

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Extraction, analyse et évaluation de l'activité
antimicrobienne de l'huile essentielle de la cannelle de
chine**

Présenté par :

MEDJANI CELIA et **MAGUEMOUN KENZA**

Soutenu publiquement, le 27 / 09 / 2017, *devant le Jury composé de :*

SAAL Amar	MCA	UMMTO	Président
BENCHOULAK Mounir	MAB	UMMTO	Encadreur
ABDOUNE Amar	Pharmacien Microbiologiste	CHU.TO	Co-encadreur
BELMAHDI Lila	MAA	UMMTO	Examinatrice
BENLOUNES Ouarda	MCA	UMMTO	Examinatrice

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, nous remercions le Dieu tout puissant, pour nous avoir aidées à réaliser ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au département de Chimie, laboratoire de « Chimie Pharmaceutique », sous la direction de Monsieur **BENCHOULEK Mounir**, la partie biologique a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie à l'hôpital Nedir Mohammed C.H.U de Tizi-Ouzou, sous la direction de **Dr Abdoune Amar**.

Tout d'abord, Nous tenons à remercier du fond du cœur , notre promoteur Monsieur **BENCHOULAK Mounir**, Professeur à l'université Mouloud Mammeri de TIZI-OUZOU, Pour la totale confiance qu'il nous a accordée, son soutien ,ses précieux conseils, ses encouragements et sa disponibilité dans le travail ont permis le bon déroulement de ce mémoire.

Nous sommes également sensible à l'honneur que nous fait **Dr Abdoune Amar**, Pharmacien Résidant en Microbiologie à l'hôpital C.H.U de Tizi-Ouzou, en acceptant d'être le co-promoteur de ce travail, Nous aimerions lui adresser notre plus vifs remerciements pour l'attention qu'il a portée à ce mémoire, pour sa confiance, son soutien ,sa disponibilité et sa rigueur dans le travail. Nous vous remercions également pour votre aide concernant la rédaction. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous exprimons notre gratitude aux membres de jury, chacun a son nom, d'accepter de juger notre travail :

M^r SAAL Amar

M^{me} BENLOUNES Ouarda

M^{me} BELMAHDI Lila

On remercie vivement l'ingénieure de Laboratoire de Chimie pharmaceutique pour son aide ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Nous tenons à remercier M^{elle} **HALEM Zohra**, pour l'aide qu'elle nous a apportée dans la réalisation d'analyse d'huile essentielle par IF à l'université de Bouira.

Nous remercions **Dr Azzam Amina**, chef d'unité du Laboratoire microbiologie du C.H.U de TIZI-OUZOU , de nous avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire et pour les moyens matériels mis à notre disposition.

Un immense merci au personnel du laboratoire de microbiologie et parasitologie de C.H.U de TIZI-OUZOU particulièrement : **MAGUEMOUN Chafia, HADJI Djazira, BOURKAB Asma, DJERDI Fetheddine, CHYEB Said**. Nous adressons notre profonde reconnaissance pour leur soutien et leur infinie gentillesse.

Enfin, nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mon père que j'aurais tant aimé voir à mes côtés en ce moment, que dieu t'accueille dans son vaste paradis.

A ma maman, pour ton dévouement, ton amour, tes sacrifices et tes encouragements. Que ce travail soit, pour toi, un témoignage de ma profonde affection et tendresse, que dieu te protège et te garde.

A mon très cher oncle DAHMANE.

A mon frère SAMIR

A toute ma famille.

A mes amis (es) et à tous ceux que j'ai connus qui m'ont aidé et soutenus.

A tous mes camarades de la promotion 2017 et à tous les étudiants en chimie pharmaceutiques.

Celia 

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Aux êtres les plus chères : Mes PARENTS.

Vous êtes mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant. La où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous MES CHERS que je le dois.

A mes chers frères Mohamed et Abdelmalik,

A toute ma famille

A tous ceux qui m'ont encouragé et m'ont apporté leur soutien.

A tous mes camarades de la promotion 2017 et à tous les étudiants en chimie pharmaceutiques.

Kenza 

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
INTRODUCTION	1

Chapitre I : Partie Bibliographique

I. Généralité sur les huiles essentielles	2
I.1. Définition	2
I.2. Répartition, localisation.....	2
I.3. propriétés physiques	2
I.4. Composition chimique	2
I.5. Méthodes d'extraction	3
I.5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	3
I.5.2. Extraction par hydro distillation d'huile essentielle	3
I.5.3. Extraction par solvants organiques	3
I.5.4. Enfleurage	3
I.6. Contrôle des huiles essentielles et des essences	4
I.6.1. Essai physiques	4
I.6.2. Essai chimiques	4
I.6.3. Analyse chromatographique	5
I.7. Activité biologique des huiles essentielles	6
I.7.1. Activité antimicrobienne	6
I.7.2. Autres propriétés	8
II. Présentation de l'espèce étudiée (cannelle de Chine)	8
II.1. Généralité sur les canneliers	8
II.2. Description botanique du cannelier de Chine: <i>C.cassia</i>	9
II.3. La partie active de cannelle de Chine : <i>C.cassia</i>	9

II.4.Conservation ..	10
II.5.Composition chimique de l'huile essentielle de <i>C.cassia</i>	10
II.6.Effet thérapeutique de <i>C.cassia</i>	11
II.7.Utilisation traditionnels et courants de <i>C.cassia</i>	11

Chapitre II : Partie Expérimentale

Partie A : Matériels et Méthodes

I. Extraction de l'huile essentielle de cannelle de Chine : <i>C.cassia</i>	12
I.1 Matière végétale	12
I.2. Mode d'extraction	12
I.3. Paramètre intervenant dans le procédé d'extraction	13
1.Rendement en huile essentielle	13
2.Caractérisation organoleptique de l'huile essentielle de <i>C. cassia</i>	13
3. Caractérisation physicochimique	14
3. 1.Détermination de la densité relative	14
3.2. Indice de réfraction	14
3.3. Indice d'acide	15
3.4. Indice de saponification	15
3.5. Indice d'esters	16
3.6. Indice de peroxyde	16
3.7. Miscibilité a l'éthanol	16
3.8. Spectroscopie infrarouge	17
3.9. Caractérisation chromatographique	18
3.9.1. Chromatographie sur couche mince	18
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Cinnamomum cassia</i> en milieu solide	19
4.1. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de	

C.Cassia (aromatogramme	19
4. 1.1. Matériel	19
4. 1.1.1. Provenance des souches bactériennes et fongiques	29
4.1.1.2. Milieux de cultures utilisés	20
4.1.2. Isolement et confirmation des souches bactériennes sensibles	21
4.1.3. Reisolement des souches microbiennes	22
4.1.4. Préparation des suspensions microbiennes	23
4.1.5. Ensemencement des boîtes de pétri	23
4.1.6. Dépôt des disques	23
4.1.7. Mesure des diamètres des zones d'inhibitions	25
4.2. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de Cinnamomum Cassia	25
4.2.1. Détermination de la CMI	25
4.2.2. Détermination de CMB /CMF.....	27

Partie B : Résultats et Discussions

I. Rendement d'extraction	28
II. Détermination des propriétés physico-chimiques	29
III. Spectroscopie infrarouge	31
IV. Caractérisation chromatographique	32
V. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>C.cassia</i> en milieu solide	33
V.1. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de cannelle	33
V.2. Mesure des diamètres des zones d'inhibition	34
V.3. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de cannelle	35

CONCLUSION	40
-------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

AB : Amphotéricine

AMP : Ampicilline

ATCC : American Type Culture Collection

ATM : Aztréonam

B.subtilis : Bacillus subtilis

BLSE : Betalactamases à spectre élargie

C.albicans : Candida Albicans.

C.cassia : Cinnamomum cassia.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CL : Colistine

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

d²⁰₂₀ : Densité relative

E.coli : Escherichia coli

g : gramme

h : heure

HE : Huile Essentielle

IA : Indice Acide

IE : Indice Ester

Ip : Indice de peroxyde

IPM : Imipénème

Is : Indice de saponification

mg : milligramme

Liste des abréviations

MH : Muller Hinton

min : minute

mm : millimètre

NCCLS : National Comite for Clinical Laboratory Standards.

N.B : notez bien

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Ox: oxacilline

P.aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa

Pn: Pénicilline

PP: phénolphtaléine

R : Résistant

RF : facteur de rétention

S : Sensible

S.aureus : Staphylococcus aureus

(T+) : Témoins positif

(T) : Témoin négatif

T_{éb} : température d'ébullition

TIC : Ticarcilline

UMMTO : Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou

UV : Ultra-violet

VA : vancomycin

VP : Vogs Proakauer

°C : Degré Celsius

µl : microlitre

% : pourcentage

Liste des tableaux

Tableau 1 : Corrélation entre sensibilité du germe et taille du halo d'inhibition	25
Tableau 2 : Rendement d'extraction de l'HE de Cinnamomum cassia	28
Tableau 3 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de C.cassia.....	28
Tableau 4 : Résultats des rapports frontaux	32
Tableau 5 : Caractère des souches bactériennes sensibles étudiée	33
Tableau 6 : Diamètres des zones d'inhibition provoqués par l'HE testée sur différentes souches microbiennes.....	34
Tableau 7 : Résultats des CMI pour les germes testés.....	36
Tableau 8 : Récapitulatif des résultats des CMI pour les germes sensibles.....	37
Tableau 9 : Résultats des CMB et CMF pour les germes testés	38
Tableau 10 : Rapport CMB/CMI	38

Liste des figures

Figure 1 : Feuille de <i>cinnamomum cassia</i>	9
Figure 2 : Cannelle de Ceylan.....	10
Figure 3 : Cannelle de Chine.....	10
Figure 4 : Quelques composés chimiques d'huile essentielle de cannelle de Chine.....	10
Figure 5 : Montage d'hydrodistillation.....	12
Figure 6 : le milieu réactionnel avant et au point d'équilibre	15
Figure 7 : (a) : Coloration du mélange réactionnel avant l'ajout de PP, (b) : après l'ajout de PP et (c)	15
Figure 8 : Migration du solvant	18
Figure 9 : Préparation des suspensions microbiennes à partir des colonies isolées.....	23
Figure 10 : Ensemencement par les suspensions microbiennes.....	23
Figure 11 : Dépôt des disques sur les boites préalablement ensemencées	24
Figure 12 : Dépôt des disques sur MH, 1:Escherichia coli, 2: E.coli pénicillinase+, 3 : E.coli BLSE +,4 : Staphylococcus aureus, 5: S.aureus pénicillinase+, 6 : S.aureus résistantes à la méticilline, 7 : Pseudomonas aeruginosa, 8 : Bacillus subtilis.....	26
Figure 13 : Dépôt des disques imprégné de la suspension de <i>Candida albicans</i> sur Sabouraud (D1 : disque n°1 et D2 : disque n°2.....	26
Figure 14 : Huile essentielle de <i>cinnamomum cassia</i>	28
Figure 15 : Allure du spectre IR de l'HE de <i>cinnamomum cassia</i>	31
Figure 16 : Tâches de l'HE apparues après pulvérisation avec I_2	32
Figure 17 : Résultats du test de sensibilité de souches microbiennes à l'HE de cannelle par la méthode de l'aromatogramme.....	34
Figure 18 : Détermination de la CMI de 0.03	36
Figure 19 : Détermination de la CMI de 0.06	37

Introduction

Introduction

L'augmentation de la fréquence des infections microbiennes au cours des dernières années ainsi que l'émergence des résistances aux antibiotiques et aux antifongiques de synthèse, constituent un problème de santé majeur, d'où la nécessité d'orienter la recherche vers de nouvelles molécules, entre autre vers les substances d'origine végétale.

Les plantes aromatiques sont considérées comme étant un réservoir inépuisable de composés bioactifs du fait de leurs richesses en huiles essentielles présentant un effet inhibiteur considérable vis-à-vis des bactéries, des champignons, des parasites et des virus.

Il nous semble donc intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche, ce travail porte sur l'étude d'une huile essentielle issue d'une plante appartenant à la famille des Lauracées : cannelle de Chine, *Cinnamomum cassia* Nees ou *C. aromaticum* Nees. Ce choix s'est basé sur sa disponibilité et son usage quotidien comme épice.

Notre manuscrit sera donc scindé en deux parties : une recherche bibliographique consacrée à l'étude des huiles essentielles d'une manière générale et une description de la plante *C.cassia*.

La partie pratique, quant à elle comprend l'extraction de l'huile essentielle de la plante étudiée, la détermination de ses propriétés physico-chimiques, analyse chromatographique et spectroscopique de l'essence extraite et l'étude de son activité biologique. Ainsi qu'une présentation des différents résultats obtenus et leurs discussions par rapport aux références issues d'une recherche bibliographiques.

Enfin, une conclusion générale résumant l'ensemble des résultats obtenus et dégagant les principales perspectives.

Chapitre I

Etude Bibliographique

I. Généralité sur les huiles essentielles

I.1. Définition

La Pharmacopée européenne (8^e édition) définit une HE comme suit : « 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. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. » (**Pharmacopée européenne, 2008**).

I.2. Répartition, localisation

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il aurait 17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles ex : Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Apiaceae, Zingiberaceae.....etc.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs bien sûr (bergamotier, turbéreuse), mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus) et, bien que cela soit habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose), des racines (vétiver), des fruits (toute-épice), des graines (muscade). Si tous les organes de même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation.

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées : cellules à huiles essentielles des Lauraceae, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (**Anton et al ; 2005**).

I.3. propriétés physiques

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles « fixes ».elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (les huiles essentielles de girofle ou de cannelle constituent des exceptions).elle ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels et très peu solubles dans l'eau (**Bruneton, 1999**).

I.4. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par de origines biogénétiques distinctes : le groupe terpénoïdes d'une part et le groupes des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

- **Groupe des terpénoïdes**

Dans la composition des HE on rencontre des terpènes avec une formule générale $(C_5H_8)_n$ et dont la masse moléculaire n'est pas élevée à savoir des monoterpènes avec dix atomes de carbone, des sesquiterpènes avec quinze atomes de carbone et des rares diterpènes avec vingt atomes de carbones (Kaloustian et al ; 2012).

- **Groupes des composés aromatiques dérivés du phénylpropane**

Ce sont les dérivés du phénylpropane (C6-C3). Ils sont beaucoup moins fréquent que les précédents on cite l'acide et l'aldéhyde cinnamique de l'essence de cannelle, l'eugénol (clou de girofle). (Kaloustian et al ; 2012).

I.5.Méthodes d'extraction

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique. Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants (Laib ,2010).

I.5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction, 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 (Laib, 2010).

I.5.2. Extraction par hydro distillation d'huile essentielle

C'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Laib, 2010).

I.5.4. Extraction par solvants organiques

Les solvants les plus utilisés dans l'extraction par solvant organique sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le dichlorométhane et l'acétone. (Haddad, 2016).

I.5.6. Enfleurage

Enfleurage à froid : consiste à mettre des fleurs fraîches dans un solvant lipophile, ce dernier absorbe ainsi les molécules odorantes. On renouvelle régulièrement les fleurs pour saturer au maximum les graisses du solvant.

La graisse est ensuite lavée à l'alcool dans des batteuses, on évapore l'alcool et on obtient ainsi une absolue de pommade.

Enfleurage à chaud : consiste à faire fondre dans de grandes marmites au bain-marie de la graisse à laquelle on ajoute les fleurs. On renouvelle les fleurs tous les deux jours environ. Puis on filtre le tout à travers plusieurs couches de tissus (lin et coton) afin de séparer la graisse inutile de la pommade. On peut utiliser cette pommade telle quelle ou la traiter par la même méthode que pour l'enfleurage à froid afin d'obtenir une absolue (**Bouderdara, 2013**).

I.6. Contrôle des huiles essentielles et des essences

Les pharmacopées prévoient différents essais :

I.6.1. Essai physiques

➤ Densité relative

La densité relative est définie comme étant le rapport de la masse d'un volume d'HE à 20°C par la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C. Cette grandeur est sans dimension, son symbole est d_{20}^{20} et elle varie avec la température (**Ouibrahim, 2015 ; Chouitah, 2012**).

➤ Indice de réfraction

La réfraction est le changement de direction subi par un rayon lumineux lorsqu'il passe d'un milieu optique donné (l'air) à un autre milieu (HE). L'indice de réfraction d'un milieu est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et dans la substance à analyser, il n'a donc pas d'unité (**Ouibrahim, 2015 ; Chouitah, 2012**).

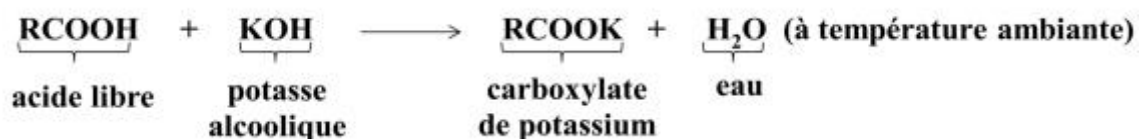
➤ Miscibilité à l'éthanol

La composition chimique riche en terpénoïdes et en molécules polaires permet la solubilisation des HE dans l'éthanol. Plusieurs tests de solubilité sont réalisés avec des volumes croissants d'alcool par rapport à la même quantité d'HE. Il suffira donc de déterminer la limite de solubilité de l'HE à analyser par rapport à l'éthanol (**Kaloustian et al, 2012**).

I.6.2. Essai chimiques

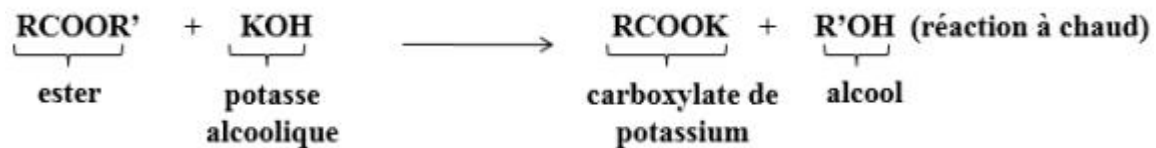
➤ Indice d'acide

L'indice d'acide (IA) est le nombre de milligrammes (mg) de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres dans 1 g d'HE selon la réaction suivante (**Kaloustian et al, 2012**).



➤ **Indice d'esters**

L'indice d'esters (IE) est le nombre de milligrammes (mg) de potasse nécessaire pour saponifier les ester présent dans 1 g d'HE suivant la réaction (**Kaloustian et al, 2012**).



➤ **Indice de saponification**

L'indice de saponification (IS) est le nombre de milligrammes de potasse nécessaire pour neutraliser les acides libres et saponifier les esters présents dans 1g d'HE (**Kaloustian et al, 2012**).

➤ **Indice de peroxyde**

L'indice de peroxyde IP est le nombre qui exprime, en milliéquivalents d'oxygène actif, la quantité de peroxyde contenu dans 1000g de substance (**Kaloustian et al, 2012**).

I.6.3. Analyse chromatographique

➤ **Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Selon la pharmacopée européenne (6ème édition), la CCM est une technique de séparation dans laquelle une phase stationnaire, constituée d'un matériau approprié, est répandue en une couche mince et uniforme sur un support (plaque) de verre, de métal ou de plastique. Des solutions d'analytes sont appliquées sur la plaque avant le développement. La séparation repose sur des mécanismes d'adsorption, de partage ou d'échange d'ions ou sur des combinaisons de ces derniers. Elle s'effectue par migration (développement) de soluté (solutions d'analytes) dans un solvant ou un mélange de solvants approprié (phase mobile) à travers la couche mince (**Mebarki, 2010**).

➤ **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation et d'analyse des composés d'un mélange, reposant sur la migration différentielle des espèces entre deux phases non miscibles ; une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile (gaz vecteur), qui traverse cette phase stationnaire. La CPG est fondée sur des mécanismes d'adsorption, de distribution de masse ou d'exclusion. Elle s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans dégradation (non thermolabiles) (**Benazzouz, 2011 ; Pharmacopée européenne, 2008**).

I. 7. Activité biologique des huiles essentielles

Les plantes aromatiques et leurs extraits (HE) sont largement utilisés pour leurs nombreuses propriétés pharmacologiques, cependant il est important de ne pas confondre l'activité d'une HE avec celle de la plante dont elle est issue (**Bruneton J, 1999**).

I.7.1. Activité antimicrobienne

➤ Activité antibactérienne

Certaines HE sont dotés d'un spectre d'action très large. Ce dernier s'exerce sur des souches bactériennes variées, y compris celles habituellement résistantes aux antibiotiques (**Bruneton J, 1999**).

▪ Mode d'action antibactérien

On distingue deux sortes d'effets des HE sur ces microorganismes : un effet bactéricide en exerçant une activité létale et un effet bactériostatique en inhibant leur croissance. (**Lakhdar L, 2015**)

Le mode d'action des HE sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé compte tenu de la variabilité des quantités et des profils de leurs composants. Cette diversité suggère que l'activité bactérienne des HE n'est pas attribuable à un seul mécanisme, mais plutôt à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Guinoiseau E, 2010**).

D'une manière générale l'action des HE peut s'expliquer par les mécanismes suivant :

- interférence avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, provoquant une augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires.
- altération des différents systèmes enzymatiques dont ceux impliqués dans la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- destruction ou inactivation du matériel génétique.

Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne une modification de la morphologie de la cellule bactérienne et par conséquent la mort de la bactérie.

▪ Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

L'efficacité antimicrobienne des HE dépend de deux principaux paramètres : l'HE et sa composition chimique d'une part, et le microorganisme d'autre part.

• Activité liée à la composition chimique

L'efficacité d'une HE dépend de sa richesse en composés phytochimique, plus elle est riche en substances actives, plus son activité est importante (**Chouitah O, 2012**).

La structure chimique des constituants des HE influence directement leurs activités qui dépendent, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère

hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Ainsi, *in vitro*, on a observé que les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (**OUIBRAHIM A, 2015 ; Lakhdar L, 2015**).

Sur cette base, les composés chimiques d'une HE sont classés selon l'ordre décroissant de leur activité antimicrobienne : phénols, alcools, aldéhydes, cétones, oxydes, hydrocarbures, esters.

- **Activité liée aux microorganismes ciblés**

Le type de microorganismes ciblés est un paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HE. En général, les différents microorganismes n'ont pas la même sensibilité vis à vis des HE. Une HE peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganisme (Gram positif ou négatif), à sa forme, à son métabolisme et à sa résistance (**Lakhdar L, 2015**).

- **Activité antifongique**

Les HE sont actifs sur les levures en agissant sur la biomasse. Plusieurs travaux ont révélé que le pouvoir inhibiteur était essentiellement dû à la formation d'un complexe entre le donneur d'électrons et l'aldéhyde induit un changement de l'état ionique de la membrane se traduisant par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire (**Haddad et al, 2016**).

- **Activité antiparasitaire**

Les molécules aromatiques possédant des phénols ont une action puissante contre les parasites à l'exemple du thym à linalol. (**Haddad et al, 2016**).

- **Activité antivirale**

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des HE telles que les aldéhydes et les alcools monoterpéniques (**Mayer F, 2012**).

- **Méthode d'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne des HE**

La détermination du pouvoir antimicrobien des HE fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Parmi ces techniques on trouve :

- **Technique de diffusion en milieu solide**

Méthode de Vincent

Appelée aussi technique de l'aromatogramme ou méthode de diffusion sur le milieu gélosé. C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antimicrobien des HE dont le principe est similaire à celui d'un antibiogramme.

On utilise des disques de papier filtre de 6mm de diamètre imprégnés de quantités connues d'HE et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface par la suspension microbienne à tester. Après incubation, la lecture des résultats se fait par l'observation de la présence ou non d'un halo d'inhibition qui apparaît si l'HE est active et dont on mesure le diamètre en millimètre (mm) afin de classer les germes selon leur sensibilité (**Chabert G, 2013;Mayer F.2012**).

➤ **Technique de dilution en milieu solide**

Le but de la méthode de dilution en milieu gélosé est de déterminer la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance visible à l'œil nu d'un microorganisme après incubation qui est par définition la CMI ainsi que de la concentration minimale bactéricide/fongicide (CMB/CMF) qui est la plus faible concentration d'antimicrobien qui tue 99,9% des microorganismes déterminés après repiquage (**El Kalamouni , 2010**).

1.7.2. Autres propriétés

➤ **Activité antioxydante**

Les antioxydants transmettent aux radicaux oxygénés l'hydrogène des fonctions phénoliques ou ils forment des produits stables avec des radicaux d'acide gras et interrompent ainsi les réactions radicalaires en chaîne. C'est le cas des HE soufrées, des phénols, des aldéhydes mono et diterpéniques, des dérivés des aldéhydes benzéniques et cinnamiques, etc. (**Haddad et al, 2016**).

➤ **Action anti-inflammatoire**

Les huiles essentielles anti-inflammatoires stimulent les mécanismes de défense naturelle à réagir tout en activant les propriétés immuno-modulantes.

Elles aident ainsi le corps en le soutenant lors de tout processus inflammatoire même sous-jacent (**Sylvie Verbois, 2001**).

II. Présentation de l'espèce étudiée (cannelle de Chine)

II.1.Généralité sur les canneliers

Le cannelier est un arbre de la famille des Lauracées qui pousse dans des régions tropicales. Le nom de genre du cannelier est *Cinnamomum*. Il existe de nombreuses espèces en fonction de leur provenance : cependant la véritable cannelle est la cannelle de Ceylan ou *Cinnamomum zeylanicum* Blume ou *C. verum* Nees produite au Sri Lanka. (**Bruneton, 1999**)

La casse ou cannelle de Chine, *Cinnamomum cassia* Nees ou *C. aromaticum* Nees, Originaire de Chine et du Japon est une espèce voisine qui possède pratiquement les mêmes propriétés thérapeutiques et qui fournit une cannelle de qualité inférieure. (**Paul, 2001**)

Dans notre étude nous nous sommes intéressées à la Cannelle de Chine : *cinnamomum cassia*

Nom: *Cinnamomum cassia*; *Cinnamomum aromaticum*

Famille: lauracées

Habitat: Chine.

Obtention: distillation à la vapeur d'eau des feuilles, des rameaux et de l'écorce.

Fragrance/goût : goût de cannelle ; chaud, épicé, piquant, boisé.

II.2. Description botanique du cannelier de Chine: *C.cassia*

Arbre toujours vert, à écorce épaisse et rugueuse.les feuilles sont simples, entière, insérées en hélice (**Figure1**). L'inflorescence est une grappe très ramifiée de fleurs blanchâtres, régulière et à 6 pétales. Le fruit est une baie rassemblant à celle du laurier noble. (**Ronbi , 2007**)



Figure 1 : feuille de *Cinnamomum cassia* (**Barbier, 2014**).

Les branches sont coupées pour la récolte de l'écorce qui sera mise ensuite à sécher après l'avoir dépouillée de son épiderme. En séchant, elle s'enroule sur elle-même, formant des bâtonnets friables ressemblant à des tubes. (**Trousseau et al, 1870**)

II.3.La partie active de cannelle de Chine : *C.cassia*

La partie active, constituée par l'écorce de *C.cassia* conserve souvent une partie du suber ; comparée à la cannelle de Ceylan, l'écorce est plus épaisse, la coloration plus foncée (figure2), l'odeur est moins fine, la saveur moins aromatique.au microscope les fibres apparaissent plus large et plus courtes, l'amidon est plus abondant (**Ronbi M, 2007**).



Figure 2 : Cannelle de Ceylan (**Barbier, 2014**).



Figure 3: Cannelle de Chine (**Barbier, 2014**).

II.4. Conservation

La cannelle se conserve à l'abri de l'humidité et de la lumière, stockée dans des récipients hermétiques (en porcelaine, en verre ou en métal). Dans ces conditions, elle conserve son arôme et ces qualités gustatives durant 3 à 4 années. Sous forme pulvérisée, elle perd rapidement ses qualités aromatiques (Teuscher et al, 2005).

II.5. Composition chimique de l'huile essentielle de *C. cassia*

La teneur en huile essentielle de la cannelle de Chine atteint 1 à 4%, avec comme principaux constituants le cinnamaldéhyde (70- 88%) suivi de trans-2 méthoxycinnamaldéhyde (3 -15 %), benzaldéhyde (0.5-2%), aldéhyde salicylique (0.2-1%), acétate cinnamyle (0-6%), coumarine (1.5-4%). L'eugénol est quasiment absent de cette huile essentielle (<0.5%).

Plusieurs diterpènes ont été décrits : cinnacasiols, cinnzeylanine...etc. la drogue renferme en outre des dérivés phénylpropaniques, des lignanes furanofuranique, des polysaccharides, des hétérosides mono- et sesquiterpéniques (cassioside, cinnamoside) et de très nombreux dérivés flavaniques, notamment des proanthocyanidols et des oligomères de 4 à 6 unités, les cinnamtanins (Bruneton 1999 ; Teuscher et al, 2005).

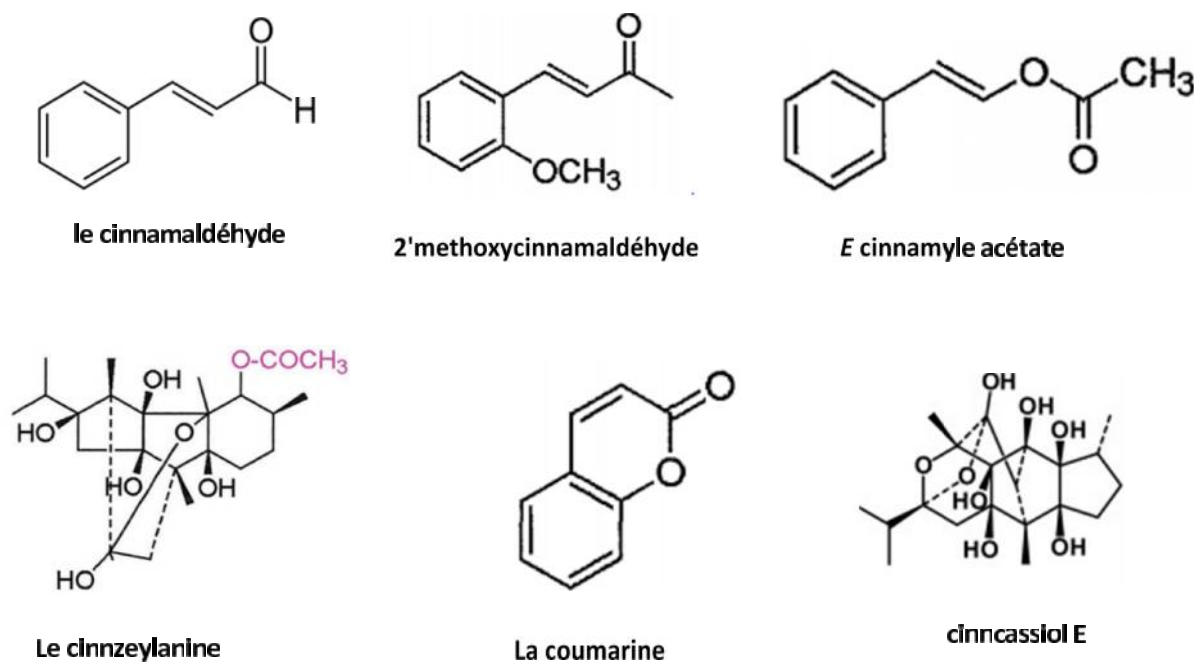


Figure 4 : Quelques composés chimiques d'huile essentielle de cannelle de Chine.

II.6.Effet thérapeutique de C.cassia

La cannelle de Chine est une des plantes majeures de la médecine traditionnelle chinoise. Ces utilisations ont donné aux chercheurs, l'envie de mettre en évidence ces propriétés biologiques (**Priyanga et al. 2013**). Des études in vitro et in vivo chez les animaux et les humains ont démontré de nombreux effets thérapeutiques de la cannelle qui sont les suivantes :

- anti-inflammatoires.
- antimicrobienne.
- antifongique.
- antioxydant.
- antidiabétique.
- anticancéreux.
- anticoagulant.

On a également signalé que la cannelle avait des activités contre les troubles neurologiques, comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (**Senhaji et al, 2005 ; Medagama, 2015 ; Ronbi, 2007**).

II.7.Utilisation traditionnels et courants de C.cassia

En plus d'être utilisé comme épice et agent aromatisant, la cannelle de Chine est également ajoutée aux gommages à mâcher en raison de ses effets rafraîchissants de la bouche. Elle a été traditionnellement utilisée comme poudre dentaire pour traiter les douleurs et les problèmes dentaires.

En Inde comme en Europe, la cannelle est utilisée pour « réchauffer » en cas de refroidissement, souvent en association avec le gingembre. Elle stimule la circulation notamment périphérique (doigts et oriels). C'est aussi un remède classique en cas de troubles digestifs tel que nausées, vomissements et diarrhées, mais aussi contre douleurs musculaires et rhumes.

La cannelle de Chine soulage les troubles digestifs .elle est particulièrement recommandée en cas d'asthénie.

La plante peut favoriser l'arrivée des règles. Elle est utilisée comme contractif après l'accouchement. (**Pasupuleti et al, 2014 ; Paul, 2001**)

Chapitre II

Etude Expérimentale

Partie A

Matériels et Méthodes

Notre travail a pour but d'extraire, d'analyser et d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la cannelle de Chine.

Afin d'atteindre les objectifs de notre étude, on a procédé à l'extraction d'écorce de la cannelle et à la caractérisation de cette HE sur le plan organoleptique, physicochimique, spectrophotométrique, et enfin on évaluera son pouvoir antimicrobien vis à vis des souches bactériennes et fongiques.

1. Extraction de l'huile essentielle de cannelle de Chine : *C.cassia*

1.1 Matière végétale

La plante *Cinnamomum cassia*, qui fait l'objet de notre étude chimique et biologique, a été achetée chez l'herboriste sous forme de bâtonnets d'écorce sèche et identifiée comme étant originaire du Chine.

1.2. Mode d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia* a été réalisée par hydrodistillation au niveau du laboratoire de Chimie Pharmaceutique de département de Chimie à l'université de Tizi-Ouzou.

L'appareil d'hydrodistillation est représenté sur la figure suivante :

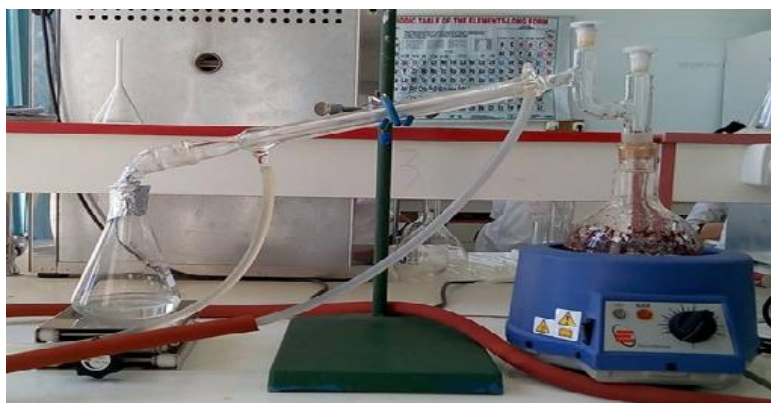


Figure 5 : Montage d'hydrodistillation.

Les bâtonnets d'écorce de *C.cassia* sont lavés avec de l'eau distillée et séchés à l'air, après séchage ils sont broyés à l'aide d'un moulin électrique, et tamisés avec un tamis. 25g de la poudre de *C.cassia* sont trempées dans l'eau distillée dans un ballon de 1 litre pendant 30 minutes, Ensuite l'ensemble est porté à ébullition pendant environ 2 heures et demi. Les vapeurs chargées de substances volatiles traversent le réfrigérant et se condensent puis elles sont récupérées sous forme de distillat dans un erlenmeyer. (Jeyaratnam et al, 2016)

L'opération est reproduite plusieurs fois afin de recueillir une quantité suffisante de l'huile essentielle (Sedik ,2010).

➤ **Décantation**

Après cela, on a introduit le distillat obtenu dans une ampoule à décanter en ajoutant un solvant organique (le dichlorométhane). Après avoir agité, dégazé et laissé reposer, on a récupéré la phase organique qui contient l'HE.

Le dichlorométhane a été choisi comme solvant car il est facile à éliminer (T_{eb} à 41°C) et aussi parceque il est un bon solvant pour les huiles en général (**Jeyaratnam et al, 2016**).

➤ **Évaporation du solvant organique**

L'élimination du solvant organique, le dichlorométhane, a été réalisé à l'aide d'un évaporateur rotatif de type HEIDOLPH à une température de 41°C (**pharmacopée internationale, 1980**).

Enfin, l'huile essentielle de la cannelle de Chine a été récupérée dans un petit flacon approprié et conservée à une température de 4°C (**Nur Nasulhah et al, 2014**).

1.3. Paramètre intervenant dans le procédé d'extraction

- **Rendement en huile essentielle**

Le rendement en huile essentielle (R_{HE}) est défini comme étant le rapport entre la mase d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M_H) et la masse de la matière végétale utilisée (M_v).

Le rendement est exprimé en pourcentage, est déterminé par rapport à 25 g de la poudre d'écorce de cannelle, et il est donné par la formule suivante (**Fekih N.2014**) :

Où :

$$R_{HE} (\%) = (M_H / M_v) * 100$$

R_{HE} : Rendement en Huile essentielle en %.

M_H : Masse d'huile essentielle récupérée en gramme.

M_v : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

2. Caractérisation organoleptique de l'huile essentielle de *C. cassia*

Cette caractérisation porte sur trois volets

- **L'aspect ;**
- **La couleur ;**
- **L'odeur ;**

3. Caractérisation physicochimique

Ces tests ont été réalisés au niveau du laboratoire de Chimie Pharmaceutique du département de Chimie à l'UMMTO.

3.1. Détermination de la densité relative

A une température de 20°C, on pèse à l'aide d'un flacon approprié, des volumes égaux d'HE et d'eau distillée : on pèse successivement le flacon vide, puis le flacon rempli d'eau purifiée. Après essuyage, on le remplit avec l'HE et on note leurs poids exacts.

La densité relative est donnée par la formule (Kaloustian et al.2012) :

$$d = \frac{m2 - m0}{m1 - m0}$$

m0 : est la masse en gramme du flacon vide en (g)

m1 : est la masse en gramme du flacon rempli d'eau purifiée en (g)

m2 : est la masse en gramme du flacon rempli d'huile essentielle en (g)

3.2. Indice de réfraction

A l'aide du réfractomètre d'Abbe, on a mesuré l'indice de réfraction de l'HE de cannelle à une température de 22°C (indiquée par le thermomètre intégré de l'appareil). Pour cela, on a placé une goutte d'HE sur le prisme du réfractomètre, puis on a effectué le réglage à l'aide de la micro visse et on lit la valeur.

L'indice de réfraction est donné pour la température de référence de 20°C. Dans le cas de mesure de cet indice dans différentes températures, on effectue la correction à 20°C par le biais de la formule suivante ci-dessous (Kaloustian et al.2012).

$$n^{20} = n^t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C})$$

n²⁰ = Indice de réfraction à 20°C

n^t = Indice de réfraction à température ambiante (de mesure)

T = Température ambiante

3.3. Indice d'acide

On pèse 2g de l'HE de *C. cassia* qu'on dissout dans 5ml d'éthanol à 96°. On ajoute 0,5 ml d'une solution de phénolphthaléine utilisée comme indicateur coloré. On titre par l'hydroxyde de potassium 0,1 M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant au moins 15 seconde, on note alors le volume (n) du réactif titrant

L'indice d'acide est calculé par la formule suivante (**Pharmacopée européenne, 2008**) :

$$\mathbf{IA = (5,610 \times n) / m}$$

IA : Indice d'acide (sans unité)

n : Volume de KOH utilisée pour le titrage (en ml)

m : Masse en grammes de l'huile essentielle



Figure 6 : Le milieu réactionnel avant et au point d'équilibre.

3.4. Indice de saponification

On introduit 2 g d'HE de cannelle dans un ballon, puis on ajoute 25 ml d'une solution de KOH 0.5N. On adapte le réfrigérant à reflux au ballon sur un bain d'eau bouillante et on maintient le montage pendant une heure pour que la réaction puisse avoir lieu.

Après refroidissement, on démonte le ballon puis on ajoute 20 ml d'eau distillée suivi de 5 gouttes d'une solution de phénolphthaléine PP (indicateur coloré). Enfin, on titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,5 N).



Figure 7 :(a) : Coloration du mélange réactionnel avant l'ajout de PP, (b) : après l'ajout de PP et (c) : à l'équilibre.

On a également effectué un essai à blanc, dans les mêmes conditions opératoires et en utilisant les mêmes réactifs (**Pharmacopée européenne, 2008 ; Mebarki, 2010**).

$$IS = 28.05 \times (V_0 - V) / m$$

IS : indice de saponification

V : Volume en ml de HCl utilisé dans cette détermination

V₀ : Volume en ml de HCl utilisé dans cette détermination de l'essai à blanc

m : la masse de la prise d'essai.

3.5. Indice d'esters

L'indice d'ester est calculé par la formule suivante (**Haddad et al, 2016**) :

$$IE = IS - IA$$

IE: indice ester

IA : indice d'acide

3.6. Indice de peroxyde

On pèse environ 1 g d'huile à examiner dans un erlenmeyer de 250 ml auquel il faut rajouter 10 ml de chloroforme et 15 ml d'acide acétique et immédiatement après 1 ml d'une solution aqueuse saturé d'iodure de potassium.

On agite pendant une minute et on met à l'obscurité pendant 5 mn.

On rajoute 75 ml d'eau distillée en agitant rigoureusement et quelques gouttes d'emplois d'amidon.

Le dosage se fait alors avec une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.01M. On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions.

L'indice de peroxyde est évalué à l'aide de la formule suivante (**Haddad et al, 2016**) :

$$IP = 10 \times (V_1 - V_2) / m$$

IP : indice de peroxyde

(V₁-V₂) : volume de thiosulfate utilisé en ml (0.01M)

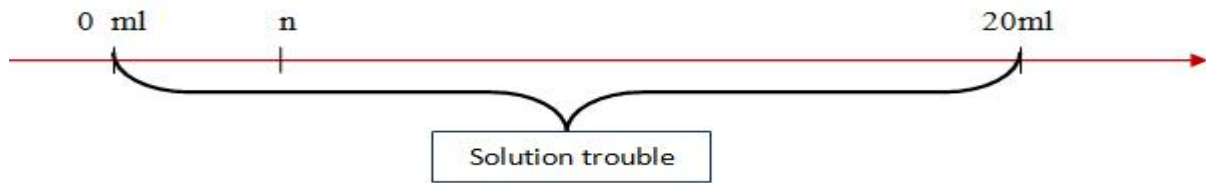
m : masse en g de la prise d'essai d'HE.

3.7. Miscibilité à l'éthanol

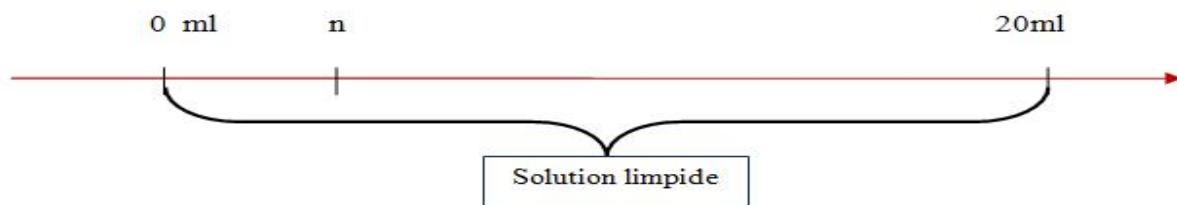
A une température ambiante de 20°C, On introduit 1 ml de l'huile essentielle à examiner dans un erlen à bouchon rodé de 200 ml. Puis, à l'aide d'une burette de 20 ml, on ajoute par fractions de 0,1 ml l'alcool à (96°) jusqu'à dissolution complète, puis on continue à ajouter le solvant par fractions de 0,5 ml jusqu'à 20 ml, en agitant fréquemment et énergiquement. On note le volume **n** d'alcool utilisé lorsqu'une solution limpide a été obtenue, si la solution devient trouble ou opalescente avant que le volume ajouté n'atteigne 20 ml, on note le volume **n₁** utilisé au moment de l'apparition du trouble ou de l'opalescence.

Selon la pharmacopée européenne (Haddad et al, 2016) :

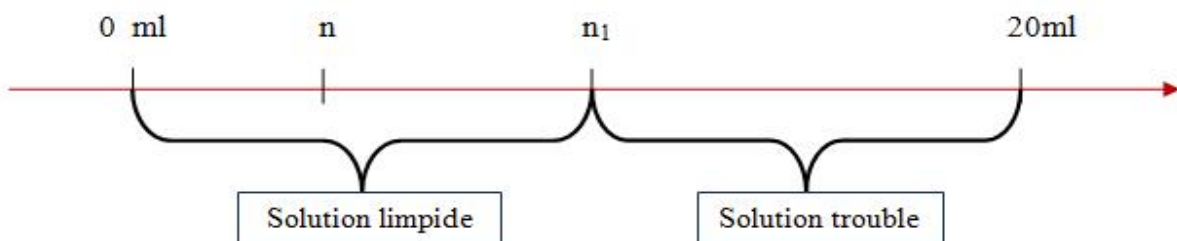
- 1er cas : Si une solution limpide n'est pas obtenue après addition de 20 ml d'alcool d'un titre donné, On refait l'essai avec un alcool de titre plus élevé.



- 2ème cas : Une huile essentielle est dite « soluble dans n volumes et plus d'alcool d'un titre donné » si la solution limpide dans n volumes demeure limpide (comparée à l'huile essentielle non diluée), après addition progressive de nouvelles quantités d'alcool de même titre, jusqu'à concurrence de 20 volumes d'alcool.



- 3ème cas : Une huile essentielle est dite « soluble dans n volumes d'alcool d'un titre donné, devenant trouble après dilution » si la solution limpide dans n volumes devient trouble dans n_1 volumes ($n_1 < 20$) et le demeure après addition progressive de nouvelles quantités d'alcool de même titre, jusqu'à concurrence de 20 volumes d'alcool.



3.8. Spectroscopie infrarouge

Afin de mettre en évidence les groupements fonctionnels constitutifs de l'HE testée, on a eu recours à la spectrophotométrie à infrarouge qui est une méthode d'analyse rapide, simple et précise.

Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire de Chimie d'université de Bouira.

L'appareil utilisé est le spectrophotomètre JASCO FT/IR-4200 à transformée de fourrier piloté par le logiciel « OPUS » qui fournit aussi bien un spectre qu'un ensemble de données numériques que l'on va retraduire en spectre à l'aide du logiciel « OriginPro 9.0 » qui nous permettra d'obtenir par la suite la transmittance et les nombres d'ondes des différents pics.

Pour cela on dépose une goutte d'HE sur le compartiment échantillon après l'avoir bien essuyé avec de l'isopropanol et on lance le logiciel pour avoir les spectres d'absorption.

3.9. Caractérisation chromatographique

La chromatographie sous toutes ses formes représente un moyen d'identification et de séparation très efficace fréquemment utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles.

3.9.1. Chromatographie sur couche mince

Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire de Chimie Pharmaceutique du département Chimie à l'UMMTO.

La CCM de l'HE de *Cinnamomum cassia* a été réalisé sur une plaque de gel de silice pour CCM suivant le protocole décrit dans la pharmacopée française 6^{ème} édition.

Préparation des solutions à examiner

On dissolvait 0.5 ml d'huile essentielle de cannelle dans l'acétone et on complète à 10 ml avec le même solvant.

Dépôt d'échantillon

A l'aide d'un crayon, on trace une ligne fine afin de délimiter la zone de dépôt.

En utilisant une micro-seringue pour CCM, on dépose 10 µl de notre HE.

On dépose la plaque dans la cuve d'une façon inclinée et on laisse l'éluant migrer jusqu'à ce qu'il atteigne une longueur de 15 cm.

On laisse la plaque sécher à l'air ambiant pendant 10 min.



Figure 8 : Migration du solvant.

Révélation

La révélation des tâches a été effectuée par le diode (I₂) et aussi sous la lumière UV.

Calcul des rapports frontaux (RF)

$$RF=d_1/d_2$$

d_1 : la distance entre le point du dépôt et le centre de la tâche

d_2 : la distance entre le point de dépôt et le front de solvant après migration

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Cinnamomum cassia* en milieu solide.

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE de cannelle a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Nedir Mohammed C.H.U de Tizi-Ouzou.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) préconise/ recommande d'adopter la méthode des disques du NCCLS (National Comite for Clinical Laboratory Standards) (**Khadri, 2009**).

Cette méthode s'effectue en deux étapes : qualitative et quantitative.

Dans un 1er temps, la technique de contact direct par diffusion en milieu gélosé (aromatogramme), permet de prévoir l'efficacité in vitro de l'HE testée. Elle servira ainsi à la présélection des souches sensibles à son pouvoir antimicrobien.

Ensuite, les CMI (concentrations minimales inhibitrices) seront déterminées par la méthode de dilution en milieu solide puis des subcultures permettent d'évaluer la CMB (concentration minimale bactéricide).





4.1. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *C.cassia* (aromatogramme)

4. 1.1. Matériel

Pour la mise en évidence de l'activité biologique, nous avons utilisée des souches bactériennes sensibles, des souches bactériennes résistantes sont caractérisées par leurs résistances par un mécanisme connu à au moins un antibiotique ou une classe d'antibiotique, et (01) souche fongique.

4. 1.1.1. Provenance des souches bactériennes et fongiques

Souches bactériennes sensibles :

-  Escherichia coli ATCC 25922.
-  Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.
-  Staphylococcus aureus ATCC 25923.
-  Bacillus subtilis.

Souches bactériennes résistantes :

- ✚ Escherichia coli pénicillinase+ présente une résistance vis-à-vis d'ampicilline et ticarcilline.
- ✚ Escherichia coli BLSE+ (bêta-lactamine à spectre élargie) sécrète des enzymes qui dégradent les antibiotiques appartenant à la famille bêta-lactamine.
- ✚ Staphylococcus aureus pénicillinase+ présente une résistance vis-à-vis des pénicillines du groupe G.
- ✚ ATCC 43300 SARM (staphylococcus aureus résistant à la méticilline) présente une résistance aux pénicillines du groupe M (méticilline et oxacilline).

Remarque : Les souches bactériennes de référence sont sous forme des lots “American Type Culture Collection” ATCC ; elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance, les autres souches bactériennes sont isolées au milieu hospitalier.

Souche fongique :

- ❖ Candida albicans d'origine clinique : issue d'un prélèvement clinique chez un patient au niveau du service de parasitologie au CHU de Tizi-Ouzou.

4.1.1.2. Milieux de cultures utilisés**Pour les souches bactériennes :**

- Gélose nutritive** : est un milieu minimum, utilisé pour l'isolement des bactéries ;
- Gélose Chapman** : est un milieu sélectif des bactéries du genre staphylococcus ;
- Gélose Hektoen** : est un milieu sélectif pour l'isolement des bactéries bacilles Gram négatif;
- Gélose de Mueller Hinton** : est une gélose standardisée recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode d'antibiogramme.

Pour les souches fongiques :

- Gélose de sabouraud** : favorise la culture et l'isolement des champignons et des moisissures, et pour réaliser le test d'aromatogramme ;
- semi synthétique** : est un milieu solide utilisé spécialement pour l'étude de la sensibilité des champignons à l'agent antifongique (la 5 fluorocytosine) ;
- Casitone** : est un milieu solide utilisé spécialement pour l'étude de la sensibilité des champignons aux agents antifongiques (les polyènes et dérivés d'imidazole) ;

4.1.2. Isolement et confirmation des souches bactériennes sensibles :

Ces souches bactériennes utilisées sont déjà identifiées et référencées. Nous avons tenu à vérifier leurs puretés par les testes suivantes :

a).Isolement des souches bactériennes sensibles sur leurs milieux sélectifs :

E.coli ATCC et P. aeruginosa ATCC sontensemencées sur le milieu Hektoen, S.aureus ATCC estensemencée sur le milieu Chapman et B.subtilis estensemencée sur le milieu gélose nutritive.les souches sont incubées pendant 24h à 37°C.

b).Examen macroscopique : La lecture des ensemencements vise à noter la couleur ; la taille et l'aspect des colonies (**Bey, 2009**).

c).Examen microscopique :

La coloration de Gram et l'observation à l'état frais sont la deuxième étape de l'identification (**Bey, 2009**).

- **Examen à l'état frais :**

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne. Les renseignements obtenus par cette observation concernant principalement la mobilité des bactéries (**Denis et al, 2007**).

- **Examen après coloration de GRAM**

La coloration de GRAM permet l'observation du mode de regroupement, de la forme des cellules bactériennes, et du type de Gram. Elle a été effectuée selon le protocole décrit par (**Haddad et al, 2016**). La technique est indiquée en annexe n°4.

e).Tests enzymatiques

- **Test de la catalase**

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène. Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène sur une lame propre. La présence d'une catalase est révélée immédiatement par des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (**Dechache et al, 2014**).

- **Test d'oxydase**

Le disque d'oxydase est déposé sur une lame propre et imbibé avec une goutte d'eau physiologique stérile. Une colonie est prélevée à partir du milieu gélosée à l'aide d'une pipette pasteur puis déposer sur la bandelette. En présence de l'oxydase la coloration violet foncé apparaît immédiatement ou en quelque secondes, puis noircit (rose violette puis elle devient brun foncé) (**Bey, 2009**).

- **Test de coagulase pour *S. aureus***

La coagulase libre est présente chez *S. aureus*. La détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse 0.5 ml de plasma humain et 0.5 ml d'une culture *S. aureus* de 24 h en bouillon. La lecture s'effectue après 2h, 4h et 24h. Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum (Afissa, 2014).

f. Identification des bactéries à Gram négatif (*Entérobactéries, Pseudomonas*) :

L'identification des souches à Gram négatif a porté sur une série de tests biochimiques. Les tests biochimiques ayant servi à l'identification sont :

- **Test des TSI (Trois Sucres à identifier)**

La souche à étudier est ensemencé sur le milieu TSI, il est incubé à 37°C pendant 24 heures. Ce test permet la mise en évidence de la fermentation du glucose, du lactose et du saccharose, la réaction est dite positive si le milieu devient jaune orange (Bey, 2009).

- **Recherche de la production d'indole**

Le milieu urée indole est ensemencé avec la souche à tester, après incubation à 37°C, pendant 24 heures, on ajoute quelques gouttes de réactif Kovacs, s'il ya formation d'un anneau rouge la réaction est dite indole positif (Bey, 2009).

- **Test de Simmons :**

Ce test permet la mise en évidence du citrate perméase : enzyme permettant à la souche l'utilisation du citrate comme seule source de carbone ; après incubation à 37°C pendant 24 heures, l'utilisation du citrate se traduit par la libération des ions « OH⁻ », qui alcalinisent le milieu en se traduisant par une couleur bleue après le virage du vert de bromothymol (Gaillot, 2008)

- **Production d'acétone**

La souche à identifier est ensemencé dans un tube qui contient le milieu Clark et Lubs, après incubation à 37°C, pendant 24 heures une goutte de VP1 et une goutte de VP2 (VP : Voges Proakauer), sont ajoutées ; si après 10 min la couleur rouge au préalable devient rose la réaction est dite alors positive (Bey, 2009).

N.B : les figures des résultats des différentes testes réalisés sont présentés en Annexe (I jusqu'à X).

4.1.3. Reisolement des souches microbiennes

Le test antibactérien doit être réalisé à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. Les souches bactériennes entretenues par repiquage sur la gélose nutritive, favorable à leur croissance. La levure est cultivée sur milieu gélose sabouraud. Après repiquage, les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve à 37 °C, pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure (Yezza 2015).

4.1.4. Préparation des suspensions microbiennes

A l'aide d'une pipette pasteur flambée, on racle 2 à 3 colonies bien isolées que l'on décharge dans un volume d'environ 5ml d'eau physiologique (de façon à obtenir une suspension d'une opacité approximativement de 0.5 Mc Farland) (Haddad et al, 2016).



Figure 9 : Préparation des suspensions microbiennes à partir des colonies isolées.

4.1.5. Ensemencement des boîtes de pétri

Pour les souches bactériennes, on imbibe un écouvillon stérile de la suspension bactérienne puis on l'essor en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum. On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas, en stries serrés, puis on refait la même opération deux fois en tournant la boîte d'un angle de 60°, après chaque application, de sorte à avoir une culture homogène en nappe (on utilise MH) (Haddad et al, 2016).



Figure 10 : Ensemencement par les suspensions microbiennes

En ce qui concerne la levure, les boîtes en milieu sabouraud préalablement séchées sont inondées avec 5 ml d'inoculum fongiques (*C. albicans*) pour la boîte de 90 mm. L'excès de liquide est aspiré à la pipette.

4.1.6. Dépôt des disques

Les disques utilisés sont des disques de papier buvard de 6mm de diamètre, stérilisés dans un stérilisateur Binder ED115 à 180°C pendant 1h30. Ils sont déposés, à l'aide d'une pince stérile, sur la surface des géloses préalablement ensemencé par les suspensions microbiennes, les disques doivent être espacés d'au moins 24mm centre à centre (Haddad et al, 2016).

Pour chaque boîte de pétri, on dépose 3 à 5 disques :

- un disque qu'on imprègne de 10µl d'HE pure de *Cinnamomum cassia*. (HE) prélevé à l'aide d'une micropipette de 10 µl ;

- Un disque qu'on imprègne de 10µl d'eau purifiée stérile comme témoin négatif (T⁻) également prélevé à l'aide de la micropipette ;

-un disque d'antifongique (amphotéricine) utilisé comme témoin positif (+) pour *Candida albicans*.

-Des disques d'antibiotiques utilisés comme témoins positifs (T⁺) pour chaque souche bactérienne sont:

- Aztréonam ATM pour *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* pénicillinase+ et *P.aeruginosa* ATCC 27853.
- Vancomycin (V_A) pour *S. aureus* ATCC 2592 et ATCC 43300 SARM.
- Colistine (CL) pour *E.coli* BLSE+.
- Vancomycin (V_A), imipenem (IPM) pour *Bacillus subtilis* ATCC 6663.
- Vancomycin (V_A), oxacilline (O_x) pour *S.aureus* pénicillinase+.

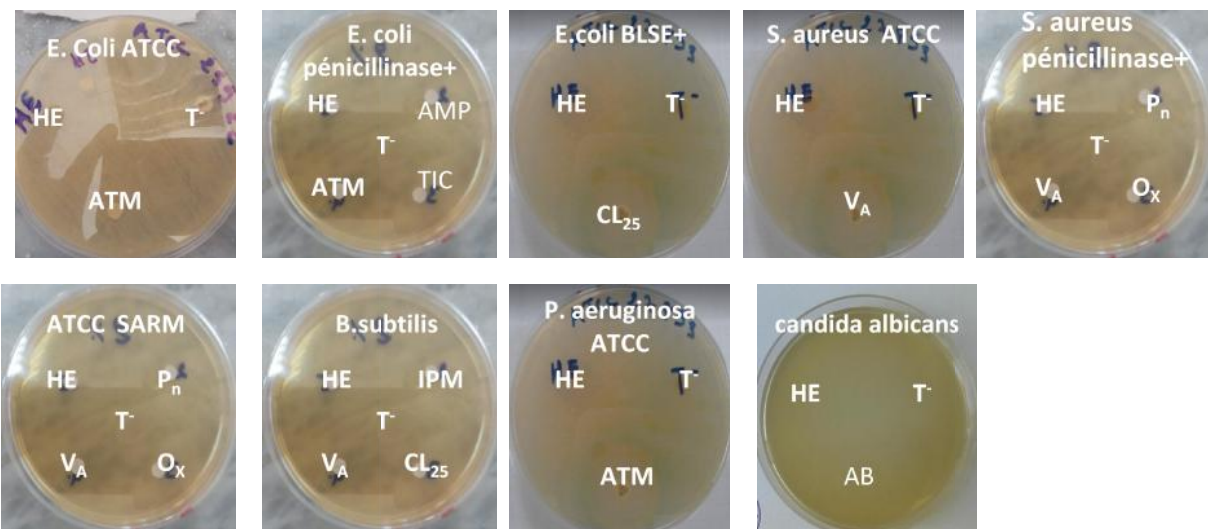


Figure 11: Dépôt des disques sur les boîtes préalablement ensemencées.

On ferme les boîtes et on les laisse 1h à température ambiante, puis on les retourne (couvercle en bas) et on les incube pendant 24 heures à 37.5°C pour les bactéries (MH) et pendant 48 heures à 25°C pour *Candida albicans* (sabouraud) (**khebri 2001**)

N.B: Le caractère de sensibilité et de résistance des souches microbiennes est confirmé avant par un antibiogramme pour les souches bactériennes et un antifongigramme pour la levure (*C.albicans*) (**voir Annexe XI**).

4.1.7. Mesure des diamètres des zones d'inhibitions

A l'aide d'un pied à coulisse, on mesure les diamètres des zones d'inhibitions autour des disques imprégnés d'HE pour toutes les souches testées et le résultat sera exprimé en mm. Pour cette technique (aromatogramme), la sensibilité du germe testé pour 10 µl d'HE peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu en se référant au tableau suivant :

Tableau 1 : Corrélation entre sensibilité du germe et taille du halo d'inhibition (Chabert ,2013)

Taille du halo d'inhibition	Conclusion
Diamètre Inférieur ou égal à 8 mm	la sensibilité du germe est nulle
Diamètre compris entre 8 et 14 mm	la sensibilité du germe est limitée
Diamètre compris entre 14 et 20 mm	la sensibilité du germe moyenne
Diamètre supérieur ou égale à 20 mm	Le germe est très sensible à l'HE

4.2. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Cinnamomum cassia*

Cette évaluation consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) en utilisant la technique de dilution en milieu solide (Haddad et al, 2016).

4.2.1. Détermination de la CMI

Pour les germes ayant montré une sensibilité lors de la première étape, une mesure de la CMI est réalisée.

➤ Préparation des différentes dilutions de l'HE

-On incorpore 1mL d'HE de cannelle dans 49 ml d'un milieu gélosé MH (ou sabouraud) liquéfié (fondu puis refroidi à 45°C). On agite à l'aide d'un agitateur magnétique afin d'homogénéiser le mélange, on obtient alors une dilution à 2% volumes à volumes (v/v).

-On prélève 25mL du mélange précédent (HE + milieu gélosé) qu'on verse dans deux boites de pétri à raison de 12.5 ml.

-On ajoute 25mL du milieu gélosé liquéfié MH (ou sabouraud) au 25mL restant de la dilution à 2%, on obtiendra ainsi une dilution à 1%, dont on transvase 25mL dans deux boites de pétri. Les 25ml restant serviront à la préparation d'une dilution à 0.5%

-On procède de la même manière afin de réaliser les autres dilutions (Chabert ,2013).

N.B : Un schéma montre la méthode en détaille est représenté en annexe XII.

- On prépare également deux boites sans HE contenant 12.5 ml de MH pour la première et 12.5ml de sabouraud pour la deuxième, elles serviront de témoin positif.

Sachant qu'on peut tester l'HE sur plusieurs souches dans la même boîte, pour chaque dilution et pour chaque milieu, on utilisera les boîtes suivantes :

- MH : 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.06%, 0.03%, 0.015% et 1 boîte témoin.
- Sabouraud : 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.06%, 0.03% et 0.015% et 1 boîte témoin.

➤ Dépôt des disques

Après solidification des milieux, on dépose des disques stériles de 6mm de diamètre imprégnés de 10µl de chaque suspension bactérienne (ou fongique) dans chaque boîte y compris la boîte témoin sans HE.

Remarque : il est impératif d'utiliser des embouts stériles lorsqu'on prélève à l'aide de la micropipette pour éviter tout risque de contamination.

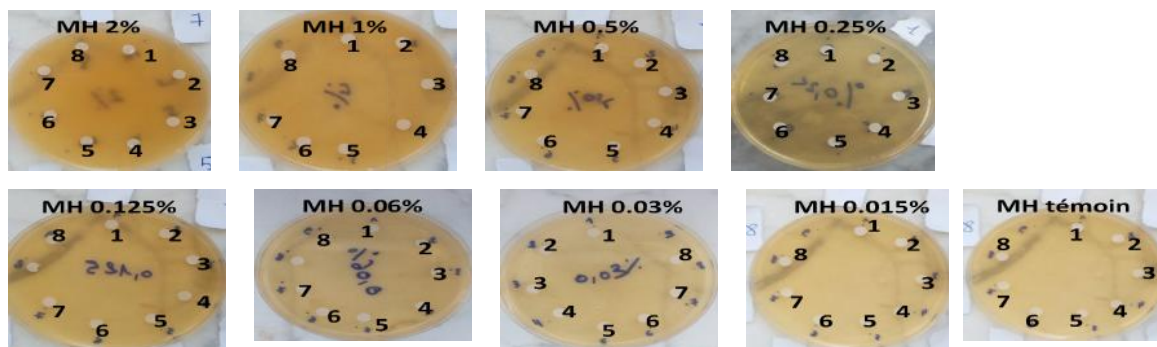


Figure 12: Dépôt des disques sur MH, 1: Escherichia coli, 2: E. coli pénicilline+, 3: E. coli BLSE +, 4: Staphylococcus aureus, 5: S. aureus pénicilline+, 6: S. aureus résistantes à la méticilline, 7: Pseudomonas aeruginosa, 8: Bacillus subtilis.

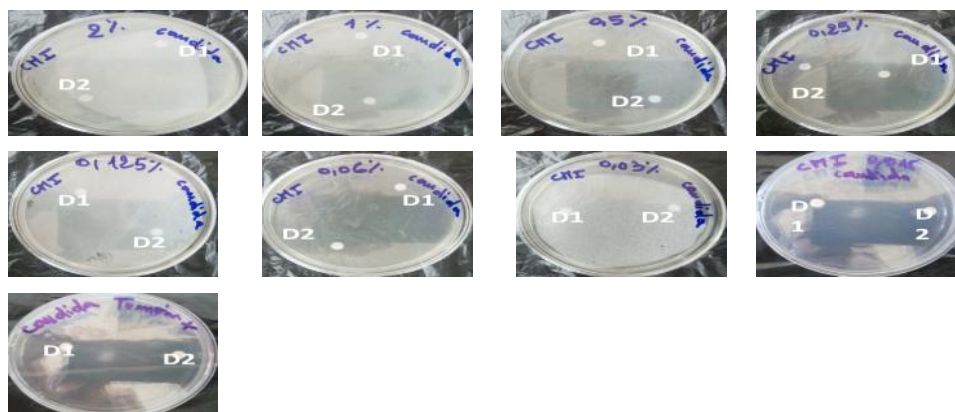


Figure 13 : Dépôt des disques imprégnés de la suspension de *Candida albicans* sur Sabouraud (D1 : disque n°1 et D2 : disque n°2).

Lecture : La CMI correspond à la plus petite concentration inhibant toute croissance visible à l'œil nu.

4.2.2. Détermination de CMB /CMF

Afin d'apprécier la nature de l'activité antimicrobienne de l'HE de cannelle (bactériostatique ou bactéricide) et/ou (fongicide ou fongistatique), pour chaque germe, on transfère les disques de chacune des dilutions précédentes, qui n'ont pas montré de croissance visible (c'est à dire celles qui sont supérieures ou égale à la CMI), sur des boîtes contenant 12.5 ml de MH sans HE (pour les bactéries) ou bien 12.5 ml de sabouraud sans HE (pour *Candida*). Les boîtes sont incubées 24h à 37°C (MH) ou 48-72h à 25°C (sabouraud) et la CMB/CMF correspondra à la plus petite concentration dont aucune croissance ne sera visible à l'œil nu (**Haddad et al, 2016**). La plus faible concentration dont aucune culture microbienne n'est apparue correspond à la CMB/CMF (la plus faible concentration tuant 99,9% des micro-organismes en culture sur ce milieu).

En effet, lorsque le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) est inférieur ou égal à 4, l'HE est bactéricide et/ou fongicide. Quand ce rapport est supérieur à 4, l'HE est dite bactériostatique et /ou fongistatique (**LEVISON, 2004**).

Partie B

Résultats et Discussions

I. Rendement d'extraction

Le rendement R en huile essentielle est déterminé par rapport à 25 g de poudre d'écorce de *C.cassia*.

La détermination des propriétés physico-chimiques d'huile essentielle de *C.cassia* nécessite une quantité élevée d'huile. Ceci nous a amené à faire plusieurs extractions conduites sur certain temps pour arriver à la quantité voulue.

Les résultats de calcul des rendements obtenus lors de l'extraction de l'HE de la poudre de cannelle par hydrodistillation sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Rendement d'extraction de l'HE de *Cinnamomum cassia*

Quantité de la plante (g)	25g
Volume d'eau distillée	200 ml
Durée d'extraction	2h : 30min
Rendement(%)	3.16-3.71%

Nous avons obtenu un rendement qui varie entre 3.16 et 3.71% sur les différentes opérations d'extraction qu'on a réalisées. La teneur en huile essentielle de cannelle de Chine est 1% à 4% (Teuscher et al, 2005).

Le rendement et la composition chimique des HE dépendent de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, le milieu de récolte, la période de récolte, la durée de séchage, les pratiques culturelles et technique d'extraction (Svoboda et al, 1999).

Tableau 3 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de *C.cassia*.

	Aspect	Couleur	Odeur
Pharmacopée européenne 2008	Liquide mobile, limpide.	Jaune ou brun-rouge	-Caractéristique rappelant à celle de l'aldéhyde cinnamique.
Notre huile	Liquide mobile, limpide.	Jaune ou brun-rouge	Caractéristique



Figure 14 : Huile essentielle de *cinnamomum cassia*.

Discussion

Notre huile essentielle est obtenue par technique d'hydrodistillation, qui est la méthode normalisée et validée pour l'extraction d'une huile essentielle (**Lucchesi, 2005**). Ainsi les résultats obtenus par cette méthode, suggère que les paramètres organoleptiques de notre huile essentielle sont en accord avec ceux répertoriés dans la **pharmacopée européenne, 2008**.

II. Détermination des propriétés physico-chimiques

➤ Densité relative

Poids de flacon vide : 2630.5mg

Poids de flacon remplie d'eau : 4343.1mg

Poids de flacon remplie d'HE de *C.cassia* : 4457.7mg

$$d_{20}^{20} = (4457.7 - 2630.5) / (4343.1 - 2630.5)$$

$$d_{20}^{20} \approx 1.067$$

Discussion

La densité relative des HE peut être considérée comme un critère de pureté et selon la pharmacopée française 6ème édition, la densité relative de l'HE de *C.cassia* doit être comprise entre 1.052 et 1.070. Cela signifie que la densité de notre échantillon (1.067) est dans les normes requises.

➤ Indice de réfraction

Le résultat de l'indice de réfraction pour l'HE à 22°C était de : 1.610

Pour ramener la valeur de l'indice de réfraction à 20°C, on utilise la formule suivante :

$$\begin{aligned}n^{20} &= n^t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C}) \\n^{20} &= n^{22} + 0,00045 (22 - 20^\circ\text{C}) \\n^{20} &= 1.610\end{aligned}$$

Discussion

Selon la **pharmacopée française 6ème édition**, l'indice de réfraction de l'HE de *C.cassia* se situe entre 1.600 et 1.614. L'indice trouvé (1.610) est donc dans les normes requises.

➤ **Indice d'acide**

Le volume équivalent de KOH pour les deux essais était de : 0.8ml.

Soit 0.8 ml de KOH 0.1M.

Calcul de l'indice d'acide :

$$IA = 5.610 \times 0.8 / 2$$

$$IA = 2.24$$

Discussion

Selon la **pharmacopée 11ème édition**, la valeur de l'indice d'acide doit être au maximum égale à 2 (**Haddad et al, 2016**) or elle est légèrement supérieure pour notre échantillon.

Sachant que les HE ne contiennent pas ou très peu d'acides gras libres à courte chaîne carbonique, ce paramètre est une variable qui dépendra donc essentiellement des conditions d'extraction et de conservation. Ceci s'explique par le phénomène d'hydrolyse des esters qui engendre ces acides avec le temps. (**Kaloustian et al, 2017**)

➤ **Indice de saponification**

Le volume équivalent pour le blanc était de 22ml.

Le volume équivalent pour l'HE était de 20ml.

$$I_s = 28.05 \times (22 - 20) / 2$$

$$I_s = 28.05$$

➤ **Indice de peroxyde**

Le volume équivalent pour le blanc était de 0.1ml.

Le volume équivalent pour l'HE était de 0.3ml.

$$I_p = 10 \times (0.3 - 0.1) / 1 = 2$$

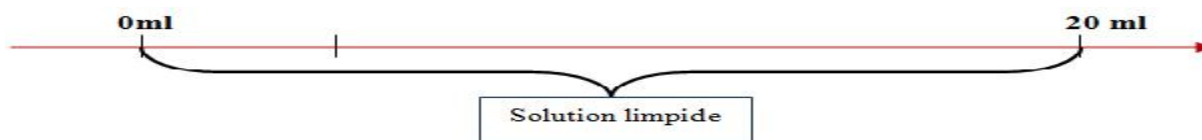
La mauvaise conservation d'une HE (présence d'air, température élevée, etc.) induit son vieillissement par la formation de peroxydes toxiques et instable surtout à la chaleur.

Le « *code of practice* » de L'IFRA (International Fragrance Association) ,38^{ème} Amendement recommande que l'indice de peroxyde ne doit pas dépasser 20 mEq O₂/L, l'indice trouvé est donc conforme aux normes établies (**Haddad et al, 2016**).

➤ Miscibilité à l'éthanol

• Alcool à 96°

Avec l'ajout de l'alcool à 96° par fraction de 0.1 puis de 0.5ml notre solution demeure limpide jusqu'à concurrence de 20 volumes d'alcool, donc **1ml de l'huile testée est soluble dans n ml et plus d'éthanol à 96°** avec « n » compris entre 0 et 20 ml.



Les propriétés physicochimiques de cette HE permettent uniquement une meilleure caractérisation ; elles peuvent varier avec la situation géographique, les conditions climatiques, la nature du sol ainsi que les traumatismes et pathologies.

III. Spectroscopie infrarouge

Cette méthode permet d'obtenir un spectre sur lequel la transmittance T en % est portée en ordonnée et le nombre d'onde exprimé en cm^{-1} est porté en abscisse (la fenêtre spectrale utilisée par les appareils du commerce correspondant au domaine de l'infrarouge qui s'étend de 400cm^{-1} à 4000cm^{-1}).

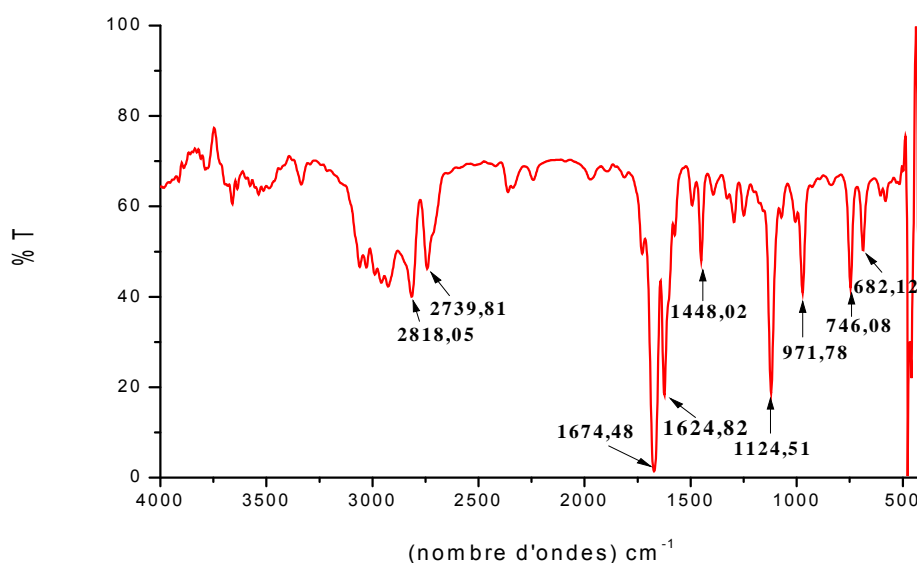


Figure 15: Allure du spectre IR de l'HE de *cinnamomum cassia*.

L'observation générale de ce spectre permet de remarquer la présence d'un nombre relativement important de bandes d'absorption.

La partie du spectre allant de 3000 à 2500cm^{-1} se compose de deux pics d'amplitude différente. Cette zone de vibration indique la présence de la liaison **C-H** des **alcanes**.

La zone du spectre s'étalant entre 1800 et 600cm^{-1} montre plusieurs bandes d'absorption.

Le pic à 1674.48 et 1624.82 cm^{-1} correspond au mode de vibration de la liaison **C=O** des **aldéhydes**. Ces pics principaux correspondent au cinnamaldéhyde et ces dérivés qui sont les constituants principaux de l'HE d'écorce de cannelle de C.cassia.

Le pic 1448.02 cm^{-1} correspond au mode de vibration de la liaison **C-OH** des **alcools**.

Les pics à 1124 cm^{-1} est attribué au mode de vibration des liaisons **C-O** des **éthers**, des **acides** et des **alcools**.

Le pic à 971.78 cm^{-1} est caractéristique de liaison : **C-H** des **alcane**s.

Le pic à 746,08 cm^{-1} correspond au mode de vibration de liaison **=C-H** de **benzène**

Le pic à 682.12 cm^{-1} correspond au mode de vibration de liaison **C=C-H** des **alcènes**.

En somme, l'HE étudiée renferme les groupements suivants : **alcane**s, **aldéhydes**, **alcools**, **éthers**, **acides**, **benzène**, **alcènes** (Bizuneh, 2014) (Jeyaratnam et al, 2016) (Yan-qun et al, 2013)

IV. Caractérisation chromatographique

- **Chromatographie sur Couche Mince**

Après avoir analysé la plaque de gel de silice avec le pulvérisateur (**I₂**), quatre tâches jaunes sont apparues à des distances variables pour les deux essais effectués. Ces tâches sont aussi apparues sous la lampe UV.



Figure 16 : Tâches de l'HE apparues après pulvérisation avec **I₂**.

Les résultats du calcul des RF sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Résultats des rapports frontaux.

Echantillon	HE étudiée (essai n°1)				HE étudiée (essai n°2)			
	Tache1	Tache2	Tache3	Tache4	Tache1	Tache2	Tache3	Tache4
RF	0.58	0.71	0.87	0.98	0.6	0.72	0.84	0.98

Ces tâches obtenues sont probablement celles décrites dans la **pharmacopée française, 2008** révélées par l'aldéhyde anisique qui sont les suivants :

- une bande bleu-vert correspondant à l'**aldéhyde trans-cinnamique**.
- une bande de fluorescence bleue correspondant à la **Coumarine**.
- une bande de fluorescence violacée de très faible intensité correspondant à l'**eugénol**.
- D'autres bandes de faible coloration sont présentes.

En effet, le fait de ne pas avoir des solutions étalons, rend l'interprétation des résultats des RF impossible.

V.Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de C.cassia en milieu solide

V.1. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de cannelle

➤ Confirmation des souches bactériennes sensibles

Les résultats des différentes testes de confirmation des souches bactériennes sensibles utilisées sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Caractère des souches bactériennes sensibles étudiées

Testes d'identification	Résultats obtenus			
	E.coli ATCC	S.aureus ATCC	B.subtilis	P.aeruginosa ATCC
Aspect macroscopique	- Des colonies rondes, saumons lisses.	- Des colonies entourées d'une auréole jaune.	-Des colonies sèches.	-Des colonies fines, vertes.
coloration de Gram	- Coccobacilles -Gram ⁻	-Cocci par en amas. -Gram ⁺	- Bâtonnet -Gram ⁺	-Bacilles fins -Gram ⁻
Etat frais	mobile	immobile	immobile	Très mobile
Catalase	+	+	+	+
oxydase	-	-	-	+
Fermentation des sucres TSI (Glu, Sac, Lac)	-Glu : + -Sac : + -Lac : +	X		-Glu : + -Sac : + -Lac : +
Citrate de Simmons	-			+ où -
Indole	+			-
Production de VP	-			-

V.2. Mesure des diamètres des zones d'inhibition

Les résultats de l'aromatogramme se manifestent sous forme d'halo qu'on mesure à l'aide du pied à coulisse.

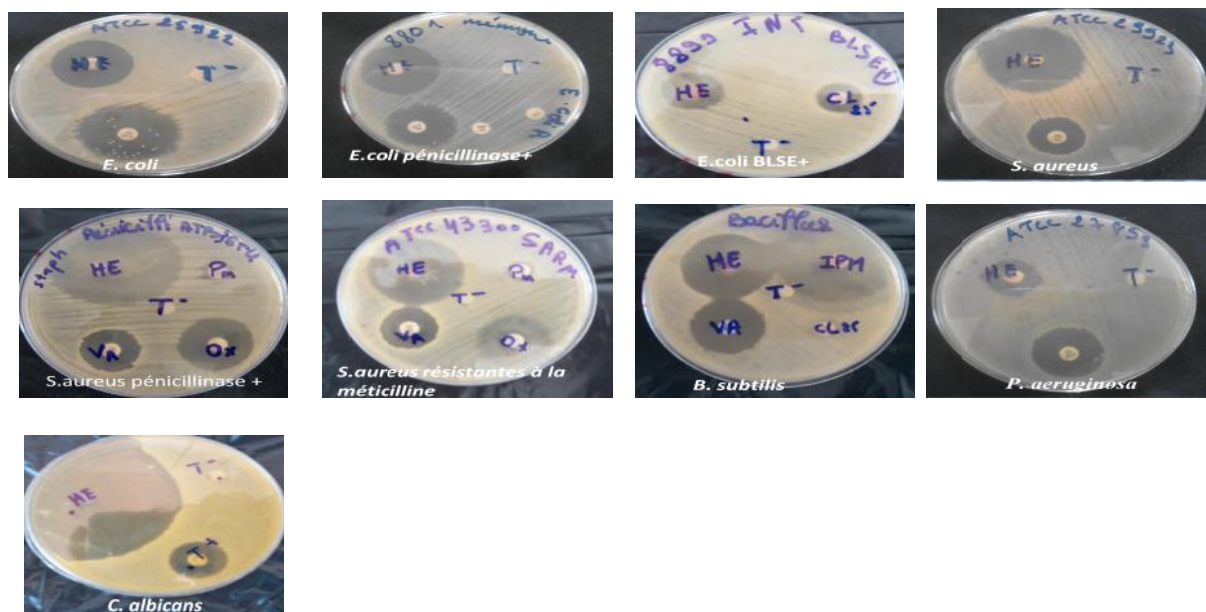


Figure 17 : Résultats du test de sensibilité de souches microbiennes à l'HE de cannelle par la méthode de l'aromatogramme.

Les résultats de l'aromatogramme sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 6: Diamètres des zones d'inhibition provoqués par l'HE testée sur différentes souches microbiennes.

Souche microbienne	Diamètre des zones d'inhibition obtenue	Taille du halo d'inhibition	Conclusion
<i>E. coli</i> ATCC	29 mm	ou =20 mm	Le germe est très sensible à l'HE testée.
<i>E.coli pénicillinase+</i>	29 mm	ou =20 mm	//
<i>E.coli BLSE +</i>	19 mm	[14mm-20mm]	La sensibilité du germe est moyenne.
<i>S. aureus</i> ATCC	35 mm	ou =20 mm	Le germe est très sensible à l'HE testée.
<i>S.aureus pénicillinase+</i>	34 mm	ou =20 mm	//
<i>S.aureus résistantes à la méticilline</i> ATCC	32 mm	ou =20 mm	//
<i>B. subtilis</i>	31 mm	ou =20 mm	//
<i>P. aeruginosa</i>	18 mm	[14mm-20mm]	La sensibilité du germe est moyenne.
<i>C. albicans</i>	64 mm	ou =20 mm	Le germe est très sensible à l'HE testée.

Discussion

Les résultats obtenus montrent que l'activité antibactérienne est différente en fonction de la bactérie testée. Il s'avère que toutes les bactéries testées ont été sensibles vis-à-vis de l'huile de cannelle. Ce résultat est en accord avec la littérature (**Barbie, 2014**).

En revanche, les bactéries résistantes (*S.aureus pénicillinase+*, *S.aureus résistantes à la méticilline* et *E.coli BLSE +*) possèdent une faible diminution de sensibilité par rapport aux bactéries de référence suite à la diminution des zones d'inhibition vis-à-vis de l'HE.

Ces résultats ont montré que *S. aureus* et *B. subtilis* était plus sensible qu' *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cette sensibilité plus marquée des Gram (+) par rapport aux Gram (-) vis-à-vis des H.E a été déjà observée dans plusieurs études antérieures. (**Ouis, 2015**)

La grande résistance des bactéries à Gram (-) est liée en partie à la complexité de la paroi cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+). (**Ouis, 2015**)

Pour *Candida albicans* a révélé très sensibles à cette huile avec une zone d'inhibition de 64 mm. Ce résultat est en accord avec la littérature. (**Barbier, 2014**)

L'huile essentielle de cannelle fait partie des huiles essentielles ayant le plus fort pouvoir antibactérien. Les huiles essentielles présentant une bonne activité antibactérienne sont aussi de bons antifongiques (**Kaloustian et al, 2008**).

Cette activité est due au constituant majoritaire de l'HE de *C.cassia* : cinnamaldéhyde, qui semble inhiber la production d'enzymes par les bactéries et/ou causer des dommages à la paroi des bactéries. Le cinnamaldéhyde fait partie des aldéhydes les plus actifs contre les bactéries Gram positives et Gram négatives, y compris les levures et les champignons (**Barbier, 2014**).

V.3. Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de cannelle

➤ Lecture des CMI

La CMI de l'HE de *Cinnamomum cassia*, pour un germe donné, correspond à la plus petite concentration inhibant toute croissance visible à l'œil nu et donc dans notre cas à la plus petite dilution ne montrant pas de croissance visible au tour du disque imbibé de suspension microbienne après incubation.

Tableau 7: Résultats des CMI pour les germes testés.

Dilutions	2%	1%	0.5%	0.25%	0.125%	0.06%	0.03%	0.015%	Témoin
Souches microbiennes									
<i>E. coli</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	- CMI	+	+
<i>E.coli</i> pénicillinase+	-	-	-	-	-	- CMI	+	+	+
<i>E.coli</i> BLSE+	-	-	-	-	-	- CMI	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC	-	-	-	-	-	- CMI	+	+	+
<i>S.aureus</i> pénicillinase+	-	-	-	-	-	- CMI	- CMI	+	+
<i>S.aureus</i> SARM ATCC	-	-	-	-	-	- CMI	- CMI	+	+
<i>B. subtilis</i> ATCC	-	-	-	-	-	- CMI	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	-	-	-	-	-	- CMI	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	- CMI	- CMI	+	+

+ : pousse microbienne pour un disque.

- : absence de pousse microbienne pour un disque.

Pour *C.candida*, *E.coli* ATCC, *S.aureus* pénicillinase+ et *S.aureus* SARM .on observe des colonies microbiennes dans la boîte témoin, la dilution 0.015% et 0.06% cependant rien n'est remarqué au tour des disques des dilutions allant de 0.03% à 2%. Leurs CMI sont donc égale à 0.03%.

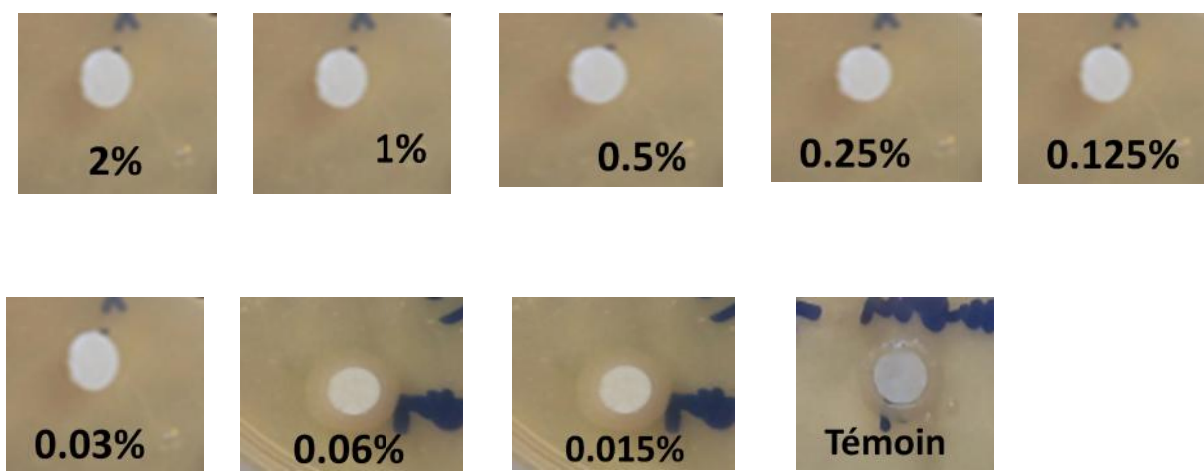


Figure 18: Détermination de la CMI de 0.03%.

Pour les autres souches bactériennes, il ya des colonies bactériennes au tour des disques placés dans la boîte témoin et dans la dilution 0.015% et absence de culture dans les dilutions allant de 0.06% à 2%.leurs CMI sont donc de l'ordre de 0.06%.

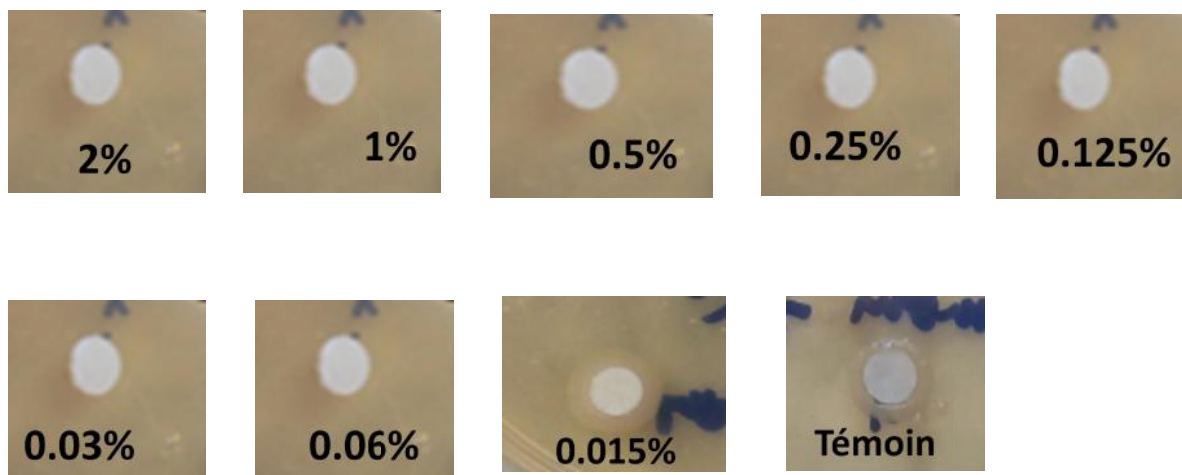


Figure 19 : Détermination de la CMI de 0.06%.

Ces résultats ont montré que l'huile essentielle de cannelle a une efficacité sur les souches bactériennes et la levure candida. En effet, leurs CMI sont faibles varient entre 0.03% et 0.06%.

Dans le tableau suivant on présente ces CMI exprimées avec différentes unités.

Tableau 8: Récapitulatif des résultats des CMI pour les germes sensibles.

Germes testés	Dilutions correspondantes à la CMI			
	(%, v/v)	(μ l/ml)	(μ g/ml)	(mg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC	0.03	0.3	0.32	3.2×10^{-4}
<i>E.coli</i> pénicillinase+	0.06	0.6	0.64	6.4×10^{-4}
<i>E.coli</i> BLSE+	0.06	0.6	0.64	6.4×10^{-4}
<i>S. aureus</i> ATCC	0.06	0.6	0.64	6.4×10^{-4}
<i>S.aureus</i> pénicillinase+	0.06	0.6	0.64	6.4×10^{-4}
<i>S.aureus</i> SARM ATCC	0.06	0.6	0.64	6.4×10^{-4}
<i>B. subtilis</i> ATCC	0.06	0.6	0.64	6.41×10^{-4}
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0.06	0.6	0.64	6.4×10^{-4}
<i>C. albicans</i>	0.03	0.3	0.32	3.2×10^{-4}

➤ Lecture des CMB/CMF

Toutes les dilutions supérieures ou égales à la CMI ont été transférées sur des boîtes sans HE.

Tableau 9: Résultats des CMB et CMF pour les germes testés.

Dilutions	2%	1%	0.5%	0.25%	0.125%	0.06%	0.03%
Souches microbiennes							
<i>E. coli</i> ATCC	-	-	-	-	- CMB	+	+
<i>E.coli pénicillinase+</i>	-	-	-	-	- CMB	+	
<i>E.coli BLSE+</i>	-	-	-	-	- CMB	+	
<i>S. aureus</i> ATCC	-	-	-	-	- CMB	+	+
<i>S.aureus pénicillinase+</i>	-	-	-	-	- CMB	+	+
<i>S.aureus SARM</i> ATCC	-	-	-	-	-	- CMB	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	- CMB	+	
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	- CMB	+	
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	- CMF	+

+ : pousse microbienne pour un disque.

- : absence de pousse microbienne pour un disque.

➤ Calcul de rapport CMB/CMI et CMF/CMI

Tableau 10: Rapport CMB/CMI, CMF/CMI

Souches bactériennes	CMB/CMI	Interprétation
<i>E. coli</i> ATCC	4	Bactéricide
<i>E.coli pénicillinase+</i>	2	Bactéricide
<i>E.coli BLSE+</i>	2	Bactéricide
<i>S. aureus</i> ATCC	2	Bactéricide
<i>S.aureus pénicillinase+</i>	4	Bactéricide
<i>S.aureus SARM</i> ATCC	1	Bactéricide
<i>B. subtilis</i> ATCC	2	Bactéricide
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	2	Bactéricide
<i>C. albicans</i>	2	Fongicide

Discussion

Ces résultats ont montré que l'huile essentielle de cannelle peut être qualifiée de bactéricide et fongicide sur toutes les souches utilisées.

L'huile essentielle de cannelle tue les cellules de ces souches microbiennes en perturbant la membrane plasmique **(Inouye et al, 2001)**.

De plus, les aldéhydes réagissent avec les macromolécules (protéine, acide nucléiques) pour modifier leur structure. Des études in vitro montrent que les huiles essentielles concernant des aldéhydes aromatiques, comme le cinnamaldéhyde, et des phénols sont les plus actives vis-à-vis des bactéries impliquées. Ces huiles ciblent la membrane cellulaire et la déstabilisent. **(Inouye S. et al., 2001)**.

Conclusion

Conclusion

Les plantes aromatiques constituent une source insoupçonnée de molécules bioactives qui pourront constituer une alternative aux agents antimicrobiens conventionnels.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressées à extraire l'huile essentielle de cannelle de Chine dite *Cinnamomum cassia*, ou *C. aromaticum* Nees.

L'hydrodistillation, méthode de choix pour l'extraction des huiles essentielles nous a permis de montrer que la plante cannelle de Chine ou *C. cassia* est riche en essence. Le rendement estimé varie entre 3.16 et 3.71%.

L'étude des caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle a permis de mettre en évidence sa conformité aux normes établies, elle se distingue par une densité relative, un indice de réfraction, et un indice de peroxyde globalement comparable à ceux donnés par la pharmacopée française, en revanche l'indice d'acide s'est révélé légèrement en dehors de la norme.

Afin de mettre en évidence les groupements fonctionnels constitutifs de l'HE testée, on a eu recours à la spectrophotométrie à infrarouge.

Nous avons également réalisés une chromatographie sur couche mince en suivant le protocole de la pharmacopée française, afin de mettre en évidence certains constituants de l'HE étudié, cependant les résultats obtenus n'ont pas pu être interprétés en raison de l'absence de témoins.

Les tests d'activité biologique réalisés *in vitro* par la méthode d'aromatogramme, ont démontré que l'HE possède une activité inhibitrice sur toutes les souches testées, la sensibilité la plus élevée est observée sur la levure *C. albicans*. Cette activité est due au constituant majoritaire de l'HE de *C. cassia* : cinnamaldéhyde.

Le rapport trouvé CMB/CMI montre que l'huile essentielle de cannelle peut être qualifiée de bactéricide sur la plupart des souches bactériennes testées et fongicide pour *C. albicans*.

Afin d'approfondir les aspects entrevus dans ce travail, un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées :

-Procéder à une séparation par des méthodes avancées telles que CPG, HPLC et la RMN afin d'identifier la composition de l'huile essentielle de cannelle

-Exploitation de ce pouvoir antimicrobien dans l'industrie pharmaceutique pour enrichir l'arsenal thérapeutique.

- Étude de nouvelles activités biologiques de l'HE de cannelle.

Au final, les résultats obtenus ainsi que les perspectives proposées vont permettre d'ouvrir de nouvelles voies dans le domaine thérapeutique.

Bibliographie

Références Bibliographiques

Akindoyo J.O. 2016. Essential oil from Cinnamomum cassia bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Industrial Corps and Products*, 92, pp 57-66.

Anton R., Lobstein A., Teuscher E. 2005. Plantes aromatiques: Épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris: Editions TEC & DOC.

Afissa H.S. 2014. Etude de l'antibiorésistance des souches de Staphylocoques isolées à partir des dispositifs médicaux à l'hôpital de Mohamed Boudiaf : [Mémoire] : Université Kasdi Merbah, Ouargla.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 3^{ème} éd. Paris : TEC&DOC et IME Editions.

Bouderdara N. 2013. Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de *Cachrys libanotis L.* [Thèse] : Chimie Organique. Université MENTOURI de Constantine.

Benazzouz M. 2011. Les huiles essentielles, importance et potentialités : Mise à jour bibliographique des derniers recherches sur leurs emplois et toxicité et analyse de la composition de l'huile essentielle de quinze plantes des plus consommées au Maroc. [Thèse] : Rabat : Université Mohammed V.

Barbier C. 2014. L'huile essentielle de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*). [Thèse] : pharmacie : Université de picardie Jules Verne.

Bey F. 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus sp.* et quelques souches d'entérobactéries. [Magister] : Microbiologie alimentaire : Université d'Oran Es-Senia.

Binzuneh A. 2014. GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from Cinnamon bark growing in South-west of Ethiopia. *International Journal of Herbal Medicine*, 1, 6, pp22-31.

Chouitah O. 2012. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. [Thèse] : Biochimie : Université d'Oran.

Chabert G. 2013. Myrtacées et aromathérapie. [Thèse] : Pharmacie : université Joseph Fourier de Grenoble.

Denis F., Poly M.C. 2007. Bactériologie médicale: techniques usuelles Elsevier Masson, pp 573.

Dechache A, Mofradj Z. 2014. Contribution à l'étude de conservation d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait caprin : [Thèse] : Biologie : Université Kasdi Merbah, Ouargla.

El Kalamouni C. 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. [Thèse] : Biologie : Université de Toulouse.

Références Bibliographiques

Fekih N. 2014. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussante en Algérie. [Thèse] : Chimie organique : Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

Guinoiseau E. 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action [Thèse] : Biochimie : Université Pasquale Paoli.

Gaillot O. 2008. Identification des Entérobactéries. a review. *J. Appl. Microbiol*, 99, pp 223-229.

Haddad D, Haddji D. 2016. Contribution à l'Etude de L'Huile Essentielle De *Myrtus communis* L. [thèse] : Pharmacie : Université Mouloud Mammeri : Faculté de Médecine.

Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, *Antimicrobial Chemother*, 47, pp565-573.

Jeyaratnam N, Abdurahman Hamid N, Kanthasamy R, Nour A.H, Yuvaraj A.R, Akindoyo J.O. 2016. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Industrial Corps and Products*, 92, pp 57-66.

Kaloustian J, Hadji-Minaglou F. 2012. La connaissance des huiles essentielles qualilogie et aromathérapie. Paris : Edition Springer.

Khadri S. 2009. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle cultivée (*Allium sativum*) de l'est Algérien vis-à-vis de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* [Mémoire]:Université Badji Mokhtar : Annaba.

Khebri S. 2001. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de trois *Artemisia* : [Mémoire] : biologie : université El-Hadj Lakhdar.

Laib I. 2011. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. [Mémoire] : Technologie alimentaire : Université Mentouri Constantine.

Levison ME. 2004. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infection disease clinic North America*, 18, pp 451-461.

Lakhdar L. 2015. Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles Marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : Etude in vitro. [Thèse] : Sciences Odontologiques : Université Mohammed V de Rabat.

Lucchesi J. 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception en application à l'extraction des huiles essentielles, pp 17, 23,52.

Références Bibliographiques

Mebarki N. 2010. Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse –antimicrobienne. [Mémoire] : industrie Pharmaceutique: Université M'Hamed Bougara.

Mayer F. 2012. Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite. [Thèse]: Pharmacies: Université de Lorraine.

Medagama A. 2015. The glycaemic outcomes of Cinnamon. A review of the experimental evidence and clinical trials. *Nutr J*, 14, pp108.

Mebarki N. 2010. Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. [Mémoire]: Université M'Hamed Bougara: Boumerdès.

Nur Nasulhar K, Syarifah Nursyimi Azlina S.I, Masdar N.D, Fatimah H, Nawawi W.I. 2014. Extraction and potential of Cinnamon essential oil towards repellency and insecticidal activity. *International journal of scientific and research publication*, 4, 7, pp 1-6.

Ouibrahim A. 2015. Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien [Thèse] : Toxicologie : Université Badji Mokhtar- Annaba.

Ouis N. 2015. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. [Thèse] : chimie organique : Université d'Oran 1.

Paul I. 2001. Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse. 2ème édition. Londres.

Priyanga R., Shehani P., Sirimal P., Priyadarshani G. 2013. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complement Altern Med*, 13, p275.

Pasupuleti V.R., Siew H.G. 2014. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. *Evid based Alternat Med*, 10, p 642.

Pharmacopée internationale. 1980. Méthode générales d'analyse. Genève : Organisation mondiale de la santé.

Pharmacopée européenne. 2008. 6ème édition.

Ronbi M, Dominique R. 2007. 120 plantes médicinales : Composition, Mode d'action et intérêt thérapeutique. Edition Alpen.

Rhayour K. 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. [Thèse]. Biologie cellulaire et moléculaire : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah.

Senhaji O., Farid M., Elychioui M., Dehhaoui M. 2005. Antifungal activity of different cinnamon extracts. *Journal of Mycologie Medical*, 15, pp 220-229.

Références Bibliographiques

Svoboda K.P., Hampson J.B. 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti inflammatory and other related.

Sylvie Verbois. 2001. Huiles Essentielles et Parfums qui Guérissent et Relaxent, La Voie De l'Ayurveda, Ed. Trajectoire.

Sedik M. 2010. Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique de l'huile essentielle d'Ammoides Verticillata de la région d'Adrar :[Mémoire] :Chimie moléculaire : Université d'Oran.

Trousseau A ; Pidoux H. 1870. Traité de thérapeutique et de matière médicale. 8^{ème} éd. Tome 2. Paris.

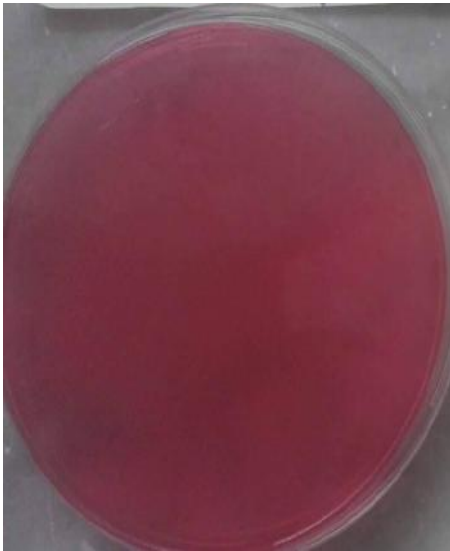
Yezza S., Djedial R. 2015. Analyse physicochimique et activités biologiques des huiles essentielles de quelques épices : [Mémoire] : Biologie : Université Kasdi Merbah Ouargla.

Yan-qun Li, De-xin K, Hong W. 2013. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. Industrial Corps and Products, 41, pp269-278.

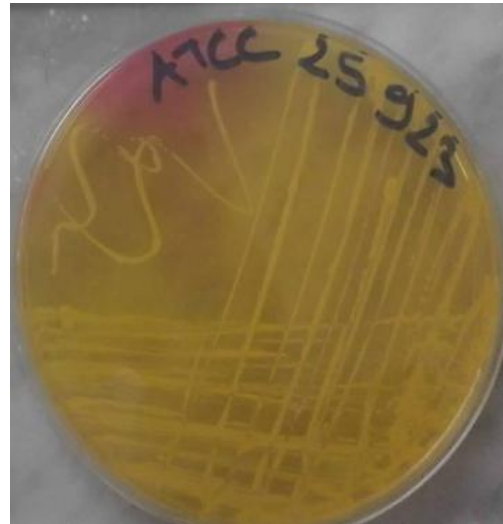
Annexes

Annexes

Annexe I : Examen macroscopique de S.aureus ATCC sur le milieu Chapman après incubation à 37°C/24h.

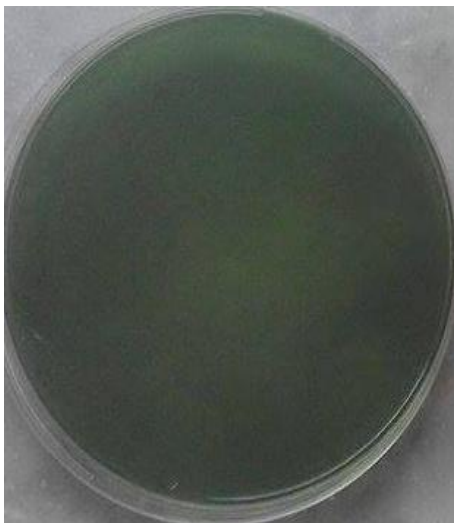


Le milieu Chapman avant culture.



Le milieu Chapman après culture de **S.aureus**.

Annexe II : Examen macroscopique d'Ecoli ATCC sur le milieu Hektoen après incubation à 37°C/24h



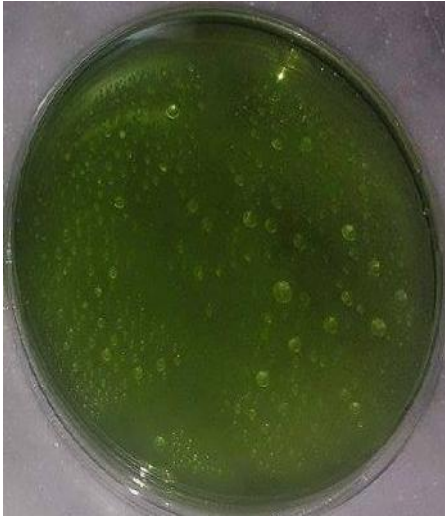
Le milieu Hektoen avant culture



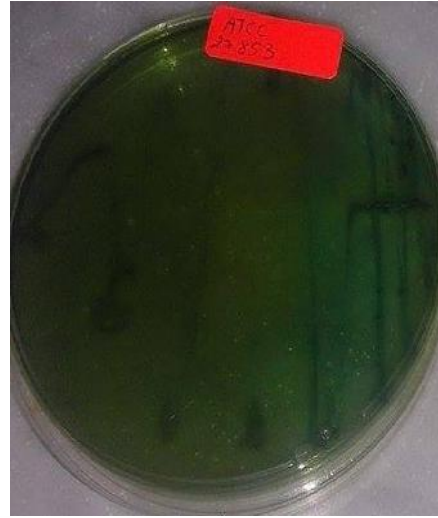
Le milieu Chapman après culture d'**E.coli**.

Annexes

Annexe III : Examen macroscopique de *P.aeruginosa* ATCC sur le milieu Hektoen après incubation à 37°C/24h

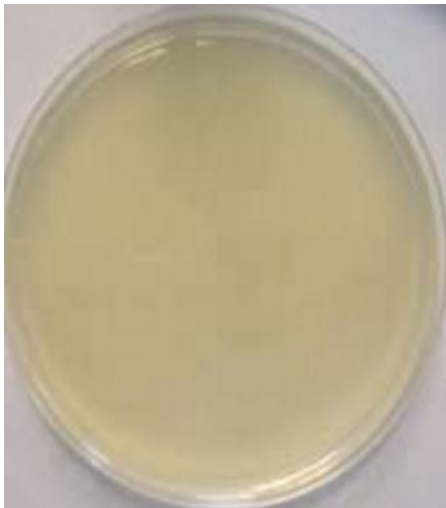


Le milieu Hektoen avant culture



Le milieu Hektoen après culture de *P.aeruginosa*

Annexe IV : Examen macroscopique de *B.subtilis* sur le milieu gélose nutritive après incubation à 37°C/24h.



La gélose nutritive avant culture



La gélose nutritive après culture de *B. subtilis*.

Annexes

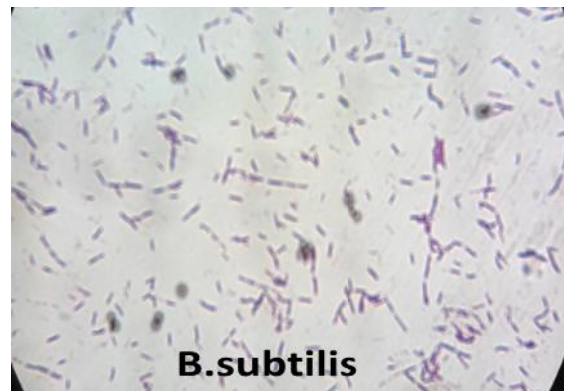
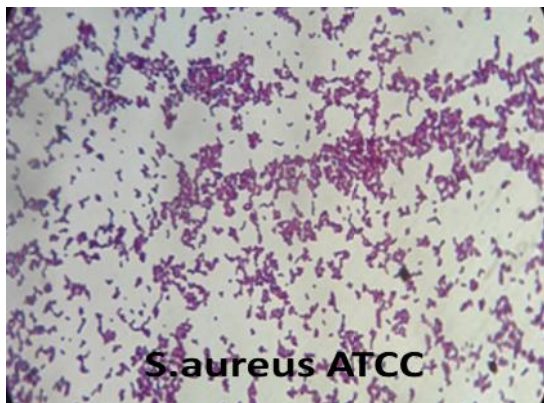
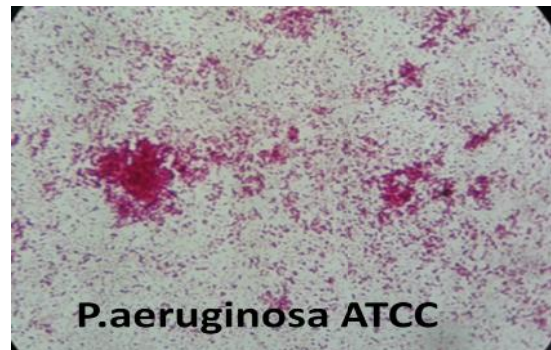
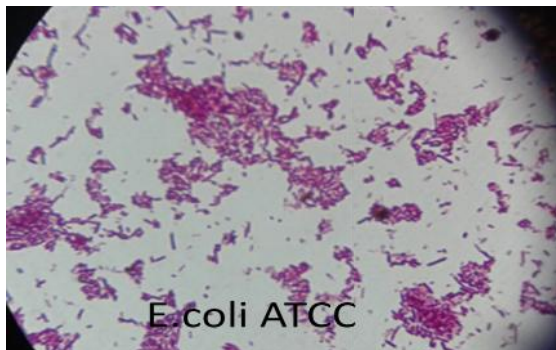
Annexe V : la Coloration de Gram (Haddad et al, 2016).

On prépare un frottis de la souche test : pour cela, on racle une petite colonie bactérienne bien isolée à l'aide d'une pipette paster que l'on dépose sur une lame avec une petite goutte d'eau péptonée stérile, On étale l'échantillon en couche mince et régulière. Le frottis est ensuite séché au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen puis fixé avant coloration ;

- On recouvre le frottis avec le violet de gentiane, on le laisse agir 1 minute puis on rince à l'eau distillée ;
- On verse du lugol qu'on laisse agir pendant 1 minute puis on rince à l'eau distillée ;
- On décolore à l'alcool absolu pendant 15 secondes et on rince abondamment à l'eau distillée ;
- On recolore avec de la fuchsine pendant 30 secondes et on rince encore une fois à l'eau distillée ;
- Après séchage des lames colorées au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, on passe à l'observation au microscope optique à l'objectif 100 avec une goutte d'huile d'immersion, les observations sont photographiées.

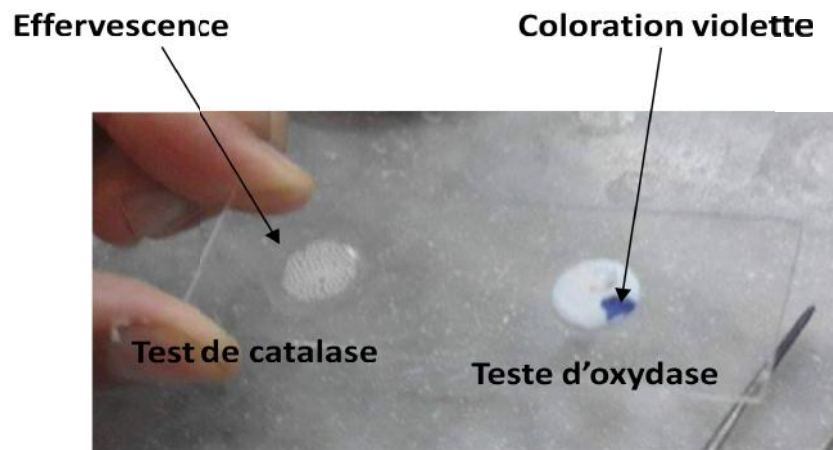
Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif

Annexe VI : Résultats de coloration de Gram des souches bactériennes.

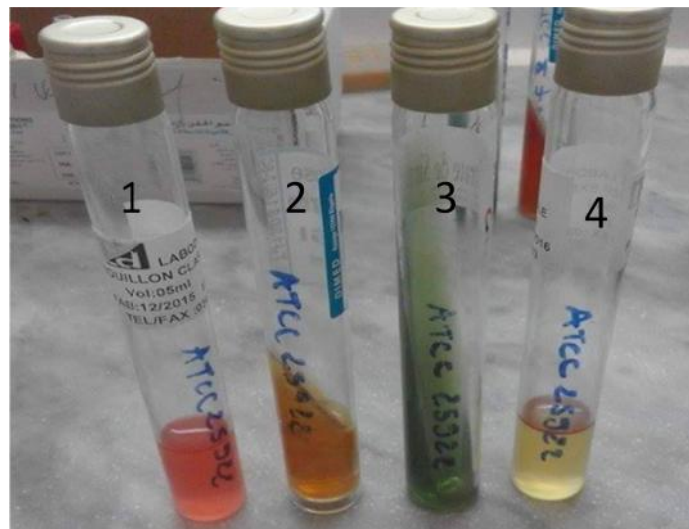


Annexes

Annexe VII : Test de catalase et oxydase pour la souche *P.aeruginosa* ATCC.



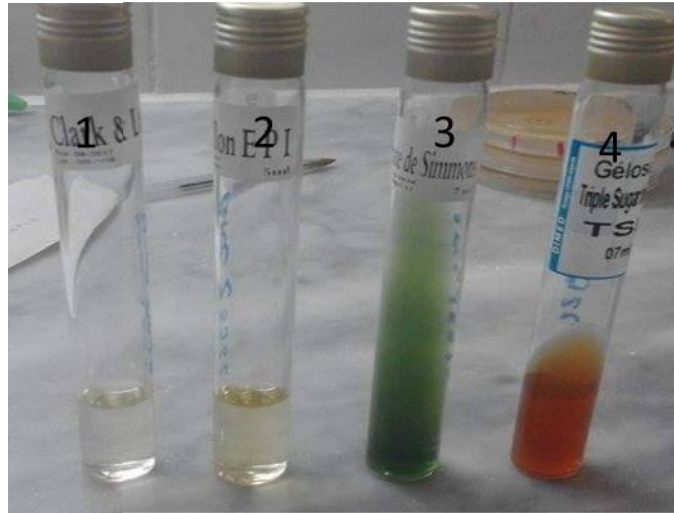
Annexe VIII : Résultats de l'identification biochimique de la souche *E.coli* ATCC.



1: Test d'Acétone VP, 2: Milieu TSI, 3: Citrate de Simmons, 4: Indole.

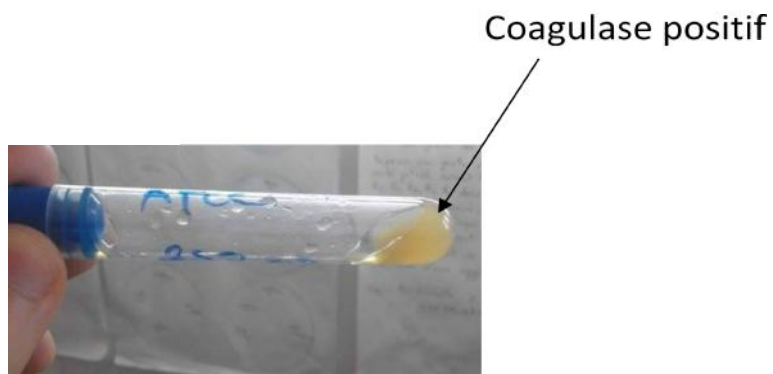
Annexes

Annexe IX : Résultats de l'identification biochimique de la souche *P. aeruginosa* ATCC



1: Test d'Acétone VP ,2: Indole ,3: Citrate de Simmons, 4: Milieu TSI.

Annexe X : Résultat du test de coagulase libre de la souche *S.aureus* ATCC.



Annexes

Annexe XI : Un antibiogramme a été effectué pour les bactéries et un antifongigramme pour la levure.les disques d'antibiotiques ou antifongiques sont déposés sur la surface des géloses préalablement ensemencé par les suspensions microbiennes et les boites sont incubées à 37°C pendant 24h pour la bactérie (MH) et 48h pour la levure (casitone et semi synthétique).

Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits par mesures du diamètre des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

A).Résultat d'antibiogramme de S.aureus ATCC

Amikacine	S	21 mm	Clindamycine	S	30 mm
Erythromycine	S	27 mm	Acide fusidique	S	32 mm
Gentamicine	S	23 mm	Kanamycine	S	21 mm
Pénicilline G	S	44 mm	Rifampine	S	35 mm
Tétracycline	S	30 mm	Vancomycine	S	21 mm
Oxacilline	S	30 mm	Ciprofloxacine	S	30 mm
Levofloxacine	S	29 mm	Teicoplanine	S	18 mm

R:Résistant

S=Sensible

Annexes

B).Résultat d'antibiogramme de S.aureus pénicillinase+



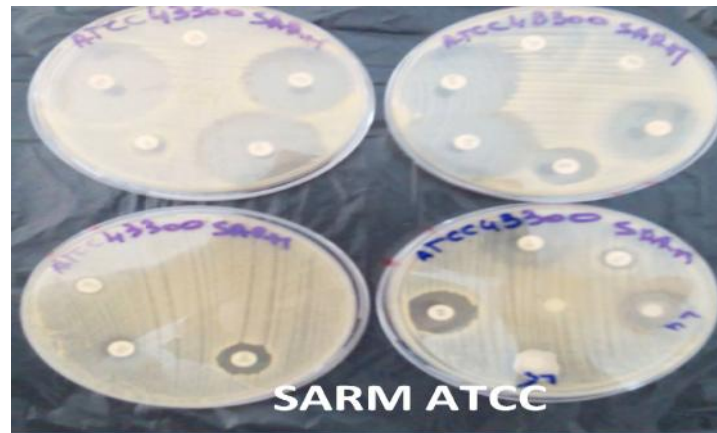
Teicoplanine	S	14mm	Céfoxitine	S	25mm
Tetracycline	S	30mm	Tobramycine	S	27 mm
Ciproflonacine	S	33mm	Kanamycine	S	19 mm
Streptomycine	S	32mm	Lévoflonacine	S	30mm
Gentamycine bas niveau	S	24mm	Clindamycine	S	29 mm
Acide fusidique	S	29mm	Erythromycine	S	27 mm
Amikacine	S	23mm	Rifampicine	S	37 mm

R:Résistant

S=Sensible

Annexes

C).Résultat d'antibiogramme de S.aureus SARM



Teicoplanine	S	14mm	Streptomycine	S	25mm
Céfoxitine	S	10mm	Amikacine	S	28mm
Gentamycine bas niveau	R	0.6mm	Tobramycine	R	0.6 mm
Rifampicine	S	34mm	Ciprofloxacine	S	29mm
Lévoflonacine	S	33mm	Tetracycline	S	30mm
Fosfomycine	S	26mm	Clindamycine	R	0.6mm
Kanamycine	S	9mm	Erythromycine	R	0.6 mm

R:Résistant

S=Sensible

Annexes

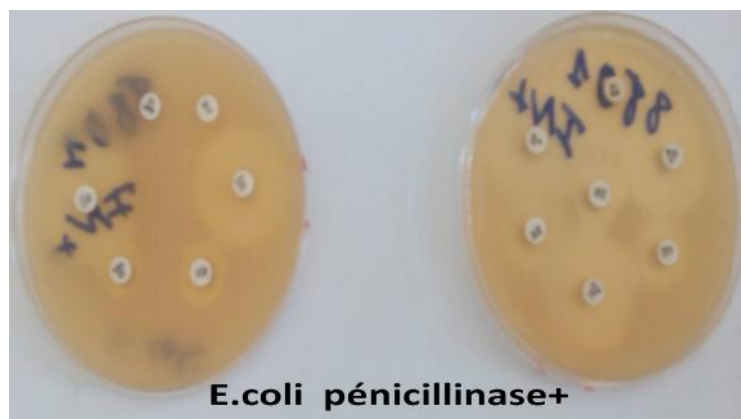
d).Résultat d'antibiogramme d'E.coli ATCC

Cotrimoxazole	S	30mm	Ertapénème	S	26 mm
Céplazoline	S	24mm	Amikacine	S	19mm
Céfoxitine	S	22 mm	Colistine	S	17mm
Chloramphénicol	S	31 mm	Ampicilline	S	19mm
Amoxicilline	S	21mm	Aztreoname	S	30 mm
Céftazidime	S	26 mm	Imipénème	S	29mm
Gentamycine bas niveau	S	16 mm			

R:Résistant

S=Sensible

E).Résultat d'antibiogramme d'E.coli pénicillinase+



Cotrimoxazole	S	31mm	Gentamycine bas niveau	S	16 mm
Colistine	S	16mm	Aztreoname	S	28 mm
Céfotaxime	S	30 mm	Amikacine	S	21 mm
Amoxicilline	S	14 mm	Ciprofloxacine	S	31 mm
Ampicilline	R	0.6 mm	Imipénème	S	28 mm
Ticarcilline	R	0.6 mm	Céplazoline	S	16 mm

R:Résistant

S=Sensible

Annexes

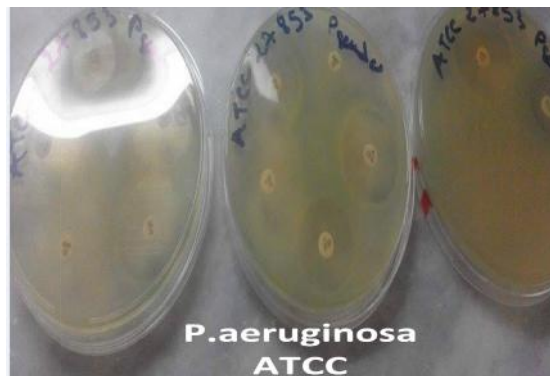
F).Résultat d'antibiogramme d'E.coli BLSE+

Ticarcilline	S	13mm	Ertapénème	S	20mm
Aztreoname	R	0.6mm	Amikacine	S	20mm
Céfotaxime	R	0.6mm	Colistine	S	15mm
Gentamycine bas niveau	S	15mm	Céfoxitine	S	20 mm
Céftazidine	S	12mm	Imipénème	S	29mm

R:Résistant

S=Sensible

G).Résultat d'antibiogramme de P.aeruginosa ATCC



Colistine	S	19mm	Gentamycine bas niveau	S	19mm
Imipénème	S	30mm	Aztreoname	S	27mm
Ciprofloxacine	S	38mm	Céftazidine	S	22 mm
Ticarcilline	S	27mm	Tobramycine	S	28 mm
Pipéracilline	S	31mm	Nétilmicine	S	24 mm

R:Résistant

S=Sensible

Annexes

K).Résultat d'antifongigramme de C.albicans



Milieu Casitone

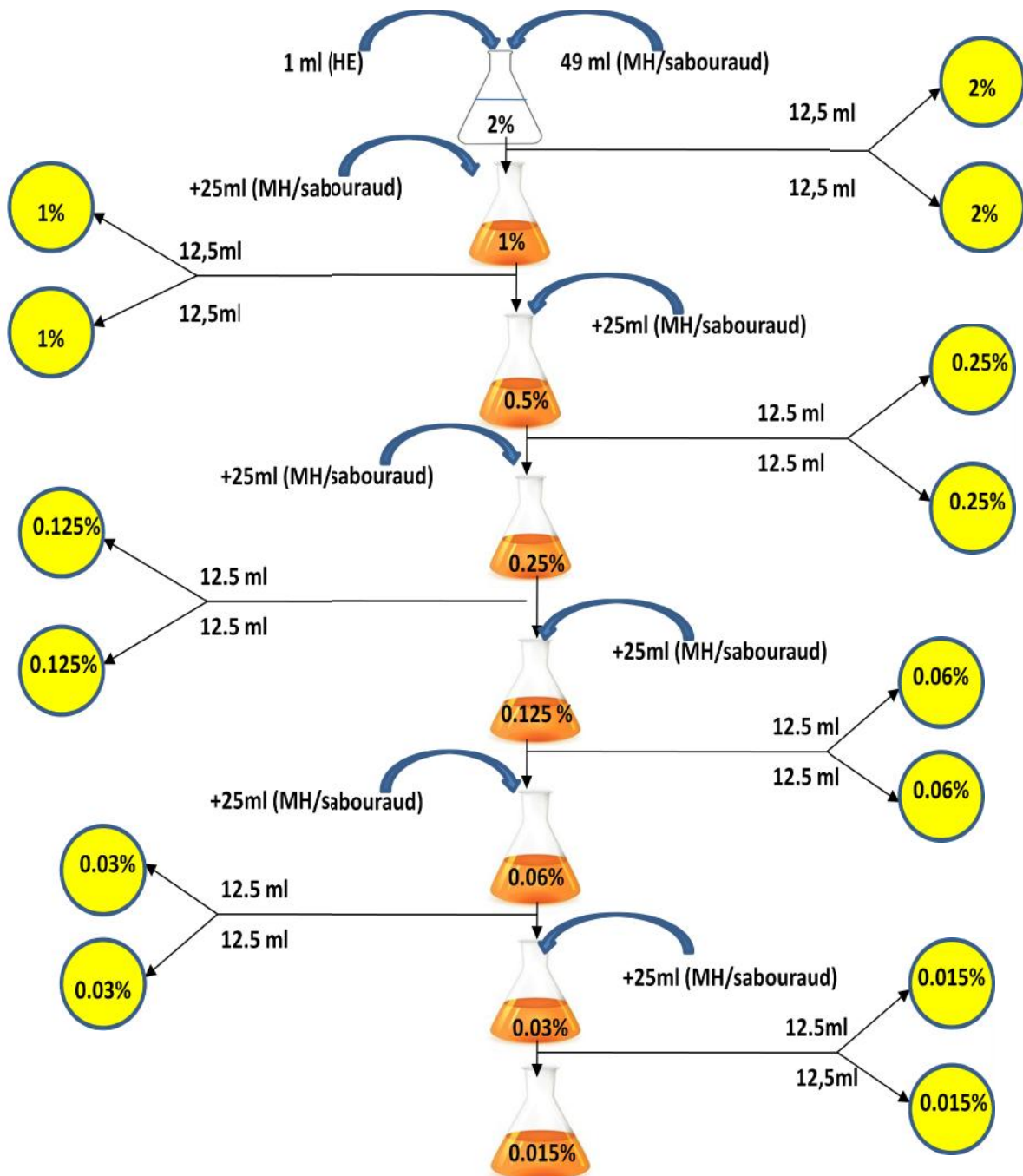
Amphotéricine	S	20mm
Ketoconazole	S	23mm
Fluconazole	R	0.6mm

Milieu semi casitone

Fluorocytosine	S	42 mm
----------------	---	-------

Annexes

Annexe XII : Récapitulatif des différentes étapes de préparation des dilutions.



Résumé

Suite à l'augmentation de la fréquence des infections microbiennes et à l'apparition des résistances aux traitements conventionnels, notre travail s'oriente vers la recherche de nouvelles molécules alternatives à ces traitements. On s'est donc intéressé à l'étude de l'huile essentielle de cannelle de Chine. Pour cela, on a effectué l'extraction de l'huile par hydrodistillation, puis on a procédé à une caractérisation physicochimique et une analyse chromatographique (CCM) et spectroscopique (IF) de l'huile analysée et enfin on a évalué son activité antimicrobienne vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques. L'extraction par hydrodistillation a donné un rendement qui varie de 3.16 à 3.71%. L'huile essentielle est globalement conforme aux normes établies. L'activité antimicrobienne s'est révélée variable selon la nature de la souche testée avec une prédominance pour les bactéries Gram positif et pour *Candida albicans*.

Mots clés : hydrodistillation, caractérisation physicochimique, CCM et IF, huile essentielle, cannelle de Chine, activité antimicrobienne.

Abstract

Our work is motivated by the increase of microbiological infection frequency and the emergence of resistances in conventional treatments. In fact, our aim is to find out new alternatives of these treatments. Our research is wanted to study the essential oil of Chinese cinnamom. In order to reach our purpose, we have carried out the extraction by hydrodistillation, we conducted a physicochemical characterization, a chromatographic (TIC) and spectroscopic analysis (IF) of the analyzed oil, and then we proceeded to assess the oil's antimicrobial activity towards bacterial stumps. Extraction by hydrodistillation gave a yield which varied from 3.16 to 3.71%. We have concluded that essential oil is in conformity with the established standards and its antimicrobial activity is varying according to the tested strain with the predominance of positive Gram bacteria and *Candida albicans*.

Keywords: hydrodistillation, physicochemical characterization, TLC and IF, essential oil, cinnamon cassia, antimicrobial activity.