de thymol à 0,38 mg/mL et de carvacrol à 0,19 mg/mL [163] donc le *totum* d'huile essentielle possède une efficacité correspondant à la moyenne des deux molécules actives. Ceci est confirmé par une étude comparant le mélange [thymol + carvacrol] au *totum* d'huile essentielle, qui montre les mêmes valeurs sur *S. aureus* ATCC 6538p et donc qu'une nouvelle fois, seules ces molécules interviennent majoritairement dans l'efficacité antibactérienne [108]. Il est important que les proportions de carvacrol et de thymol soient le plus équilibrées possible car une huile essentielle étudiant un origan à 98 % de carvacrol montre une CMI de 1 mg/mL, ce qui est plus que notre valeur de  $CI_{90}$  [197]. Une autre étude montre que le *para*-cymène pur a une CMI plus élevée sur *S. aureus* ATCC 6538p (1,25mg/mL [95]) prouvant encore que l'effet exercé par le *para*-cymène dans le *totum* d'huile essentielle est inférieur à celui du thymol et du carvacrol. Le  $\gamma$ -terpinène pur possède une CMI de 2,5 mg/mL [95] ce qui montre sa moins grande efficacité que les phénols terpénoïdiques.

Les auteurs démontrent que les huiles essentielles de *Thymus* possèdent de faibles CMI sur *S. aureus*, en général entre 0,02 et 0,25 % (v/v) [89], [93] et montent rarement à 3,2 % (v/v) [36] ou 2 mg/mL [197]. Les sources montrent des résultats similaires sur *Listeria*, salmonelles et *E.coli* [26], [109], ainsi que sur streptocoques (CMI de 0,063 % v/v [194]) nous prouvant que l'efficacité de l'huile essentielle n'est pas Gram-dépendante. Une étude montre que le thymol pur possède une CMI de 0,31 mg/mL [95] ce qui est aussi tout-à-fait comparable à notre valeur de  $CI_{90}$  de 0,030 % = 0,28 mg/mL.

#### **II.2.2.5. Détermination des concentrations minimales bactéricides sur *S. aureus* sauvage**

Les stries sur géloses incubées montrent des croissances bactériennes différentes selon la dilution et l'huile essentielle testées. Nous présentons ci-dessous la photographie d'une gélose contenant les réensemencements des dilutions du témoin positif, qui montrent les différences de recroissance bactérienne selon la quantité de bactéries présente dans le

dépôt, appréciables à l'œil nu.

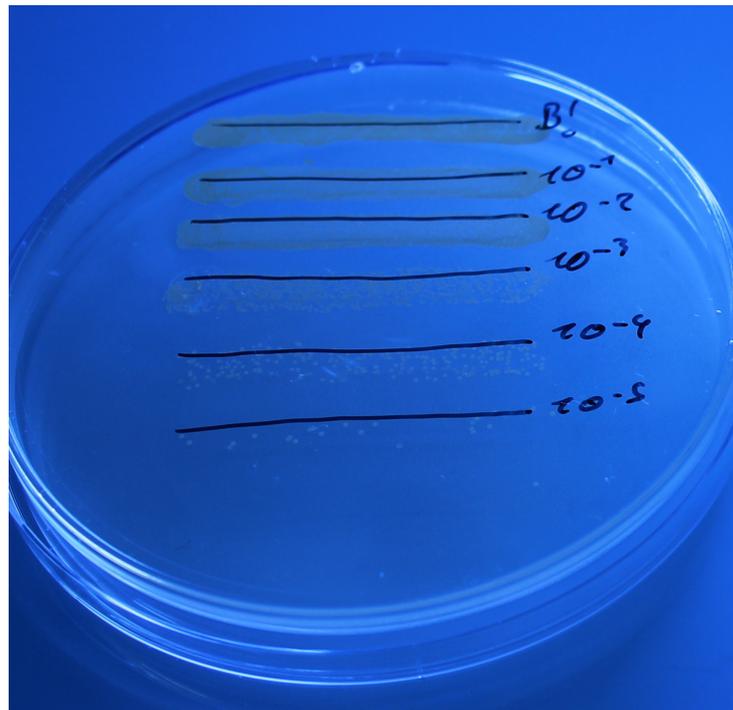


Illustration 35: Gélose des dilutions du témoin positif (B') réensemencées, après incubation

Nous n'avons pas réalisé les CMB sur les huiles essentielles à phénols terpénoïdiques par manque de temps. Seules quelques huiles essentielles ont pu être testées, et les valeurs de leurs CMB sont présentées sur le diagramme suivant :

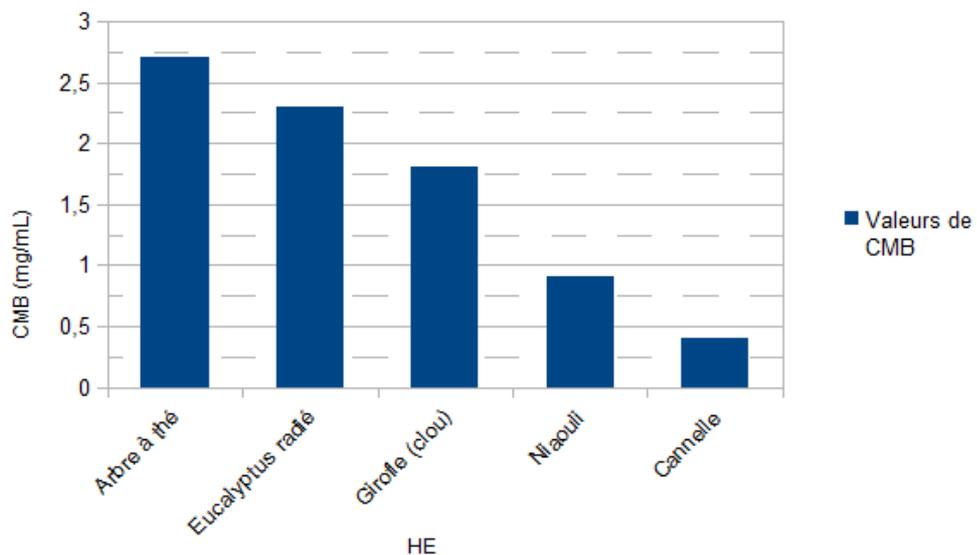


Illustration 36: Valeurs de concentrations minimales bactéricides déterminées sur *S. aureus* sauvage (mg/mL)

La croissance observée au repiquage sur milieu gélosé avec l'huile essentielle d'arbre à thé est bien inférieure à la dilution  $10^{-4}$  du témoin incubé sans huile essentielle, ce qui confirme l'effet bactéricide de cette huile essentielle à partir de cette concentration. La mesure de la CMB montre qu'une valeur de 0,3 % v/v = 2,7 mg/mL se révèle bactéricide. De plus, la  $CI_{90}$  de cette huile essentielle, et par conséquent sa CMI, sont du même ordre de grandeur que la CMB, ce qui signifie que l'activité globale de l'huile essentielle d'arbre à thé est vraisemblablement bactéricide sur les staphylocoques. La littérature sur *S. aureus* montre des CMB de l'ordre de 0,2 [36], 1 à 2 voire jusqu'à 4 % (v/v) [112] donc notre huile essentielle possède une activité antibactérienne modérée, comparable aux données de la littérature. Une étude rapporte une CMB de 0,025 % ce qui est extrêmement efficace pour l'huile essentielle d'arbre à thé. L'huile essentielle contient une quantité de terpinèn-4-ol similaire à celle de l'huile essentielle testée (40 %) mais une quantité plus faible de  $\gamma$ -terpinène : selon cette observation, nous pouvons émettre l'hypothèse que le  $\gamma$ -terpinène limite l'action du terpinèn-4-ol [49].

La CMB que nous obtenons avec l'huile essentielle de cannelle vaut 0,039 % = 0,40 mg/mL. Elle est du même ordre de grandeur que la  $CI_{90}$  et donc la CMI, ce qui nous permet encore de supposer de l'action bactéricide globale de cette huile essentielle sur les staphylocoques. La valeur de CMB de cette huile essentielle est la plus faible que nous avons pu tester. Une étude menée sur *C.cassia* (cinnamaldéhyde) révèle une CMB de 0,025 % (v/v) [49] ce qui est un peu plus bas que notre valeur. Cette huile essentielle contient plus de  $\delta$ -methoxy-cinnamaldéhyde que la nôtre : des études approfondies pourraient confirmer ou infirmer l'importance de son activité.

Pour l'eucalyptus radié, la CMB vaut 0,24 % (v/v) soit 2,2 mg/mL ce qui montre également qu'elle est du même ordre de grandeur que la  $CI_{90}$  et donc la CMI et suggérant encore qu'elle puisse être catégorisée comme bactéricide.

En ce qui concerne l'huile essentielle de girofle, les CMB s'élèvent à 0,16 % (v/v) = 1,6 mg/mL pour *S. epidermidis* (*data not shown*) et 0,17 % (v/v) = 1,7 mg/mL pour *S. aureus* sauvage. Les valeurs sont à nouveau du même ordre de grandeur que les  $CI_{90}$  et donc les CMI, signifiant que cette huile essentielle est aussi vraisemblablement bactéricide sur les staphylocoques. La littérature nous apprend que l'eugénol possède une CMB de 1,6 mg/mL sur *E.coli* [109] soit une valeur identique à leur CMI, de façon similaire à nos résultats. L'huile essentielle de girofle exercerait donc un effet bactéricide qui n'est pas Gram-dépendant. Une huile essentielle de girofle d'origine Inde montre une CMB et une CMI de 0,04 % sur *S. aureus*, ce qui signifie qu'elle est bactéricide à des concentrations bien moindres que la nôtre (sans doute par une différence de composition) [36].

Pour l'huile essentielle de niaouli, les valeurs de la CMB nous indiquent, comme pour les précédents tests, que la  $CI_{90}$  et donc la CMI sont du même ordre de grandeur que la CMB et donc que cette huile essentielle est vraisemblablement bactéricide. Nous noterons que les CMB sur *S. aureus* sauvage et *S. aureus* ATCC 6538p sont identiques (*data not shown* : CMB = 0,91 mg/mL sur *S. aureus* ATCC 6538p).



Pour l'origan, une référence utilisant une huile essentielle d'*Origanum vulgare* (57 % carvacrol, 11 % p-cymène, 7 %  $\gamma$ -terpinène et terpinène-4-ol, 4 % thymol) contre *S. aureus* donne une CMB de 0,12 % soit 2 fois sa CMI [83]. Nous n'avons pas mesuré la CMB de notre huile essentielle d'origan, mais à la vue de l'ensemble des résultats précédents et de ces données, si nous supposons que notre huile essentielle est bactéricide alors elle possède une CMB du même ordre de grandeur que la CMI, et donc que la  $CI_{90}$  mesurée. Dans ce cas, notre valeur de CMB serait bien inférieure à la valeur de cette étude. Leur huile essentielle possède moins de thymol, ce qui pourrait expliquer la CMB plus élevée. Nous pouvons appliquer le même procédé à notre huile essentielle de thym, cependant la CMB serait plus haute que celle d'une huile essentielle de thym blanc, qui montre une CMB de 0,003 % ce qui est extrêmement faible par rapport à nos résultats (il serait intéressant d'avoir la composition exacte de cette huile essentielle). Des tests menés avec du thymol et du carvacrol purs montrent une CMB de 0,8 mg/mL sur *E.coli*, qui serait donc plus sensible aux phénols que *S. aureus* [109].

La comparaison des valeurs de CMB des huiles essentielles de thym et d'origan supposées sont toujours les plus faibles que les CMB mesurées de la cannelle et du niaouli. La girofle arrive ensuite après un palier, puis l'eucalyptus radié devant l'arbre à thé. Toutes ces huiles essentielles possèdent vraisemblablement une activité globale bactéricide sur les staphylocoques. Les CMB de marjolaine, ciste ladanifère et orange amère n'ont pu être déterminées.

## II.2.3. Effets des mélanges d'huiles essentielles

### II.2.3.1. Aromatogrammes

Tableau 8: Valeurs des diamètres d'inhibition en milieu solide

Mélange d'huiles essentielles	Souche	Diamètre d'inhibition (mm)
thym - origan 1:1	<i>S. aureus</i> sauvage	52
arbre à thé - eucalyptus radié 1:1		Ø
girofle - niaouli 1:1		20

#### II.2.3.1.1. Mélange thym - origan 1:1

Nous avons étudié le mélange de thym et d'origan en proportions équivalentes sur *S. aureus* sauvage dans 10 % de DMSO afin de déterminer si le mélange d'huiles essentielles à constituants majoritairement phénolés apporte un effet synergique ou non à l'activité antibactérienne. Le diamètre d'inhibition est équivalent à celui du thym ou de l'origan seuls :

il n'y a aucun effet supplémentaire observé avec ce mélange par rapport aux huiles essentielles seules.

#### **II.2.3.1.2. Mélange arbre à thé - eucalyptus radié 1:1**

Le mélange arbre à thé et eucalyptus radié en proportions équivalentes sur *S. aureus sauvage* dans 10 % de DMSO va nous permettre de tester un mélange utilisé dans une étude australienne pour soigner diverses infections cutanées [198]. Aucune inhibition supplémentaire n'a pu être observée par rapport aux huiles essentielles seules, donc aucune synergie n'a été mise en évidence par cette technique. Ce résultat confirme les données de la littérature, qui ne montrent pas d'effet synergique entre les deux molécules majoritaires de ces huiles essentielles (terpinèn-4-ol et 1,8-cinéole) [33], [70].

#### **II.2.3.1.3. Mélange girofle - niaouli 1:1**

Nous allons tenter de déceler une synergie d'effets avec l'huile essentielle phénolée testée la moins active, soit l'huile essentielle de girofle. L'huile essentielle de niaouli ayant démontré une certaine efficacité dans les tests, nous allons les utiliser ici en proportions 1:1 dans 10 % de DMSO.

Nous obtenons les mêmes résultats que l'huile essentielle de girofle. Nous pouvons en déduire que ce sont les composants de cette huile essentielle qui sont observés majoritairement en milieu solide comme ayant une activité antibactérienne dans le mélange. Nous constatons cependant que nous obtenons une sensibilité similaire à la girofle pure pour des concentrations deux fois plus faibles d'eugénol dans le milieu. L'association ne semble donc pas antagoniste de ce point de vue, nous allons approfondir cette interaction dans les tests suivants.

#### **II.2.3.2. Détermination des valeurs de concentrations inhibitrices**

Les valeurs des CI mesurées dans les mélanges n'ont pas pu être converties en g/mL car nous ne connaissons pas les densités des mélanges. Elles restent en % v/v.

Tableau 9: Valeurs des concentrations inhibitrices des mélanges en milieu liquide

Huile essentielle	Souche	CI <sub>50</sub> (v/v)	CI <sub>90</sub> (v/v)	RI = CI <sub>90</sub> / CI <sub>50</sub>
arbre à thé - eucalyptus radié 1:1	<i>S. epidermidis</i>	1,9.10 <sup>-3</sup>	3,2.10 <sup>-3</sup>	1,68
cannelle - girofle 1:2	<i>S. aureus</i> sauvage	5,3.10 <sup>-4</sup>	7,8.10 <sup>-4</sup>	1,47
cannelle - girofle - niaouli 1:1:1	<i>S. aureus</i> sauvage	5,0.10 <sup>-4</sup>	6,7.10 <sup>-4</sup>	1,34

Les résultats peuvent se déterminer visuellement : une interaction synergique est décelée lorsque l'allure de la courbe du mélange arrive plus rapidement au *maximum* d'inhibition que celles des courbes de chaque composant seul. L'association est indifférente lorsque la courbe du mélange se superpose avec celle du plus efficace des deux composants et l'effet antagoniste s'exprime par la courbe du mélange arrivant plus lentement au maximum d'inhibition que celles des courbes des composés seuls.

#### II.2.3.2.1. Mélange des huiles essentielles d'arbre à thé et d'eucalyptus radié 1:1

En milieu liquide la gamme de dilution sur *S. epidermidis* nous donne (voir Annexe 2.2) :

- CI<sub>50</sub> = 0,19 % (v/v) ;
- CI<sub>90</sub> = 0,32 % (v/v).

Comparativement aux courbes d'arbre à thé et d'eucalyptus radié seuls, la courbe de leur mélange en proportions équivalentes peut elle aussi être amenée à subir une régression, avec un coefficient compris entre ceux des deux huiles essentielles pures utilisées pour le mélange. Nous voyons aussi que la valeur de cette courbe de CI<sub>50</sub> = 0,21 % se confond avec celle de l'arbre à thé, et sa CI<sub>90</sub> = 0,34 % s'approche davantage de l'arbre à thé que de l'eucalyptus radié. L'association peut donc être qualifiée comme étant additive entre ces deux huiles essentielles. Le RI est situé à la moyenne de ceux des deux courbes d'huiles essentielles seules, signifiant que la bactérie réagit de façon similaire au mélange et aux huiles essentielles seules.

Les publications scientifiques qui utilisent l'association de ces deux huiles essentielles ne semblent pas mettre en œuvre de relation synergique, mais l'association se fait peut-être dans le but d'étendre le spectre antibactérien. Le grand pourcentage de guérison avec l'utilisation combinée de ces huiles essentielles ne se justifie pas par leur activité *in vitro* sur *S. epidermidis*, mais peut-être est-ce le cas sur d'autres bactéries, ou bien ces huiles essentielles exercent certains effets *in vivo* qui permettent la guérison rapide de la plupart des infections cutanées, par exemple en interagissant avec les cellules cutanées ou immunitaires.

### II.2.3.2.2. Mélange des huiles essentielles de cannelle et de girofle 1:2

On se propose à présent d'étudier l'efficacité du mélange d'huile essentielle de cannelle 1/3 et de girofle 2/3 sur *S. aureus* sauvage, afin de déterminer si le mélange de deux huiles essentielles puissamment actives sur les bactéries, mais avec des molécules actives de classes différentes, agit en synergie ou non sur l'activité inhibitrice de la croissance bactérienne. L'huile essentielle de cannelle est testée en proportion 1/3 afin de comparer ensuite les résultats avec le mélange triple et parce qu'une proportion supérieure risquerait de donner des résultats trop similaires à la cannelle pure, raison pour laquelle les huiles essentielles phénolées de thym et d'origan n'ont pas été testées en mélange. La gamme de dilution réalisée nous donne (voir Annexe 2.1) :

- $CI_{50} = 0,053 \%$  (v/v) ;
- $CI_{90} = 0,078 \%$  (v/v).

Les courbes obtenues nous montrent que le mélange 1/3 cannelle - 2/3 girofle possède une action inhibitrice de la croissance bactérienne avec une efficacité comprise entre celles des deux huiles essentielles pures utilisées pour le créer (CI et RI intermédiaires par rapport aux valeurs des huiles essentielles seules). Cependant, le graphique illustre bien que l'efficacité du mélange se rapproche davantage de celle de la cannelle pure que de la girofle ( $CI_{90} = 0,078 \%$  proche de la valeur de l'huile essentielle de cannelle) ; ainsi, nous pouvons utiliser moins d'huile essentielle de cannelle, qui est bien plus dermocaustique, et obtenir une efficacité satisfaisante pour inhiber le développement bactérien. Nous voyons aussi que le mélange avec la girofle a créé une cassure de la courbe d'inhibition aux alentours de 0,06 %, qui donne à la courbe une allure de « rebond » mais la courbe garde globalement l'allure de celle de la cannelle. Nous remarquons donc que ce mélange peut être jugé très efficace au même titre que l'huile essentielle de niaouli en milieu liquide (ce mélange peut être un choix judicieux pour le traitement de *S. aureus*). Il serait intéressant de tester sa tolérance cutanée. La courbe du mélange se situant entre celle des deux constituants purs, l'effet obtenu est qualifié d'effet additif.

### II.2.3.2.3. Mélange des huiles essentielles de cannelle, girofle et niaouli 1:1:1

Nous tentons ici de réduire encore la dermocausticité et d'élargir le spectre antibactérien du mélange précédent en y ajoutant une troisième huile essentielle, ce qui à notre connaissance n'a été réalisé que de rares fois et très récemment dans une publication scientifique et qui représente sans doute ce vers quoi les tests de détermination d'huiles essentielles à propriétés antibactériennes tendront de plus en plus [199]. D'ailleurs, les plus célèbres aromatalogues se réfèrent souvent à l'idée qu'une association triple d'huiles essentielles lors d'un traitement est le plus sûr moyen de limiter l'apparition des résistances bactériennes, d'obtenir une guérison rapide tout en conservant une maîtrise de leurs interactions [54]. Voyons l'effet de ce mélange sur *S. aureus* sauvage grâce à la gamme de dilution (voir Annexe 2.3) :

- $CI_{50} = 0,05 \%$  (v/v) ;
- $CI_{90} = 0,067 \%$  (v/v).

D'après ce que nous pouvons voir de l'ensemble des courbes, l'efficacité du mélange triple

est rapidement établie, tout comme celle du mélange double ( $CI_{50} = 0,05 \%$ , avec un RI inférieur à celui du mélange double) et semble avoir un effet additif légèrement supérieur au mélange double : cela signifie que l'on peut mélanger les huiles essentielles de cannelle, girofle et niaouli en proportions égales sans risquer de réduire l'efficacité inhibitrice de la croissance bactérienne du mélange obtenu, et diminuer encore l'agressivité du mélange vis-à-vis de la peau, l'huile essentielle de niaouli étant la plupart du temps très bien tolérée à ce niveau. De plus, comme la cannelle a été introduite à la même dilution dans ce mélange et le précédent, nous pouvons comparer les deux en terme de proportion de molécules actives et estimer que c'est cette huile essentielle qui détermine l'activité globale du mélange. La courbe se situe aussi entre celles de la cannelle et les autres sur *S. aureus* sauvage (il l'est d'ailleurs plus efficace que le mélange cannelle - girofle vu précédemment) possédant toujours une grande capacité bactériostatique (là encore supérieure à celui du mélange précédent, et bien supérieur à la girofle) voire bactéricide ce qui reste à démontrer, avec une tolérance cutanée que l'on peut espérer améliorée et un spectre d'activité sans doute bien plus étendu qu'une huile essentielle phénolée pure.



## II.2.4. Discussion

La relation entre structure moléculaire et activité antibactérienne a été démontrée depuis longtemps pour les huiles essentielles, et se révèle extrêmement spécifique.

Aujourd'hui, l'étude *in vitro* de l'activité antibactérienne des huiles essentielles se fait de façon similaire à celle des antibiotiques, à savoir la détermination des concentrations inhibitrices à 50 et 90 %, la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide. Mais, alors qu'il existe des référentiels (abaques de lecture) pour les antibiotiques permettant une corrélation des données avec celles de l'*in vivo* en termes de quantité à administrer au patient par voie générale, il n'en existe aucun pour les huiles essentielles [18]. De ce fait, il n'est pas possible de vérifier si des concentrations jugées efficaces *in vitro* ne seraient pas nocives pour l'organisme à traiter *in vivo*, à savoir le patient. De plus, le traitement aromathérapique cutané est pensé à la fois pour la voie locale et pour la voie générale. Dans ces conditions, est-il possible d'exploiter ces données pour l'*in vivo* comme pour les antibiotiques (qui nécessite aussi des données pharmacocinétiques comme les paramètres d'administration en Annexe 4 [141]) et d'établir une balance bénéfique/risque propre à chaque huile essentielle ?

La transposition des différentes méthodes de détermination de l'activité antibactérienne d'une huile essentielle à partir des méthodes utilisées pour les antibiotiques nécessite de définir précisément certains facteurs. Ils sont connus en ce qui concerne les tests sur les antibiotiques mais pas ceux sur les huiles essentielles, et peuvent influencer sur les résultats d'un test de détermination de la sensibilité bactérienne. Ces variables sont : [3], [18], [26], [200]

- **la composition, le pH [120] et l'épaisseur milieu de culture.** Ainsi *S. aureus* et *S. epidermidis* sont moins inhibées par l'huile essentielle d'arbre à thé lorsque le pH dépasse 5,5 [201]. La valeur de la concentration minimale inhibitrice à pH<sub>5</sub> est trois fois plus faible qu'à pH<sub>7</sub>, pour le carvacrol, et deux fois plus faible pour le cinnamaldéhyde, sur *L.monocytogenes* [120]. Il est connu qu'une légère modification de sa composition peut changer les résultats du tout au tout puisque l'ajout de sang de mouton à du bouillon de Mueller-Hinton fait passer la concentration minimale inhibitrice de la flavomycine de 0,12 à 256 mg/L. [173]. C'est pour cette raison qu'il serait judicieux de créer un milieu de culture standardisé adapté afin de permettre la visualisation d'un halo d'inhibition pour toute huile essentielle antibactérienne, indépendamment de sa composition moléculaire ;
- **la phase de croissance du micro-organisme** (les bactéries étant naturellement moins sensibles aux substances en phase stationnaire qu'en phase exponentielle de croissance), **et le type de bactérie testée** [101] ;
- **la concentration bactérienne, le volume de l'inoculum et la procédure d'inoculation.** Ces étapes sont déterminantes pour obtenir un tapis bactérien homogène sans qu'il soit trop chargé ;
- **la quantité de substance testée, sa capacité de diffusion dans le milieu et sa volatilité** [173]. La quantité de substance doit être suffisante pour faire apparaître un halo d'inhibition

circulaire aux contours nets. La prise en compte de la volatilité dans notre protocole a été nécessaire pour mettre en évidence les halos, puisque les vapeurs contenant les molécules aromatiques antibactériennes des huiles essentielles se répartissent sur toute la surface de la gélose et inhibent entièrement le tapis bactérien. En ce qui concerne la diffusibilité dans le milieu gélosé, la transposition de l'expérimentation de l'antibiogramme en aromatochrome doit se faire en respectant les limites physicochimiques de ce test, c'est-à-dire ne tester que des composés polaires ou de petit et moyen poids moléculaire pouvant migrer convenablement à travers la gélose [202]. C'est heureusement le cas des molécules terpéniques et aromatiques actives contenues dans les huiles essentielles. Cependant, nos tests révèlent que le type de molécule contenue dans l'huile essentielle influe sur l'apparition ou non du halo d'inhibition, indépendamment de leur poids moléculaire. La capacité de diffusion dans le milieu gélosé reste donc la principale problématique, peu importe le type de test mené ;

- exclusivement au milieu solide : **le diamètre et le type de disque** [3], [200], [202], devraient être des données parfaitement établies, car elles conditionnent directement les diamètres d'inhibition obtenus ;
- **la température constante, l'atmosphère et le temps d'incubation** [196] ;
- **la technique utilisée pour la lecture des résultats**, qui doit permettre une mesure précise (au dixième de millimètres) du diamètre d'inhibition.

De nombreux auteurs ont remarqué les obstacles de la diffusion des composés lipophiles des huiles essentielles dans le milieu aqueux gélosé de Mueller-Hinton à la bonne interprétation des résultats [202]. Ils ont alors tenté d'utiliser des adjuvants de solubilisation, qui peuvent être des émulsifiants ou des solvants. Les plus souvent utilisés sont l'éthanol, le méthanol, l'éthylacétate, les Tween, les agars, l'acétone ou encore le diméthylsulfoxyde [4], [33], [35], [45], [108], [120], [158], [168], [171], [182], [203]. Cependant ils ne doivent pas être utilisés arbitrairement et doivent être nécessairement caractérisés par les propriétés suivantes : [33]

- **être inertes** : les adjuvants ne doivent être dotés d'aucun effet modulateur (stimulation ou inhibition) de la croissance bactérienne ni d'interaction physico-chimique avec l'huile essentielle (ni synergie, ni antagonisme, ni dénaturation). Cela ne joue pas en la faveur des émulsifiants cationiques (germicides) et des surfactants non-ioniques comme le Tween 21, le Tween 80 et le Span 20 qui agissent sur la croissance de certaines bactéries. L'éthanol est aussi un mauvais exemple (une solution alcoolique à 64 % est synergique avec l'huile essentielle d'arbre à thé sur de multiples bactéries). L'agar est une structure gélatineuse formant des réticules, empêchant toute migration de molécules de gros poids moléculaire et rendant aléatoire la migration de celles de faible poids moléculaire ;
- **être physico-chimiquement stables** : une fois de plus, les Tween peuvent entraîner certaines difficultés d'interprétation : leur stabilité est dépendante des proportions dans lesquelles ils sont apportés par rapport à l'huile essentielle, rendant les tests délicats à réaliser. Les adjuvants les plus stables sont l'éthanol et le diméthylsulfoxyde.

Malheureusement, ces substances (solvants ou détergents) ont aussi leurs limites : certaines peuvent réduire la valeur des résultats obtenus [93]. Une étude a montré de plus faibles concentrations minimales (inhibitrices et bactéricides) des huiles essentielles en l'absence d'adjuvants [204]. Cette inhibition du pouvoir antibactérien n'est pas aberrante

lorsqu'on sait que Cremieux et al. en 1981 recommandaient l'usage du Tween 80 dans la neutralisation des désinfectants phénoliques [93]. De plus, les huiles essentielles ont des degrés de diffusibilité dans l'agar qui sont très variables (ainsi que leur volatilité et leur solubilité) [39], [49]–[51]. Chaque adjuvant semblant posséder ses propres inconvénients, notre choix s'est porté sur l'étude du diméthylsulfoxyde, solvant polaire utilisé en laboratoire capable de solubiliser de nombreux composés chimiques et organiques. Nous avons utilisé des dilutions d'huiles essentielles 9:1 dans le DMSO pour la majeure partie des tests en milieu solide ce qui, d'après la bibliographie, s'approche de son rapport idéal de concentration dans un but d'adjuvant de solubilisation [203], [205], [206].

L'ensemble de ces éléments justifie de la nécessité à mettre en place un protocole standardisé pour les tests d'huiles essentielles en géloses et bouillons, comme c'est le cas pour les antibiotiques.

Nous avons sélectionné les huiles essentielles de cette thèse selon les données trouvées dans la bibliographie, mais également au regard de leur composition chimique :

- **les huiles essentielles constituées des molécules phénolées** les plus utilisées : l'huile essentielle de thym à thymol pour le thymol, l'huile essentielle d'origan pour le carvacrol, l'huile essentielle de clou de girofle pour l'eugénol ;
- **l'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan** pour sa richesse en cinnamaldéhyde ;
- **les huiles essentielles d'arbre à thé et de niaouli ainsi que l'eucalyptus radié**, tous trois composés de molécules alcooliques et terpéniques principalement, en proportions diverses ;
- **l'huile essentielle de ciste ladanifère**, afin de savoir si un éventuel pouvoir anti-infectieux vient compléter son activité cicatrisante des petites plaies et blessures ;
- **l'huile essentielle de marjolaine**, pour sa richesse en composés terpéniques ;
- **l'huile essentielle d'orange amère / petit grain bigaradier**, composé d'esters et d'alcools.

Pour certaines huiles essentielles comme celle de l'arbre à thé, nous observons une efficacité antibactérienne dose-dépendante, tout comme certains auteurs [36], [50], [56], [98]. Nous avons aussi pu observer ce phénomène pour l'huile essentielle d'eucalyptus radié. Ce phénomène ne s'observe pas pour toutes les huiles essentielles, et semble parfois dépendre de la bactérie testée. C'est le cas de l'huile essentielle de girofle, qui agit différemment sur *S. aureus* et *S. epidermidis*.

Des auteurs ont montré des différences de susceptibilité entre plusieurs espèces de staphylocoques : pour l'huile essentielle d'arbre à thé, les concentrations nécessaires à l'inhibition bactérienne sont plus élevées pour les staphylocoques coagulase- (saprophytes) que pour les staphylocoques coagulase+ (par exemple *S. aureus* résistant à la méticilline). 8 staphylocoques coagulase négative sont inhibés à des concentrations de 0,5 à 4 % (v/v) tandis que 28 *S. aureus* résistants à la méticilline le sont plutôt entre 0,25 et 0,5 % v/v) [207] : on a donc une sélectivité d'action sur les bactéries pathogènes dans une flore saprophyte, ce qui prouve que certaines huiles essentielles sont capables de réguler un écosystème bactérien. Ainsi, les huiles essentielles antibactériennes sont réputées agir en

respectant la flore saprophyte (intestinale, buccale, vaginale et cutanée) et certains auteurs vont jusqu'à leur attribuer une action bénéfique sur le système immunitaire. Ces critères les différencient des traitements antibiotiques classiques [41], [48]. Nos observations entre les *S. aureus* non-résistants aux antibiotiques et les *S. epidermidis* sont similaires, donc notre huile essentielle d'arbre à thé ne possède pas de sélectivité d'action basée sur une espèce de staphylocoques. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une éventuelle sélectivité d'action se ferait vis-à-vis de souches de staphylocoques résistants à certains antibiotiques.

Une huile essentielle est un ensemble de molécules, dont certaines exercent une activité antibactérienne. Il est nécessaire de connaître précisément le mode d'action des constituants d'une huile essentielle afin d'éviter les interactions moléculaires indésirables, et d'optimiser les combinaisons pour approcher de la dose la plus faible possible permettant de maintenir l'efficacité et l'innocuité du traitement [78], [121]. Ainsi, l'allyl-isothiocyanate est très efficace lorsqu'utilisé seul, mais le carvacrol le dépasse en efficacité en association avec d'autres huiles essentielles [163].

En règle générale, les effets des huiles essentielles dépendent beaucoup des variations de concentration de leurs molécules majoritaires [208]. Par exemple, l'association [thymol + carvacrol] possède une efficacité similaire à l'huile essentielle d'origan, principalement constituée de ces deux composés [99]. D'autre part, pour une même bactérie, les huiles essentielles d'origan et de girofle montrent des efficacités similaires à celles du thymol ou de l'eugénol [17].

Néanmoins, ce phénomène est dépendant de la composition de l'huile essentielle puisque de nombreuses études nous révèlent que certaines huiles essentielles possèdent une efficacité antibactérienne supérieure au mélange de ses actifs majoritaires : [93] ainsi, le 1,8-cinéole pur est moins actif que la même quantité d'huile essentielle d'eucalyptus à 70 % de 1,8-cinéole [203]. Ce phénomène peut être expliqué en considérant que l'activité des composants majoritaires soit modulée par celle des composants minoritaires et/ou qu'ils soient directement inefficaces mais pourraient modifier les propriétés du mélange [39], [129], [209]. Nous avons pu déduire dans cette thèse que l'activité des huiles essentielles à 1,8-cinéole (niaouli et eucalyptus radié) était modulée par leurs constituants minoritaires. Pour toutes ces raisons, l'étude du *totum* de l'huile essentielle sera plus révélatrice de sa valeur effective [39], [41], [71]. Tout comme pour les antibiotiques, nous pouvons extrapoler les notions d'effet synergique, additif, indifférent et antagoniste aux réactions qu'adoptent les composés d'huiles essentielles entre-eux. L'étude de ces effets permet d'éviter l'association d'huiles essentielles dont les composants antibactériens seraient antagonistes. Mais une fois de plus, aucune méthode standardisée pour évaluer ou quantifier les interactions entre huiles essentielles ou entre composés d'huiles essentielles, rendant les études difficiles à comparer [109], [129].

L'utilisation de multiples molécules à différents modes d'action a prouvé son efficacité supérieure si l'interaction entre les molécules est synergique [210]. C'est le cas du 1,8-cinéole et de l' $\alpha$ -pinène [136], résultat que l'on retrouve avec nos tests sur les huiles essentielles de niaouli et d'eucalyptus radié et qui expliquerait la plus grande activité du



niaouli par rapport à l'eucalyptus radié. Le carvacrol et le thymol possèdent un effet additif entre-eux sur *S. aureus* [99], mais sont aussi d'effet additif avec le linalol, les trois molécules se retrouvant dans la plupart des huiles essentielles de thym [211] (de 3 à 6,5 % de linalol dans la nôtre). Les mélanges d'huiles essentielles d'origan et de thym montrent une efficacité supérieure à celle de ces deux huiles essentielles séparément sur *Listeria monocytogenes*, *E.coli*, et *P.aeruginosa* [121]. Là encore, nos tests en milieu solide n'ont pas démontré de modulation de l'effet antibactérien avec une telle association sur *S. aureus*. La synergie ou l'effet additif entre les trois molécules d'eugénol, de carvacrol et de thymol (tous mélanges confondus) ont aussi été démontrés sur ces trois bactéries [134].

Une nouvelle fois, la constance d'une synergie ne semble pas se retrouver d'une bactérie à l'autre [71]. De plus, l'étude des molécules de thymol, carvacrol, eugénol et du cinnamaldéhyde sur des streptocoques de pathologies buccales montre que [thymol + carvacrol], [thymol + eugénol] et [carvacrol + eugénol] sont des mélanges synergiques, mais pas [cinnamaldéhyde + carvacrol OU + eugénol] [212], ce que confirme notre test : l'association d'huiles essentielles de cannelle + girofle, correspondant en majeure partie à l'effet de l'association [cinnamaldéhyde + eugénol], ne donne pas d'interaction synergique dans nos tests sur *S. aureus*. L'étude de bactéries pathogènes alimentaires montre que des taux plus faibles d'eugénol sont synergiques avec le cinnamaldéhyde et le carvacrol (dilution d'eugénol à 1:4 voire 1:8), tandis que le thymol et le carvacrol sont synergiques avec le cinnamaldéhyde à des dilutions équivalentes, et le thymol l'est avec le carvacrol aux dilutions de 1:1 et 2:1 [109], [213], [214]. Il serait intéressant de retester nos mélanges d'huile essentielle de clou de girofle à des dilutions plus basses pour déceler un éventuel effet à ces dilutions.

Des effets antagonistes ont été explicités entre composés actifs et composés non-oxygénés : ces derniers réduisent leur solubilité et donc leur efficacité. C'est de cette façon que le terpinèn-4-ol voit sa solubilité et son efficacité réduites par des hydrocarbures monoterpéniques comme le  $\gamma$ -terpinène et le *para*-cymène [192], ce que nous avons conclu pour l'huile essentielle d'arbre à thé. L'huile essentielle d'*Eucalyptus sp.* et de clou de girofle ont montré un effet antagoniste sur *S. aureus* [71]. Nous comprenons qu'un traitement par une grande diversité de composants simultanément n'est pas garant de l'efficacité d'un traitement par les huiles essentielles, car il est impossible de maîtriser l'ensemble des interactions qui y siègent. Pourtant, les mélanges avec pléthore d'huiles essentielles proposés par des laboratoires sont légion. L'un d'eux est fabriqué à partir de 41 huiles essentielles : certes, son spectre d'action est large mais il existe une très grande variabilité de la susceptibilité des souches testées et il n'est pas possible de prévoir ses effets antibactériens [1].

La synergie des huiles essentielles est un sujet complexe qui nécessitera encore de longues années d'observations et de tests pour être maîtrisé. De nouvelles interactions sont décelées régulièrement.

Nous avons évoqué en introduction l'utilisation des huiles essentielles comme alternative aux antibiotiques, afin de réduire les phénomènes de résistance bactériens. Cependant, la résistance bactérienne aux huiles essentielles a déjà été observée [13] car

elles n'ont jamais été exploitées à si grande échelle, contrairement à l'Antiquité où elles étaient beaucoup moins exploitées et sont restées efficaces [13]. Le risque de voir émerger ce phénomène à grande échelle est donc décuplé [52], d'autant que certains scientifiques s'inquiètent de l'utilisation des huiles essentielles en cosmétologie à des concentrations sub-inhibitrices (2 à 5 %) [33], qui sont des conditions propices au développement de ce que l'on pourrait nommer par néologisme l'« aromarésistance » bactérienne.

Des auteurs ont observé ce phénomène de résistance avec certaines bactéries, dont *S. aureus* [166], [215]–[217]. Nous observons que, de façon générale, la résistance aux huiles essentielles apparaît moindre que pour les antibiotiques, ce qui serait dû à la pluralité des constituants et des différents mécanismes d'action antibactériens des huiles essentielles.

Des tests approfondis sur l'huile essentielle d'arbre à thé montrent une corrélation entre l'expression de certains phénotypes bactériens et une certaine résistance à cette huile essentielle [124], [184], [218]. Cette observation peut être rapprochée à la résistance de certains phénotypes bactériens à des antibiotiques. Des tests approfondis permettraient d'obtenir des renseignements sur le mode d'action et la résistance génétique spécifique à cette huile essentielle ainsi qu'à ses autres *cf.*, en comparaison avec les résistances connues aux antibiotiques [33].

Pour toutes les raisons décrites dans les précédentes parties, nous voyons qu'il est indispensable de déterminer quel mécanisme de résistance pourrait suivre l'administration de telle huile essentielle, afin d'éviter les fautes thérapeutiques et de se retrouver démuni face à la survenue de nouvelles résistances bactériennes [52].

Les antibiotiques et huiles essentielles utilisés en association sont une stratégie thérapeutique efficace, à la fois pour la lutte antistaphylococcique et pour la lutte contre l'antibiorésistance bactérienne, à condition que les associations soient choisies spécifiquement en fonction du germe pathogène, de l'antibiotique utilisé et de l'huile essentielle qui y est associée. Les antibiotiques et les huiles essentielles agissant tous les deux sur les membranes, il faut suggérer que l'antibiotique soit le premier mis en contact avec la bactérie, afin d'éviter un éventuel effet inhibiteur de l'antibiotique par l'huile essentielle par compétition sur les cibles cellulaires [39].

## Conclusion

---

L'aromathérapie est pluridisciplinaire et, plus que simple médecine allopathique, s'inscrit aussi dans les domaines de la psychoneuroendocrinologie, de l'aromachologie et de l'olfactothérapie, qui étudient l'effet des odeurs et de l'inhalation d'une huile essentielle sur la stimulation cérébrale : le psychisme (cerveau émotionnel et instinctif) ainsi que la libération de neuromédiateurs comme la sérotonine, les endorphines et la noradrénaline. Des effets sur l'humeur, l'anxiété, le stress et le système immunitaire peuvent en résulter [219], [220], ouvrant la voie à de nouvelles recherches dans le domaine de l'aromathérapie.

La définition de la Pharmacopée européenne reste centrée sur les modes d'obtention traditionnels d'une huile essentielle. Elle ne prend pas en compte les critères nécessaires à leur utilisation thérapeutique, ni les avancées scientifiques sur le développement de nouveaux modes d'extraction de constituants à partir d'organes de plantes. De plus, nous savons qu'une huile essentielle est un ensemble de substances lipophiles, mais n'est pas constituée d'acides gras végétaux. Nous pouvons nous demander pourquoi cette étymologie d'« huile » essentielle a été conservée. Le terme « essentiel » nous rapportant aux principes actifs constitutifs de la plante, composés organiques inflammables, volatils et aromatiques issus en général d'une distillation, les huiles essentielles porteraient mieux le nom d'éthers plutôt qu'huiles, ainsi que le mentionne le nom latin qui leur est octroyé par la Pharmacopée : *aetherolea*, les « éthers huileux » [44], [221]. Ici, l'adjectif « huileux » fait référence aux propriétés lipophiles des constituants d'huiles essentielles et non au corps gras. D'après l'ensemble des éléments rappelés dans cette thèse, mon avis personnel est en faveur d'une réévaluation de la définition actuelle des huiles essentielles, et qu'il serait plus approprié de les nommer « éthers essentiels ».

Les huiles essentielles peuvent se révéler très utiles dans la pratique thérapeutique quotidienne. Nous avons montré qu'une huile essentielle de qualité certifiée et de traçabilité assurée était capable d'exercer une activité antibactérienne, qu'elle soit seule ou en association, et peut être incluse dans une prise en charge pluri-thérapeutique du patient dans des conditions bien déterminées. Les huiles essentielles de qualité certifiée présentent un intérêt certain dans la prise en charge des infections cutanées, qu'elles soient seules, en mélange ou en association avec un antibiotique. Le pouvoir bactériostatique et/ou bactéricide des huiles essentielles est important. Il serait dommage de se priver de leurs bienfaits, d'autant qu'elles ont d'autres atouts si elles ne sont pas bactéricides ou si elles sont utilisées à des doses sub-inhibitrices, comme le ralentissement du métabolisme ou l'inhibition de certaines fonctions physiologiques des micro-organismes (facteurs de virulence, production de toxines, mobilité, biofilm, réplication) réduisant la pathogénicité de la bactérie qui sera identifiée et éliminée plus facilement par le système immunitaire du patient.

Les expérimentations réalisées pendant cette thèse nous permettent de dire que les huiles essentielles à phénols terpénoïdiques (l'huile essentielle d'origan compact et celle de thym *cf.* thymol), celles contenant une grande proportion de cinnamaldéhyde (l'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan) et l'huile essentielle de niaouli sont celles auxquelles les staphylocoques testés sont le plus sensibles. L'activité antibactérienne se

manifeste à plus faibles concentrations. L'huile essentielle de clou de girofle possède une efficacité spécifique de type « tout-ou-rien » sur *S. epidermidis* mais pas sur *S. aureus*, ce qui montre que les huiles essentielles peuvent agir différemment sur des genres bactériens divers. Les huiles essentielles d'arbre à thé et d'eucalyptus ont montré leur effet concentration-dépendant. Les huiles essentielles de niaouli et d'eucalyptus radié, ainsi que de marjolaine et d'arbre à thé, nous ont révélé l'importance des constituants minoritaires présents dans les huiles essentielles. Enfin, les huiles essentielles de ciste et d'orange amère montrent un pouvoir antibactérien beaucoup plus faible. La détermination des CMB de certaines de ces huiles essentielles a pu mettre en évidence leur probable activité bactéricide sur les staphylocoques.

Cependant, les huiles essentielles (surtout les phénolées) présentent certains désavantages : elles peuvent être très irritantes pour la peau et requièrent donc de nombreuses précautions d'emploi. En usage interne ou au long cours également, elles peuvent aussi se révéler néfastes par diverses toxicités organiques. Une des solutions possibles proposée dans cette thèse est d'étudier davantage les associations d'huiles essentielles afin de réduire la quantité d'huile essentielle dermocaustique nécessaire à l'activité sans altérer la qualité de l'inhibition bactérienne. Pour cela, nous avons testé des associations d'huiles essentielles phénolées (girofle) et non-phénolées (cannelle, puis niaouli + cannelle) afin d'observer les modulations de l'activité antibactérienne *in vitro*. Nous avons alors trouvé une association triple efficace sur les staphylocoques, constituée de cannelle, girofle et niaouli en proportions équivalentes, et dont les interactions ne sont pas antagonistes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette association pourrait élargir le spectre antibactérien d'un traitement aromathérapique et limiter la survenue de résistances au traitement. Des études *in vivo* permettrait de statuer sur les propriétés de ce mélange et sur sa tolérance cutanée.

L'association d'huile essentielle d'arbre à thé et d'eucalyptus nous a permis de tester une association d'huile essentielle trouvée dans la littérature, mais l'interaction entre ces huiles essentielles ne révèle pas de synergie, donc le grand nombre de cas pathologiques soigné par cette association ne se justifie pas du point de vue de l'augmentation de l'activité antibactérienne du mélange. Les facteurs de l'*in vivo* entrent sans doute en compte, comme un élargissement du spectre d'activité ou un effet sur le tissu cutané permettant une guérison facilitée, qui démontrent la limite de ces tests *in vitro*.

En conclusion, l'aromathérapie est un domaine complexe et encore trop peu exploité, délimité par une législation sujette à controverse. Des possibilités thérapeutiques s'offrent à ceux qui les recherchent, mais ils vont comme toujours de pair avec des effets indésirables qui doivent être davantage étudiés afin d'obtenir un rapport bénéfice/risque parfaitement déterminé. Pour faciliter la comparaison des données de la littérature, les études menées devraient mieux renseigner la traçabilité complète et la composition des huiles essentielles qu'elles testent.

## Références bibliographiques et sitographiques

- [1] M. Aouni, F. Pelen, et R. Soulimani, « Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application », *Phytothérapie*, vol. 11, n° 4, p. 225-236, juill. 2013.
- [2] MACCHI, « Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* Poiret. d'origine algérienne sur *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline », *MACCHI*, 18-sept-2013. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.macchiuniv.com/article-composition-chimique-et-activite-antibacterienne-de-l-huile-essentielle-de-thymus-numidicus-poiret-119829284.html>. [Consulté le: 20-sept-2016].
- [3] M. Montevecchi, A. Dorigo, M. Cricca, et L. Checchi, « Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test », *New Microbiol.*, vol. 36, n° 3, p. 289-302, juill. 2013.
- [4] J. E. Amri, K. Elbadaoui, T. Zair, H. Bouharb, S. Chakir, et T. I. Alaoui, « Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silene vulgaris* sur différentes souches testées », *ResearchGate*, vol. 82, n° 1, p. 7481, déc. 2014.
- [5] [s.n.], « HMPC - Monographies communautaires de plantes », *AFMPS*, 15-mars-2016. [En ligne]. Disponible sur: [http://www.fagg-afmps.be/fr/humain/medicaments/medicaments\\_a\\_base\\_de\\_plantes/procedures\\_damm/hmpc\\_monographies](http://www.fagg-afmps.be/fr/humain/medicaments/medicaments_a_base_de_plantes/procedures_damm/hmpc_monographies). [Consulté le: 22-sept-2017].
- [6] T. J. Karpanen, T. Worthington, E. R. Hendry, B. R. Conway, et P. A. Lambert, « Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis* », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 62, n° 5, p. 1031-1036, janv. 2008.
- [7] [s.n.], « Streptocoque du groupe A », *CNR-Strep*, 2011. [En ligne]. Disponible sur: <https://cnr-strep.fr/index.php/infections-a-streptocoque/infection-a-streptocoque-du-groupe-a>. [Consulté le: 10-janv-2017].
- [8] [s.n.], « Staphylocoque », *Institut Pasteur*, 08-juin-2016. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>. [Consulté le: 11-janv-2017].
- [9] [s.n.], « Prévalence : les enquêtes du Cclin Sud-Ouest », *CPIAS Nouvelle Aquitaine*, 2017. .
- [10] [s.n.], « Formation au conseil en dermatologie du pharmacien – Club pharmaweb – Pierre Fabre », [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.clubpharmaweb.com/front/fr>. [Consulté le: 03-nov-2017].
- [11] J. Dubois et M. Demelin, *La peau: de la santé à la beauté : notions de dermatologie et de dermocosmétologie*. Toulouse, France: Privat, 2007.
- [12] A. de la santé publique du C. Gouvernement du Canada, « *Staphylococcus aureus* - Fiches techniques santé-sécurité: agents pathogènes - Agence de la santé publique du Canada », *Agence de la santé publique du Canada*, 30-avr-2012. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/staphylococcus-aureus-fra.php>. [Consulté le: 11-janv-2017].
- [13] P. Belaiche, *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Paris, France: Maloine, 1979.
- [14] [s.n.], « CPIAS Nouvelle-Aquitaine lutte contre les infections nosocomiales », *CPIAS Nouvelle Aquitaine*, 2017. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.cpias-nouvelle-aquitaine.fr/>. [Consulté le: 12-oct-2017].
- [15] D. Farhat S., P. Gauri, et J. Mamta, « A Study of Antibacterial Effect of Some Selected Essential Oils and Medicinal Herbs Against Acne Causing Bacteria », *IJPSI*, vol. 2, n°



- 1, p. 27-34, janv. 2013.
- [16] A. de la santé publique du C. Gouvernement du Canada, « *Streptococcus pyogenes* - Fiches techniques santé-sécurité: agents pathogènes », *Agence de la santé publique du Canada*, 26-sept-2001. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/strep-pyogenes-fra.php>. [Consulté le: 11-janv-2017].
- [17] K. Rhayour, « Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* », juill. 2002.
- [18] M. B. Coyle, « Antimicrobial Susceptibility Testing Manual », ASM, 2005. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.asm.org/index.php/34-international/asm-meetings-and-conferences/274-antimicrobial-susceptibility-testing-manual>. [Consulté le: 08-nov-2017].
- [19] P. M. Blumberg et J. L. Strominger, « Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. », *Bacteriol. Rev.*, vol. 38, n° 3, p. 291-335, sept. 1974.
- [20] B. D. Davis, « Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. », *Microbiol. Rev.*, vol. 51, n° 3, p. 341-350, sept. 1987.
- [21] [s.n.], « Santé publique France - InVS / Accueil », *Santé Publique France*, 2011. [En ligne]. Disponible sur: <http://invs.santepubliquefrance.fr/>. [Consulté le: 15-sept-2017].
- [22] S. Hemaiswarya, A. K. Kruthiventi, et M. Doble, « Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases », *Phytomedicine*, vol. 15, n° 8, p. 639-652, août 2008.
- [23] H. Nikaido, « Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux », *Science*, vol. 264, n° 5157, p. 382-388, avr. 1994.
- [24] [s.n.], « Campus Necker - Paris V », *Necker*, [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.necker.fr/>. [Consulté le: 10-nov-2017].
- [25] D. Hogan et R. Kolter, « Why are bacteria refractory to antimicrobials? », *ResearchGate*, nov. 2002.
- [26] H. Mith, R. Duré, V. Delcenserie, A. Zhiri, G. Daube, et A. Clinquart, « Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria », *Food Sci. Nutr.*, vol. 2, n° 4, p. 403-416, juill. 2014.
- [27] P. Huovinen, « Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole », *ResearchGate*, juill. 2001.
- [28] [s.n.], « Multirésistance aux antibiotiques : pourquoi les bactéries sont si efficaces », *Institut Pasteur*, [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/documents-presse/multiresistance-aux-antibiotiques-pourquoi-les-bacteries-sont-si-efficaces>. [Consulté le: 19-sept-2016].
- [29] E. Guerin *et al.*, « The SOS response controls integron recombination », *Science*, vol. 324, n° 5930, p. 1034, mai 2009.
- [30] E. Guinoiseau, « Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action », phdthesis, Université de Corse, 2010.
- [31] International Congress of Chemotherapy, W. Siegenthaler, et R. Lüthy, *Current chemotherapy: proceedings of the 10th International Congress of Chemotherapy, Zurich/Switzerland, 18-23 September 1977*. Washington: American Society for Microbiology, 1978.
- [32] É. Denes et N. Hidri, « Synergie et antagonisme en antibiothérapie », *Antibiotiques*, vol. 11, n° 2, p. 106-115, mai 2009.
- [33] L. Mayaud, « Etude de l'activité antimicrobienne de 13 huiles essentielles par des techniques de microbiologie », Thèse d'exercice, Université Claude Bernard, Lyon,

- France, 2006.
- [34] S. Shetty, B. Thomas, V. Shetty, R. Bhandary, et R. M. Shetty, « An *in-vitro* evaluation of the efficacy of garlic extract as an antimicrobial agent on periodontal pathogens: A microbiological study », *Ayu*, vol. 34, n° 4, p. 445-451, 2013.
- [35] S. de Rapper, G. Kamatou, A. Viljoen, et S. van Vuuren, « The *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Other Aromatherapeutic Oils », *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM*, vol. 2013, 2013.
- [36] N. Thosar, S. Basak, R. N. Bahadure, et M. Rajurkar, « Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An *in vitro* study », *Eur. J. Dent.*, vol. 7, n° Suppl 1, p. S71-S77, sept. 2013.
- [37] M. Faucon, *Aromathérapie: pratique et usuelle*. Paris, France: Sang de la terre, 2009.
- [38] A. Dussart, « Affections dermatologiques: traitements en phytothérapie et aromathérapie », Thèse d'exercice, Université de Bourgogne, France, 2015.
- [39] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, et M. Idaomar, « Biological effects of essential oils – A review », *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, n° 2, p. 446-475, févr. 2008.
- [40] N. Bousbia, « Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires », Thèse de doctorat, École doctorale 536 « Sciences et agrosociétés », Avignon, France, 2011.
- [41] S. Schieber, « Les huiles essentielles en milieu hospitalier: application dans le service de soins intensifs hématologiques de l'hôpital Pasteur de Colmar », Thèse d'exercice, Université de Strasbourg, 2009-....., France, 2013.
- [42] X. Fernandez, F. Chemat, T. K. T. Do, E. Carénini, S. Monneyron, et P. Bénard, *Les huiles essentielles: vertus et applications*. Paris, France: Vuibert, impr. 2012, 2012.
- [43] A. Carpentier, « Acadpharm, Le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie », *Académie nationale de Pharmacie*, [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Acadpharm:Accueil>. [Consulté le: 24-sept-2017].
- [44] [s.n.], « Pharmacopée Européenne en ligne », 2017. [En ligne]. Disponible sur: <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>. [Consulté le: 30-mars-2017].
- [45] M. Sienkiewicz, M. Łysakowska, M. Pastuszka, W. Bienias, et E. Kowalczyk, « The Potential of Use Basil and Rosemary Essential Oils as Effective Antibacterial Agents », *Molecules*, vol. 18, n° 8, p. 9334-9351, août 2013.
- [46] L. E. Homer, D. N. Leach, D. Lea, L. S. Lee, R. J. Henry, et P. R. Baverstock, « Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) », *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 28, n° 4, p. 367-382, 2000.
- [47] G. Avril, *La santé naturelle avec les huiles essentielles: 43 huiles essentielles, 200 pathologies*. Mens, France: Terre vivante, DL 2013, 2013.
- [48] D. Baudoux, *L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles*. Biarritz, France: Atlantica, 2000.
- [49] A. D. B. Melo *et al.*, « Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives », *Can. J. Vet. Res.*, vol. 79, n° 4, p. 285-289, oct. 2015.
- [50] F. Ocheng *et al.*, « Essential Oils from Ugandan Aromatic Medicinal Plants: Chemical Composition and Growth Inhibitory Effects on Oral Pathogens », *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM*, vol. 2015, 2015.
- [51] G. Carmen et G. Hancu, « Antimicrobial and Antifungal Activity of *Pelargonium roseum* Essential Oils », *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 4, n° Suppl 2, p. 511-514, déc. 2014.
- [52] W. T. Langeveld, E. J. A. Veldhuizen, et S. A. Burt, « Synergy between essential oil components and antibiotics: a review », *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 40, n° 1, p. 76-94, févr. 2014.



- [53] [s.n.], « Dossier technique huiles essentielles ». Ladrôme, sept-2014.
- [54] P. Franchomme, R. Jollois, D. Pénéol, et J. Mars, *L'aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles: fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle*. Limoges (51 rue Montmailler), France: Roger Jollois, 2001.
- [55] T. Folliard, *Le petit Larousse des huiles essentielles*. Paris, France: Larousse, impr. 2014, 2014.
- [56] A.-C. DEGRYSE, I. DELPLA, M.-A. VOINIER, et Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique. (E.H.E.S.P.). Rennes. FRA / com., « Risques et bénéfices possibles des Huiles Essentielles. », 2008.
- [57] T. Robert, « Huiles essentielles et antibiotiques: alternative et complémentarité », Thèse d'exercice, Université de Montpellier. UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques, 2015, France, 2015.
- [58] X. Fernandez, F. Chemat, et S. Antoniotti, Éd., *La chimie des huiles essentielles: tradition et innovation*. Paris, France: Vuibert, DL 2012, 2012.
- [59] [s.n.], « Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles - Comptes Rendus », *Etudier*, mai-2008. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.etudier.com/dissertations/Recommandations-Relatives-Aux-Crit%c3%a8res-De-Qualit%c3%a9/294607.html>. [Consulté le: 10-nov-2017].
- [60] S. Barbelet, « Le Giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle », Université de Lorraine, Nancy, 2015.
- [61] [s.n.], « Pharmacopée française - Plan / Préambule /index - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé », 07-2017. [En ligne]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Plan-Preambule-index>. [Consulté le: 27-août-2017].
- [62] [s.n.], « Ecocert France - Organisme de contrôle et de certification », *Ecocert France*, [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ecocert.fr/>. [Consulté le: 04-avr-2017].
- [63] [s.n.], « Les organismes certificateurs - Agence Française pour le Développement et la Promotion de l'Agriculture Biologique », *Agence BIO*, [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.agencebio.org/les-organismes-certificateurs>. [Consulté le: 13-nov-2017].
- [64] [s.n.], « Les garanties de la bio - Agence Française pour le Développement et la Promotion de l'Agriculture Biologique - Agence BIO », *Agence BIO*, [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.agencebio.org/les-garanties-de-la-bio>. [Consulté le: 04-avr-2017].
- [65] [s.n.], « Nos engagements qualité », *Phytosun arômes*, [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.phytosunaroms.com/nos-engagements-qualit%C3%A9>. [Consulté le: 04-avr-2017].
- [66] [s.n.], « Pranarôm | Les huiles essentielles », 2017. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.pranarom.com/fr/aromatherapie-scientifique/les-huiles-essentielles>. [Consulté le: 04-avr-2017].
- [67] [s.n.], « Tout savoir sur les huiles essentielles », *Le blog EONA*, 09-mars-2015. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.eona-lab.com/blog/tout-savoir-sur-les-huiles-essentielles/>. [Consulté le: 05-avr-2017].
- [68] P. Mailhebiau, « E.O.B.B.D. quality-assurance », *Aromanet*, 2016. [En ligne]. Disponible sur: <http://aromanet.com/identification-huile-essentielle-controle-qualite/eobbd-quality-assurance/>. [Consulté le: 05-avr-2017].
- [69] [s.n.], « La charte exclusive QBI® », *Osmobiose*, 2014. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.osmobiose.com/la-charte-QBI/>. [Consulté le: 05-avr-2017].
- [70] I. A. Southwell, A. J. Hayes, J. Markham, et D. N. Leach, « The search for optimally bioactive australian tea tree oil », *Acta Hort.*, n° 344, p. 256-265, nov. 1993.



- [71] S. Boubrit et N. Boussad, « Memoire Online - Détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. - Souhila Boubrit et Nafaa Boussad », *Memoire Online*, 2007. [En ligne]. Disponible sur: [http://www.memoireonline.com/10/11/4897/m\\_Determination-in-vitro--du-pouvoir-antibacterien-des-huiles-essentielles-deucalyptus-myrte-5.html](http://www.memoireonline.com/10/11/4897/m_Determination-in-vitro--du-pouvoir-antibacterien-des-huiles-essentielles-deucalyptus-myrte-5.html). [Consulté le: 19-sept-2016].
- [72] [s.n.], *Code de la santé publique - Article L4211-1*, vol. L4211-1. .
- [73] [s.n.], *Code de la santé publique - Article D4211-13*, vol. D4211-13. .
- [74] [s.n.], *Arrêté du 28 juillet 2016 relatif à la création du comité technique placé auprès du directeur général de l'Agence nationale de santé publique*. .
- [75] [s.n.], « Allergenic Substances | Unitis », *UNITIS*, avr-2017. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.unitis.org/en/allergenic-substances,208.html>. [Consulté le: 05-avr-2017].
- [76] G. S. Fraenkel, « The Reason d'Être of Secondary Plant Substances », *Science*, vol. 129, n° 3361, p. 1466-1470, mai 1959.
- [77] F. Obert, « Huile capillaire pédiculicide », *Phytothérapie*, vol. 12, n° 4, p. 245-247, août 2014.
- [78] M. Hyldgaard, T. Mygind, et R. L. Meyer, « Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components », *Front. Microbiol.*, vol. 3, janv. 2012.
- [79] Caballero, « Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition - (Second Edition) - ScienceDirect », *ScienceDirect*, 2003. [En ligne]. Disponible sur: [http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unilim.fr/science?\\_ob=RefWorkIndexURL&\\_idxType=AR&\\_cid=272994&\\_alpha=E&md5=564992ed01527ebe4146a465d91be517](http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unilim.fr/science?_ob=RefWorkIndexURL&_idxType=AR&_cid=272994&_alpha=E&md5=564992ed01527ebe4146a465d91be517). [Consulté le: 12-févr-2017].
- [80] S. Cosentino *et al.*, « *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 29, n° 2, p. 130-135, août 1999.
- [81] G. F. Santoro, M. G. Cardoso, L. G. L. Guimarães, L. Z. Mendonça, et M. J. Soares, « *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes », *Exp. Parasitol.*, vol. 116, n° 3, p. 283-290, juill. 2007.
- [82] M. D'Arrigo, G. Ginestra, G. Mandalari, P. M. Furneri, et G. Bisignano, « Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* », *Phytomedicine*, vol. 17, n° 5, p. 317-322, avr. 2010.
- [83] J. Carneiro de Barros *et al.*, « Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods », *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 42, n° 6, p. 1139-1143, juill. 2009.
- [84] Helander, « Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria », *ResearchGate*, 1998.
- [85] Hemaiswarya, Soudaminikkutty, Narasumani, et M. Doble, « Phenylpropanoids inhibit protofilament formation of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ », *ResearchGate*, 2011.
- [86] J. a. Kwon, C. b. Yu, et H. d. Park, « Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus* », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 37, n° 1, p. 61-65, juill. 2003.
- [87] S. Bouhdid, J. Abrini, M. Amensour, A. Zhiri, M. j. Espuny, et A. Manresa, « Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 109, n° 4,

- p. 1139-1149, oct. 2010.
- [88] E. L. de Souza, J. C. de Barros, C. E. V. de Oliveira, et M. L. da Conceição, « Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 137, n° 2–3, p. 308-311, févr. 2010.
- [89] S. Caillet et M. Lacroix, « Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire - RESALA, INRS », [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <http://docplayer.fr/15524131-Les-huiles-essentielles-leurs-proprietes-antimicrobiennes-et-leurs-applications-potentielles-en-alimentaire.html>. [Consulté le: 08-nov-2017].
- [90] S.-E. Moon, H.-Y. Kim, et J.-D. Cha, « Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria », *Arch. Oral Biol.*, vol. 56, n° 9, p. 907-916, sept. 2011.
- [91] S. Hemaiswarya et M. Doble, « Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria », *Phytomedicine*, vol. 16, n° 11, p. 997-1005, nov. 2009.
- [92] J. S. Armstrong, « Mitochondrial membrane permeabilization: the *sine qua non* for cell death », *BioEssays*, vol. 28, n° 3, p. 253-260, mars 2006.
- [93] S. Burt, « Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, n° 3, p. 223-253, août 2004.
- [94] R. Di Pasqua, G. Betts, N. Hoskins, M. Edwards, D. Ercolini, et G. Mauriello, « Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, n° 12, p. 4863-4870, juin 2007.
- [95] M. Cristani *et al.*, « Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, n° 15, p. 6300-6308, juill. 2007.
- [96] H. Sakkas, P. Gousia, V. Economou, V. Sakkas, S. Petsios, et C. Papadopoulou, « *In vitro* antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates », *J. Intercult. Ethnopharmacol.*, vol. 5, n° 3, p. 212-218, mai 2016.
- [97] R. Di Pasqua, G. Mamone, P. Ferranti, D. Ercolini, et G. Mauriello, « Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar *Thompson* as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol », *PROTEOMICS*, vol. 10, n° 5, p. 1040-1049, mars 2010.
- [98] V. M. Hans, H. S. Grover, H. Deswal, et P. Agarwal, « Antimicrobial Efficacy of Various Essential Oils at Varying Concentrations against Periopathogen *Porphyromonas gingivalis* », *J. Clin. Diagn. Res. JCDR*, vol. 10, n° 9, p. ZC16-ZC19, sept. 2016.
- [99] R. j. w. Lambert, P. n. Skandamis, P. j. Coote, et G.-J. e. Nychas, « A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 91, n° 3, p. 453-462, sept. 2001.
- [100] H. N. H. Veras *et al.*, « Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol », *Fitoterapia*, vol. 83, n° 3, p. 508-512, avr. 2012.
- [101] Gustafson *et al.*, « Effects of tea tree oil on *Escherichia coli* », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 26, n° 3, p. 194-198, mars 1998.
- [102] B. j. Juven, J. Kanner, F. Schved, et H. Weisslowicz, « Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents », *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 76, n° 6, p. 626-631, juin 1994.
- [103] A. E. Vercesi, A. J. Kowaltowski, M. T. Grijalba, A. R. Meinicke, et R. F. Castilho, « The Role of Reactive Oxygen Species in Mitochondrial Permeability Transition », *Biosci. Rep.*, vol. 17, n° 1, p. 43-52, févr. 1997.
- [104] A. Rao, Y. Zhang, S. Muend, et R. Rao, « Mechanism of Antifungal Activity of

- Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, p. 5062-5069, 2010.
- [105] S. Bouhdid, J. Abrini, A. Zhiri, M. j. Espuny, et A. Manresa, « Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, n° 5, p. 1558-1568, mai 2009.
- [106] I. Rasooli, M. B. Rezaei, et A. Allameh, « Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes* », *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 10, n° 3, p. 236-241, mai 2006.
- [107] H. J. D. Dorman et S. G. Deans, « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 88, n° 2, p. 308-316, févr. 2000.
- [108] A. Rosato, C. Vitali, N. D. Laurentis, D. Armenise, et M. A. Milillo, « Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin », *ResearchGate*, vol. 14, n° 11, p. 727-32, déc. 2007.
- [109] R.-S. Pei, F. Zhou, B.-P. Ji, et J. Xu, « Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E. coli* with an Improved Method », *ResearchGate*, vol. 74, n° 7, p. M379-83, sept. 2009.
- [110] A. O. Gill et R. A. Holley, « Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 111, n° 2, p. 170-174, sept. 2006.
- [111] M. K. Stefanakis, E. Touloupakis, E. Anastasopoulos, D. Ghanotakis, H. E. Katerinopoulos, et P. Makridis, « Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum* », *Food Control*, vol. 34, n° 2, p. 539-546, déc. 2013.
- [112] C. F. Carson, K. A. Hammer, et T. V. Riley, « *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, n° 1, p. 50-62, janv. 2006.
- [113] E. Schmolz, R. Doebner, R. Auste, R. Daum, G. Welge, et I. Lamprecht, « Bioenergetic investigations on tea-tree and related essential oils », *Thermochim. Acta*, vol. 337, n° 1-2, p. 71-81, oct. 1999.
- [114] V. J. Feron, H. P. Til, F. de Vrijer, R. A. Woutersen, F. R. Cassee, et P. J. van Bladeren, « Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment », *Mutat. Res. Toxicol.*, vol. 259, n° 3, p. 363-385, mars 1991.
- [115] C. N. (Kyoto U. Wendakoon et M. Sakaguchi, « Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices », *J. Food Prot. USA*, 1995.
- [116] S. Hemaiswarya et M. Doble, « Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria », *J. Med. Microbiol.*, vol. 59, n° 12, p. 1469-1476, 2010.
- [117] J. m. Kim, M. Marshall, J. a. Cornell, J. f. P. Iii, et C. i. Wei, « Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes », *J. Food Sci.*, vol. 60, n° 6, p. 1364-1368, nov. 1995.
- [118] J. Qiu *et al.*, « Eugenol Reduces the Expression of Virulence-Related Exoproteins in *Staphylococcus aureus* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, n° 17, p. 5846-5851, sept. 2010.
- [119] G. Horváth, K. Kovács, B. Kocsis, et I. Kustos, « Effect of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oil and Its Main Constituents on the Outer Membrane Protein Composition of *Erwinia* Strains Studied with Microfluid Chip Technology », *Chromatographia*, vol. 70, n° 11-12, p. 1645-1650, déc. 2009.
- [120] L. Miyague, R. E. F. Macedo, G. Meca, R. A. Holley, et F. B. Luciano, « Combination of phenolic acids and essential oils against *Listeria monocytogenes* », *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 64, n° 1, p. 333-336, nov. 2015.

- [121] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, et P. Bourke, « The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 124, n° 1, p. 91-97, mai 2008.
- [122] V. Moleyar et P. Narasimham, « Antibacterial activity of essential oil components », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 16, n° 4, p. 337-342, août 1992.
- [123] S. a. Burt et R. d. Reinders, « Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 36, n° 3, p. 162-167, mars 2003.
- [124] J. E. Gustafson, S. D. Cox, Y. C. Liew, S. G. Wyllie, et J. R. Warmington, « The bacterial multiple antibiotic resistant (MAR) phenotype leads to increased tolerance to tea tree oil », *Pathology (Phila.)*, vol. 33, n° 2, p. 211-215, 2001.
- [125] C. F. Bagamboula, M. Uyttendaele, et J. Debevere, « Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri* », *Food Microbiol.*, vol. 21, n° 1, p. 33-42, févr. 2004.
- [126] A. Ultee, M. H. J. Bennik, et R. Moezelaar, « The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, n° 4, p. 1561-1568, janv. 2002.
- [127] C. f. Carson et T. v. Riley, « Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* », *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 78, n° 3, p. 264-269, mars 1995.
- [128] E. Veldhuizen, J. L M Tjeerdsma-van Bokhoven, C. Zweijter, S. A Burt, et H. P Haagsman, « Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, p. 1874-9, avr. 2006.
- [129] N. Mathlouthi *et al.*, « Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: *In vitro* antimicrobial activities and effects on growth performance », *J. Anim. Sci.*, vol. 90, n° 3, p. 813-823, mars 2012.
- [130] J. Zemek, M. Valent, M. Pódová, B. Kosíková, et D. Joniak, « Antimicrobial properties of aromatic compounds of plant origin », *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 32, n° 5, p. 421-425, 1987.
- [131] Y.-L. Chen *et al.*, « Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 43, n° 3, p. 188-194, juin 2011.
- [132] S. F. van Vuuren et A. M. Viljoen, « Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination », *ResearchGate*, vol. 22, n° 6, p. 540-544, nov. 2007.
- [133] A. Ultee, R. A. Slump, G. Steging, et E. J. Smid, « Antimicrobial Activity of Carvacrol toward *Bacillus cereus* on Rice », *J. Food Prot.*, vol. 63, n° 5, p. 620-624, mai 2000.
- [134] I. H. N. Bassolé *et al.*, « Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination », *Molecules*, vol. 15, n° 11, p. 7825-7839, nov. 2010.
- [135] V. Edwards-Jones, R. Buck, S. G. Shawcross, M. M. Dawson, et K. Dunn, « The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model », *Burns*, vol. 30, n° 8, p. 772-777, déc. 2004.
- [136] S. Savelev, E. Okello, N. S. L. Perry, R. M. Wilkins, et E. K. Perry, « Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil », *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 75, n° 3, p. 661-668, juin 2003.
- [137] D. Averbek, S. Averbek, L. Dubertret, A. R. Young, et P. Morlière, « Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae* », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 7, n° 2-4, p. 209-229, nov. 1990.

- [138] N. Dijoux *et al.*, « Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay », *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA*, vol. 20, n° 4, p. 480-489, juin 2006.
- [139] J. L. Burkey, J.-M. Sauer, C. A. McQueen, et I. Glenn Sipes, « Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners — a mechanism of activation for methyleugenol », *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 453, n° 1, p. 25-33, sept. 2000.
- [140] M. Eisenhut, « The toxicity of essential oils », *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 11, n° 4, p. 365, juill. 2007.
- [141] A. Jilani et A. Dicko, « The Therapeutic Benefits of Essential Oils », in *Nutrition, well-being and health*, 2012.
- [142] D. M. Shankel, S. Kuo, C. Haines, et L. A. Mitscher, « Extracellular interception of mutagens », *Basic Life Sci.*, vol. 61, p. 65-74, 1993.
- [143] M. D. Waters, H. F. Stack, M. A. Jackson, H. E. Brockman, et S. De Flora, « Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data », *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 350, n° 1, p. 109-129, févr. 1996.
- [144] B. Vuković-Gačić, S. Nikčević, T. Berić-Bjedov, J. Knežević-Vukčević, et D. Simić, « Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* », *Food Chem. Toxicol.*, vol. 44, n° 10, p. 1730-1738, oct. 2006.
- [145] Y. Kuroda et T. Inoue, « Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria », *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 202, n° 2, p. 387-391, déc. 1988.
- [146] M. G. Evandri, L. Battinelli, C. Daniele, S. Mastrangelo, P. Bolle, et G. Mazzanti, « The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay », *Food Chem. Toxicol.*, vol. 43, n° 9, p. 1381-1387, sept. 2005.
- [147] N. Mezzoug *et al.*, « Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents », *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 629, n° 2, p. 100-110, mai 2007.
- [148] C.-B. Yoo *et al.*, « Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells », *Cancer Lett.*, vol. 225, n° 1, p. 41-52, juill. 2005.
- [149] A. Maralhas *et al.*, « Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol », *Mutagenesis*, vol. 21, n° 3, p. 199-204, janv. 2006.
- [150] A. Stamatii, P. Bonsi, F. Zucco, R. Moezelaar, H. L. Alakomi, et A. von Wright, « Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays », *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 37, n° 8, p. 813-823, août 1999.
- [151] R. Cuba, « Toxicity myths essential oils and their carcinogenic potential », *Int. J. Aromather.*, vol. 11, n° 2, p. 76-83, juin 2001.
- [152] [s.n.], « NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of d-Limonene (CAS No. 5989-27-5) in F344 N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). », *OMICS International*, 2017. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.omicsonline.org/references/ntp-toxicology-and-carcinogenesis-studies-of-dlimonene-cas-no-5989275-in-f344n-rats-and-b6c3f1-mice-gavage-studies-248865.html>. [Consulté le: 10-nov-2017].
- [153] L. Jirovetz, G. Buchbauer, I. Stoilova, A. Stoyanova, A. Krastanov, et E. Schmidt, « Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, n° 17, p. 6303-6307, août 2006.
- [154] R. Aeschbach *et al.*, « Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol », *Food Chem. Toxicol.*, vol. 32, n° 1, p. 31-36, janv. 1994.

- [155] Y. Sakihama, M. F. Cohen, S. C. Grace, et H. Yamasaki, « Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants », *Toxicology*, vol. 177, n° 1, p. 67-80, août 2002.
- [156] S. Aydın, A. A. Başaran, et N. Başaran, « The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C », *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 581, n° 1–2, p. 43-53, mars 2005.
- [157] V. Bouvier, « Recommandations », *eVIDAL*, déc-2017. [En ligne]. Disponible sur: <https://evidal-vidal-fr.ezproxy.unilim.fr/recos/vidalRecos.html>. [Consulté le: 06-déc-2017].
- [158] V. Pereira, C. Dias, M. C. Vasconcelos, E. Rosa, et M. J. Saavedra, « Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*) », *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, p. 1-7, janv. 2014.
- [159] A. Rosato *et al.*, « *In Vitro* Synergistic Action of Certain Combinations of Gentamicin and Essential Oils », *ResearchGate*, vol. 17, n° 28, p. 3289-95, sept. 2010.
- [160] S. F. van Vuuren, S. Suliman, et A. M. Viljoen, « The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 48, n° 4, p. 440-446, avr. 2009.
- [161] K. L. LaPlante, « *In vitro* activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* », *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 57, n° 4, p. 413-418, avr. 2007.
- [162] P. S. X. Yap, S. H. E. Lim, C. P. Hu, et B. C. Yiap, « Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria », *Phytomedicine*, vol. 20, n° 8–9, p. 710-713, juin 2013.
- [163] K. Palaniappan et R. A. Holley, « Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 140, n° 2–3, p. 164-168, juin 2010.
- [164] Z. Schelz, J. Molnar, et J. Hohmann, « Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils », *Fitoterapia*, vol. 77, n° 4, p. 279-285, juin 2006.
- [165] F. Mariam, J. Chevalier, A. Saad, et J.-M. Pagès, « Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria », *ResearchGate*, juill. 2011.
- [166] K. A. Hammer, C. F. Carson, et T. V. Riley, « Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, n° 2, p. 909-915, janv. 2012.
- [167] M. A. S. McMahon, I. S. Blair, J. E. Moore, et D. A. McDowell, « Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 59, n° 1, p. 125-127, janv. 2007.
- [168] L. Boulekbache-Makhlouf, S. Slimani, et K. Madani, « Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria », *Ind. Crops Prod.*, vol. 41, p. 85-89, janv. 2013.
- [169] [s.n.], « Société Française de Microbiologie », *SFM*, 2016. [En ligne]. Disponible sur: [http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page\\_id/90.html](http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/90.html). [Consulté le: 21-janv-2017].
- [170] S. Benkherara, O. Bordjiba, et A. B. Djahra, « Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* », *Phytothérapie*, vol. 13, n° 1, p. 14-18, févr. 2015.
- [171] Z. Zarai, I. B. Chobba, R. B. Mansour, A. Békir, N. Gharsallah, et A. Kadri, « Essential

- oil of the leaves of *Ricinus communis* L.: *In vitro* cytotoxicity and antimicrobial properties », *Lipids Health Dis.*, vol. 11, p. 102, août 2012.
- [172] N. Bouzouita, F. Kachouri, M. B. Halima, et M. M. Chaabouni, « Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* », *ResearchGate*, vol. 10, p. 119-125, janv. 2008.
- [173] P. Cos, A. J. Vlietinck, D. V. Berghe, et L. Maes, « Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept' », *J. Ethnopharmacol.*, vol. 106, n° 3, p. 290-302, juill. 2006.
- [174] S. Cabiac, « Traitements et conseils à l'officine des affections cutanées les plus couramment rencontrées », Thèse d'exercice, Université de Montpellier I. UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques, 1968-2014, France, 2010.
- [175] [s.n.], « GRAS Substances (SCOGS) Database - Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Clove Bud Extract, Clove Bud Oil, Clove Bud Oleoresin, Clove Leaf Oil, Clove Stem Oil, Eugenol », 14-oct-2015. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261254.htm> m. [Consulté le: 23-sept-2016].
- [176] S. A. Guénette, A. Ross, J.-F. Marier, F. Beaudry, et P. Vachon, « Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 562, n° 1-2, p. 60-67, mai 2007.
- [177] P. Fournier et C. Boisvert, *Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France*. Paris, France: Omnibus, 2010.
- [178] D. Festy, *Ma bible des huiles essentielles*. Paris, France: Leduc.s éd., 2008.
- [179] S. Mallikarjun, A. Rao, G. Rajesh, R. Shenoy, et M. Pai, « Antimicrobial efficacy of Tulsi leaf (*Ocimum sanctum*) extract on periodontal pathogens: An *in vitro* study », *J. Indian Soc. Periodontol.*, vol. 20, n° 2, p. 145-150, 2016.
- [180] I. Pacchioni, J.-C. Francolon, P. Morin, et L. Allorge-Boiteau, *Aromatherapia: tout sur les huiles essentielles: les connaître, les utiliser: beauté, santé, bien-être: 500 recettes pratiques pour tous*. Paris, France: Éditions Aroma Thera (LOR Communication), 2011.
- [181] J. Bugnon, « Utilisation des huiles essentielles dans les affections courantes en dermatologie », Thèse d'exercice, Université de Bordeaux II, 1970-2013, France, 2004.
- [182] K. A. Hammer, C. F. Carson, et T. V. Riley, « *In-vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida spp.* », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 42, n° 5, p. 591-595, janv. 1998.
- [183] J. May, C. H. Chan, A. King, L. Williams, et G. L. French, « Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, n° 5, p. 639-643, mai 2000.
- [184] G. K. Elsom et D. Hide, « Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to tea tree oil and mupirocin », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 43, n° 3, p. 427-428, mars 1999.
- [185] P. J. Delaquis, K. Stanich, B. Girard, et G. Mazza, « Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 74, n° 1, p. 101-109, mars 2002.
- [186] A. Lefief-Delcourt, *180 huiles essentielles*. Paris, France: Éditions ESI, 2015.
- [187] [s.n.], « Gentamicine - Vidal.fr », *Vidal*, mars-2016. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/substances/1610/gentamicine/>. [Consulté le: 28-nov-2016].
- [188] C. Moch *et al.*, « Stratégies thérapeutiques innovantes pour l'administration médicamenteuse intravésicale », *AFU*, 06-janv-2011. [En ligne]. Disponible sur:

- <http://www.urofrance.org/nc/science-et-recherche/base-bibliographique/article/html/strategies-therapeutiques-innovantes-pour-ladministration-medicamenteuse-intravesicale.html>. [Consulté le: 04-déc-2016].
- [189] A. Mekonnen, B. Yitayew, A. Tesema, et S. Taddese, « *In Vitro* Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis* », *Int. J. Microbiol.*, vol. 2016, 2016.
- [190] A. Elaïssi *et al.*, « Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities », *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 12, p. 81, juin 2012.
- [191] R. S. of Chemistry, « The Royal Society of Chemistry », 15-août-2012. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.rsc.org/>. [Consulté le: 26-juin-2017].
- [192] S. d. Cox, C. m. Mann, et J. I. Markham, « Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 91, n° 3, p. 492-497, sept. 2001.
- [193] A. Kunicka-Styczyńska, M. Sikora, et D. Kalembe, « Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 107, n° 6, p. 1903-1911, déc. 2009.
- [194] M. Nasir, K. Tafess, et D. Abate, « Antimicrobial potential of the Ethiopian *Thymus schimperi* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species », *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 15, juill. 2015.
- [195] S. Mulyaningsih, F. Sporer, S. Zimmermann, J. Reichling, et M. Wink, « Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens », *Phytomedicine*, vol. 17, n° 13, p. 1061-1066, nov. 2010.
- [196] Smith-Palmer, Stewart, et Fyfe, « Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 26, n° 2, p. 118-122, févr. 1998.
- [197] J. Kaloustian, J. Chevalier, C. Mikail, M. Martino, L. Abou, et M.-F. Vergnes, « Étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne », *Phytothérapie*, vol. 6, n° 3, p. 160-164, juin 2008.
- [198] J. Malloy, *The Power of Eucalyptus for Health & Healing*. Author House, 2005.
- [199] M. Fadil *et al.*, « Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2017.
- [200] R. G. Bachir et M. Benali, « Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* », *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 2, n° 9, p. 739-742, sept. 2012.
- [201] S. Biju, A. Ahuja, R. Krishen Khar, et R. Chaudhry, « Formulation and evaluation of an effective pH balanced topical antimicrobial product containing tea tree oil », *ResearchGate*, 2005.
- [202] J. L. Ríos et M. C. Recio, « Medicinal plants and antimicrobial activity », *J. Ethnopharmacol.*, vol. 100, n° 1-2, p. 80-84, août 2005.
- [203] J. Safaei-Ghomi et A. A. Ahd, « Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta* », *Pharmacogn. Mag.*, vol. 6, n° 23, p. 172-175, 2010.
- [204] A. Remmal, T. Bouchikhi, A. Tantaoui-Elaraki, et M. Ettayebi, « Inhibition of antibacterial activity of essential oils by Tween 80 and Ethanol in liquid medium », *ResearchGate*, 1993.
- [205] O. Y. Karima, M. Boumedienne, et T. touil Aicha, « Etude de l'effet d'huile essentielle



- de laurier noble de l'Ouest algérien sur *Salmonella spp. in vitro et in vivo* », *Eur. Sci. J.*, n° 33, nov. 2015.
- [206] N. Didry, L. Dubreuil, et M. Pinkas, « Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination », *ResearchGate*, vol. 48, n° 4, p. 301-4, mai 1993.
- [207] C. H. Chan et K. W. Loudon, « Activity of tea tree oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) », *J. Hosp. Infect.*, vol. 39, n° 3, p. 244-245, juill. 1998.
- [208] E. Ipek, H. Zeytinoglu, S. Okay, B. A. Tuylu, M. Kurkcuoglu, et K. H. C. Baser, « Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test », *Food Chem.*, vol. 93, n° 3, p. 551-556, déc. 2005.
- [209] K. Cal, « Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles », *Planta Med.*, vol. 72, n° 4, p. 311-316, mars 2006.
- [210] H. Wagner et G. Ulrich-Merzenich, « Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals », *Phytomedicine*, vol. 16, n° 2–3, p. 97-110, mars 2009.
- [211] F. Iten, R. Saller, G. Abel, et J. Reichling, « Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris*- chemotype carvacrol », *ResearchGate*, vol. 75, n° 09, juill. 2009.
- [212] N. Didry, L. Dubreuil, et M. Pinkas, « Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria », *Pharm. Acta Helv.*, vol. 69, n° 1, p. 25-28, juill. 1994.
- [213] B. S. M. Mahmoud, K. Yamazaki, K. Miyashita, S. Il-Shik, C. Dong-Suk, et T. Suzuki, « Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds », *Food Microbiol.*, vol. 21, n° 6, p. 657-666, déc. 2004.
- [214] I. H. N. Bassolé et H. R. Juliani, « Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties », *Molecules*, vol. 17, n° 4, p. 3989-4006, avr. 2012.
- [215] N. J. Gomes Neto, I. da Silva Luz, A. Gama Tavares, et E. Leite de Souza, « *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil and Its Majority Compound 1,8-Cineole at Sublethal Amounts Induce No Direct and Cross Protection in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 », *ResearchGate*, nov. 2012.
- [216] A. Ultee, E. P. Kets, M. Alberda, F. A. Hoekstra, et E. J. Smid, « Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol », *Arch. Microbiol.*, vol. 174, n° 4, p. 233-238, oct. 2000.
- [217] R. Becerril, C. Nerín, et R. Gómez-Lus, « Evaluation of Bacterial Resistance to Essential Oils and Antibiotics After Exposure to Oregano and Cinnamon Essential Oils », *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 9, n° 8, p. 699-705, juill. 2012.
- [218] C. J. Longbottom, C. F. Carson, K. A. Hammer, B. J. Mee, et T. V. Riley, « Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 54, n° 2, p. 386-392, janv. 2004.
- [219] J. K. Kiecolt-Glaser, J. E. Graham, W. B. Malarkey, K. Porter, S. Lemeshow, et R. Glaser, « Olfactory influences on mood and autonomic, endocrine, and immune function », *Psychoneuroendocrinology*, vol. 33, n° 3, p. 328-339, avr. 2008.
- [220] A. Meyer, « L'olfactothérapie: applications et limites », Thèse d'exercice, Université de Strasbourg, 2009-....., France, 2009.
- [221] [s.n.], « ÉTHER: Définition de ÉTHER », *CNRTL*, 2012. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.cnrtl.fr/definition/%C3%A9ther>. [Consulté le: 29-août-2017].
- [222] S. B. Warad, S. S. Kolar, V. Kalburgi, et N. B. Kalburgi, « Lemongrass essential oil gel as a local drug delivery agent for the treatment of periodontitis », *Anc. Sci. Life*, vol. 32, n° 4, p. 205-211, 2013.
- [223] M. Pidoux *et al.*, « Traitements topiques d'affections dermatologiques par les huiles

- essentielles de géranium, saro, niaouli, à Madagascar (2e partie) », *Phytothérapie*, vol. 13, n° 4, p. 214-222, mars 2015.
- [224] A. Faure et H. Fessi, *L'aromathérapie en Rhône-Alpes: exemples d'utilisation thérapeutique des huiles essentielles en soins palliatifs*. Lyon, France: Université Claude Bernard Lyon 1, 2013.
- [225] C. Kohlert *et al.*, « Systemic Availability and Pharmacokinetics of Thymol in Humans », *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 42, n° 7, p. 731-737, juill. 2002.
- [226] S. B. Singh et J. F. Barrett, « Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 71, n° 7, p. 1006-1015, mars 2006.
- [227] S. B. Levy et B. Marshall, « Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses », *Nat. Med.*, vol. 10, n° 12s, p. nm1145, nov. 2004.
- [228] [s.n.], « The PubChem Project », *PubChem*, [s.d.]. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Consulté le: 07-déc-2017].
- [229] J.-M. Morel, « WikiPhyto, l'encyclopédie de la phytothérapie », *WikiPhyto*, 21-sept-2017. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.wikiphyto.org/wiki/Accueil>. [Consulté le: 07-déc-2017].

## Annexes

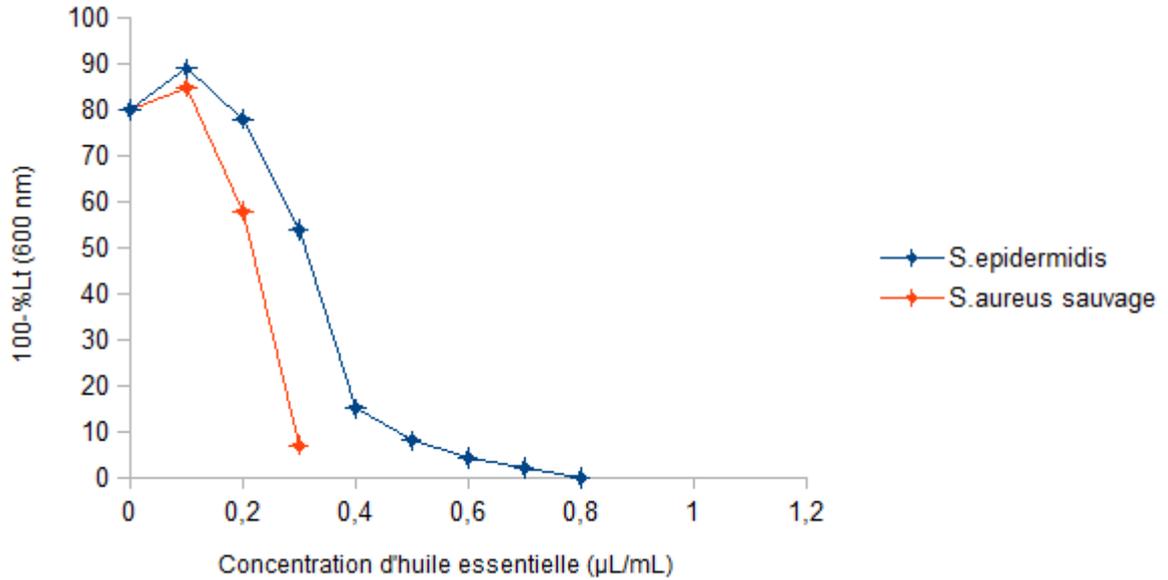
Annexe 1. Influence des huiles essentielles sur la croissance bactérienne	131
Annexe 1.1. Croissance staphylococcique en présence d'huile essentielle de thym	131
Annexe 1.2. Croissance staphylococcique en présence d'huile essentielle d'origan	131
Annexe 1.3. Croissance staphylococcique en présence d'huile essentielle de girofle....	132
Annexe 1.4. Croissance de deux souches staphylococciques en présence d'huile essentielle de niaouli.....	132
Annexe 2. Influence des mélanges d'huiles essentielles sur la croissance bactérienne.....	133
Annexe 2.1. Croissance de <i>S. aureus</i> sauvage en présence des huiles essentielles de cannelle, girofle et leur mélange.....	133
Annexe 2.2. Croissance de <i>S. epidermidis</i> en présence des huiles essentielles d'arbre à thé, eucalyptus radié et leur mélange.....	133
Annexe 2.3. Croissance de <i>S. aureus</i> sauvage en présence des huiles essentielles de cannelle, girofle, niaouli et leurs mélanges.....	134
Annexe 3. Article D4211-13 du CSP : liste fixée par décret des huiles essentielles dont la vente au détail et la dispensation au public est réservée aux pharmaciens (modifié par Décret n°2007-1198 du 3 août 2007) [73].....	135
Annexe 4. Conseil au traitement aromathérapie antibactérien cutané à l'officine.....	136



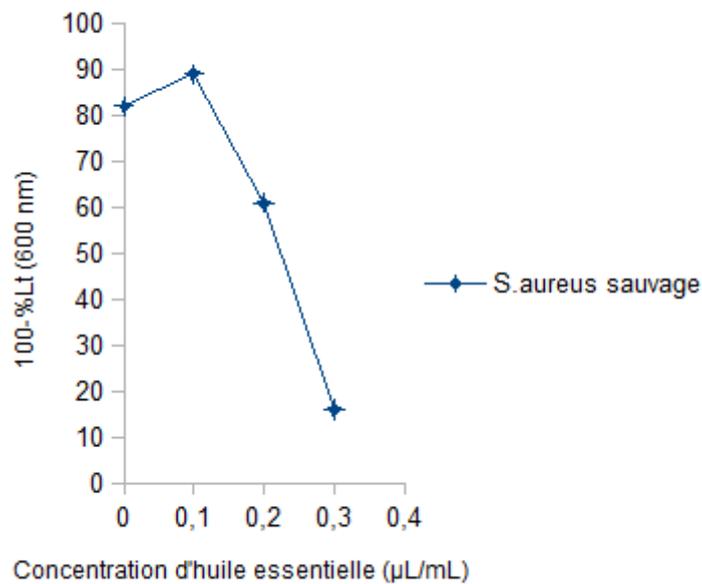
## Annexe 1. Influence des huiles essentielles sur la croissance bactérienne

Rappel : le %Lt est inversement proportionnel à la croissance bactérienne.

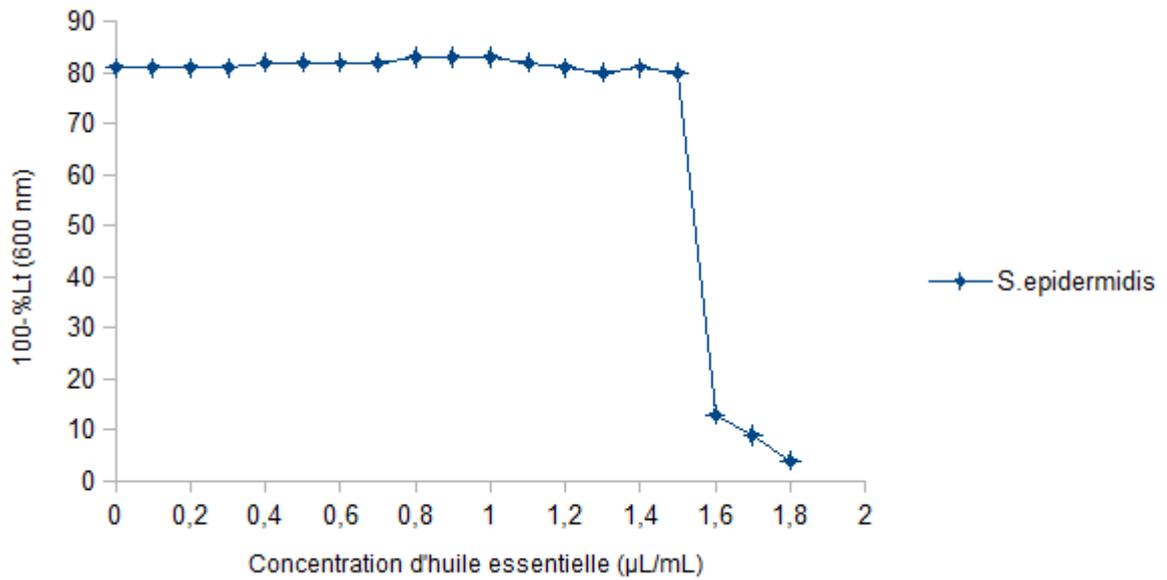
### Annexe 1.1. Croissance staphylococcique en présence d'huile essentielle de thym



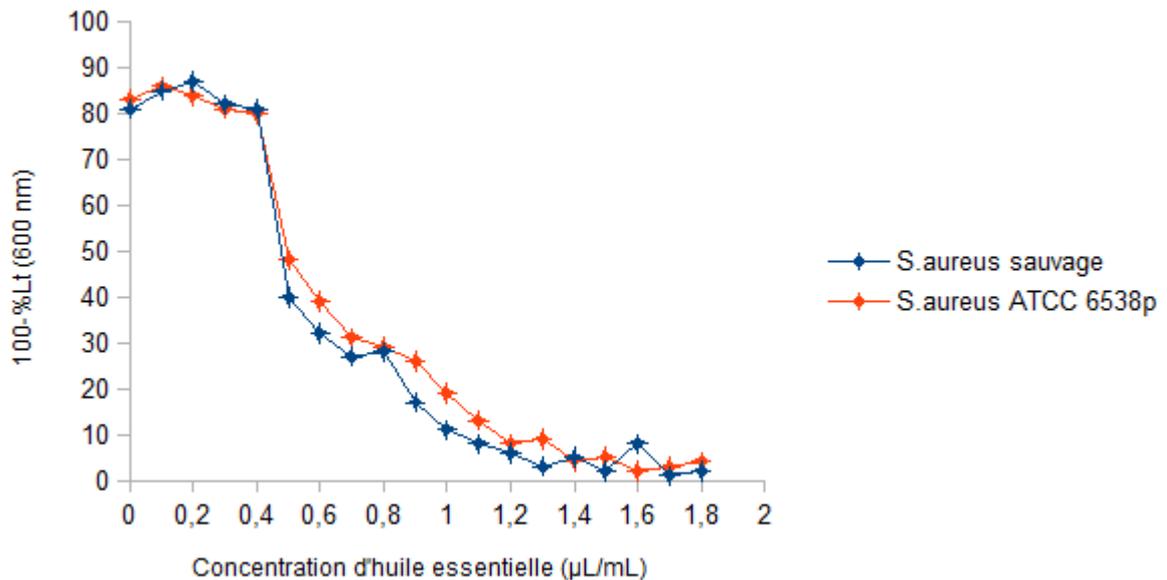
### Annexe 1.2. Croissance staphylococcique en présence d'huile essentielle d'origan



### Annexe 1.3. Croissance staphylococcique en présence d'huile essentielle de girofle



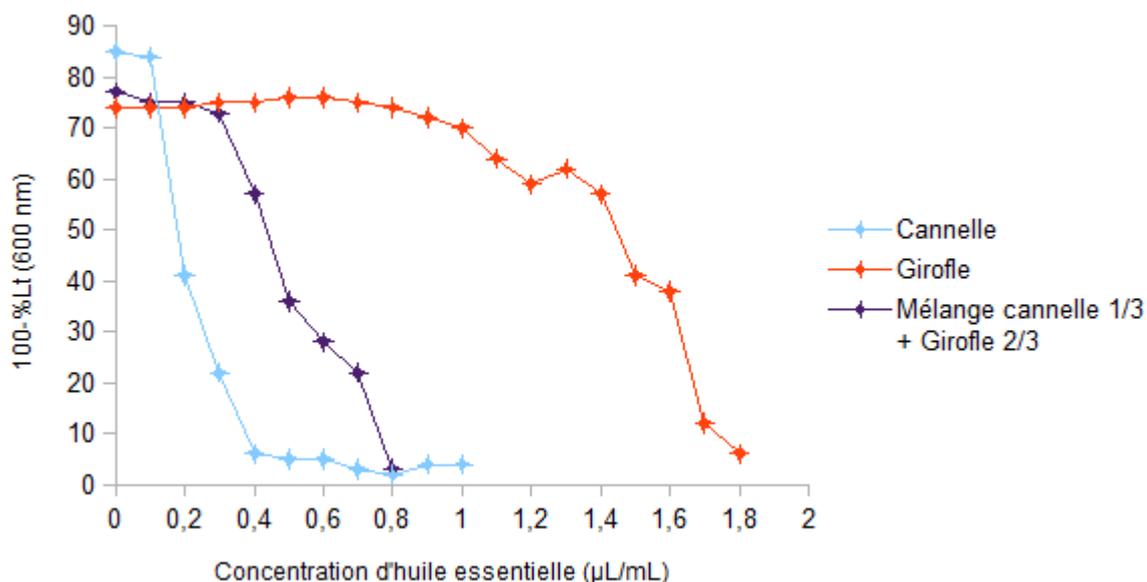
### Annexe 1.4. Croissance de deux souches staphylococciques en présence d'huile essentielle de niaouli



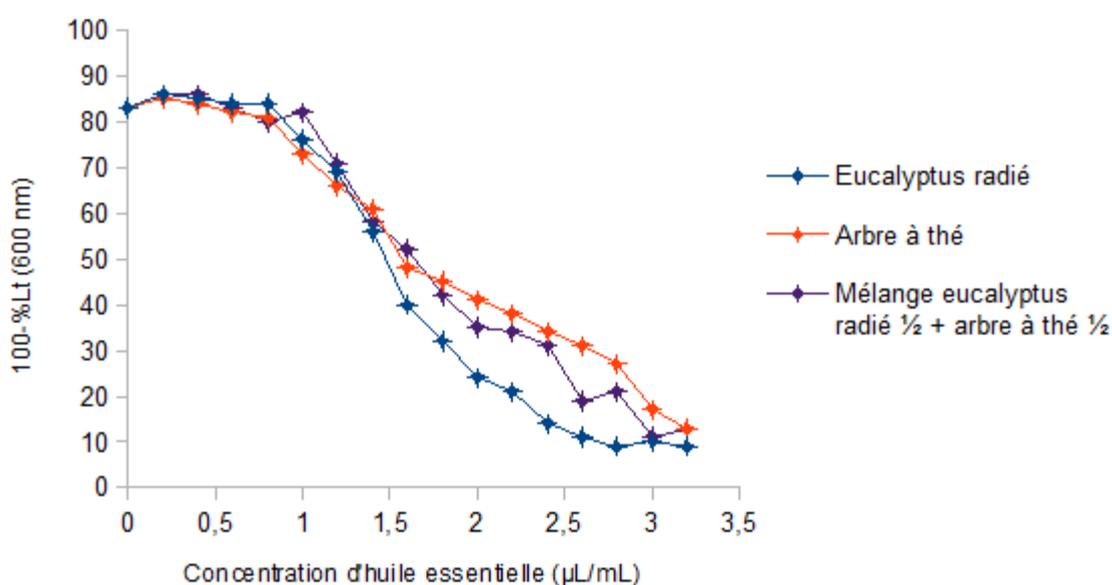
## Annexe 2. Influence des mélanges d'huiles essentielles sur la croissance bactérienne

Rappel : le %Lt est inversement proportionnel à la croissance bactérienne.

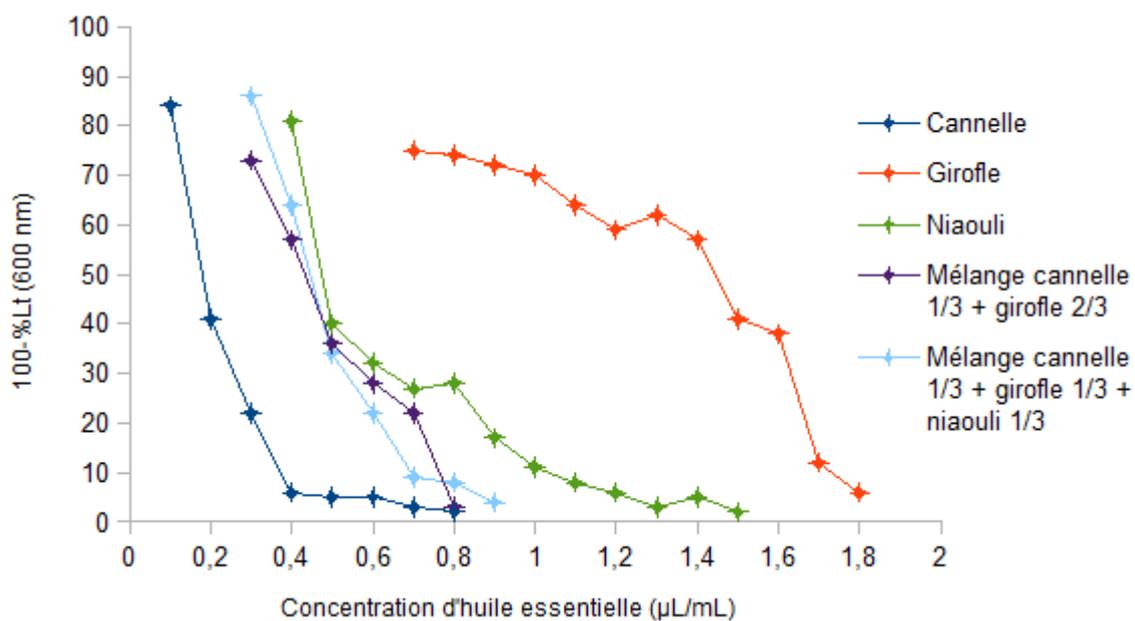
### Annexe 2.1. Croissance de *S. aureus* sauvage en présence des huiles essentielles de cannelle, girofle et leur mélange



### Annexe 2.2. Croissance de *S. epidermidis* en présence des huiles essentielles d'arbre à thé, eucalyptus radié et leur mélange



### Annexe 2.3. Croissance de *S. aureus* sauvage en présence des huiles essentielles de cannelle, girofle, niaouli et leurs mélanges



**Annexe 3. Article D4211-13 du CSP : liste fixée par décret des huiles essentielles dont la vente au détail et la dispensation au public est réservée aux pharmaciens (modifié par Décret n°2007-1198 du 3 août 2007) [73]**

- grande absinthe (*Artemisia absinthium L.*) ;
- petite absinthe (*Artemisia pontica L.*) ;
- armoise commune (*Artemisia vulgaris L.*) ;
- armoise blanche (*Artemisia herba alba Asso*) ;
- armoise arborescente (*Artemisia arborescens L.*) ;
- thuya du Canada ou cèdre blanc (*Thuja occidentalis L.*) et cèdre de Corée (*Thuja Koraenensis Nakai*), dits "cèdre feuille" ;
- hysope (*Hyssopus officinalis L.*) ;
- sauge officinale (*Salvia officinalis L.*) ;
- tanaïs (*Tanacetum vulgare L.*) ;
- thuya (*Thuja plicata Donn ex D. Don.*) ;
- sassafras (*Sassafras albidum [Nutt.] Nees*) ;
- sabine (*Juniperus sabina L.*) ;
- rue (*Ruta graveolens L.*) ;
- chénopode vermifuge (*Chenopodium ambrosioides L.* et *Chenopodium anthelminticum L.*) ;
- moutarde jonciforme (*Brassica juncea [L.] Czernj. et Cosson*)



#### Annexe 4. Conseil au traitement aromathérapique antibactérien cutané à l'officine<sup>17</sup>

Voie d'administration	Conseils d'utilisation
<p>locale (cutanée) : compresses, massages...</p> <p><b>atteinte localisée</b></p>	<p>si non-irritante (arbre à thé, niaouli, lavande) : pure ou faible dilution                      si irritante (thyms, origans, cannelles...) : dilution à 20-50 %, et selon localisation de l'atteinte :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- superficielle (épiderme) : dans huiles végétales épaisses (olive, avocat, amande douce adoucissante) ;</li> <li>- profonde (derme ou plus) : dans huiles végétales fluides (argan, pépins de raisin, sésame, noisette adoucissante).</li> </ul> <p>1 application 1-3x/j pendant 7-14j                      JAMAIS SUR PAUPIÈRES (hydrolats<sup>++</sup>)</p>
<p>orale ou sublinguale : en plus, pour <b>action générale ou récidives</b></p>	<p>toujours sur un support : demi-sucre, miel, pain, comprimé neutre, huile végétale, dispersant (Solubol® dans l'eau), teinture mère...</p> <p>1 prise avant les 2-3 repas pendant 7-14j                      TOXICITÉ possible selon l'huile essentielle</p>

Passage cutané < 10 min, métabolisation hépatique, élimination urinaire

- **eugénol (girofle)** : demi-vie = 18 h ; effet anti-agrégant plaquettaire + possible dermocausticité
- **thymol (thym)** : effet max après 1-3h ; demi-vie = 10h
- **HE d'agrumes** : photosensibilisation

Traitements complémentaires :

- traitement hygiéno-diététique, hydratation ;
- métallothérapie (oligo-éléments) anti-infectieuse : cuivre-soufre-étain ou manganèse-cuivre (voire associés à magnésium et zinc) pendant les 2 premières semaines, puis poursuivre avec une association cuivre-or-argent ;
- traitement vitaminique et reminéralisant avec la levure de bière ;
- cures thermales pour les atteintes graves et/ou chroniques.

17 Sources : [13], [33], [37], [41], [48], [53]–[55], [57], [60], [141], [176], [182], [193], [222]–[225]



## Serment de Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



## **Potentialité *in vitro* de 10 huiles essentielles, seules ou en association, dans le traitement des infections bactériennes cutanées.**

---

L'étude *in vitro* de trois huiles essentielles phénolées (thym, origan et girofle) ainsi que sept autres huiles essentielles (cannelle, niaouli, arbre à thé, eucalyptus radié, ciste ladanifère, marjolaine, orange amère) a été menée sur des bactéries de la sphère cutanée (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Streptococcus pyogenes*). L'activité antibactérienne a été évaluée par deux techniques complémentaires : l'aromatogramme, et la macrométhode de dilution en milieu liquide permettant de déterminer les CI<sub>50</sub> et les CI<sub>90</sub> ainsi que la CMB. Dans le but de déceler une éventuelle action synergique, des mélanges de deux ou trois huiles essentielles ont été réalisés et testés *in vitro*. Nous concluons que les huiles essentielles phénolées, celles de cannelle et de niaouli sont les plus efficaces contre les staphylocoques, mais que les autres huiles essentielles exercent aussi une activité mesurable avec un effet dépendant à la fois de l'huile essentielle et de la bactérie. L'étude des mélanges d'huiles essentielles révèle une efficacité similaire à celle des huiles essentielles seules. Ce résultat montre la pertinence d'employer ces huiles essentielles seules plutôt qu'en mélange pour obtenir une activité optimale sur les staphylocoques.

---

Mots-clés : huiles essentielles, bactéries pathogènes cutanées, aromatoigramme, concentration inhibitrice, *Staphylococcus aureus*

## ***In vitro* potentiality of 10 essential oils, alone or in combination, in the treatment of cutaneous bacterial infections.**

---

The *in vitro* study of three phenolic essential oils (thyme, oregano and clove) as well as seven other essential oils (cinnamon, niaouli, tea tree, narrow leaved eucalyptus, cistus ladaniferous, marjoram, bitter orange) was conducted on cutaneous bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes*). Antibacterial activity was assessed by two complementary techniques : the aromatogram, and liquid dilution macromethod for determining the IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> as well as the CMB. In order to detect a possible synergistic action, mixtures of two or three essential oils were tested *in vitro*. We found that phenolic, cinnamon and niaouli essential oils were the most effective against *Staphylococci*, but other essential oils also had measurable activity with an effect depending on both the essential oil and the bacteria. The study of essential oil blends reveals an efficacy similar to that of essential oils alone. This result shows the relevance of using these essential oils alone rather than in combination to obtain an optimal activity on *Staphylococci*.

---

Keywords : essential oils, cutaneous pathogenic bacteria, aromatogram, inhibitory concentration, *Staphylococcus aureus*

