



UNIVERSITÉ D'ANTANANARIVO

=====

FACULTÉ DES SCIENCES

=====

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE

=====



Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Études Approfondies en sciences de la vie

Option : Biochimie appliquée aux sciences médicales

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES DES HUILES ESSENTIELLES DE *Cedrelopsis grevei* Baillon (RUTACEAE)

Présenté par

RANDRIANAIVO Heriniaina Jeannot

Maître ès Sciences

Soutenu publiquement le : **08 décembre 2011**

Devant le jury composé du :

Président : **Pr. RAHERIMANDIMBY Marson**

Rapporteurs : **Dr. RAKOTO-RANOROMALALA Aurore Danielle Doll**

Dr. DANTHU Pascal

Examinateurs : **Dr. RAZAFIARIMANGA Zara**

Dr. RANDRIANARIVO Hanitra Ranjana



"Fa ny fahasoavan'Andriamanitra no nahatoy izao ahy" I Kor 15¹⁰
Ho an 'Andriamanitra ireny anie ny voninahitra. Amen.

Ho an'i Dada sy Neny izay tsy nitandro
hasasarana andro aman'alina. Fisaorana sy
Fankatelemana tanteraka amin'ireo zavatra
rehetra izay nataonareo.

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le résultat de l'initiation à la recherche que nous avons effectuée au sein du laboratoire du Département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. Nous tenons à adresser nos sincères remerciements aux personnes qui ont contribué à l'élaboration et à la finalisation de ce mémoire malgré leurs nombreuses occupations, notamment :

Madame le Docteur **RAKOTO-RANOROMALALA Danielle Aurore Doll**, Chef du Département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, encadreur de notre stage. Vos remarques pertinentes ont été très instructives pour l'élaboration de notre mémoire.

Monsieur le Docteur **DANTHU Pascal**, chercheur du Cirad, Animateur DP "Forêts et Biodiversité" de Madagascar, co-encadreur de notre stage. Vos directives et conseils avisés ont contribué à notre formation.

Madame le Docteur **SARTER Samira**, chercheur du Cirad UMR Qualisud basé au Vietnam, qui en plus de nous avoir proposé un sujet de recherche, nous a aussi guidé au cours de notre stage et a bien voulu corriger notre mémoire malgré l'éloignement géographique. Votre perspicacité et vos encouragements ont été d'une grande aide.

Monsieur le Professeur **RAHERIMANDIMBY Marson**, enseignant-chercheur au Département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des Sciences, d'avoir accepté de présider cette soutenance.

Madame le Docteur **RAZAFIARIMANGA Zara**, enseignant-chercheur au Département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des Sciences, d'avoir accepté de siéger parmi les membres du jury.

Monsieur le Docteur **RANDRIANARIVO Hanitra Ranjana**, enseignant-chercheur au Département de Biochimie fondamentale et appliquée de la Faculté des Sciences, d'avoir accepté de faire partie du jury et pour tous les conseils qu'il a donnés au cours de notre stage.

Nous tenons également à remercier Madame **RAKOTOBÉ Miarantsoa** et Madame **RAZAFINTSALAMA Vahinalahaja E.** pour leurs appuis et conseils, le CIRAD et le FOFIFA Ambatobe pour leur appui financier et matériel sans lesquels nous aurions eu du mal à effectuer notre stage.

Notre reconnaissance va aussi envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce mémoire.

Que Dieu miséricordieux vous bénisse et vous rende au centuple les bonnes choses que vous nous avez données.

SOMMAIRE

	Page
REMERCIEMENTS	i
SOMMAIRE	ii
GLOSSAIRE	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
INTRODUCTION	1
I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I.1 GÉNÉRALITÉS SUR <i>Cedrelopsis grevei</i>	3
I.1.1 PRÉSENTATION DE LA PLANTE	3
I.1.2 DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE	3
I.1.3 DESCRIPTION	4
I.1.4 UTILISATION	5
I.1.5 RÉSUMÉ DES ÉTUDES SUR LES HUILES ESSENTIELLES DE <i>Cedrelopsis grevei</i>	6
I.2 GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES	6
I.2.1 DÉFINITION, PARTICULARITÉ ET LOCALISATION	7
I.2.2 COMPOSITION CHIMIQUE	8
I.2.3 RÔLE PHYSIOLOGIQUE	10
I.2.4 FACTEURS DE VARIABILITÉ	10
I.2.4.1 Facteurs d'ordre technologique	11
I.2.4.2 Facteurs d'ordre naturel	11
I.2.5 PROCÉDÉS D 'EXTRACTION	12
I.2.5.1 La distillation	12
I.2.5.1.1 L'hydrodistillation	12
I.2.5.1.2 L'hydrodiffusion	12
I.2.5.1.3 Entraînement à la vapeur	13
I.2.5.1.4 Étude de la cinétique de distillation	13
I.2.5.2 L'expression	13

	Page
I.2.5.3 Les autres procédés d'extraction	14
I.2.5.4 Mode de conservation	15
I.2.6 UTILISATION	16
I.2.7 TOXICITÉ DES HUILES ESSENTIELLES	17
II MATÉRIELS ET MÉTHODES	18
II.1 MATÉRIELS	18
II.1.1 LES HUILES ESSENTIELLES	18
II.1.2 LES MICROORGANISMES	19
II.1.3 LES MATÉRIELS DE LABORATOIRE	21
II.2 MÉTHODES	23
II.2.1 DIFFUSION EN MILIEU GÉLOSÉ	24
II.2.2 DILUTION	25
II.2.3 MICROATMOSPHÈRE	28
III RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS	30
III.1 DIFFUSION EN MILIEU GÉLOSÉ	30
III.2 DILUTION	34
III.3 MICROATMOSPHÈRE	41
IV DISCUSSION	43
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	47
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	49
ANNEXES	

GLOSSAIRE

Abortive : substance qui a la propriété de faire avorter.

Allélopathie : ensemble des interactions biochimiques entre deux ou plusieurs plantes

Antibiotique : substance, d'origine naturelle ou synthétique, utilisée contre les infections causées par les bactéries.

Artéfact : altération du résultat d'un examen due au procédé technique utilisé. Phénomène, production artificielle ou factice.

Asthénie : état de faiblesse générale caractérisé par une diminution du pouvoir fonctionnel de l'organisme, non consécutive au travail ou à l'effort et ne disparaissant pas avec le repos.

Azéotropique : qui a les propriétés d'un azétope (mélange de deux liquides qui bout à température fixe et ne se distille pas en bouillant).

Bactéricide : qui tue les bactéries, qui les détruit.

Bactérie basophile : bactérie qui croît dans un milieu à pH basique.

Bactérie halophile : ce sont des bactéries qui ont besoin de sel (NaCl) pour leur croissance. Cette croissance peut varier de 1 à 6 % pour les faiblement halophiles et peut aller jusqu'à 30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.

Bactérie mésophile : bactérie dont la croissance optimale se situe entre 30 et 37°C.

Bactérie neutrophile : bactérie qui croît dans un milieu à pH neutre.

Bactérie psychrotrophe : bactérie qui a la capacité de se développer au-dessous de +7°C.

Bactériostatique : se dit de tout phénomène ou de toute substance, notamment un antibiotique capable d'inhiber la multiplication des bactéries sans les tuer.

Bioactive : substance qui a une activité sur le vivant.

Biocide : agent antimicrobien qui tue le microbe.

Biostatique : agent antimicrobien qui inhibe la croissance du microorganisme cible.

Biosynthétisé : produit dans un organisme vivant.

Biotope : milieu biologique déterminé offrant à une biocénose des conditions d'habitat relativement stables.

Caduc : se dit d'un feuillage (ou de chaque feuille) d'un végétal destiné à tomber en cours d'année, après avoir rempli sa fonction, ce qui se produit normalement à l'approche de la mauvaise saison.

Chémotype ou chimiotype : type chimique des huiles essentielles des plantes d'une même espèce

mais différent par plusieurs critères comme la zone de récolte, la période. Il est déterminé à partir de l'analyse chimique de ses métabolites secondaires, soit de l'identité chimique du composant ayant la plus grande proportion ou composant majeur.

Composé : (1) feuille composée : c'est une feuille dont le limbe est si profondément divisé que les divisions résultantes, indépendantes entre elles, portent le nom de folioles et sont alors supportées comme autant de petites feuilles distinctes par l'axe de la feuille composée.(2) inflorescence composée : ce terme s'emploie pour désigner des grappes, des ombelles, des épis, dont l'axe principal est lui-même ramifié et dont chacune des branches ainsi nées supporte à son tour, selon les cas, une petite grappe, une ombellule, un épillet.

Diarrhée : émission, aiguë ou chronique, de selles trop fréquentes.

Endocardite : inflammation de l'endocarde.

Entérohémorragique : substance qui peut provoquer des hémorragies dans le système digestif.

Fumigation : action d'exposer à des fumées médicinales le corps ou une partie du corps.

Gastro-entérite : inflammation des muqueuses gastrique et intestinale.

Glabrescente : qui devient glabre à la longue.

Hermaphrodite : se dit d'un être vivant où sont présents les organes reproducteurs des deux sexes.

Hétéroazéotrope : azéotrope formé de deux liquides non miscibles.

Hétéroazéotropique : qui a les propriétés d'un hétéroazéotrope.

Infection nosocomiale : infection contractée au cours d'une hospitalisation, qui n'existe pas auparavant, ni pendant les 48 premières heures à l'hôpital.

Inflorescence : mode de regroupement des fleurs sur une plante. Les principaux types d'inflorescence sont : grappe, épi, ombelle, capitule, cyme, corymbe.

Méningite : inflammation des méninges et du liquide cérébrospinal qu'elles contiennent entre leurs feuillets.

Moiré : qui a des reflets changeants et l'apparence ondée de la moire.

Neurotoxique : toxique pour le système nerveux.

Névralgie : douleur provoquée par une irritation ou par une lésion d'un nerf sensitif.

Oblongue : plus long que large.

Ombrophile : se dit d'un végétal qui aime la pluie.

Panicule : inflorescence indéfinie (et donc terminée par un bourgeon) et dérivée de l'épi et que les fleurs, isolées ou groupées en épillets, sont pédonculées.

Pennée : se dit d'une feuille ou d'une fronde dont les nervures sont disposées de part et d'autre d'un pétiole commun comme les barbes d'une plume.

Photosensibilisante : substance qui provoque une sensibilisation de la peau au rayonnement solaire.

Phytoalexine : substance produite par la plante en réponse à une infection par un agent pathogène.

Phytotoxique : toxique pour la plante.

Pleurésie : inflammation aiguë ou chronique de la plèvre, avec ou sans épanchement de liquide dans la cavité pleurale. Généralement, la pleurésie est la conséquence d'une infection générale, une broncho-pneumonie et parfois chez les sujets âgés, d'une tuberculose...

Pollinisateur : insecte qui pollinise les fleurs en transportant du pollen des étamines jusqu'aux stigmates.

Polyplioïdie : quantité excessive de chromosomes dans le noyau d'une cellule.

Pubérulent : se dit d'un organe faiblement pubescent.

Pubescent : couvert de poils fins et courts. S'oppose à glabre.

Septicémie : état infectieux généralisé, dû à la dissémination d'un germe pathogène dans tout l'organisme, par l'intermédiaire du sang.

Substance allélochimique : un métabolite secondaire éliminé par un être vivant, plante ou animal, et qui agit sur d'autres êtres vivants d'une autre espèce.

Tensioactifs ou émulsionnants : molécules amphiphiles ayant deux parties de polarité différente, l'une lipophile et apolaire, l'autre hydrophile et polaire. Les tensioactifs se disposent à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huileuse. Ils permettent ainsi la liaison entre les deux phases en modifiant leurs tensions superficielles et empêchent de ce fait le rassemblement des gouttelettes dispersées et les phénomènes de coalescence.

Totum (sing.) ou tota (plur.) : (1) ensemble des molécules entrant dans la composition de la plante. (2) Ensemble moléculaire complexe et cohérent, spécifique d'une espèce végétale bien définie par son génome, issu de l'un ou de plusieurs de ses organes à l'aide d'une méthode d'extraction appropriée. (3) Intégralité des constituants d'une huile essentielle.

Toxi-infection alimentaire : ingestion massive de bactéries et de toxines dans l'aliment. C'est une infection digestive contractée par ingestion d'aliments souillés par différents microorganismes.

Tropophile : se dit d'un végétal présentant un cycle de défoliation pendant une période sèche.

Vermifuge : se dit d'un remède qui a la propriété d'expulser les vers intestinaux

Xérophile : se dit en matière d'habitat d'une plante capable de vivre dans des conditions de sécheresse accusée.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AUF : Agence Universitaire de la Francophonie

BLSE : Bétalactamase à Spectre Élargi

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

DL₅₀ : Dose léthale 50 %

FOFIFA : Foibem-pirenena ho an'ny Fikarohana momba ny Fampandrosoana ny Ambanivohitra

GME : Gentamycine

HC : huile complète

HE : huile essentielle

INRA : Institut National de Recherches Appliquées

IPP : diphosphate d'isopentenyle

MBO : 2-méthyl-3-buten-2-ol

MEP : 2-C-méthyl-D-érythritol 4- phosphate

PER : Pôle d'Excellence Régional

REC : huile recomposée

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

TE : Tétracycline

tr : trace

UFC : Unit Formating Colony

WHO : World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Quelques exemples de toxicité des huiles essentielles	17
Tableau 2 : Détail des échantillons d'huiles essentielles	18
Tableau 3 : Reconstitution des huiles essentielles	19
Tableau 4 : Caractéristiques des microorganismes-tests	20
Tableau 5 : Diamètre (mm) du halo d'inhibition des huiles essentielles et des antibiotiques de références	30
Tableau 6 : Comparaison des échantillons conservés au FOFIFA Ambatobe et à l'Université d'Antananarivo Ankatso.....	33
Tableau 7 : Activité des échantillons d'huile essentielle dans deux milieux de culture	34
Tableau 8 : Comparaison des propriétés des huiles essentielles en fonction des lieux de conservation	35
Tableau 9 : Valeurs de la CMI et de la CMB des huiles essentielles exprimées en μ l/ml	37
Tableau 10 : Diamètre des halos d'inhibition (mm) selon le protocole des microatmophères	42

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Répartition géographique de <i>Cedrelopsis grevei</i>	4
Figure 2 : Un pied de <i>Cedrelopsis grevei</i>	5
Figure 3 : Représentation de l'isoprène et du diphosphate d'isopentenyle	8
Figure 4 : Voie métabolique des terpénoïdes et des composés aromatiques	9
Figure 5 : Halo d'inhibition provoqué par CG 4 sur <i>Vibrio harveyi</i>	31
Figure 6 : Comparaison des tota issus de différentes régions	32
Figure 7 : Comparaison de l'activité des tota	39
Figure 8 : Étude de l'effet bactéricide des huiles essentielles	40

INTRODUCTION

Les plantes médicinales et les plantes aromatiques en particulier sont utilisées depuis les temps immémoriaux pour soigner diverses maladies humaines. Les huiles essentielles sont, par exemple, connues pour leurs vertus thérapeutiques et sont des remèdes courants en médecine traditionnelle. La fumigation des personnes malades est en effet l'une des plus anciennes techniques thérapeutiques. En France, il a été remarqué que les ouvriers parfumeurs et tanneurs, qui étaient quotidiennement en contact avec des huiles essentielles, résistaient mieux aux épidémies de toutes sortes (Piochon, 2008). Mais la découverte des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire. L'utilisation clinique des antibiotiques, dès la fin de la première moitié du XX^{ème} siècle, a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne (Rhayour, 2002).

Cependant, l'utilisation massive des antibiotiques en médecine animale et humaine a entraîné l'apparition de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Depuis une dizaine d'années, le type *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou SARM est devenu l'une des causes d'infections graves les plus communes (Tremblay, 2008). Selon Buruoa (2009) la résistance des Entérococques comme *Enterococcus faecalis* aux glycopeptides est un problème grave qui réduit les possibilités de traitement et risque de se transmettre aux *Staphylococques*. Croizé (2011) a affirmé qu'*Escherichia coli* est l'espèce la plus concernée par l'émergence des bétalactamases à spectre élargi ou BLSE.

Dans le cadre de la sécurité sanitaire des denrées alimentaires, l'acquisition des facteurs de résistance par les bactéries responsables des intoxications alimentaires constitue un problème majeur pour la santé publique. À titre d'exemple, plus de 5000 cas par an d'infection à *Escherichia coli* entérohémorragique, souvent fatale sont enregistrés dans le monde. Les nourrissons, les enfants et les personnes âgées sont les plus touchés (WHO, 2002 ; Burt *et al.*, 2005). Récemment, en Allemagne, *Escherichia coli* a été à l'origine d'une fulgurante épidémie. La bactérie a été isolée sur des graines germées produites dans une exploitation agricole en Basse-Saxe (Allemagne du Nord). Selon les données publiées par le Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies, 3507 personnes ont été contaminées en Europe (majoritairement en Allemagne), 837 ont développé un syndrome hémolytique et urémique caractérisé par des troubles rénaux graves, 38 personnes ont décédé en Allemagne et une en Suède (INRA, 2011).

Face au problème de la résistance des bactéries, l'utilisation des huiles essentielles semble être une alternative fiable aux antibiotiques. La grande diversité de leurs composants empêche les microbes d'organiser leur résistance surtout lorsque les huiles essentielles sont associées entre elles. Ainsi, les huiles essentielles sont préconisées principalement pour leurs propriétés bactéricides et bactériostatiques mais aussi pour augmenter les défenses naturelles du malade,

INTRODUCTION

notamment vis-à-vis des virus (Degryse *et al.*, 2008). Les huiles essentielles sont de ce fait d'excellents candidats pour faire face aux difficultés rencontrées dans le traitement des maladies exigeant la destruction des germes pathogènes des patients immunodéprimés (Rhayour, 2002).

D'après les données recueillies dans la littérature concernant l'utilisation empirique des plantes aromatiques malgaches, il apparaît que l'espèce endémique *Cedrelopsis grevei* est une plante très connue et dotée de vertus extraordinaires (Constantin & Poisson, 1908 ; Guéneau *et al.*, 1975 ; Blaser *et al.*, 1993 ; Gauvin *et al.*, 2003 ; Randevoson, 2004 ; Dongock Nguemo, 2008 ; Rakotoarison, 2008). Cependant, peu d'études biologiques approfondies existent sur ses huiles à notre connaissance. Ainsi, dans le cadre du projet PER/AUF intitulé " Valorisation de la biodiversité végétale de Madagascar et des Comores pour la sécurité des aliments : identification des plantes, criblage et caractérisation des molécules actives ", nous avons initié l'étude des propriétés antibactériennes de l'huile essentielle de l'écorce de *Cedrelopsis grevei* une plante endémique Malgache. En effet, ce projet vise à chercher de nouvelles alternatives aux antibiotiques et de nouvelles propriétés nutritionnelles des plantes endémiques. Même si des études sur la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante a révélé l'existence de molécules originales, très peu d'étude sur leurs propriétés biologiques a été effectuée.

Dans ce contexte, le présent mémoire est donc axé sur l'étude des propriétés antibactériennes des huiles essentielles de l'écorce de *Cedrelopsis grevei*. L'objectif est de déterminer si les huiles essentielles ont une activité antibactérienne intéressante et s'il existe une variation de cette activité en fonction de la zone de récolte et du temps d'extraction. Pour cela, les propriétés antibactériennes des fractions d'huiles essentielles et de leurs tota obtenus par hydrodistillation ont été étudiées pour quatre zones de récolte du matériel végétal.

Les détails de cette étude sont consignés dans ce mémoire. Après l'introduction, la première partie est consacrée à la synthèse bibliographique qui résume les généralités sur *Cedrelopsis grevei* et les huiles essentielles. La seconde partie décrit les matériels et les méthodes que nous avons utilisés. La troisième partie est réservée aux résultats obtenus et leurs interprétations. Ces résultats sont discutés dans la quatrième partie qui est suivie de la conclusion et des perspectives de l'étude.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 GÉNÉRALITÉS SUR *Cedrelopsis grevei*

I.1.1 PRÉSENTATION DE LA PLANTE

Le genre *Cedrelopsis* de la famille des Rutaceae élargie comprend 8 espèces, toutes endémiques de Madagascar (Dongock Nguemo, 2008).

Parmi les huit espèces d'arbustes et de grands arbres (Leroy & Lescot, 1991), il semble que seule l'espèce la plus abondante et la plus connue, *Cedrelopsis grevei*, soit utilisée par la pharmacopée traditionnelle.

▲ Classification

Règne : VEGETAL

Embranchement : SPERMAPHYTES

Sous-embranchement : ANGIOSPERMES

Classe : MAGNOLIOPSIDA

Sous classe : ROSIDAE

Ordre : SAPINDALES

Famille : RUTACEAE

Genre : *Cedrelopsis*

espèce : *grevei*

Source : Schatz (2001)

I.1.2 DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

Cedrelopsis grevei est présent dans la savane boisée, les terrains broussailleux, la forêt secondaire et la forêt périodiquement sèche, du niveau de la mer jusqu'à 500 m d'altitude. Il pousse sur des types de sols très divers, souvent les sols sablonneux rouges ou jaunes, mais sa croissance en hauteur est meilleure dans les vallées fluviales que sur les sols des plateaux (Dongock Nguemo, 2008). Elle se rencontre dans les forêts d'épineux, les forêts tropophiles, xérophiles et ombrophiles du Sud, Sud-Ouest, Sud-Est, Ouest et Nord-Ouest de Madagascar (Randevoson, 2004). La figure 1 représente sa répartition géographique.

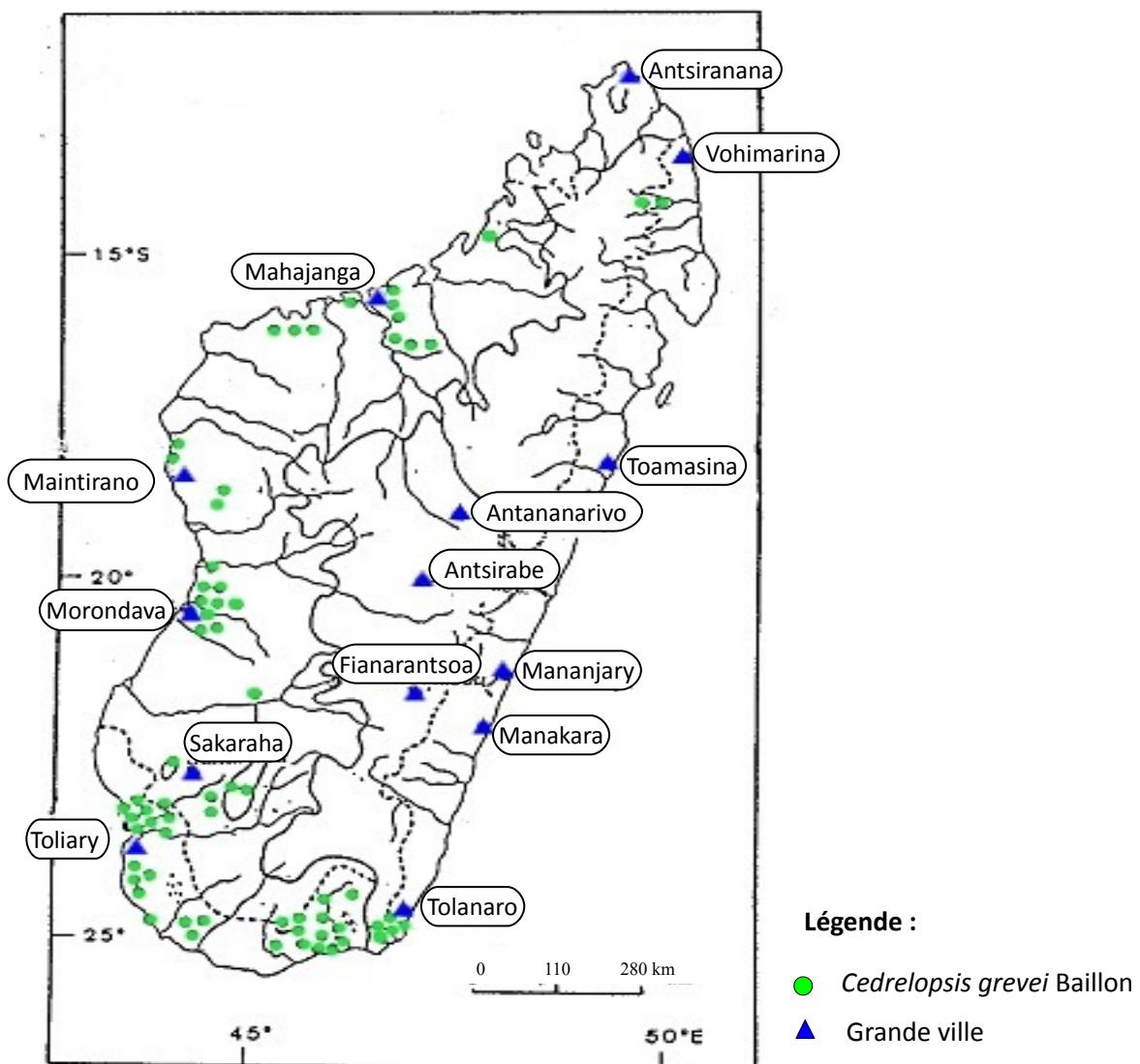


Figure 1 : Répartition géographique de *Cedrelopsis grevei* (Samisoa, 1998)

Connu sous plusieurs noms vernaculaires, *Cedrelopsis grevei* est souvent appelée Katrafay ou Katsafa¹, Katrafaina², Bemafaitra (amer), Hafatraina, Katafa, Katrafay Dobo, Katrafay lahys, Katrafay vatany, Katrafe, Matahora (ayez peur), Mantaora, Mampandry, Valomahay, Katrajay, Hafatray, Hafatraina, Bemafaitra, Dobo, Katrafaifilo, Valomahamay, Vatany, Mantara, Fatraina (Randevoson, 2004 ; Rakotomalala, 2004).

I.1.3 DESCRIPTION

L'espèce *Cedrelopsis grevei* Baillon ou *Katafa crassisepalum* est une plante pérenne. Elle se présente comme un arbuste à tiges très ramifiées de 2 à 4 mètres ou un arbre, petit ou moyen, de 5 à 15 mètres de hauteur. L'écorce des rameaux est grisâtre, rugueuse, légèrement crevassée et particulièrement aromatique. Les jeunes plantes sont pubérulentes et les adultes glabres à

¹ Nom attribué par le tribu Sakalava et par le tribu Mahafaly

² Nom attribué par le tribu Sakalava

glabrescentes. Les feuilles sont généralement caduques. Elles sont composées et pennées. Les inflorescences sont en panicules ramifiées. Les fleurs mâles, femelles ou hermaphrodites sont jaunâtres. Les fleurs hermaphrodites sont non fonctionnelles. Les fruits glabres ou pubescents, se présentent sous forme de capsules vertes qui seront noires à maturité. Les graines sont oblongues et aplatises latéralement (Constantin & Poisson, 1908). Le bois est jaune pâle très clair, légèrement moiré, lourd, très dur, à résistance naturelle élevée vis-à-vis des champignons de pourriture et des termites. La floraison a lieu entre septembre et décembre et la maturité des fruits se situe entre le mois d'octobre et janvier (Randevoson, 2004). *Cedrelopsis grevei* pousse lentement (50 cm par an maximum) pour atteindre une hauteur de 0,5–3 m à l'âge de 7 ans (Dongock Nguemo, 2008).

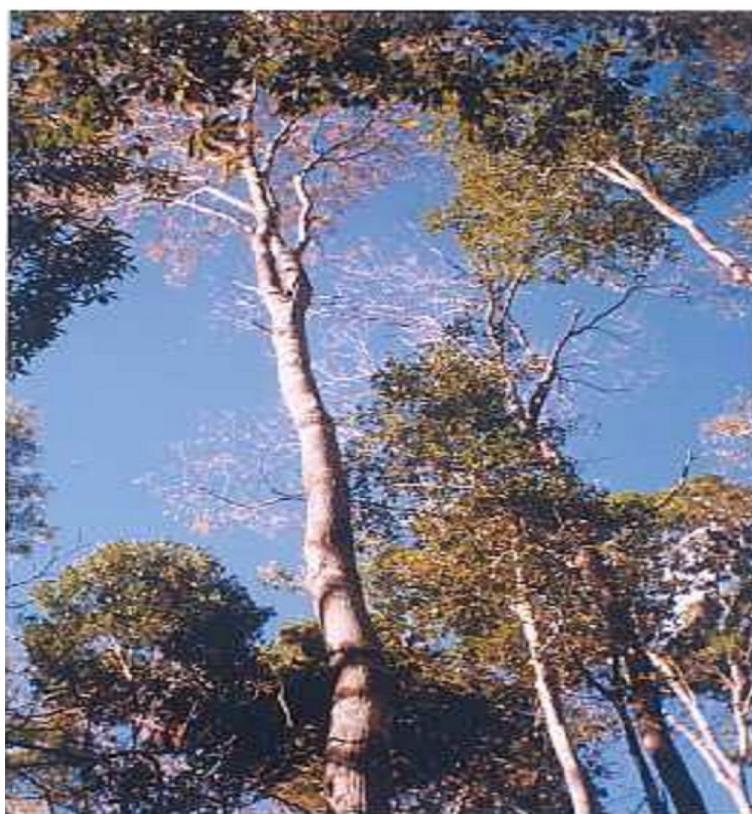


Figure 2 : Un pied de *Cedrelopsis grevei* (Rakotoarison, 2008)

I.1.4 UTILISATION

La dureté et la résistance de son bois aux attaques fongiques et d'insectes lui confèrent la réputation d'être un bois impérissable, traditionnellement utilisé pour fabriquer les tombeaux royaux Sakalava. Il est également utilisé comme bois de feu et pour faire du charbon de bois (Dongock Nguemo, 2008) et comme bois de charpente, d'embarcation et de charonnage. L'écorce du " Katrafay " sert à aromatiser le rhum local (Guéneau *et al*, 1975).

Cet arbre est exploité non seulement pour son bois mais aussi pour ses multiples propriétés

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

médicinales. En effet, à Madagascar, *Cedrelopsis grevei* est l'un des arbres forestiers les plus importants que l'on connaisse pour ses usages médicinaux. La plante entière (écorce, bois, tiges, feuilles, graines) est utilisée sous différentes formes (décoction, infusion, onguents, huiles essentielles) dans la pharmacopée traditionnelle malgache (Rakotomalala, 2004 ; Dongock Nguemo, 2008).

L'utilisation ethno-médicale la plus connue du "Katrafay" est relative à ses activités tonifiante, fortifiante, stimulante générale et aphrodisiaque. Les feuilles sont utilisées contre la fragilité capillaire, les maux de tête, de gorge et de reins. En fumigation, elles constituent un remède contre les névralgies. Les graines sont aussi utilisées pour traiter les ulcères ; elles possèdent également des propriétés vermifuges. Les tiges servent à traiter la blennorragie. L'écorce est tonifiante et cicatrisante et est utilisée contre les toux, les diarrhées, l'asthénie, les fièvres, les rhumatismes, les affections gastro-intestinales et le diabète (Randevoson, 2004).

Les huiles essentielles de tiges et d'écorce sont connues pour leurs propriétés antirhumatismale, anti-inflammatoire, antibiotique, antifongique et antivirale. De même, les huiles essentielles de feuilles et d'écorce sont utilisées comme remèdes défatigants, dynamisants et décontractants (Rakotomalala, 2004).

I.1.5 RÉSUMÉ DES ÉTUDES SUR LES HUILES ESSENTIELLES DE *Cedrelopsis grevei*

▲ Étude chimique

Selon la littérature, il s'est avéré que la composition chimique de l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* est extrêmement variable. Toutefois, ces données concordent sur le fait que cette huile essentielle est complexe par sa richesse en sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés. Environ 80 % de ces molécules ont été identifiées (Cavalli, 2003 ; Rakotomalala, 2004 ; Razafimamponjison, 2007 ; Dongock Nguemo, 2008 ; Rakotobe *et al.*, 2008). Ces résultats sont résumés en annexe 1.

▲ Étude biologique

Malgré le fait que le "Katrafay" soit largement utilisé de façon empirique à Madagascar, à notre connaissance, une seule étude sur les activités biologiques de son huile essentielle a été effectuée. Ainsi, dans ses travaux sur *Cedrelopsis grevei*, Rakotomalala (2004) a entrepris l'étude de l'activité antimicrobienne et pharmacologique des huiles essentielles de l'écorce de la plante.

I.2 GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10 % seulement sont dites "aromatiques", c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent d'infimes quantités d'essences

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

aromatiques qui sont responsables du parfum que dégagent les végétaux. La majorité de ces plantes sont des spermaphytes (Randriantsoa, 2004 ; Pibiri, 2006).

1.2.1 DÉFINITION, PARTICULARITÉ ET LOCALISATION

- Définition

Le terme " essence " désigne la sécrétion naturelle des cellules spécialisées d'une plante aromatique. L' huile essentielle est issue de cette essence.

D'une manière générale, l'appellation de l'essence extraite de la plante diffère par la méthode d'extraction et des produits qui sont coextraits. En se basant sur la définition de la Commission de la Pharmacopée Européenne (AFSSAPS, 2008), une huile essentielle est de l'essence extraite de la plante qui est un " 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 ".

- Particularité

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits " aromatiques " en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique (Pibiri, 2006).

L'aspect généralement liquide à température ambiante des huiles essentielles ainsi que leur volatilité sont les principaux caractères les distinguant des huiles fixes. Les huiles essentielles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînables à la vapeur d'eau, très peu solubles dans l'eau. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau. Les huiles essentielles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière. Cependant, après distillation, la composition de l'huile essentielle est légèrement différente de celle de l'essence de départ suite à une hydrolyse et oxydation, et à des effets de la chaleur et de l'oxygène (AFSSAPS, 2008 ; Wikiphoto, 2010).

- Localisation

Les essences se rencontrent dans toutes les parties de la plante : écorce, feuilles, sommités fleuries, racines, rhizomes, fruits, tiges ou bois. Ce sont des métabolites secondaires dont la composition chimique peut varier d'un organe à l'autre pour une même espèce végétale.

La synthèse et l'accumulation des essences se font généralement au niveau de structures histologiques spécialisées. Ces structures sont souvent situées sur, ou à proximité de la surface de la plante et elles varient selon les familles botaniques. Les Lauracées, Magnoliacées et les

Pipéracées秘ètent les essences par l'intermédiaire de leurs poils sécréteurs externes. Dans le cas des Myrtacées et des Aurantiacées ce sont les poches sécrétrices alors que pour les Ombellifères et les Conifères ce sont les canaux sécréteurs (Rakotomalala, 2004 ; Malecky, 2008).

I.2.2 COMPOSITION CHIMIQUE

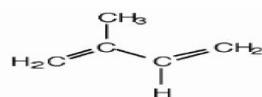
Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plus d'une centaine de composés (Cavalli, 2002). Cependant, les constituants peuvent être classés dans les trois catégories suivantes : les terpénoïdes, les composés aromatiques et les composés minoritaires de différentes familles chimiques.

▲ Les terpénoïdes ou isoprénoïdes

Les isoprénoïdes sont les composés majoritaires de la plupart des huiles essentielles. Ils se présentent sous forme d'hydrocarbures ou de dérivés oxygénés (alcool, cétones, phénols, ...) et se caractérisent par des formes de molécule insaturées, cycliques ou acycliques (Bruneton, 1993).

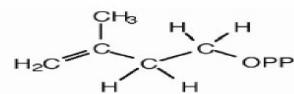
La classification des terpénoïdes est fonction du nombre d'unités qu'ils contiennent. On distingue les hémiterpènes (C_5) dont l'isoprène est le principal représentant (C_5H_8), les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les triterpènes (C_{30}) et les tétraterpènes (C_{40}). L'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiène)(I), le MBO (2-méthyl-3-buten-2-ol (I)) et les monoterpènes sont considérés comme volatils et les sesquiterpènes comme semi-volatils (Kesselmeier & Staudt, 1999).

Sur le plan biogénétique, les terpénoïdes sont formés par l'assemblage de plusieurs unités isopréniques (5 atomes de carbone) appelé isoprènes. Cet isoprène (I) est à la base de la "règle isoprène" énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen *et al.* en 1958, puis par Bloch *et al.* en 1959. Cette règle considère le diphosphate d'isopentenyle (II), désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique ; d'où le nom d'isoprénoïdes.



I

Isoprène



II

diphosphate d'isopentenyle

(= methylbutadiène = 2-methyl 1,3-butadiène)

Figure 3 : Représentation de l'isoprène et du diphosphate d'isopentenyle (Lamarti, 1994)

Le schéma général communément admis aujourd'hui propose que, chez les végétaux

supérieurs, les unités isopréniques sont synthétisées par deux voies métaboliques : dans le cytosol et le réticulum endoplasmique par la voie du mévalonate et dans les plastes par la voie du MEP (2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate). Des inter-croisements entre ces deux voies sont répandus en particulier du cytosol vers les plastes (Sharkey, 1991 ; Rohmer, 1999 ; Lavois, 2008).

La voie du mévalonate fournirait des unités isopréniques pour la formation des sesquiterpènes tandis que les monoterpènes et les diterpènes sont formés à partir des précurseurs issus de la voie du MEP (Lichtenthaler, 2000 ; Lavois, 2008).

Les isoprénoides volatils obtenus peuvent également subir des transformations permettant la formation d'autres composés (hydroxylation, oxydations (inter-conversion alcools/aldéhydes), méthylation des groupes hydroxyles et carboxyles, acylation...) (Lavois, 2008).

▲ Les composés aromatiques

Les composés aromatiques sont des dérivés du phénylpropane d'où leur appellation " phénylpropanoïdes ". Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpènes bien qu'il existe quand même des huiles essentielles à forte teneur en composés aromatiques comme l'eugénol du girofle.

Ce sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont formés à partir de la voie de l'acide shikimique.

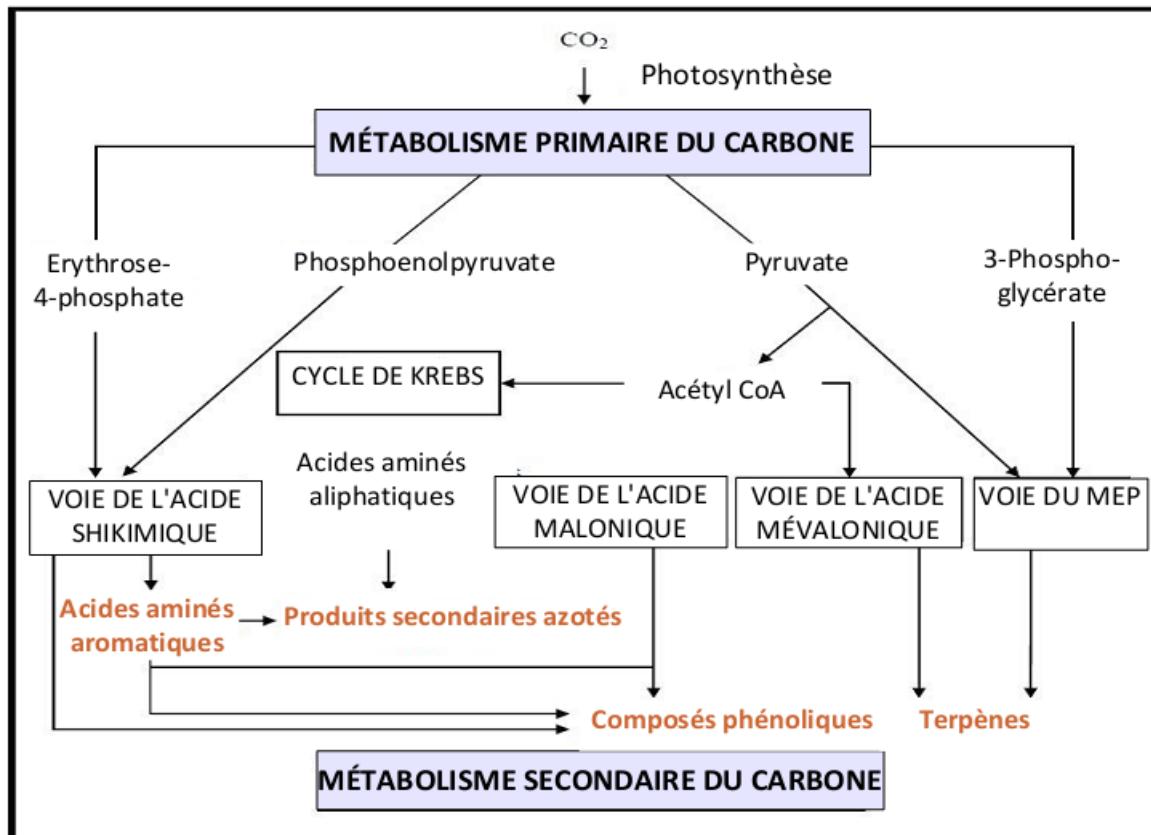


Figure 4 : Voie métabolique des terpénoïdes et des composés aromatiques (Ebbs, 2005)

▲ Les autres composés

Lors de la préparation des huiles essentielles, certains composés aliphatiques, de faible poids moléculaire, sont entraînés lors de l'hydrodistillation (carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters...)(Bruneton, 1993).

I.2.3 RÔLE PHYSIOLOGIQUE

La fonction exacte des essences dans la physiologie de la plante reste encore mal connue. Toutefois, quelques rôles ont pu être définis.

- Pollinisation :

Les composés volatils libérés des fleurs et des fruits servent à attirer les polliniseurs (Knudsen *et al.*, 2006). Ces composés sont essentiellement des dérivés aromatiques et parfois des isoprénoïdes (Reinhard *et al.* 2004 ; Lavois, 2008).

- Allélopathie :

Certaines plantes produisent des substances allélochimiques qui tuent les microorganismes (bactéries, virus et champignons) et/ou des autres plantes ou inhibent leur croissance (Balandrin & Kloche, 1988). Ces substances phytotoxiques peuvent être des herbicides, des phytoalexines (inhibiteurs des microbes) et inhibiteurs de la germination des graines. À titre d'exemple, les monoterpènes diminuent la respiration mitochondriale, les sesquiterpènes diminuent la photosynthèse et les monoterpènes oxygénés seraient utilisés comme bio-herbicides (Lavois, 2008).

- Autres rôles :

Certaines molécules seraient impliquées dans des mécanismes divers. L'isoprène et les monoterpènes améliorent la tolérance face aux stress dus à de fortes chaleurs, de fortes lumières ou aux stress oxydatifs (lié à l'action de substances chimiques oxydatives)(Lavois, 2008). Certains terpénoïdes seraient des phytohormones. Exemple : L'isoprène, à forte concentration accélère la floraison chez *Arabidopsis* (Terry *et al.*, 1995).

I.2.4 FACTEURS DE VARIABILITÉ

Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont les principaux constituants des essences. Ils sont associés en nombre et en proportion très variable de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle (Ganou, 1993). Hormis cette caractéristique chimique, deux facteurs principaux sont à l'origine de la variabilité des essences et des huiles essentielles résultantes.

I.2.4.1 Facteurs d'ordre technologique

Les conditions de transport, de séchage et de stockage peuvent engendrer des dégradations enzymatiques. Les changements les plus importants interviennent lors de l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (pH, température) et de la durée d'extraction (Ganou, 1993).

D'autres facteurs tels que les traitements auxquels le matériel végétal est soumis avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (Ochoa, 2005).

I.2.4.2 Facteurs d'ordre naturel

Ces facteurs peuvent être intrinsèques, spécifiques de la génétique de la plante ou extrinsèques, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante.

▲ Facteurs intrinsèques :

Sur le plan génétique, les variations peuvent être attribuées à des hybridations, à un polymorphisme génétique ou à des mutations (polyploïdie, aberration chromosomique). En général, la modification chimique de l'huile essentielle chez un même génotype est liée à celle de la teneur. Par exemple, les rendements en huiles essentielles de *Daucus carota* et de *Foeniculum vulgare* varient respectivement de 0,5 à 7,16 % et de 1,3 à 9,8 % (Ganou, 1993).

Le potentiel et la composition de l'essence dépendent de l'organe producteur. Ainsi les racines, les fleurs, les feuilles peuvent produire des huiles essentielles différentes (Benachour *et al.*, 1998). Ils dépendent également de la nature des glandes sécrétrices. Selon Heinrich *et al.* (1983), les poches situées dans l'exocarpe ou dans l'endocarpe des fruits de *Poncirus trifoliata* génèrent des essences qui diffèrent en monoterpènes et sesquiterpènes. Chez le fenouil, la composition chimique de l'huile essentielle de la racine varie selon qu'elle est issue des canaux sécrétateurs du xylème ou de ceux du cortex. L'essence du xylème comporte de l'α pinène, composé non généré dans le cortex (Ganou, 1993).

Des variations en fonction du cycle végétatif ont été également observées. La biosynthèse des principes odorants évolue lors de la maturation de la plante. Elle est prédominante pendant les périodes de forte croissance ou pendant celles correspondant à des activités métaboliques intenses telles que la floraison ou la maturation du fruit (Ganou, 1993).

▲ Facteurs extrinsèques

Les composants aromatiques d'une plante peuvent varier en fonction du biotope : ensoleillement, conditions climatiques, le type de sol. La variation des composants aromatiques

induit inévitablement des variations au niveau des propriétés chimiques de la plante et de l'huile essentielle que l'on extrait. En effet, pour une même variété botanique, il existe plusieurs chémotypes c'est-à-dire des plantes fournissant des huiles essentielles de composition chimique différente (Nerlet, 1993). Exemple : on compte pour *Thymus vulgaris*, espèce morphologiquement homogène sept chimiotypes différents (Bruneton, 1993).

I.2.5 PROCÉDÉS D 'EXTRACTION

I.2.5.1 La distillation

La distillation est un procédé de séparation basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée. La technique implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes (Ganou, 1993). On parle de distillation simple ou fractionnée lorsqu'il s'agit de liquides miscibles. On peut également procéder à la distillation de liquides non miscibles (Ochoa, 2005) tel est le cas de l'extraction par distillation des huiles essentielles. Parmi les plus couramment utilisées on peut citer l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur.

I.2.5.1.1 L'hydrodistillation

L'hydrodistillation est la technique la plus courante pour l'extraction des huiles essentielles. Elle fut découverte par les Chinois il y a environ 2000 ans avant Jésus-Christ. L'hydrodistillation s'est ensuite répandue dans tout le monde antique (Ganou, 1993). Cette méthode d'extraction s'est largement développée au fil des années mais l'hydrodistillation classique est encore la plus utilisée jusqu'à présent.

Lors de l'hydrodistillation classique, la matière première est immergée dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Les poches à essences, soumises à l'action de l'humidité et de la chaleur, éclatent. Les vapeurs d'eau entraînent avec elles l'essence. Alors, le mélange distille. Entraîné vers le système de refroidissement, le mélange se condense. À la sortie du condenseur, il y a séparation des deux liquides par différence de densité. Un essencier ou un vase florentin est également utilisé à cet effet. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage. (Morin *et al.* 1985 ; Smadja, 2001).

I.2.5.1.2 L'hydrodiffusion

Le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau mais avec la vapeur. Cependant le principe consiste à faire circuler celle-ci de haut en bas au travers du végétal. Dans ces conditions, les cellules végétales sont soumises à une action "osmotique" du flux de vapeur d'eau. L'extrait associé à l'eau condensée au contact du végétal s'écoule vers un collecteur. Ce procédé évite grand

nombre d'artéfacts liés à une température excessive. Il donne des produits de qualité, riches en composés oxygénés, de faible volatilité, qui sont généralement les plus recherchés (Smadja, 2001).

I.2.5.1.3 Entraînement à la vapeur

Dans l'entraînement direct à la vapeur d'eau, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic. Ce procédé favorise le traitement des matières végétales sensibles qui pourraient souffrir d'une longue ébullition. Cette méthode permet d'extraire la quasi-totalité des constituants aromatiques à partir de la matière première. Il s'agit d'une codistillation d'eau et de produits odorants volatils ; ces derniers étant entraînés par des aérosols de vapeur d'eau avant leur propre point d'ébullition, ce qui permet de les recueillir intacts. Le mélange hétéroazéotropique eau/composé organique distille généralement à une température inférieure à 100°C (Ganou, 1993 ; Smadja, 2001).

I.2.5.1.4 Étude de la cinétique de distillation

L'étude de la cinétique de distillation est une pratique courante pour les distillateurs ; cette étude est de ce fait propre à l'extraction des huiles essentielles par distillation. Il s'agit de prélever à chaque heure de distillation les huiles essentielles afin d'analyser son évolution quantitative et qualitative. Le but de ce travail est de déterminer la durée adéquate de la distillation. La détermination de cette durée d'extraction est basée sur trois critères : La consommation minimale d'énergie (eau, bois de chauffe), l'obtention du maximum de rendement et le recueil des huiles essentielles de meilleure qualité (Raobelison, 2004).

Il faut aussi signaler que la cinétique de distillation n'est pas la même pour les constituants d'une huile essentielle (carbures, alcools, cétones,...), la composition du distillat varie en fonction du temps (Bruneton, 1999).

I.2.5.2 L'expression

Cette technique s'applique uniquement aux huiles essentielles d'agrumes (Hespéridées) telles que le citron, l'orange. Ne supportant pas la chaleur, les huiles essentielles de ces végétaux sont aussi altérables par l'action de la vapeur d'eau. L'extraction du péricarpe frais des agrumes s'effectue par différents modes d'expression. Généralement c'est le procédé de scarification mécanique et entraînement de l'huile essentielle par un courant d'eau qui est utilisé dans l'industrie. L'essence est ensuite séparée par décantation (Bendriss, 2003).

I.2.5.3 Les autres procédés d'extraction

▲ Enfleurage et macération

Ces techniques sont réservées aux organes végétaux particulièrement fragiles comme les fleurs. On obtient par la suite une pommade florale qui est un " corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs, soit par " enfleurage à froid " (diffusion des composés odorants des fleurs dans le corps gras), soit par " enfleurage à chaud " (digestion ou immersion des fleurs dans le corps gras fondu) " (ISO 9235 : 1997).

L'enfleurage consiste en la mise en contact des pétales et d'un corps gras sur des châssis superposés à température ambiante. Les fleurs sont ensuite renouvelées 10 à 15 fois jusqu'à l'obtention d'une pommade de plus en plus parfumée. Une fois gorgés de parfums, les corps gras sont filtrés au travers de tissus de lin ou de coton. Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées (Bendriss, 2003).

En se basant sur le principe selon lequel la chaleur augmente le pouvoir absorbant des graisses utilisées, la macération se distingue de l'enfleurage par l'immersion des fleurs fraîchement cueillies et constamment renouvelées dans un bac de graisse chaude jusqu'à saturation de celle-ci. La graisse est ensuite épuisée par l'alcool absolu.

▲ Extraction par des solvants organiques

Ce procédé consiste à épuiser la matière végétale de ses constituants odorants au moyen d'un solvant. Ceci est lié à la propriété des essences d'être solubles dans la plupart des solvants organiques, particulièrement les hydrocarbures aliphatiques (hexane, éther de pétrole,...) qui sont les plus utilisés. La séparation de l' extrait et du solvant se fait par évaporation à l'évaporateur rotatif (Mohamed, 1997). La qualité de l'extrait aromatique obtenu est fonction de la technique et de la nature du solvant utilisé.

Les résinoïdes sont des extraits à odeur caractéristique obtenus à partir d'une matière sèche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux (ISO 9235 : 1997).

Les concrètes sont des concentrées aromatiques sous forme cireuse issues de la matière végétale fraîche. Ces concentrées sont obtenues par extraction de la plante naturelle fraîche, habituellement avec les solvants organiques non polaires, volatils, non aqueux (ex : hexane, dichlorométhane), évaporés à température modérée sous vide (Ranaivosoa, 2007).

Les oléorésines sont des substances obtenues par extraction habituellement d'épice naturelle, qui utilise des solvants sélectionnés pour enlever les composants vitaux. Les oléorésines contiennent de l'huile essentielle plus les autres composants non volatils importants qui

caractérisent saveur, couleur, et autres aspects de la matière première initiale. Ce sont des substances visqueuses ou semi-solides. La méthode d'extraction présente des analogies avec celles des concrètes (Ranaivosoa, 2007).

Les alcoolats sont des distillats résultant de la distillation d'une matière première d'origine naturelle en présence d'éthanol de titre variable (ISO 9235 : 1997).

Les absolues sont des produits fortement concentrés obtenus à partir des concrètes, d'une pommade florale ou d'un résinoïde. Pour cela, on effectue une extraction à l'éthanol suivie d'un refroidissement rapide (vers – 20°C) pour provoquer la précipitation des cires. Après filtration, centrifugation et évaporation sous vide du surnageant, les cires, terpènes, sesquiterpènes ainsi que les autres matières inodores sont éliminées et on obtient des absolues très odorantes (Ganou, 1993 ; Mohamed, 1997).

Contrairement aux huiles essentielles obtenues par expression ou distillation à la vapeur d'eau, les absolues ne sont pas utilisables en aromathérapie par voie interne à cause des infimes traces résiduelles de solvants (Paris & Hurabielle, 1986).

▲ Extraction par CO₂ supercritique

Cette technique est basée sur le fait que certains gaz, notamment le CO₂, dans des conditions critiques ou supercritiques, présente un pouvoir de dissolution accru vis – à – vis de divers composés tels que les huiles essentielles, les arômes, les colorants naturels, les graisses ...

Sous pression et à température supérieure à 31°C, le CO₂ se trouve dans un état "supercritique". La matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant (Bernard *et al.*, 1988).

I.2.5.4 Mode de conservation

La relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation difficile. Les risques sont multiples : photoisomérisation, photocyclisation, coupure oxydative de propénylphénol, peroxydation de carbures et décomposition en cétone et alcool (limonènes). Ces dégradations peuvent modifier les propriétés et/ou mettre en cause l'innocuité du produit (AFNOR NFT 75-001-[1996]).

Toutefois, l'huile essentielle se conserve parfaitement bien pendant quelques années si certaines conditions sont respectées : l'huile doit être placée à l'abri de la chaleur et de la lumière.

Des flacons en verre teinté sont aussi nécessaires à la bonne conservation des huiles essentielles, car des incompatibilités sérieuses peuvent exister avec certains conditionnements en matières plastiques (Bendriss, 2003 ; AFSSAPS, 2008). Selon Lazouni *et al.* (2007), la basse température contribue à la conservation de la stabilité de l'huile essentielle.

Ainsi, les huiles essentielles sont mis dans des flacons en verre teinté fermé hermétiquement puis conservés à +4°C. Ce mode de conservation serait aussi applicable pour les produits obtenus par les autres produits d'extraction (concrètes, oléorésines, absolues ...).

I.2.6 UTILISATION

Les huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités divers. L'utilisation des huiles essentielles est en constante évolution.

▲ En alimentation

Les huiles essentielles sont utilisées en tant que boissons, assaisonnements ou encore colorants. Guenther (1948) a même décrit leur rôle dans la digestion. En effet, l'arôme des huiles essentielles stimule la sécrétion des enzymes digestives gastriques et intestinales. Les huiles essentielles sont aussi utilisées comme conservateurs.

▲ En cosmétologie

Les huiles essentielles sont utilisées pour la fabrication de produits de beauté, parfums et articles de toilette ainsi que les produits d'hygiène (Porter, 2001).

▲ En thérapeutique

L'utilisation des plantes aromatiques et des huiles essentielles en thérapeutique remonte aux temps les plus anciens. Actuellement, les huiles essentielles sont préconisées principalement pour leurs propriétés bactéricides et bactériostatiques, mais aussi pour augmenter les défenses naturelles du malade, notamment vis-à-vis des virus. Mais cela n'exclut pas pour autant les autres utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : certaines huiles essentielles sont des analgésiques ; d'autres sont des anti-enzymatiques ; sédatifs ou stimulants (Belaïche, 1979 ; Duriez, 2000).

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. Des investigations sur le potentiel anticancéreux des huiles essentielles ont même été rapportées. L'huile essentielle d'ail (*Allium sativum*), par exemple, est une bonne source de composés sulfurés reconnus pour leur effet préventif contre le cancer (Maruyama *et al.*, 2005 ; Pyun *et al.*, 2006).

▲ Les autres usages

Les huiles essentielles sont utilisées en diffusion dans l'air ambiant pour assainir et parfumer l'atmosphère. Elles sont également utilisées comme agents détachants ou encore comme solvants dans l'industrie de la peinture (Razafindrakoto, 1988 ; Mapola, 2003).

I.2.7 TOXICITÉ DES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles sont réputées pour leur innocuité et leurs activités à large spectre. Toutefois, leur utilisation n'est pas sans risque. De plus, certaines huiles essentielles ou du moins certains de leurs composants sont réellement toxiques pour l'organisme. Le tableau 1 ci-après donne un petit aperçu des activités toxiques déjà observés chez l'homme.

Tableau 1 : Quelques exemples de toxicité des huiles essentielles (Homburger *et al.*, 1968 ; Franchomme *et al.*, 1990 ; Smith *et al.*, 2000 ; Bendriss, 2003).

HUILE ESSENTIELLE	CAUSE	MOLÉCULE EN CAUSE	ACTIVITÉ
<i>Artemisia absinthium</i>	Méconnaissance des chémotypes	α-Thujone	Neurotoxique
<i>Thymus vulgaris</i>	Application sur la peau	Thymol ou Carvacrol	Irritante
Huiles riches en cinnamaldéhyde	Application sur la peau	Cinnamaldéhyde	Allergisante
<i>Sassafras albidum</i>	Usage interne	Safrole	Inductrice de cancers
<i>Ruta chalepensis</i>	Usage interne	Inconnue	Cause des gastro-entérites intenses, vertiges, tremblements et convulsions
<i>Boldea fragrans</i>	Application sur les bébés, enfants, femmes enceintes	Dioxyde : ascaridole (DL ₅₀ = 0,13g/kg)	Neurotoxique et abortive
<i>Foeniculum vulgare</i> <i>ssp. Capillaceum</i> <i>var. dulce</i>	Usage externe et application sur les bébés, enfants, femmes enceintes	cis-, trans-Anéthole et Coumarines	Hépatotoxique et légèrement phototoxique

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1 MATÉRIELS

II.1.1 LES HUILES ESSENTIELLES

• Provenance

La collecte du matériel végétal ainsi que l'extraction de l'huile essentielle à partir de l'écorce de *Cedrelopsis grevei* ont été réalisées par le Laboratoire du FOFIFA Ambatobe. D'après les informations qui nous ont été communiquées : la plante a été récoltée au mois de septembre 2009 dans 4 zones de récolte. Deux d'Itampolo (Sud de Toliary), une de Salary (Nord de Toliary) et une de Tsaramandroso (Mahajanga). L'extraction des huiles essentielles a ensuite été effectuée au FOFIFA au mois de septembre 2009. Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation fractionnée avec un alambic de capacité 12 kg. Les détails relatifs à l'origine des échantillons sont donnés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Détail des échantillons d'huiles essentielles

Origine	Nom vernaculaire	Nom de code	Fraction
Itampolo	Filo	CG 1-1	0-3 h
		CG 2-1	0-3 h
		CG 2-2	3-6 h
		CG 2-3	6-9 h
	Dobo	CG 2-4	12-14 h
		CG 2	REC
Salary	Katrafay	CG 3-1	0-3 h
		CG 3-2	3-6 h
		CG 3-3	6-9 h
		CG 3	REC
Tsaramandroso	Katrafay	CG 4	HC (0-14 h)

REC : huile recomposée ; HC : huile complète

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le lot d'échantillons obtenu contient des fractions d'huile essentielle, des huiles essentielles recomposées (ou reconstituée) et une huile essentielle complète.

Pour obtenir les fractions, les huiles essentielles qui ont été distillées durant trois heures sont recueillies dans des contenants bien secs. On change de contenants pour recueillir les huiles essentielles qui ont été distillées durant les trois heures suivantes et ainsi de suite jusqu'à la fin de l'extraction.

Les huiles essentielles recomposées sont obtenues en recomposant les fractions d'huiles essentielles qui devaient constituer une huile complète. Pour cela, on recompose les huiles en fonction du pourcentage massique des fractions d'huile essentielle.

Tableau 3 : Reconstitution des huiles essentielles

fraction HE	Poids (g)	% massique	Huile recomposée	Poids (g)	%
CG 2-1	27,212	55,366	CG 2	49,149	100
CG 2-2	10,813	22,000			
CG 2-3	8,614	17,526			
CG 2-4	2,51	5,107			
CG 3-1	26,963	62,100	CG 3	43,419	100
CG 3-2	10,744	24,745			
CG 3-3	5,712	13,156			

L'huile complète est obtenue en faisant une distillation continue. L'huile essentielle est recueillie dans un même contenant du début jusqu'à la fin de l'extraction.

Pour simplifier, les huiles reconstituées et l'huile complète seront appelées indifféremment " totum ".

Tous les échantillons d'huiles essentielles sont mis dans des flacons en verre teinté hermétiquement fermé puis conservés à +4°C.

II.1.2 LES MICROORGANISMES

Les microorganismes utilisés sont ceux qui sont conservés et utilisés au sein du Laboratoire de Microbiologie du Département de Biochimie fondamentale et appliquée. Ce sont des cultures pures conservées à +4°C sur des géloses inclinées contenues dans des tubes vissés. Ces cultures pures sont issues des souches référencées et conservées à -20°C. Avant chaque manipulation, un repiquage sur un milieu gélosé neuf est effectué pour permettre le relancement de la croissance normale des microorganismes-tests mais aussi pour s'assurer de la pureté des souches qui ont été

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

conservées sur gélose inclinée.

Tableau 4 : Caractéristiques des microorganismes-tests (Samain *et al.*, 1987 ; Uttley *et al.*, 1989 ; Reinehart *et al.*, 1990 ; El Kouri *et al.*, 1998 ; Bornert, 2000 ; Bonhomme, 2003 ; Vimont, 2007 ; Trembaly, 2008 ; Travers, 2008 ; Raj *et al.*, 2010 ; Wikipédia, 2010)

Bactérie	Gram	Caractéristiques	Pouvoir pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	+	<ul style="list-style-type: none"> – Coque immobile dépourvue de spore et de capsule – Anaérobiose facultative préférentielle – Mésophile psychrotrophe – Neutrophile – Halotolérant 	<p>Bactérie opportuniste invasive pouvant entraîner une septicémie.</p> <p>Chez l'homme, elle est à l'origine des :</p> <ul style="list-style-type: none"> – Infections nosocomiales – Infections localisées suppurées – Diverses infections en association ou non avec d'autres bactéries.
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29 212)	+	<ul style="list-style-type: none"> – Coque immobile – Anaérobiose aéro-tolérant – Croissance en milieu hostile (température de 10 °C à 45 °C, pH=9,6) – Halophile 	<p>Bactérie opportuniste.</p> <p>Chez l'homme, elle est à l'origine des :</p> <ul style="list-style-type: none"> – Infections nosocomiales – Endocardite – Infection urinaire – Abcès intra-abdominaux – Pleurésies – Infections néonatales – Méningites
<i>Escherichia coli</i> (363)	-	<ul style="list-style-type: none"> – Bacille mobile – Aéro-anaérobiose facultatif – Mésophile – Neutrophile 	<p>Bactérie commensale mais peut devenir très pathogène et entraîner une septicémie.</p> <p>Chez l'homme elle est à l'origine de maladies diverses :</p>

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

			<ul style="list-style-type: none"> – Colite hémorragique – gastro-entérites et de diarrhées – infections urinaires, méningites.
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14 028)	-	<ul style="list-style-type: none"> – Bacille mobile – Aero-anaérobiose facultatif – Mésophile 	<p>Bactérie pathogène qui peut entraîner une septicémie. Chez l'homme elle est responsable de :</p> <ul style="list-style-type: none"> – Gastro-entérites – Toxi-infections alimentaires – Fièvres typhoïdes
<i>Vibrio harveyi</i> (ATCC 14 126)	-	<ul style="list-style-type: none"> – Bacille droit, mobile – Principalement dans les eaux de mers chaudes et les sédiments marins – Halophile – Aéro-anaérobiose – Basophile – Température optimale 32°C. 	<p>Pathogène important chez les invertébrés et certains poissons marins comme le requin</p>
<i>Vibrio fischeri</i> (ATCC 49 387)	-	<ul style="list-style-type: none"> – Bacille incurvé, mobile – Ubiquiste des océans – Halophile – Basophile 	<ul style="list-style-type: none"> – Symbiose du calmar – Pathogène de certains poissons marins causant des septicémies hémorragiques

II.1.3 LES MATÉRIELS DE LABORATOIRE

- Milieux de culture

Les milieux utilisés sont de qualité pour analyse et sont de marque Liophilchem, Becton Dickinson et Difco.

Les milieux Marine Agar, Zobell solide et Zobell liquide sont utilisés pour la culture des bactéries marines du genre *Vibrio*.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le milieu de Muëller Hinton Agar, le Poor Broth liquide et le Poor Broth solide sont utilisés pour la culture de la plupart des bactéries. La composition et le mode de préparation des milieux sont donnés en annexe 2.

- Matériels divers

Le sel de qualité pour analyse et de marque Reagent entre dans la composition de certains milieu de culture et sert à préparer de l'eau physiologique pour les suspensions bactériennes.

Le Tween 80 de marque Rectapur est un tensioactif servant à la mise en émulsion des composés hydrophobes ou de faible affinité pour l'eau. Les propriétés physiques du Tween 80 sont données en annexe 3.

Des disques d'antibiogramme de 6mm de diamètre sont utilisés pour la technique de diffusion en milieu gélosé.

Les antibiotiques de référence de marque Bio-rad sont fournis sous forme de disques standardisés de 6 mm de diamètre.

Des filtres Micropore de marque Sartorius (modèle Minisart, 0,20 µm de diamètre) sont utilisé pour filtrer le Tween 80.

Les micropipettes, cônes et porte-cônes de différents calibre, les verreries, l'anse d'inoculation, l'alcool, l'étuve, l'autoclave, le bec Bunsen, la plaque chauffante, le Vortex, le bain-marie agité sont utilisés durant toutes les manipulations.

- Précautions

Avant chaque manipulation, les milieux préalablement préparés, les cônes et porte-cônes sont stérilisés à l'autoclave durant 20 min à 121°C sous une pression de 2 bars. Après un lavage au savon et un bon rinçage à l'eau, les verreries sont placées à l'étuve durant 120 min à 120°C.

La zone de manipulation et ses alentours doivent être rigoureusement propres et désinfectés. Avant de manipuler, le manipulateur doit rincer ses mains avec de l'alcool 70°C après les avoir lavées avec du savon.

Les manipulations doivent être effectuées dans un espace restreint délimité par un rayon de 15 cm autour de la flamme d'un bec Bunsen et l'ouverture des tubes ou d'autres récipients toujours tournée vers la flamme.

Étant donné la fragilité des huiles essentielles, leur apport ne se fait qu'à la fin de tous les préparatifs. Elles sont ensuite remises directement dans les endroits où elles ont été stockées après leur utilisation.

II.2 MÉTHODES

Pour étudier les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*, trois méthodes ont été adoptées.

Le protocole expérimental des trois techniques est toujours précédé d'une phase de repiquage. La culture microbienne conservée à +4°C est repiquée sur un milieu gélosé adéquat coulé dans des boîtes de Pétri stériles. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* sont relancées sur le Muëller Hinton Agar. Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h. *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri* sont repiquées sur Marine Agar puis incubées à température ambiante pendant 48 h.

- Sélection des microorganismes

Le but de cette sélection est de déterminer les microorganismes sensibles qui seront utilisés dans les autres techniques. Le protocole qui a été adopté est la technique de disque diffusion pour sa rapidité et la facilité de la lecture des résultats. Toutefois, les résultats seront confirmés par la méthode de dilution.

- Sélection du milieu de culture

Le choix du milieu de culture approprié pour chaque type de manipulation est primordial pour le bon déroulement des expériences.

Étant donné la non-miscibilité ou du moins la faible miscibilité des huiles essentielles dans l'eau, on a comparé l'activité des huiles essentielles dans le milieu de culture seul a été comparée à celle dans le milieu de culture additionné du Tween 80, un agent tensioactif. Cette expérimentation a pour but de sélectionner le milieu adéquat pour les manipulations, notamment pour la méthode de dilution. La technique de dilution a été sélectionnée pour sa précision par rapport à la méthode de disque diffusion.

Le Tween 80 reste l'agent de prédilection pour la mise en émulsion les huiles essentielles malgré le fait que certains auteurs suggèrent que le Tween 80 exerce une inhibition de l'activité antimicrobienne (Remmal *et al.*, 1993 a et b ; Inouye *et al.*, 2001).

Mohammedi, (2006) a montré que le Tween 80 à 0,05 % influe encore sur la croissance microbienne. Mais en utilisant la méthode de dilution, Hood *et al.* (2003) ont montré qu'on obtient de meilleurs résultats en utilisant le Tween 80 à 0,02 % (v/v) pour émulsifier les huiles essentielles visqueuses et hydrophobes.

Ainsi, lors de notre étude nous avons comparé l'activité antibactérienne des huiles essentielles dans le milieu de culture seul et dans un mélange de milieu contenant du Tween 80 à

0,02 % (v/v).

II.2.1 DIFFUSION EN MILIEU GÉLOSÉ

▲ Principe

Encore appelée aromatogramme ou méthode des disques ou encore méthode de disque diffusion, cette technique est dérivée de l'antibiogramme, une technique largement utilisée en bactériologie médicale. C'est une technique d'évaluation de l'activité en milieu solide gélosé, par comparaison avec des antibiotiques de référence. Le microorganisme test est ensemencé au préalable par inondation sur la gélose.

La méthode de diffusion sur milieu gélosé consiste en un dépôt d'une quantité définie d'huile essentielle sur un disque déposé à la surface de la gélose. Le disque s'humidifie progressivement et l'huile essentielle diffuse radialement à partir du disque vers la gélose et y détermine un gradient de concentration. Après un temps d'incubation suffisant, une zone ou un halo clair est présent autour du disque si l'huile essentielle inhibe le développement bactérien. Plus la zone entourant le disque est grande, plus le germe est sensible (Bassole *et al.* 2001).

▲ Protocole expérimental

Après le repiquage, le protocole expérimental se divise en quatre étapes :

- ▲ 1ère étape : Mise en suspension d'une gousse de la culture relancée dans de l'eau physiologique. La charge bactérienne est ajustée à 10^6 UFC/ml. Une absorbance de 0,125 lue au spectrophotomètre calibré à 600 nm puis une dilution au centième de la culture permet d'avoir cette charge. Cette suspension bactérienne est ensuite ensemencée par inondation sur la gélose.
- ▲ 2e étape : Ensemencement et dépôt de l'huile essentielle : 2 ml de suspension bactérienne sont étalées sur la gélose. L'excédent est éliminé par aspiration puis la gélose est laissée sécher près de la flamme du bec Bunsen. Le disque d'antibiogramme de 6mm de diamètre est placé au centre de la gélose à l'aide d'une pince stérile. 5 µl d'huile essentielle pure sont ensuite déposés sur le disque (Mikulášová et Vaverková, 2009) puis, l'huile essentielle se diffuse radialement dans la gélose et y détermine un gradient de concentration. Afin d'éviter les effets synergiques de la phase volatile des huiles essentielles sur la croissance microbienne, un seul disque d'antibiogramme par boîte de Pétri a été déposé.
- ▲ 3e étape : Incubation de la préparation à des températures adéquates aux microorganismes tests : 24 h à 37°C pour *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* et 48 h à température ambiante pour *Vibrio*

harveyi et *Vibrio fischeri*.

- ▲ 4e étape : Lecture des résultats par la mesure à la règle du diamètre d'une zone translucide, circulaire ou halo d'inhibition. Le diamètre de ce halo est proportionnel à l'activité de l'huile essentielle. Les bactéries qui n'ont pas été inhibées par l'huile essentielle forment une nappe homogène autour du halo.

Pour avoir des résultats reproductibles, tous les tests sont effectués en double (en deux exemplaires). Des témoins négatifs (gélose avec un disque au centre sans huile essentielle sans suspension bactérienne) et des témoins positifs (gélose avec un disque au centre sans huile essentielle avec suspension bactérienne). Des disques imbibés d'antibiotiques de référence sont aussi préparés avec les tests pour évaluer l'activité des huiles essentielles par rapport aux antibiotiques couramment utilisés.

II.2.2 DILUTION

▲ Principe

Cette technique permet la mise en contact direct de l'huile essentielle et de la bactérie dans un milieu liquide défini. Une dilution en cascade (ou dilution de progression géométrique de raison 2) permet de déterminer la plus faible concentration en huile essentielle pour stopper la croissance bactérienne (CMI ou concentration minimale inhibitrice). La valeur de la CMI indique l'activité de l'huile essentielle sur la croissance de la bactérie. Plus la concentration en huile essentielle capable de stopper cette croissance est faible, plus l'huile est active sur le microorganisme test. La plus faible concentration inhibitrice est la CMI. La CMB (ou concentration minimale bactéricide) indique l'effet des huiles sur la survie des bactéries. Un repiquage en milieu solide de 5 µl des cultures où la croissance des bactéries a été inhibée permet de déterminer la CMB. La CMB est la plus faible concentration en huile essentielle où aucune croissance cellulaire des cultures repiquées n'est observée.

▲ Protocole expérimental

Après le repiquage, le protocole expérimental se déroule en huit étapes :

- ▲ 1ère étape : Mise en suspension d'une öse de la culture dans le milieu liquide : Poor Broth pour *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* et Zobell pour *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*. L'absorbance de la suspension bactérienne est lue au spectrophotomètre calibré à 600 nm. L'absorbance de l'échantillon est ajustée à 0,125. Une dilution au centième est ensuite effectuée pour avoir une charge bactérienne finale d'environ 10^6 UFC/ml.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

- ▲ 2e étape : Préparation de la solution mère d'huile essentielle dans des tubes vissés stériles :
 - ▲ 10 µl d'huile essentielle pure sont ajoutés dans 190 µl de milieu de culture uniquement ou dans 190 µl de milieu de culture contenant 20 µl de Tween 80 à 4 %.
 - ▲ Homogénéisation des solutions au Vortex.
- ▲ 3e étape : Dilution en cascade :
 - ▲ 100 µl de solution mère d'huile essentielle (solution huile essentielle + milieu ou solution huile essentielle + milieu + Tween 80) sont rajoutés dans 100 µl de milieu de culture stérile.
 - ▲ Le mélange est homogénéisé puis 100 µl de solution sont prélevés et placés dans un tube stérile contenant 100 µl de milieu stérile et ainsi de suite. Les derniers 100 µl de solution prélevés dans le dernier tube servant à la dilution en cascade sont jetés.
- ▲ 4e étape : Addition de 900 µl de suspension bactérienne dans les tubes contenant 100 µl de solution en huile essentielle diluées en cascade. Le volume final de chaque solution test est de 1 ml.
- ▲ 5e étape : Préparation des témoins dans les mêmes conditions. Le volume final est de 1 ml.
 - ▲ Témoin positif : Milieu de culture (Poor Broth ou Zobell) et la suspension bactérienne uniquement.
 - ▲ Témoin positif Tween : Milieu de culture (Poor Broth ou Zobell) contenant 0,02 % de Tween 80 et la suspension bactérienne.
 - ▲ Témoin négatif : Milieu de culture uniquement (Poor Broth ou Zobell).
 - ▲ Témoin négatif Tween : Milieu de culture uniquement (Poor Broth ou Zobell) contenant 0,02 % de Tween 80.
 - ▲ Dilutions en cascade à partir de 5 µl/ml de quantité finale d'huile essentielle des témoins huile essentielle : ces dilutions ont été effectuées pour suivre l'évolution de la quantité en huile essentielle dans les tests indépendamment de la croissance microbienne.
 - ▲ Dilutions en cascade des témoins huile essentielle Tween : la quantité mère finale en huile essentielle est de 5 µl/ml et celle du Tween est de 0,02 % (v/v). Ces dilutions ont été effectuées pour suivre l'évolution de la quantité en huile essentielle en présence du Tween 80 dans les tests indépendamment de la croissance microbienne.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

- ▲ 6e étape : Homogénéisation de toutes les solutions préparées et incubation à 30°C durant 24 h dans un bain thermostaté agité (Destoumieux *et al.*, 1999 ; Randriantsoa, 2004). La vitesse de l'agitation est de 180 tours/min.
- ▲ 7e étape : Lecture de l'absorbance des tests et des témoins au spectrophotomètre calibré à 600nm après l'incubation :
 - L'absorbance réelle des tests est obtenue par la formule :

$$AR = AT - (AT_{HE} + AT^-)$$

AR : Absorbance réelle ; AT : Absorbance des tests ; AT⁻ : Absorbance des témoins (milieu avec Tween ou milieu uniquement) ; AT_{HE} : Absorbance des témoins huile essentielle (témoin avec ou sans Tween)

- Une inhibition de la croissance se traduit par une absorbance réelle très proche du témoin négatif avec ou sans Tween.
 - La croissance bactérienne se traduit par une augmentation de l'absorbance réelle des tests jusqu'à être égale à celle du témoin positif avec ou sans Tween.
- ▲ 8e étape : Détermination de la CMB :

- 5 µl de chaque test sont repiqués sur un milieu gélosé neuf à partir de la solution mère en huile essentielle (avec ou sans Tween) jusqu'au tube correspondant à la CMI. On utilise le Poor Broth Agar pour *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* et Zobell solide pour *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*.
- L'incubation à lieu à 37°C pendant 24 h pour *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* et à température ambiante pendant 48 h pour *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*.

La CMB est la plus faible concentration en antibiotique capable de tuer 99,99 % des germes.

Après repiquage et incubation, la CMB est la plus faible concentration en huile essentielle où il n'y a pas eu de croissance sur la gélose.

Pour avoir des résultats reproductibles, tous les tests sont effectués en double.

II.2.3 MICROATMOSPHÈRE

▲ Principe

Également dérivée de l'antibiogramme, la technique d'aérodiffusion ou le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromatogrammes ou technique diffusion en milieu gélosé. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné.

Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils actifs des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri.

Le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. La gélose ensemencée et le disque imprégné d'huile essentielle ne sont donc plus en contact. Après incubation, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire lorsque le disque est bien centré (Pibiri, 2006). La taille de la zone translucide ou halo est proportionnel à l'activité des composants volatils de l'huile essentielle sur le microorganisme test.

▲ Protocole expérimental

Après le repiquage, le protocole expérimental se divise principalement en quatre étapes :

- 1ère étape : Mise en suspension d'une ose de la culture dans de l'eau physiologique. La charge bactérienne est ajustée à 10^6 UFC/ml. Une absorbance de 0,125 lue au spectrophotomètre calibré à 600 nm puis une dilution au centième de la culture permet d'avoir cette charge.
- 2e étape : Ensemencement par inondation de 2 ml de suspension bactérienne sur la gélose. L'excédent est éliminé par aspiration puis la gélose est laissée sécher près de la flamme d'un bec Bunsen. Un disque d'antibiogramme de 6 mm de diamètre est déposé à l'aide d'une pince stérile au centre du couvercle situé au-dessous de la gélose préalablement ensemencée. Une quantité définie d'huile essentielle pure est ensuite déposée sur le disque pour chaque série de test. On effectue quatre séries de tests pour lesquels le volume d'huile essentielle déposé sur le disque est respectivement de 5, 10, 15 et 20 μ l.
- 3e étape : Incubation des cultures : 24 h à 37°C pour *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* et 48 h à température ambiante pour *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*.
- 4e étape : Lecture des résultats par la mesure à la règle du halo d'inhibition.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Pour avoir des résultats reproductibles, tous les tests sont effectués en double. Des témoins négatifs (gélose avec un disque au centre du couvercle sans huile essentielle sans suspension bactérienne) et des témoins positifs (gélose avec un disque au centre du couvercle sans huile essentielle avec suspension bactérienne) sont préparés simultanément avec les tests. L'activité des composés volatils sur les germes est évaluée en comparant le diamètre des halos d'inhibition à celui des antibiotiques de référence testés en milieu solide.

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

III.1 DIFFUSION EN MILIEU GÉLOSÉ

Cette méthode (paragraphe II.2.1, p. 24) a permis de tester les propriétés antibactériennes des huiles essentielles sur les microorganismes-tests. Le tableau 5 ci-dessous résume les résultats obtenus par cette méthode.

Tableau 5 : Diamètre (mm) du halo d'inhibition des huiles essentielles et des antibiotiques de référence

Échantillon		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. typhis</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. fischeri</i>
		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Référence	TE	28	28	15,5	20	19	13,5
	GME	25,5	29	17	28,5	20,5	25
HE V= 5 µl	CG 1-1	11	11	12,5	6	21	23
	CG 2-1	10	11	9	6	14	16
	CG 2-2	9	12	10,5	6	19	23
	CG 2-3	10	11	10,5	6	24	19
	CG 2-4	10	10	10	6	22	17,5
	CG 2	11	12	12	6	20	16
	CG 3-1	9	11	9	6	11,5	22*
	CG 3-2	10	10	10	6	16	16
	CG 3-3	10	11	10	6	19	20
	CG 3	11	15	11	6	20*	20
	CG 4	15	12	10	6,5	20	25*

S. aureus : *Staphylococcus aureus* ; *E. coli* : *Escherichia coli* ; *E. faecalis* : *Enterococcus faecalis* ; *S. typhis* : *Salmonella typhimurium* ; *V. harveyi* : *Vibrio harveyi* ; *V. fischeri* : *Vibrio fischeri*

TE : Tétracycline ; GME : Gentamycine ; Ø : Diamètre du halo d'inhibition (mm)

* : Diamètre ellipsoïdal ; V= Volume d'échantillon déposé par disque

La fraction CG 3-1 et le totum CG 4 ont donné un halo ellipsoïdal avec *Vibrio fischeri* (fig. 5, p. 31) ainsi que CG 3 avec *Vibrio harveyi*. Dans ce cas, le diamètre mesuré est la plus faible distance entre les colonies qui ont poussé autour du disque.

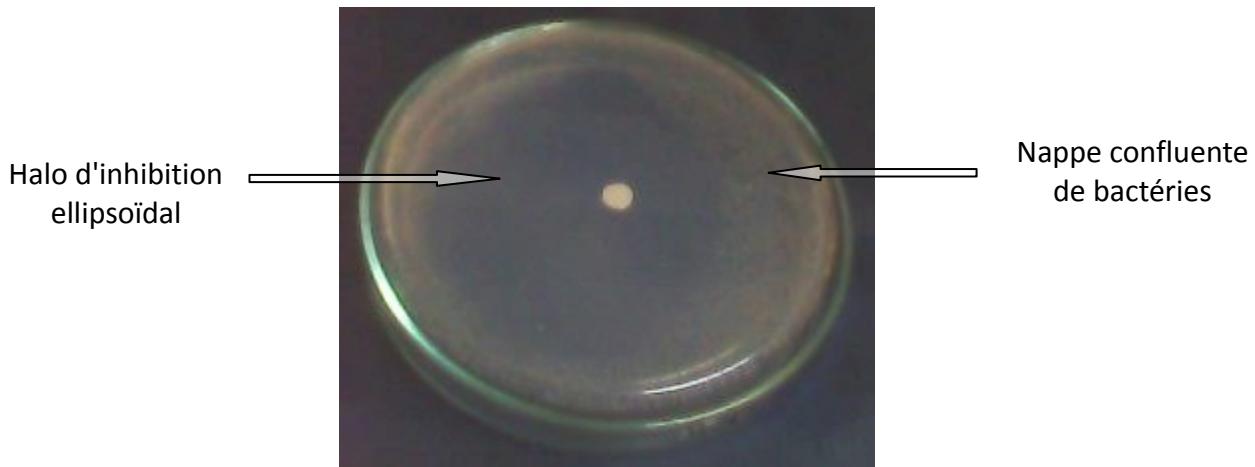


Figure 5 : Halo d'inhibition provoqué par CG 4 sur *Vibrio harveyi*

Pour évaluer l'activité des huiles essentielles, nous avons utilisé comme référence la tétracycline et la gentamycine, deux antibiotiques à large spectre d'action. Ces antibiotiques sont couramment utilisés pour traiter diverses maladies incluant celles causées par les microorganismes-tests.

D'après le tableau 5, on constate que :

- *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi* sont très sensibles à toutes les huiles essentielles testées. En effet, le diamètre du halo d'inhibition des huiles essentielles et celui des antibiotiques de références sont proches.
- *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* sont sensibles à toutes les huiles essentielles. On a un halo translucide circulaire traduisant l'inhibition de la croissance bactérienne par les huiles essentielles mais elle est assez faible par rapport aux antibiotiques de référence.
- *Salmonella typhimurium* est résistante à toutes les huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* car aucune huile essentielle n'a inhibé sa croissance.

D'après ce résultat, seules *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi* sont très sensibles aux huiles essentielles de la plante. Les tota sont plus actifs que leurs fractions sauf pour le cas des fractions CG 2-3 et CG 3-3 sur *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi*. Toutefois, avec des quantités par dépôt inférieures aux antibiotiques de référence (5 µl par dépôt pour les huiles essentielles contre 10 µl par dépôt pour les antibiotiques de références selon les fabricants des antibiotiques de référence), on peut alors dire que les huiles essentielles ont une activité intéressante sur les microorganismes-

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

tests.

Pour éviter les confusions, les études qui vont suivre seront axées sur la comparaison du diamètre du halo d'inhibition des huiles essentielles entre elles. Ainsi, en comparant l'activité des tota et de leurs fractions, on remarque que les tota sont plus actifs.

- Activité en fonction de la zone de récolte

Afin d'évaluer l'activité des huiles essentielles en fonction de la zone de récolte, nous avons comparé les halos d'inhibition des tota provenant de Itampolo (CG 2), Salary (CG 3) et Tsaramandroso (CG 4).

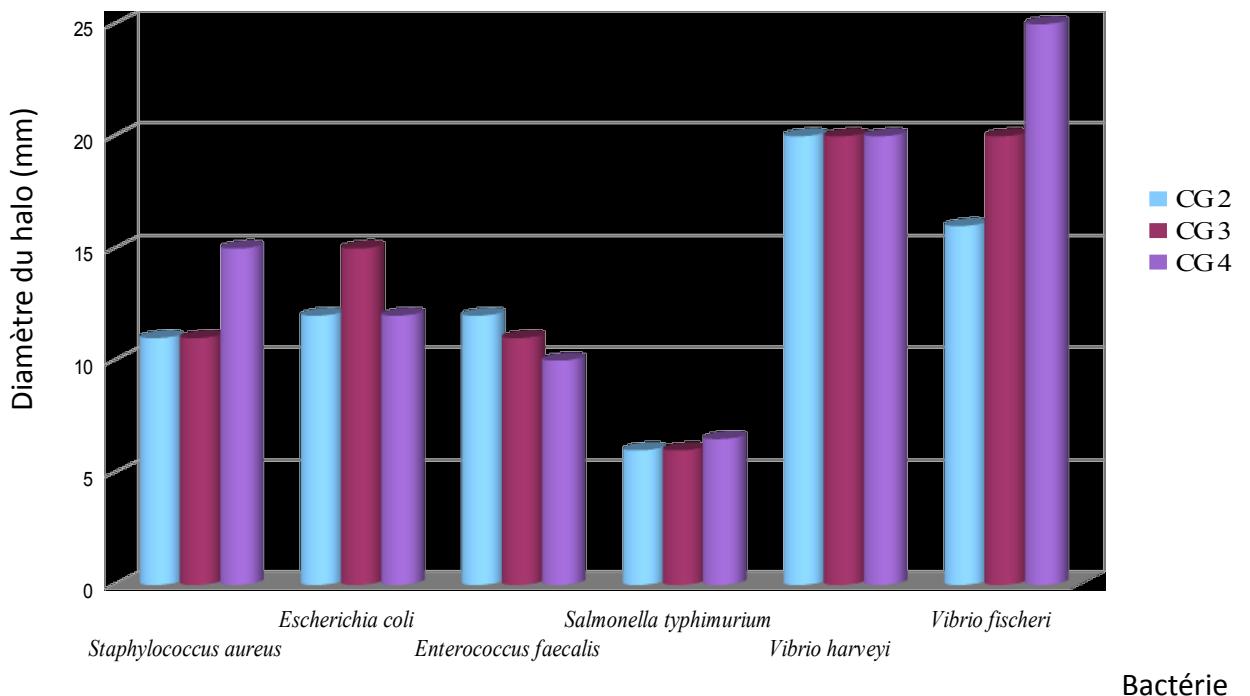


Figure 6 : Comparaison des tota issus de différentes régions

Selon cette figure, les 3 huiles sont actives sur les germes testés sauf *Salmonella typhimurium*. CG 4 est la plus active sur *Staphylococcus aureus*. CG 2 et CG 3 sont les plus actives sur *Vibrio harveyi*. Les trois huiles complètes ont à peu près la même activité sur *Enterococcus faecalis* ; CG 3 est la plus active sur *Escherichia coli* et *Vibrio fischeri*. CG 2 et CG 3 ont la même activité sur *Staphylococcus aureus* tandis que CG 2 et CG 4 ont la même activité sur *Escherichia coli*. Ces résultats montrent une variabilité de l'activité des huiles essentielles sur les souches testées en fonction de la zone de récolte.

- Effet du lieu de conservation sur les huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*

Afin d'évaluer l'effet du lieu de conservation des huiles essentielles, nous avons testé deux

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

lots d'échantillons provenant d'un même stock d'huiles essentielles distillées au FOFIFA Ambatobe (FOFIFA) au mois de septembre 2009. Un premier lot d'huiles essentielles a été pris au mois d'août 2010 et conservé à l'Université d'Antananarivo (Ankatso) et un deuxième lot de ces mêmes huiles essentielles au mois de mai 2011. L'étude des activités antibactériennes de ces deux lots a été effectuée au Laboratoire d'Ankatso au mois de mai 2011.

Tableau 6 : Comparaison de l'activité des échantillons conservés au FOFIFA Ambatobe et à l'Université d'Antananarivo Ankatso

Bactérie	HE	Lieu de conservation		Conditionnement	
		Ankatso (Ø en mm)	FOFIFA (Ø en mm)	Ankatso	FOFIFA
<i>Escherichia coli</i>	CG 2	12	10,25	4°C dans des flacons teintés	4°C dans des flacons teintés
	CG 3	15	9,5		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CG 2	11	9,5	4°C dans des flacons teintés	4°C dans des flacons teintés
	CG 3	11	10		
<i>Enterococcus faecalis</i>	CG 2	12	8	4°C dans des flacons teintés	4°C dans des flacons teintés
	CG 3	13	13		
<i>Vibrio harveyi</i>	CG 2	20	15	4°C dans des flacons teintés	4°C dans des flacons teintés
	CG 3	20	14,5		
<i>Vibrio fischeri</i>	CG 2	16	13,5	4°C dans des flacons teintés	4°C dans des flacons teintés
	CG 3	20	11		

HE : huile essentielle ; Ø : diamètre

À première vue, le mode de conservation des huiles essentielles du FOFIFA et d'Ankatso est le même. Les huiles essentielles ont toutes été conservées dans des flacons teintés à +4°C et à l'abri de la lumière après l'extraction.

Toutefois, en comparant leur activité antibactérienne on note une différence : sur les cinq microorganismes testés, l'activité des huiles essentielles conservées au FOFIFA est faible par rapport à celle des huiles conservées à Ankatso. En effet, pour des échantillons issus de la même distillation, le diamètre du halo d'inhibition provoquées par les échantillons conservés à Ankatso

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

est supérieur à celui de ceux conservés au FOFIFA. La comparaison des résultats obtenus avec les *Vibrios* permet en particulier de constater cette différence.

La méthode de diffusion en milieu gélosé a permis d'avoir un aperçu de l'activité des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*. Toutefois, elle se limite à l'observation et à la mesure du diamètre des halos d'inhibition. En effet, même si une variabilité de l'activité des huiles essentielles a été observée, cette technique est estimative et nécessite la confirmation des résultats par la méthode de dilution en milieu liquide.

III.2 DILUTION

Cette méthode décrite au paragraphe II.2.2 (p. 25) permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) exprimées en $\mu\text{l/ml}$. En raison de l'insuffisance des échantillons d'huiles essentielles, la détermination de la CMB et de la CMI n'a pas pu être déterminée au-delà de 5 $\mu\text{l/ml}$.

- Choix du milieu de culture

Afin de déterminer le milieu de culture adéquat pour notre étude, deux séries de tests ont été effectuées. Nous avons utilisé un milieu de culture avec 0,02 % (v/v) de Tween 80 lors de la première série. La deuxième série a été effectuée avec un milieu de culture sans Tween 80. *Escherichia coli* a été choisi comme germe-test car d'après les résultats de la méthode diffusion en milieu gélosé, les huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* ont à peu près la même activité sur cette bactérie. De plus, elle est plus facile à cultiver que *Vibrio fischeri* et *Vibrio harveyi*. Les fractions qui ont été choisies sont CG 2-1, CG 3-1 et CG 3-2. La raison de ce choix réside dans le fait que lors des tests préliminaires ce sont ces échantillons qui ont eu le plus de mal à se mélanger avec le milieu de culture sans le Tween 80. Les résultats obtenus sont dans le tableau 7.

Tableau 7 : Activité des échantillons d'huile essentielle dans deux milieux de culture

HE	Milieu de culture sans Tween		Milieu de culture avec Tween	
	CMB ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMB ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)
CG 2-1	> 5	1,25	> 5	1,25
CG 3-1	> 5	1,25	> 5	0,6
CG 3-2	> 5	0,6	> 5	0,6

> 5 : CMB supérieure à 5 $\mu\text{l/ml}$

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Les résultats du tableau 7 montrent qu'il n'y a pas de différence entre les deux tests (milieu sans Tween et milieu avec Tween 80). Pour simplifier et pour économiser les produits, les résultats des tests décrits plus bas sont uniquement ceux où on a utilisé le milieu de culture sans Tween 80.

- Sélection des microorganismes

La résistance de *Salmonella typhimurium* aux huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* observée par la méthode de disque diffusion a été confirmée par la méthode de dilution. En effet, tous les échantillons d'huiles essentielles testés n'ont pas eu d'effet sur la croissance de *Salmonella typhimurium*. Ainsi, les tests sur *Salmonella typhimurium* ne seront plus mentionnés dans les résultats ultérieurs.

- Effet du lieu de conservation sur les huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*

Le tableau 8 résume les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet du lieu de conservation des huiles essentielles selon la méthode de dilution (paragraphe II.2.2, p. 25).

Tableau 8 : Comparaison des propriétés des huiles essentielles en fonction des lieux de conservation

Bactérie	HE	Lieu de conservation			
		Ankatso		FOFIFA	
		CMB ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	CMI ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	CMB ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	CMI ($\mu\text{l}/\text{ml}$)
<i>Escherichia coli</i>	CG 2	5	2,5	> 5	1,25
	CG 3	2,5	1,25	> 5	1,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	CG 2	5	2,5	5	5
	CG 3	> 5	2,5	5	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	CG 2	5	1,25	> 5	2,5
	CG 3	5	1,25	> 5	2,5
<i>Vibrio harveyi</i>	CG 2	1,25	0,6	> 5	2,5
	CG 3	5	0,6	> 5	1,25
<i>Vibrio fischeri</i>	CG 2	> 5	1,25	> 5	2,5
	CG 3	> 5	1,25	> 5	1,25

> 5 : CMB supérieure à 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Les résultats du tableau 8 confirment les résultats obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé (tableau 7). L'activité des huiles essentielles conservées au FOFIFA est généralement inférieure à celle des huiles essentielles conservées à Ankatso.

Dans le cas d'*Escherichia coli*, l'échantillon CG 2 conservé au FOFIFA est plus actif que celui conservé à Ankatso, car la valeur de sa CMI est inférieure à celle de l'échantillon d'Ankatso. Par contre, la CMB de l'échantillon d'Ankatso est de 5 µl/ml alors que celle du FOFIFA n'a pas été déterminée. La CMI du CG 3 du FOFIFA et d'Ankatso est la même. La CMB du CG 3 du FOFIFA est supérieure à 5 µl/ml alors que celle d'Ankatso est de 2,5 µl/ml.

Les huiles essentielles conservées au FOFIFA sont moins actives sur *Staphylococcus aureus* que celles d'Ankatso. En effet, la CMI de CG 2 et CG 3 pour les échantillons du FOFIFA est plus élevée que celle des échantillons d'Ankatso. Pour l'huile essentielle CG 2, la CMB pour les deux lieux de conservation est la même. L'exception concerne la CMB du totum CG3 où l'huile essentielle conservée à Ankatso a une CMB supérieure à 5 µl/ml tandis que celui conservé au FOFIFA a une CMB de 5 µl/ml.

Enterococcus faecalis est plus sensible aux échantillons CG 2 et CG 3 d'Ankatso que ceux du FOFIFA. En effet, la CMI des échantillons d'Ankatso est de 1,25 µl/ml ; la CMB est de 5 µl/ml alors que la CMI des échantillons du FOFIFA est de 5 µl/ml ; la CMB est supérieure à 5 µl/ml.

On observe le même phénomène sur *Vibrio harveyi* : la CMI des échantillons d'Ankatso est de 0,6 µl/ml pour les CG 2 et CG 3 alors que pour les échantillons du FOFIFA la CMI est de 2,5 µl/ml et 1,25 µl/ml respectivement. La CMB des échantillons d'Ankatso a été déterminée mais pas pour les échantillons du FOFIFA.

Concernant *Vibrio fischeri*, l'échantillon CG 2 d'Ankatso est plus actif que celui du FOFIFA tandis que la CMI des huiles essentielles CG 3 d'Ankatso et du FOFIFA est la même (1,25 µl/ml).

D'une manière générale, les échantillons conservés à Ankatso sont plus actifs que ceux conservés au FOFIFA. Ainsi, les résultats donnés ultérieurement sont ceux obtenus avec les échantillons conservés à Ankatso.

- Étude de l'activité des huiles essentielles sur les bactéries sélectionnées

Le tableau 9 résume les résultats obtenus avec les tota et les fractions d'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei*.

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Tableau 9 : Valeurs de la CMI et de la CMB des huiles essentielles exprimées en $\mu\text{l}/\text{ml}$

HE	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>V. harveyi</i>		<i>V. fischeri</i>	
	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI
CG 1-1	2,5	2,5	> 5	2,5	>5	2,5	1,25	1,25	> 5	1,25
CG 2-1	> 5	1,25	> 5	2,5	> 5	1,25	> 5	1,25	> 5	1,25
CG 2-2	1,25	0,6	2,5	1,25	2,5	2,5	> 5	0,6	> 5	1,25
CG 2-3	2,5	0,6	2,5	1,25	2,5	2,5	2,5	0,6	> 5	1,25
CG 2-4	2,5	0,6	2,5	1,25	2,5	2,5	2,5	1,25	> 5	1,25
CG 2	5	2,5	5	2,5	5	1,25	1,25	0,6	> 5	1,25
CG 3-1	> 5	1,25	> 5	5	> 5	1,25	> 5	0,3	> 5	1,25
CG 3-2	> 5	0,6	> 5	1,25	> 5	1,25	> 5	0,3	> 5	0,6
CG 3-3	2,5	0,6	> 5	1,25	> 5	1,25	1,25	0,6	> 5	1,25
CG 3	2,5	1,25	> 5	2,5	5	1,25	5	0,6	> 5	1,25
CG 4	1,25	1,25	5	2,5	2,5	0,6	1,25	1,25	> 5	0,6

> 5 : CMB supérieure à 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$

En analysant l'activité des fractions d'huiles essentielles on constate que la valeur de la CMI des fractions F2 (CG 2-1 à CG 2-4) et celle des fractions F3 (CG 3-1 à CG 3-3) diminue au cours du temps pour *Escherichia coli* et pour *Staphylococcus aureus*. Autrement dit, les fractions qui ont été recueillies lors des trois premières heures d'extraction (CG 2-1 et CG 3-1) sont moins actives que les autres. La CMI des fractions F2 et des fractions F3 est la même sauf pour CG 2-1 qui est plus active que CG 3-1 sur *Staphylococcus aureus*. L'obtention des molécules bioactives se situe donc principalement après trois heures.

Concernant la CMB des fractions F2 et F3 on constate que, sur *Escherichia coli*, seule une des fractions F3 a une CMB de 2,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (CG 3-3) alors que la CMB des fractions F2 a pu être déterminée à partir de CG 2-2 avec une valeur de 1,25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ qui augmente et reste constante à partir de CG 2-3 (CMI= 2,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$). La CMB des fractions F3 est supérieure à 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ sur *Staphylococcus aureus* alors que sa valeur est de 2,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ à partir de CG 2-2 pour F2.

L'activité de F2 est différente de celle de F3 sur *Enterococcus faecalis*. La CMI de F3 est constante tandis que celle de F2 augmente. À part CG 2-1, F2 est moins active que F3. En effet,

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

CG 2-1, la fraction la plus active de F2 a la même CMI que F3. La CMB des fractions CG 2-2, CG 2-3 et CG 2-4 est de 2,5 μ l/ml. F3 est donc riche en molécules à activité inhibitrice qui sont obtenues dès les premières heures d'extraction. F2 possède des molécules à activité inhibitrice et bactéricide.

En considérant la CMI de F2 sur *Vibrio harveyi* on constate que les premières et dernières fractions sont les moins actives. La majorité des molécules actives sont obtenues après les trois premières heures d'extraction et avant les trois dernières heures d'extraction. Par contre, on note que l'activité bactéricide apparaît à partir de CG 2-3 et reste constante.

La CMI de CG 3-3 est plus élevée que celle de CG 3-1 et CG 3-2 sur *Vibrio harveyi*. Par contre, la CMB de CG 3-3 est de 1,25 μ l/ml.

La CMI des fractions F2 sur *Vibrio fischeri* est de 1,25 μ l/ml. Ces molécules ont distillé dès les premières heures d'extraction jusqu'à la fin. Pour les fractions F3, CG 3-2 est la plus active avec une CMI de 0,6 μ l/ml ; CG 3-1 et CG 3-3 ont la même CMI. Une plus grande quantité de molécules actives aurait donc distillé dans CG 3-2 par rapport aux deux autres fractions.

En comparant les propriétés antibactériennes des premières fractions CG 1-1, CG 2-1 et CG 3-1, on constate que la différence entre les huiles essentielles s'observe dès les premières heures d'extraction. La CMI et la CMB de CG 1-1 ont pu être déterminées sur *Escherichia coli* et *Vibrio harveyi*. On constate également que la CMI des trois fractions dépend du microorganisme. CG 3-1 est la plus active sur *Vibrio harveyi* alors qu'elle est la moins active sur *Staphylococcus aureus*. CG 2-1 et CG 3-1 ont la même CMI sur *Escherichia coli* et sur *Enterococcus faecalis*. Il en va de même pour les trois huiles essentielles sur *Vibrio fischeri* (CMI= 1,25 μ l/ml).

En analysant l'activité des huiles essentielles sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, on note que les tota sont moins actifs que certaines de leurs fractions. Ainsi, la CMI de CG2 est plus élevée que celle des fractions CG 2-2, CG 2-3 et CG 2-4, il en va de même pour la CMI de CG 3 comparée à CG 3-2 et CG 3-3. Le même phénomène est observé concernant la CMB.

Vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis*, on constate que l'activité inhibitrice ou bactéricide de chaque fraction est retrouvée dans le totum correspondant. En effet, CG 2 a la même CMI que CG 2-1 qui a la plus faible CMI des quatre fractions et une CMB qui serait due aux molécules qui ont distillées après trois heures d'extraction, car les trois dernières fractions (CG 2-2, CG 2-3 et CG 2-4) ont toutes une CMB inférieure à 5 μ l/ml. CG 3 se distingue de ses fractions par une CMB égale à 5 μ l/ml.

Sur *Vibrio harveyi*, le totum CG 2 a la même CMI que ses fractions les plus actives (CG 2-2 et CG 2-3) et une CMB inférieure à celle de CG 2-3 et CG 2-4. Ce sont les fractions qui ont une CMB

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

inférieure à 5 $\mu\text{l/ml}$. Le totum CG 3 est moins actif que ses fractions sur *Vibrio harveyi* dans la mesure où la CMI et la CMB du totum est supérieur aux fractions. La CMI de CG 2 et de ses fractions est la même sur *Vibrio fischeri*. CG 3 est moins active que CG 3-2 la fraction la plus active sur *Vibrio fischeri*.

○ Comparaison de l'activité des tota

La figure 7 ci-dessous représente l'activité des tota de trois régions différentes : le " Dobo " d'Itampolo (CG 2), le " Katrafay " de Salary (CG 3) et le " Katrafay " de Tsaramandroso (CG 4). La CMI varie de 0,6 $\mu\text{l/ml}$ à 2,5 $\mu\text{l/ml}$. La CMB est d'au moins 1,25 $\mu\text{l/ml}$.

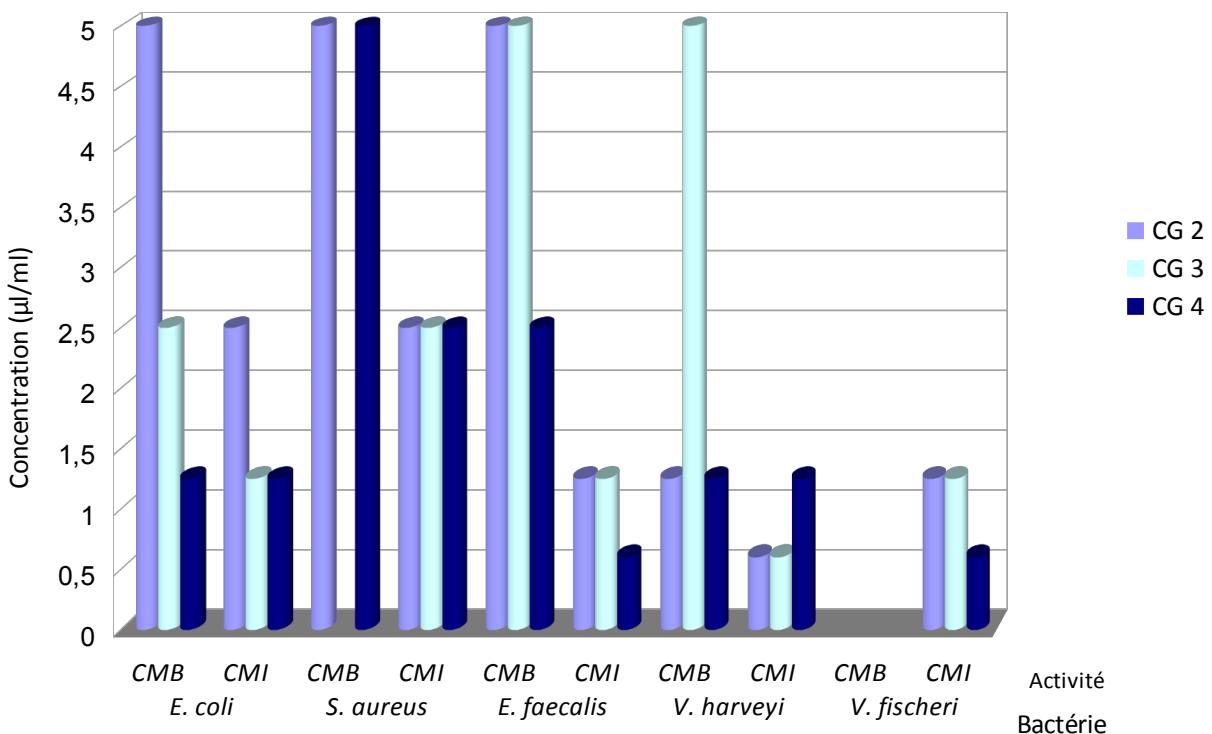


Figure 7 : Comparaison de l'activité des tota

D'après cette figure, *Enterococcus faecalis* et *Vibrio fischeri* sont très sensibles à CG 4 avec une CMI de 0,6 $\mu\text{l/ml}$. *Vibrio harveyi* est très sensible à CG 2 et à CG 3 avec la même valeur de CMI. CG 2 et CG 3 ont la même CMI sur *Enterococcus faecalis* et sur *Vibrio fischeri*. CG 3 et CG 4 ont la même CMI sur *Escherichia coli*. La CMI des trois huiles essentielles est la même sur *Staphylococcus aureus*.

CG 2 et CG 3 ont la même CMB sur *Enterococcus faecalis*. CG 2 et CG 4 ont la même CMB sur *Vibrio harveyi* et sur *Staphylococcus aureus*. Jusqu'à 5 $\mu\text{l/ml}$, la CMB de CG 3 sur

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Staphylococcus aureus n'a pas été déterminée même si les trois huiles essentielles ont la même CMI sur cette même bactérie. Les trois échantillons ont une CMB de valeur différente sur *Escherichia coli*. La CMB des trois échantillons sur *Vibrio fischeri* n'a pas été déterminée.

- Étude de l'effet bactéricide des huiles essentielles

La figure 8 ci-dessous montre le rapport de la CMB/CMI des fractions d'huile essentielle et des tota sur les cinq bactéries.

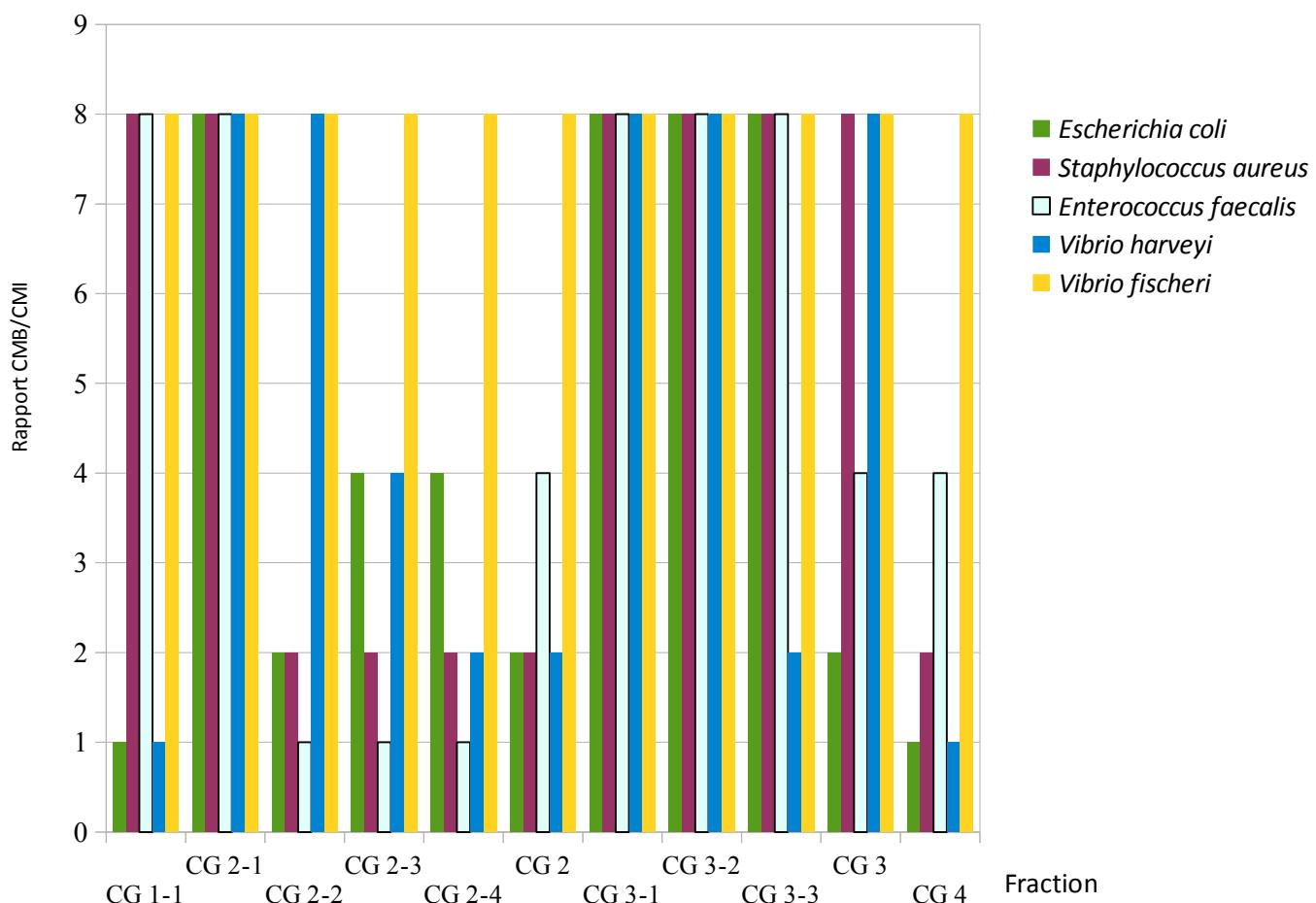


Figure 8 : Étude de l'effet bactéricide des huiles essentielles

Selon Smola (2008), le rapport de la CMB et de la CMI permet de déterminer l'action des huiles essentielles sur un microorganisme. Si le rapport est inférieur ou égal à 4, l'huile essentielle est bactéricide. Si le rapport est supérieur à 4 elle est bactériostatique.

Autrement dit,

- ▲ Si la valeur du rapport se situe entre 1 et 4 l'huile essentielle a une action bactéricide.

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

▲ Au-delà de cet intervalle, l'huile essentielle a une action bactériostatique.

Selon cette figure, CG 1-1 a une action bactéricide sur *Escherichia coli* et sur *Vibrio harveyi* ; CG 2-1 et CG 3-1 n'ont pas d'action bactéricide. En comparant ces trois fractions, il en ressort une différence de l'activité des fractions en fonction de la zone de récolte. Les molécules bactéricides sur *Escherichia coli* et sur *Vibrio harveyi* ont distillé dès les trois premières heures d'extraction pour CG 1, contrairement à CG 2 et CG 3.

On constate la variabilité des molécules actives en fonction de la zone de récolte. En comparant les propriétés antibactériennes des tota, CG 2 et CG 4 ont une action bactéricide sur *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et sur *Vibrio harveyi* tandis que CG 3 a une action bactéricide sur *Escherichia coli*, et *Enterococcus faecalis* CG 3 exerce un effet bactériostatique sur *Staphylococcus aureus* et sur *Vibrio harveyi*. CG 2 et CG 4 sont donc riches en molécules bactéricides sur les quatre souches testées.

L'évolution de l'action bactéricide des huiles essentielles est observée dans les fractions. CG 2-1 et CG 2-2 sont bactériostatiques sur *Vibrio harveyi* alors que les échantillons CG 2-3 et CG 2-4 ont une action bactéricide. Cette propriété bactéricide est retrouvée dans le totum CG 2.

La méthode de dilution a fourni des informations plus précises que la méthode de disque diffusion. Elle a notamment permis de déterminer la CMI et la CMB des fractions d'huiles essentielles, de confirmer la résistance de *Salmonella typhimurium* aux huiles testées et dans certains cas, d'avoir un aperçu de la variation des propriétés antibactériennes des huiles essentielles en fonction des zones de récolte. Toutefois, cette méthode est loin d'être complète, car les huiles essentielles sont composées de molécules actives volatiles dont l'activité ne peut être décelée par la méthode de dilution.

III.3 MICROATMOSPHÈRE

Cette méthode (voir paragraphe II.2.3, p. 28) permet uniquement de tester l'activité de la phase volatile des huiles essentielles. Le volume en huile essentielle par dépôt est augmenté de 5 µl si tous les microorganismes ont poussé. La présence d'une activité se traduit par l'existence d'un halo translucide plus ou moins circulaire sur la zone du milieu et au-dessus du disque où a été déposé l'huile essentielle. Une activité de la phase volatile des huiles essentielles sur *Vibrio* a été enregistré à 20 µl. Le tableau suivant nous donne les résultats des tests avec un dépôt de 20 µl par disque à raison d'un disque par boîte.

III. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Tableau 10 : Diamètre des halos d'inhibition (mm) selon le protocole des microatmosphères

Bactérie HE	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. fischeri</i>
CG 1-1	0	0	0	0	0
CG 2-1	0	0	0	0	0
CG 2-2	0	0	0	90	0
CG 2-3	0	0	0	90	50
CG 2-4	0	0	0	90	27
CG 2	0	0	0	0	0
CG 3-1	0	0	0	0	0
CG 3-2	0	0	0	90	40
CG 3-3	0	0	0	0	35
CG 3	0	0	0	0	0
CG 4	0	0	0	0	0

Le diamètre mesuré est proportionnel à l'activité de la phase volatile de l'huile essentielle. Un diamètre de 0 mm indique une croissance normale du microorganisme alors que la valeur 90 mm indique une inhibition totale de la croissance microbienne.

Les fractions CG 2-2, CG 2-3, CG 2-4 et CG 3-2 ont une activité sur *Vibrio harveyi*. Cette bactérie n'a pas poussé en présence de la phase volatile de volume 20 µl de ces fractions d'huiles essentielles. Pour *Vibrio fischeri*, les diamètres d'inhibition étant de 50 mm avec CG 2-3 ; 27 mm avec CG 2-4, 40 mm avec CG 3-2 et 35 mm avec CG 3-3.

Étant donné que le volume en huile essentielle est quatre fois supérieur à celui utilisé lors de la technique de disque diffusion et de la dilution et que seules quelques fractions sont actives sur deux des cinq bactéries testées, on peut alors dire que la phase volatile des huiles essentielles de *Cedrellopsis grevei* ne contribue que très faiblement à l'activité des échantillons testés.

DISCUSSION

La diffusion en milieu gélosé et la dispersion en microatmosphère mettent en évidence l'activité biostatique (Hermal, 1993), et les cultures en bouillon nutritif, l'activité biocide (Sarbach, 1962). En effet, la méthode de diffusion en milieu gélosé a permis d'estimer l'activité des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*. Le protocole des microatmosphères ou aérodiffusion a permis de déceler l'activité de la phase volatile de certaines fractions. Les CMI et CMB des huiles essentielles sur les microorganismes tests ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide.

Les résultats obtenus ont montré que des bactéries Gram négatif et Gram positif sont sensibles aux huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*. Cette activité est intéressante, car en règle générale, les bactéries Gram positif sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram négatif (De Billerbeck, 2000 ; Pibiri, 2006 ; Haddouchi *et al.*, 2009 ; El Kalamouni, 2010). L'activité des huiles essentielles varie en fonction de la zone de récolte. Le "Katrafay" de Tsaramandroso est le plus actif sur *Vibrio fischeri* et *Enterococcus faecalis*; le "Dobo" d'Itampolo et le "Katrafay" de Salary sont les plus actifs sur *Vibrio harveyi*; le "Dobo" d'Itampolo est bactéricide sur *Staphylococcus aureus* alors que le "Katrafay" de Salary est bactériostatique sur la même bactéries. Le "Dobo" d'Itampolo et le "Katrafay" de Tsaramandroso ont la même activité sur *Staphylococcus aureus*. L'existence des chémotypes serait à l'origine de ces variations. En effet, un chémotype peut être absent ou présent d'un site à l'autre et chaque site ne renferme pas les mêmes chémotypes. Même dans une partie de la forêt où un chémotype est présent, la teneur en composants majeurs peut varier considérablement (Andrianjafinandrasana, 2008).

Nos études ont montré que ces molécules seraient fragiles surtout les molécules à action bactéricides. En effet, la comparaison des échantillons conservés dans deux lieux différents adoptant les mêmes modes de conservation a montré que l'action bactéricide des huiles essentielles peut varier. À titre d'exemple, les molécules à activité bactéricide sur *Escherichia coli* seraient conservées dans l'échantillon CG 2 et CG 3 d'Ankatso alors qu'elles auraient disparu dans les échantillons du FOFIFA. Sur *Staphylococcus aureus*, l'effet bactéricide du totum CG 3 de l'échantillon conservé à Ankatso est inférieur par rapport à celui du CG 3 conservé au FOFIFA. Les molécules à activité bactéricide sur *Staphylococcus aureus* auraient donc été conservées dans l'huile essentielle conservée au FOFIFA contrairement à celle conservée à Ankatso. Ces résultats discordants laissent entrevoir un changement de l'activité des huiles essentielles. Étant donné que ces échantillons proviennent tous d'un même stock, des facteurs non prévus dans la conservation standard (voir paragraphe II.2.5.4, p. 15) des huiles essentielles ont pu contribuer au changement de leur activité (exemple : fréquence d'utilisation des échantillons).

Des différences ont été trouvées entre les résultats de Rakotomalala (2004) sur les huiles

essentielles de l'écorce de *Cedrelopsis grevei* et les nôtres. En utilisant le Tween 80 et une méthode de dilution sur milieu gélosé, Rakotomalala (2004) a trouvé que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* sont résistantes aux huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*. Or, nos résultats ont montré que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont sensibles à ces huiles essentielles. La CMI trouvée pour ces deux bactéries varie de 0,6 à 5 µl/ml ; la CMB varie de 1,25 à 5 µl/ml ou est supérieure à 5 µl/ml. Ces différences pourraient donc s'expliquer non seulement par la différence entre les techniques qui ont été utilisées mais aussi par la variabilité de l'activité des huiles essentielles de l'écorce de *Cedrelopsis grevei*. Néanmoins, nos résultats sont en accord avec ceux de Rakotomalala (2004) concernant la résistance de *Salmonella typhimurium* aux huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*. Il semble donc que *Salmonella typhimurium* ait une résistance naturelle aux huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* indépendamment de sa provenance.

Il faut aussi noter que la sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé, car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Hermal, 1993). Les huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* sont toutes biostatiques sur *Vibrio fischeri* alors que certaines de ces huiles essentielles ont une action biocide sur d'autres bactéries. C'est le cas du "Dobo" d'Itampolo sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Vibrio harveyi*.

Selon Oussou *et al.* (2010), le fractionnement de l'huile essentielle permet d'optimiser son activité antibactérienne. En étudiant les propriétés antibactériennes des tota et leurs fractions respectives, on a en effet constaté que certaines fractions sont plus actives que le totum correspondant. À titre d'exemple, les fractions CG 2-2, CG 2-3 et CG 2-4 sont plus actives sur *Escherichia coli* et sur *Staphylococcus aureus* que le totum CG 2. La présence d'autres molécules antagonistes dans le totum serait probablement à l'origine de ce résultat. Le fractionnement aurait aussi contribué à la modification du rapport quantitatif des molécules au profit de l'activité antibactérienne des fractions. Ces molécules agissent par synergie au sein de l'huile essentielle (Oussou *et al.*, 2010). Cependant, pour certaines bactéries, l'activité des tota et de ses fractions sont les mêmes. Tel est par exemple le cas de l'activité de CG 2 et de ses fractions sur *Vibrio fischeri* ; de CG 3 et de ses fractions sur *Enterococcus faecalis*. Ainsi, la quantité en molécules actives et les éventuelles interactions avec d'autres molécules auraient peu d'effet sur l'activité de l'huile essentielle. La faible activité de certaines fractions par rapport aux tota pourraient être expliquée par le fait que les molécules bioactives de ces fractions seraient en quantité insuffisante pour produire l'effet antibactérien du totum. C'est le cas de l'activité des fractions CG 2-1 et CG 2-4 comparé à l' CG 2 et aux autres fractions.

L'activité hétérogène des fractions confirme l'hypothèse de Ganou (1993) stipulant que la composition chimique de l'huile essentielle change unidirectionnellement durant le processus de distillation. D'après nos résultats, ce changement modifie l'activité des fractions résultantes.

- L'activité augmente : les premières fractions des huiles essentielles du " Dobo " d'Itampolo et du " Katrafay " de Salary sont moins actives sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* que les fractions recueillies ultérieurement. Les molécules actives sur ces bactéries ont distillé principalement après les trois premières heures d'extraction.
- L'activité reste constante : toutes les fractions du " Dobo " ont la même activité sur *Vibrio fischeri*. L'origine de cette activité serait due à la sensibilité du microorganisme aux molécules actives. *Vibrio fischeri* est sensible aux molécules qui sont obtenues tout au long de l'extraction. La concentration minimale en huile essentielle pour produire l'activité est de 1,25 µl/ml.
- L'activité est variable : la première et la dernière fraction du " Dobo " d'Itampolo sont moins actives sur *Vibrio harveyi* que les fractions recueillies au milieu de l'extraction de même que l'activité des fractions du " Katrafay " de Salary sur *Vibrio fischeri*. La majorité des molécules actives auraient distillé après les trois premières heures et avant les dernières heures d'extraction.
- L'activité diminue : la faible activité sur *Vibrio harveyi* de la dernière fraction du " Katrafay " de Salary par rapport aux deux premières fractions serait due à l'insuffisance de molécules actives dans la dernière fraction.

Selon Randrianarivelo (2009), les huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* ont une forte activité antimicrobienne. En effet, les études qui ont été menées sur les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* ont montré qu'elles sont actives à faible dose (Randriantsoa, 2004 ; Ranaivosoa, 2007 ; Randrianarivelo, 2009). D'après les études de Randriantsoa (2004) la CMB des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* sur quelques représentants du genre *Vibrio* est de 1,5 µl/ml. Or, notre étude a montré que la CMB des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* sur *Vibrio harveyi* varie de 5 µl/ml à 1,25 µl/ml. En comparant l'activité de ces deux huiles essentielles issues de deux plantes endémiques Malagasy, on peut donc dire que les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* sont intéressantes.

En général, une substance peut être considérée comme un bon agent antimicrobien *in vivo* lorsqu'elle agit à de faibles concentrations *in vitro* (Chami, 2005). Les huiles essentielles de

Cedrelopsis grevei pourraient constituer une bonne alternative aux traitements par les antibiotiques standard, étant donné que ces huiles essentielles possèdent des molécules actives variées ce qui limiterait l'adaptation des microorganismes aux huiles essentielles. De plus, les études que nous avons menées *in vitro* sur les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* ont montré une activité antibactérienne intéressante à faible dose.

Vu l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles, elles seraient d'excellents conservateurs, car elles sont stables à basse température. Selon Caillet et Lacroix (2007), les huiles essentielles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Les études des propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* ont montré une activité sur *Enterococcus faecalis*. Cette bactérie ubiquitaire connue pour sa rapidité à développer une résistance aux antibiotiques comme la vancomycine mais aussi pour le transfert de sa résistance aux autres bactéries, est responsable d'infections de plus en plus graves. Le gène vanA de résistance à la vancomycine des Entérocoques a été retrouvé dans trois souches de *Staphylococcus aureus* aux USA (Reverdy *et al.*, 2003). Or, ces deux bactéries sont impliquées dans des infections nosocomiales et constituent un réel problème de santé publique.

Vibrio harveyi est connu pour ses propriétés hyper-mutagènes et sa capacité à développer des résistances aux antibiotiques (Nakayama *et al.* 2006a). Les huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* sont actives sur *Vibrio harveyi*. Il serait donc intéressant de les tester pour substituer les antibiotiques standard couramment utilisés en aquaculture dans le traitement des infections dues à *Vibrio harveyi*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les huiles essentielles de l'écorce *Cedrelopsis grevei*, une plante endémique de Madagascar ont montré une activité antibactérienne très intéressante. Nos études *in vitro* ont révélé que ces huiles essentielles sont toutes actives à faible dose sur la plupart des microorganismes testés. Ces huiles essentielles pourraient donc être employées comme alternatives à l'utilisation de certains antibiotiques standards. Ces huiles essentielles seraient ainsi de bons candidats pour traiter les infections dues aux microorganismes antibiorésistants et pour limiter les effets indésirables des antibiotiques.

En utilisant différentes méthodes (diffusion en milieu gélosé, dilution et microatmosphère), nous avons remarqué que l'activité des huiles essentielles de l'écorce de *Cedrelopsis grevei* varie en fonction de la zone de récolte et du temps d'extraction. D'après nos résultats, l'amplitude de l'effet bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles sur les microorganismes-tests dépendent de l'origine géographique de la plante et de ce fait de l'huile essentielle résultante. Le temps d'extraction de la plupart des molécules bioactives se situe entre trois et douze heures ; les fractions d'huiles essentielles recueillies dans cet intervalle de temps sont généralement plus actives que les tota correspondants. Les molécules les moins volatiles des huiles essentielles sont responsables de cette activité avec des CMI et des CMB inférieures ou égales à 5 µl/ml. La phase la plus volatile des huiles essentielles a une faible activité sur les microorganismes-tests.

Au cours de notre étude, nous avons remarqué des variations des propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* nonobstant le mode de conservation normal des huiles essentielles. Ces variations mettent en exergue la fragilité des molécules bioactives des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* notamment les molécules à activité bactéricide.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ont permis d'obtenir des informations intéressantes sur les huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*. Néanmoins, ces études doivent être complétées par des investigations plus approfondies consistant à :

- Déterminer la nature chimique des molécules bioactives des huiles essentielles étudiées en confrontant nos résultats et ceux des analyses physico-chimiques en cours,
- Étudier l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles sur d'autres microorganismes,
- Élucider le mécanisme d'action des molécules bioactives,
- Déterminer les autres propriétés biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles que nous avons utilisées sont issues d'une hydrodistillation classique. Selon la littérature, la composition chimique ainsi que l'ordre de distillation des molécules

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

bioactives peuvent changer en fonction de l'état de la matière première utilisée et du mode d'extraction de l'huile essentielle. Il serait donc intéressant d'adopter d'autres modes d'extraction en vue de déterminer le procédé d'extraction donnant le maximum de molécules à activités intéressantes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

1. **AFSSAPS (2008).** Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles [En ligne] : <<http://www.afssaps.sante.fr>>. Visité le 13 octobre 2010.
2. **Andrianjafinandrasana S.N. (2008).** Évaluation des propriétés allélopathiques de *Ravensara aromatica* Sonnerat ou *Cryptocarya sp.* Schatz (LAURACEAE). Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies en Physiologie Végétale. Département de Biologie et Écologie Végétale, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. 73 p.
3. **Balandrin M.F. and Kloche J.A. (1988).** Medical, aromatical and industrial materials from plants. Ed. Bajaj, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry, **4**, 3-36.
4. **Bassole H.N., Kabore Z.I., Traore A.S (2001).** Étude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-a-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. Pharm. Méd. Trad. Afr., **11**, 113-122.
5. **Belaïche P. (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1, l'aromatogramme. Maloine S.A., Paris. 136 p.
6. **Benachour A. et Benabdellah Elhadj T. (1998).** Extraction et identification de l'huile essentielle de *Carum carvi*. Institut de chimie industrielle, Université de Blida. 50p.
7. **Bendriss H. (2003).** Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de : *Ruta chalepensis* et de *Marrubium vulgare*. Mémoire de Magister en Génie chimique. Faculté des Sciences et des Sciences de l'Ingénieur, Université Hassiba Ben Bouali – Chlef. 156 p.
8. **Bernard T., Peroneau F., Bravo R., Delmas M., Gaset A. (1988).** Extraction des huiles essentielles : Chimie et technologie. Information chimie, **1**, 179-184.
9. **Blaser J., Rajoelison G., Tsiza G., Rajemison M., Rabevohipitra R., Randrianjafy H., Razafindranilana N., Rakotovao G., Comtet S. (1993).** Choix des essences pour la sylviculture à Madagascar. Akon'ny ala, bulletin spécial du Département des eaux et forêts de l'E.S.S.A, 12-13. 166 p.
10. **Bonhomme A. (2003).** Les bactéries du genre *Vibrio* et la santé publique vétérinaire. Thèse de Doctorat, Faculté de Médecine de Creteil. 109 p.
11. **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 915 p.

12. **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales. 3e Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 300-500.
13. **Burt S.A., Vlielander R., Haagsman H.P. and Veldhuizen E.J.A. (2005).** Increased activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157 : H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*, **68**, 919-926.
14. **Burucoa C. (2009).** Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). Le point de vue du biologiste. Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers. 18 p.
15. **Caillet S. et Lacroix M. (2007).** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l’Alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand-Frappier. 8 p.
16. **Cavalli J.F. (2002).** Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d’huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Analytique. Faculté des Sciences et Techniques, Université de Corse Pascal Paoli. 261 p.
17. **Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F. and Casanova, J. (2003).** Composition and chemical variability of the bark oil of *Cedrelopsis grevei* H.Baillon from Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, **18**, 532-538.
18. **Chami F. (2005).** Évaluation *in vitro* de l’action antifongique des huiles essentielles d’Origan et de Girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo*. Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de Doctorat d’État Es-Sciences. Faculté des Sciences Dhar El Mehrez, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah. 126 p.
19. **Constantin J. et Poisson H. (1908).** *Katafa crassisepalum*. Compte Rendu Hebdomadaire Séances Académiques des Sciences, 635-637.
20. **Croizé J. (2011).** La résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif. UFR Médecine – CHU Grenoble. 116 p.
21. **De Billerbeck, G. (2000).** Activité fongique de l’huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l’*Aspergillus niger*. Évaluation d’un bioréacteur pour l’étude de l’effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse. 236 p.
22. **Degryse A.C., Delpa I., Voinier M.A. (2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement. École des Hautes Études en Santé Publique. 87 p.
23. **Destoumieux D., Bulet P., Strub J.M., van Dorsselaer A., and Bachère, E. (1999).** Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from

- penaeid shrimp. European Journal of Biochemistry, **266**, 335-346.
24. **Dongock Nguemo, D. (2008).** *Cedrelopsis grevei* Baill. [En ligne] : <http://database.prota.org/recherche.htm>. Visité le 15 février 2011.
25. **Duriez F. (2000).** Dictionnaire des médicaments naturels. Ed. Seuil. 297p.
26. **Ebbs S. (2005).** Plant secondary metabolism [En ligne] : www.science.siu.edu/plant-Biology/PLB320/Files/105_Lec11_12_2nd_metabolism.pdf. Visité le 13 octobre 2010.
27. **El Kalamouni C. (2010).** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat en Sciences des Agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse. 227 p.
28. **El Kouri, Pohier M.A., Treuwick, Le Gallou F., Baron D. et Potel G. (1998).** Infection à *Staphylocoques* : aspect cliniques et bactériologiques. Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-007-A-10, 8 p.
29. **Franchomme P. et Pénöel D. (1990).** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Ed. Roger Jallois. Limoges. 445 p.
30. **Ganou L. (1993).** Contribution à l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Traitements des Matières Premières Végétales. Institut National Polytechnique de Toulouse. 273 p.
31. **Gauvin A., Ravaomanarivo H. and Smadja J. (2003).** Comparative analysis by gas chromatography mass spectrometry of the essential oils from bark and leaves of *Cedrelopsis grevei* Baill, an aromatic and medicinal plant from Madagascar. Journal of Chromatography A, **1029**, 279-282.
32. **Guéneau P, Bedel J. et Thiel J. (1975).** Bois et essences malgaches. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, France. 82 p.
33. **Guenther E. (1948).** The essential oils : history, origin in plants, production, analysis. Robert E. Krieger publishing company, **1**, 440-519.
34. **Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A. et Benmansour A. (2009).** Étude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Afrique, SCIENCE, **5**, 246-259.
35. **Hermal C. (1993).** Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier I. 87 p.

36. **Homburger F., Boger E. (1968).** The carcinogenicity of essential oils, flavors and spices. A review. *Cancer Res.*, **28**, 2372-2374.
37. **Hood J.R., Wilkinson J.M. et Cavanagh H.M.A. (2003).** Evaluation of common antibacterial screening methods utilised in essential oil research. *Essential oil Res.*, Nov/Dec 2003.
38. **Inouye S., Tsuruoka T., Uchida k., Yamaguchi H. (2001).** Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol. Immunol.*, **45**, 201-208.
39. **Inouye S., Uchida K., Maruyama N., Yamaguchi H., Abe S. (2006).** A novel to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Jpn. J Med. Mycol.*, **47**, 91-98.
40. **INRA (2011).** Épidémie à *Escherichia coli* en Allemagne : une part du mystère levée [En ligne] : <<http://www.inra.fr>>. Visité le 20 juin 2011.
41. **Kesselmeier J. and Staudt M. (1999).** Biogenic volatile organic compounds (VOC) : An overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **33**, 23-88.
42. **Knudsen J. T., Eriksson R., Gershenson J. and Stahl B. (2006).** Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review*, **72**, 1-120.
43. **Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J.P. (1994).** Biogenèse des monoterpènes II – La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **133**, 79-99.
44. **Lavoir A.V. (2008).** Effet de la limitation en eau sur les émissions de composés organiques volatils chez le chêne vert (*Quercus ilex*). Thèse de Doctorat en Évolution, Écologie, Ressources Génétiques, Paléontologie. École Doctorale Sibaghe, Université Montpellier II. 269 p.
45. **Ibrahim N. (2010).** Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle des écorces de *Cryptocarya crassifolia* (LAURACEAE). Mémoire de Diplôme d'études approfondies en Biochimie appliquées aux sciences médicales. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. 69 p.
46. **Leroy J.F. et Lescot M. (1991).** Flore de Madagascar et des Comores, Famille 107 bis : Ptaeroxylaceae. Ed. Muséum National d'Histoire Naturelle Paris, 87-117.
47. **Lichtenthaler H.K. (2000).** Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochemical Society Transactions*, **28**, 785-789.
48. **Malecky M. (2008).** Métabolisme des terpénoïdes chez les Caprins. Thèse de Doctorat en Physiologie de la Nutrition Animale. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. 201 p.

49. **Mapola G. (2003).** Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles de *E. citriodora* acclimaté à Pointe-Noire (Congo-Brazzaville). Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies en Chimie et technologie alimentaires. 58 p.
50. **Maruyama N., Sekimoto N., Ishibashi H. (2005).** Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J. inflamm.*, **1**, 1-11.
51. **Mikulášová M. and Vaverková S. (2009).** Antimicrobial effects of essential oils from *Tanacetum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L., growing in Slovakia. *Nova Biotechnologica*, **9**, 161-166.
52. **Mohamed T. (1997).** Contribution à l'étude de l'huile essentielle et de la concrète de différents chémotypes de fleurs d'immortelle [*Helichrysum italicum* (Roth)]. Thèse de Doctorat en chimie analytique, Aix-Marseille. 168 p.
53. **Mohammedi Z. (2006).** Étude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magister en produits naturels, activités biologiques et synthèse, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105 p.
54. **Morin P., Gunther C., Peyron L. and Richard H. (1985).** Physical and chemical phenomena involved in steam distillation. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **5**, 921-936.
55. **Nakayama T., Ito, E., Nomura N. and Matsumura M. (2006a).** Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Letters*, **258**, 194-199.
56. **Nerlet, N. (1993).** Les huiles essentielles : production mondiale, échanges internationaux et politique de développement. Thèse de doctorat en Sciences économiques. 265 p.
57. **Norme ISO 9235 : 1997**, Matières premières aromatiques d'origine naturelle – Vocabulaire. 25 p.
58. **Ochoa H.L.R. (2005).** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné "solvant/actif" d'origine végétale. Thèse de Doctorat en Sciences des Agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse. 224 p.
59. **Oussou K.R., Yolou S.F., Tue Bi B., Kanko C., Boti J.B., Ahibo C. et Casanova J. (2010).** Étude chimique bio-guidée de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* (LAMINIACEAE). *European Journal of Scientific Research*, **40**, 50-59.
60. **Paris M., Hurabielle M. (1986).** Abrégé de matière médicale pharmacognosie, Monographie (2^e partie). Tome 2, Éd. Masson, Paris. 173 p.
61. **Pibiri M.C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation

- au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Ès Sciences. Faculté environnement naturel, architectural et construit. École polytechnique fédérale de Lausanne. 224 p.
62. **Piochon M. (2008).** Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables, Université du Québec. 220 p.
 63. **Porter, N. (2001).** Essential oils and their production. *Crop & Food Research*, **39**, 1-4.
 64. **Pyun M.S. and Shin S. (2006).** Antifungal effects of the volatile oils from *Allium Sativum* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*, **13**, 394-400.
 65. **Raj S.T., Lipton A.P. and Chauhan G.S. (2010).** Characterization and evaluation of *Vibrio harveyi* causing white patch disease among captive reared seahorses, *Hippocampus kuda*. *Indian Journal of Marine Sciences*, **39**, 151-156.
 66. **Rakotoarison O. (2008).** Étude de l'activité cardio-vasculaire d'un extrait de *Cedrelopsis grevei* (MELIACEAE) ou Katrafay. Thèse de Doctorat en Sciences de la vie. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. 155 p.
 67. **Rakotobe M., Menut C., Andrianoelisoa H.S., Rahajanirina V., Collas de Chatelperron P., Roger E. and Danthu P. (2008).** The bark essential oil composition and chemotaxonomical appraisal of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon from Madagascar. *Natural Product Communications*, **3**, 1145-1150.
 68. **Rakotomalala H. (2004).** Étude des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* : caractérisation, identification des constituants, activités biologiques. Thèse de Doctorat en Chimie Physique. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. 146 p.
 69. **Ranaivosoa B. (2007).** Étude analytique des constituants chimiques des huiles essentielles de *Cinnamosma* de Madagascar : variétés et variabilités. Mémoire Chimie appliquée à l'industrie et à l'environnement, ESPA. 127 p.
 70. **Randevoson M.N.M. (2004).** Contribution à la réalisation de la pharmacopée malagasy monographie de : *Calophyllum inophyllum*, *Cedrelopsis grevei*, *Cinnamomum camphora* et *Ravensara aromatica*. Mémoire d'Ingénierat. École Supérieure des Sciences Agronomiques d'Antananarivo. 168 p.
 71. **Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H.S., Raherimandimby M. and Danthu P. (2009).** Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*, **114**, 680-684.

72. **Randriantsoa D.R. (2004).** Étude comparative de deux huiles essentielles antibactériennes extraites des plantes *Cinnamosma fragans* et *Citrus simensis* dans l'élevage larvaire de la crevette *Panaeus monodon*. Mémoire de Diplôme d'études approfondies en Biotechnologie-microbiologie. 133 p.
73. **Raobelison F.J.L. (2004).** Contribution a l'étude de la variabilité qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Ravensara aromatica* Sonnerat dans la région de Betanimainty. Mémoire d'Ingénierat. École Supérieure des Sciences Agronomiques d'Antananarivo. 63 p.
74. **Razafimamonjison E.G.N. (2007).** Étude de la variabilité qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* en vue d'une meilleure valorisation. Mémoire de Diplôme d'études approfondies. École Supérieure des Sciences Agronomiques. 105 p.
75. **Razafindrakoto B.S. (1988).** Huiles essentielles d'Eucalyptus de Madagascar ; variabilité de la composition et du rendement en fonction de la période de récolte ; essais de classement chemotaxonomique et propriétés pharmacodynamiques. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II. 280 p.
76. **Reinehart E.R.N., Smith E.N., Wennersten C., Gross E., Freeman J., Eliopoulos G.M., Moellering R.C., Jr. and Goldmann D.A.M.D. (1990).** Rapid dissemination of β -lactamase-producing, aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecalis* among patients and staff on an infant-toddler surgical ward. The new England journal of medecine, **323**, 1814-1818.
77. **Reinhard J., Srinivasan M.V. (2004).** Floral scents induce recall of navigational and visual memories in honeybees. Journal of Experimental Biology, **207**, 4371-4381.
78. **Remmal A., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A. and Ettayebi M. (1993b).** Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. J. Pharm. Belg., **48**, 352-356.
79. **Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T. and Ettayebi, M. (1993a).** Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. J. Essent. Oil. Res., **5**, 179-184.
80. **Reverdy M.E., Meugnier H., Bes M., Ferry T., Forey F., Lina G., Vandenesch F., Etienne J. (2003).** Résistance aux antibiotiques et infections nosocomiales, Surveillance nationale des maladies infectieuses. Centre national de référence des *Staphylocoques*, Inserm E0230, Faculté de médecine Laennec, Laboratoire central de microbiologie. 7p.
81. **Rhayour K. (2002).** Étude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la

- santé. Faculté des Sciences Dhar Mehraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. 158 p.
82. **Rohmer M. (1999).** The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports*, **16**, 565-574.
83. **Samain J.F., Cochard J.C., Chevolut L., Daniel J.Y., Jeanthon C., Le Coz J.R., Marty Y., Moal J., Prieur D. et Salaun M. (1987).** Effet de la qualité de l'eau sur la croissance larvaire de *Pecten maximus* en écloserie : observations préliminaires. *Haliotis*, **16**, 363-381.
84. **Samisoa G. (1998).** Contribution à l'étude de la dynamique de la population de *Cedrelopsis grevei* B. (Katrafay) dans la forêt de Zombitse et sa régénération artificielle. Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies en Sciences Biologiques appliquées, Option Physiologie Végétale. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. 62 p.
85. **Sarbach R. (1962).** Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères. Faculté de Pharmacie, Université de Rennes. 181 p.
86. **Schatz G.E. (2001).** Flore générique des arbres de Madagascar. Royal Botanical Gardens, Kew & Missouri Botanical Garden, Grande Bretagne, 477 p.
87. **Sharkey T.D. (1991).** Stomatal control of trace gas emissions. *Trace gas emission by plants. Physiological ecology. A series of monographs, texts, and treatises.* H. E. A. Sharkey T.D., Mooney H.A. San Diego, CA, USA : Academic Press, Inc., 335-339.
88. **Smadja J. (2001).** Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments. Cours de maîtrise, Faculté des Sciences et Technologies, Université de La Réunion.
89. **Smith C.K., Moore C.A., Alahi E.N., Smart Â.T. & Hotchkiss S.A. (2000).** Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **168**, 189-99.
90. **Smola M. (2008).** Contribution à l'étude de la formulation et de l'analyse physicochimique de formulations pédiatriques microémulsionnées. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 327 p.
91. **Terry G. M., Stokes N.J. (1995).** Exposure to Isoprene Promotes Flowering in Plants. *Journal of Experimental Botany*, **46**, 1629-1631.
92. **Travers M.A. (2008).** Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata* : approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Thèse de Doctorat en Microbiologie. 270 p.
93. **Tremblay C. (2008).** Mise à jour du traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. *Pharmactuel*, **41**, 284-295.

94. **Uttley A.H.C., George R.C., Naidoo J., Woodford N., Johnson P., Collins C.H., Morrison D., Gilfillan A.J., Fitch, L.E. and Heptonstall J. (1989).** High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidem. Inf.*, 103, 173-181.
95. **Vimont A. (2007).** Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard. 318 p.
96. **W.H.O. (2002).** Food safety and foodborne illness, World Health Organization Fact sheet 237, Reviewed March 2007. 4 p.
97. **Wikipédia (2010).** *Vibrio harveyi* [En ligne] :
<http://www.en.wikipédia.org/wiki/vibrio_harveyi>. Visité le 14 aout 2010.
98. **Wikiphyto (2010).** Huile essentielle [En ligne] :
<http://www.wikiphyto.org/wiki/Huile_essentielle#cite_note-7>. Visité le 13 octobre 2010.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des composants des huiles essentielles de l'écorce de *Cedrelopsis grevei* identifiés par CPG et RMN

Nature chimique	Nom	Quantité (%)
Monoterpènes hydrocarbonés	β-pinène	1,3-17,1
	α-pinène	0,6-3,6
	limonène	0,3-1,8
	para-cymène	0,3
	δ-3-carène	0,3-4,2
	camphène	tr
	sabinène	tr-0,3
	β-myrcène	0,6-0,7
	α-terpinène	0,5-1,3
	sylvestrène	tr
	β-phellandrène	tr
	cis-β-ocimène	0,6
	trans-β-ocimène	tr
Monoterpènes oxygénés	terpinolène	tr-0,2
	linalol	0,2-0,5
	endo-fenchol	tr
	trans-pinocarvéol	0,6-2,2
	camphre	0,5
	bornéol	0,4
	umbellulone	tr
	terpin-4-ol	0,2-1
	p-cymén-8-ol	tr
	α-terpinéol	0,2-1,2
	myrténal	0,3-1,3
	myrténol	0,3-1,2
	acétate de fenchyle	0,1-3,5
Oxydes terpéniques	acétate d'isobornyle	tr
	terpène-4-ol	0,19
Sesquiterpènes hydrocarbonés	oxyde de carophyllène	0,87
Sesquiterpènes hydrocarbonés	cis-calaménène	2,62
	allo-aromadandrène	2,06
	aristolochène	1,37
	α-calacorène	0,61

Sesquiterpènes hydrocarbonés	sélina-5,11-diène	2,36
	β-carophyllène	0,5
	δ-élémène	0,3-9,6
	α-cubébène	0,48
	ishwarane	1,0-25,9
	β-élémène	1,8-11,2
	α-cédrène	0,5-2,2
	α-cis-bergamotène	tr-0,2
	β-caryophyllène	1,7-10,6
	α-trans-bergamotène	tr-0,7
	cis-β-farnésène	tr-0,2
	trans-β-farnésène	2,0-2,3
	α-humulène	1,2-4,3
	γ-curcumène	tr-0,9
	α-curcumène	2,6-8,7
	β-bisabolène	2,8-9,2
	β-curcumène	2,1-2,4
	γ-cadinène	0,7-0,8
	δ-cadinène	1,6-4,6
	trans-calaménène	tr
	(E)-caryophyllène	1,3-12,5
	α-copaène	4,9-11,1
	α-sélinène	1,0-9,40
	δ-cadinène	3,2-7,4
	β-sélinène	2,8-7,30
	α-humulène	0,8-5,4
	γ-muurolène	1,9-4,4
	β-copaène	0,3
	rotundène	0,3-0,4
	4,5-di-épi-aristolochène	1,5
	trans-calaménène	0,6
Sesquiterpènes oxygénés	sesquicinéol	0,6-2,4
	composé A ²	tr-1,5
	composé B ²	1,6-12,8

Sesquiterpènes oxygénés	composé C ²	tr-2,3
	composé D ²	1,6-7,0
	γ-eudesmol	0,1-0,3
	β-eudesmol	0,5-1,2
	α-eudesmol	1,2-1,6
	α-bisabolol	0,2-1,1
	hydrates de sesquisabinène	0,1
	hydrate de cis-sesquisabinène	12,8
	oxyde de caryophyllène	2,0-7,0
	époxyde d'humulène II	0,8
	8-épi-γ-eudesmol	0,2
	β-bisabolol	0,51-0,8
	épi-α-bisabolol	0,1-0,8
	α-humulène	3,3
	epi-globulol	1,12
	épi-cubénol	1,19
	élémol	0,59-1,3
	Ishwarol B	0,1
Autres composés	nopinone	tr
	eugénol	0,9

ANNEXE 2 : Composition et mode préparation des milieux de culture

Type de milieu	Nom	Composition	Quantité (g/l)	Préparation (1 litre de milieu)
Solide	MUËLLER HINTON AGAR	Extrait de viande	2	Verser 35 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Agiter continuellement jusqu'à ébullition et dissolution complète du milieu. pH : 7,3 ± 0,1.
		Peptone trypsique de caséine	17,5	
		Amidon	1,5	
Solide	MARINE AGAR	Agar	15	
		Peptone	5	Verser 55,5 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Agiter continuellement jusqu'à ébullition et dissolution complète du milieu. pH : 7,6 ± 0,2.
		Extrait de levure	1	
		Citrate de fer	0,1	
		Chlorure de sodium	19,45	
		Chlorure de magnésium	8,8	
		Sulfate disodique	3,24	
		Chlorure de calcium	1,8	
		Chlorure de potassium	0,55	
		Bicarbonate de sodium	0,16	
		Bromure de potassium	0,08	
		Gélose	15	
		Chlorure de strontium	0,03	
		Acide borique	0,02	
Solide	POOR BROTH AGAR	Silicate de sodium	0,004	Verser 30 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Agiter continuellement jusqu'à ébullition et dissolution complète du milieu.
		Fluorure de sodium	0,0024	
		Nitrate d'ammonium	0,0016	
Solide	ZOBELL AGAR	Phosphate disodique	0,008	Verser 50 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Agiter continuellement jusqu'à ébullition et dissolution complète du milieu.
		Chlorure de Sodium	5	
		Bactotryptone	10	
		Agar	15	

Liquide	POOR BROTH	Chlorure de Sodium	5	Verser 15 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Agiter continuellement jusqu'à ébullition et dissolution complète du milieu.
		Bactotryptone	10	
	ZOBELL	Extrait de levure	1	Verser 35 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Agiter continuellement jusqu'à ébullition et dissolution complète du milieu.
		Peptone	4	
		Chlorure de Sodium	30	

ANNEXE 3 : Propriétés physiques du Tween 80 (Source : Ibrahim, 2010)

Forme : liquide

Couleur : jaune

Odeur : inodore

Viscosité cinématique (25 °C) : 300-500 mm²/s

Point de fusion : non disponible

Point d'ébullition > 100°C

Température d'inflammation > 180 °C

Point d'éclair > 149 °C coupelle fermée

Limites d'explosion inférieure : non disponible

Limite d'explosion supérieure : non disponible

Pression de vapeur < 1,33 hPa

Densité (25 °C) 1,07 g/cm³

Solubilité dans :

L'eau (20 °C) soluble

Éthanol (20°C) soluble

ANNEXE 4 : Densité optique à 600 nm des cultures bactériennes avec les huiles essentielles dans un milieu sans Tween 80 et un milieu avec Tween 80 à 0,02 % (v/v).

Bactérie	Milieu	HE	Concentration en HE (μ l/ml)						Témoin milieu		
			5	2,5	1,25	0,6	0,3	0,1	Négatif	Positif	
<i>Escherichia coli</i>	Sans Tween	CG 2-1	A	0,076	0,051	0,042	0,161	0,840	1,956	0,004	2,890
			B	0,080	0,068	0,028	0,766	0,940	2,340		
			T	0,065	0,060	0,020	0,006	0,004	0,004		
			A-T	0,011	-0,009	0,022	0,155	0,836	1,952		
			B-T	0,015	0,008	0,008	0,760	0,936	2,336		
		CG 3-1	A	0,038	0,080	0,053	0,163	0,904	1,760		
			B	0,068	0,083	0,025	0,075	0,895	2,020		
			T	0,089	0,070	0,022	0,015	0,004	0,004		
			A-T	-0,051	0,010	0,031	0,148	0,900	1,756		
			B-T	-0,021	0,013	0,003	0,060	0,891	2,016		
		CG 3-2	A	0,063	0,082	0,031	0,038	0,876	2,650		
			B	0,088	0,060	0,030	0,039	0,894	2,32		
			T	0,079	0,057	0,030	0,007	0,004	0,004		
			A-T	-0,016	0,025	0,001	0,031	0,872	2,646		
			B-T	0,009	0,003	0,000	0,032	0,890	2,316		
	Avec Tween	CG 2-1	A	0,139	0,108	0,073	0,105	0,560	1,853	0,030	2,660
			B	0,145	0,095	0,084	0,206	0,602	1,312		
			T	0,100	0,054	0,043	0,020	0,007	0,004		
			A-T	0,039	0,054	0,030	0,085	0,553	1,849		
			B-T	0,045	0,041	0,041	0,186	0,595	1,308		
		CG 3-1	A	0,255	0,112	0,098	0,035	0,320	1,992		
			B	0,300	0,104	0,090	0,078	0,465	2,003		
			T	0,194	0,074	0,068	0,054	0,020	0,004		
			A-T	0,061	0,038	0,030	-0,019	0,300	1,988		
			B-T	0,106	0,030	0,022	0,024	0,445	1,999		
		CG 3-2	A	0,090	0,139	0,060	0,068	0,650	1,760		
			B	0,207	0,063	0,029	0,087	0,834	1,943		
			T	0,197	0,101	0,065	0,038	0,016	0,004		
			A-T	-0,107	0,038	-0,005	0,030	0,634	1,756		
			B-T	0,010	-0,038	-0,036	0,049	0,818	1,939		

Author: RANDRIANAIVO Heriniaina Jeannot

Title: "ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES DES HUILES ESSENTIELLES DE *Cedrelopsis grevei* Baillon (RUTACEAE)"

ABSTRACT

As part of the search for new bioactive molecules alternatives to standard antibiotics, the study of antimicrobial properties of essential oil from the bark of *Cedrelopsis grevei*, an endemic Rutaceae of Madagascar was made. The plant material was harvested in four areas. A fractional hydrodistillation was used to extract essential oils from the bark. The activity of the eleven samples of essential oils collected (fractions or totum) was studied using three methods.

The agar diffusion assay was used to test the activity of essential oils to 5 µl. The eleven samples are active on both Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram negative (*Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri*). Both Vibrio are the most sensitive with a halo of inhibition ranging from 16 to 23.5 mm against a halo of 9 to 13mm for the other bacteria. All oils are not active on *Salmonella typhimurium*.

Dilution assay was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of samples of essential oils. For this, we performed serial dilutions of the eleven solutions of concentration 5 µl/ml. This technique has shown that *S. typhimurium* is resistant to all concentrations of essential oils tested. All samples tested were bacteriostatic on *V. fischeri* but is bactericidal or bacteriostatic on others. The bactericidal effect depends primarily on the collection area. The totum are generally less active than their fractions.

Studies using the agar vapor assay show that the volatile phase of essential oils has a very low activity of the microorganisms tested.

Keywords : *Cedrelopsis grevei* Baillon, Katrafay, antimicrobial properties, essential oil, fraction, MIC, MBC.

Supervisors : Dr. RAKOTO-RANOROMALALA Aurore Danielle Doll

Dr. DANTHU Pascal

Auteur : RANDRIANAIVO Heriniaina Jeannot

Titre : " **ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES DES HUILES ESSENTIELLES DE *Cedrelopsis grevei* Baillon (RUTACEAE)** "

RÉSUMÉ

Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules bioactives alternatives aux antibiotiques standard, les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de l'écorce de *Cedrelopsis grevei*, une Rutacée endémique de Madagascar ont été étudiées. Le matériel végétal a été récolté dans quatre zones. Une hydrodistillation fractionnée a permis d'extraire les huiles essentielles des écorces. L'activité des onze échantillons d'huiles essentielles recueillies (fractions ou tota) a été étudiée selon trois méthodes.

La méthode de diffusion en milieu gélosé a été utilisée pour tester l'activité des huiles essentielles de volume 5 µl. Les onze échantillons sont actifs à la fois sur des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*) et sur des bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri*). Les deux *Vibrio* sont les plus sensibles avec un halo d'inhibition allant de 16 à 23,5 mm contre un halo de 9 à 13 mm pour les autres bactéries. Toutes les huiles sont inactives sur *Salmonella typhimurium*.

La méthode de dilution a permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des échantillons d'huiles essentielles. Pour cela, les onze échantillons (tota et fractions) de concentration 5 µl/ml ont été dilués en cascade. Cette technique a montré que *S. typhimurium* est résistante à toutes les concentrations d'huiles essentielles testées. Tous les échantillons testés sont bactériostatiques sur *V. fischeri* mais sont bactéricides ou bactériostatiques sur les autres. L'effet bactéricide dépend principalement de la zone de récolte. Les tota sont généralement moins actifs que leurs fractions.

Les études menées en utilisant la méthode de dispersion en microatmosphère ont montré que la phase volatile des huiles essentielles a une faible activité sur les microorganismes testés.

Mots-clés : *Cedrelopsis grevei* Baillon, Katrafay, propriétés antibactériennes, huile essentielle, fraction, CMI, CMB.

Rapporteurs : Dr. RAKOTO-RANOROMALALA Aurore Danielle Doll

Dr. DANTHU Pascal