

Étude de la Sensibilité Aux Huiles Essentielles de *Cinnamomum Verum*, *Eucalyptus Globulus*, et *Glycyrrhiza Glabra L* Ainsi qu'aux Antibiotiques de Certains Germes Issus de la Restauration Collective

***Milan Oba Samoussa,
Abderrazak Abdellaoui,
Anass Kettani,
Rachid Saile,
Houda Bennani,***

Laboratoire de Biologie et Santé URAC34, Faculté Des Sciences Ben M'sik/
Université Hassan II de Casablanca, Casablanca, Maroc

Doi: 10.19044/esj.2018.v14n3p584 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2018.v14n3p584](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2018.v14n3p584)

Abstract

Food safety is still a very important topic of interest. The use of medicinal plants extracts can be an efficient alternative for fighting food-borne infections in the face of the increase of resistance to antibiotics. We have studied the sensitivity of bacterial strains isolated from food outlets using commonly used antibiotics (Amoxicillin, Vancomycin, Ceftriaxone, Teicoplanin, Rifampicin and Amikacin). This was done using an antibiogram. We have also tested their sensitivity against essential oils extracted from medicinal plants (*Cinnamomum verum*, *Eucalyptus globulus*, and *Glycyrrhiza glabra L*) using aromatogram. This study was conducted using 27 bacterial strains, including 9 *Escherichia coli* strains, 9 *Staphylococcus aureus* strains, 9 *Salmonella* spp. strains, and 3 ATCC strains (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Results revealed that two plant extracts has a substantial antibacterial activity with zones of inhibition ranging from 10 to 25 mm, and it reached 35 mm when using a cocktail of plant extracts. Regarding the antibiotics we used, all strains of *Salmonella* spp. demonstrated a resistance to amoxicillin and to ceftriaxone. The tested strains of *E. coli* and *Staphylococcus aureus* had a partial resistance to the tested antibiotics, which confirms the results of previous studies.

Keywords: TIAC, pathogenic germs, antibiotic resistance, essential oils, Antimicrobial activity

Resume

La salubrité des aliments reste un véritable enjeu de santé publique et son intérêt est toujours d'actualité. L'utilisation des extraits des plantes médicinales peut s'avérer comme une alternative efficace dans la lutte contre les toxi-infections alimentaires face à la recrudescence de l'antibiorésistance. Ce travail a pour but d'étudier la sensibilité à certains antibiotiques couramment utilisés tels que l'Amoxicilline, la Vancomycine, la Ceftriaxone, la Teicoplanine, la Rifampicine et l'Amikacine, à travers des antibiogrammes en milieu solide. Il a été également question de tester leur sensibilité aux antimicrobiens des huiles essentielles d'extraits de plantes médicinales : *Cinnamomum verum*, *Eucalyptus globulus*, et *Glycyrrhiza glabra* L, par des aromagrammes. L'étude a été réalisée sur 27 souches bactériennes dont 9 souches d'*Escherichia coli*, 9 souches de *Staphylococcus aureus* et 9 souches de *Salmonella* spp. ainsi que les souches de références (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Ces souches ont été isolées à partir des aliments issus de la restauration collective. Les résultats obtenus montrent que deux extraits de plantes sur trois ont une activité antibactérienne importante avec des diamètres d'inhibition variant entre 10 à 25 mm. Ce dernier a atteint 35 mm dans le cas des mélanges d'extraits de plantes. En ce qui concerne les antibiotiques testés, toutes les souches de *Salmonella* spp. ont montré une résistance à l'Amoxicilline et au Céftriaxone. Les souches d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* ont une résistance partielle aux antibiotiques testés, ce qui confirme des résultats déjà décrits dans la littérature.

Mots clés: TIAC, Germes pathogènes, Antibiorésistance, Huiles essentielles, Activité antimicrobienne

Introduction

Les maladies d'origine alimentaire sont des pathologies de plus en plus fréquentes dans le monde et sont considérées aujourd'hui comme un vrai problème de santé publique (OMS, 2002). Un foyer de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) est défini par l'apparition d'au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (sauf pour le botulisme où un cas suffit à déclencher l'alerte) (Boulioux, 2000; ACIA, 2013).

Au Canada, on estime à 13 000 le nombre de cas d'infection à *E. coli* O157 d'origine alimentaire contractée au pays par année, même si la majorité de ces cas ne sont pas déclarés (Santé Canada, 2014). En 2015, 1 390 foyers

de TIAC ont été déclarés en France, affectant 11 429 personnes, dont 5 sont décédées. Les quatre agents responsables les plus fréquemment confirmés ou suspectés étaient *Salmonella* (48 %) suivi de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus* (InVS, 2015). Au Maroc, selon le rapport spécifique de toxivigilance élaboré en 2015 par le centre antipoison du Maroc, 2 887 cas de TIAC dont six décès, ont été signalés, soit une augmentation de 13 % par rapport à l'année précédente. Malgré les difficultés liées à la déclaration des cas, les maladies d'origines alimentaires sont la deuxième cause d'intoxication au Maroc (Aoued, 2015).

Les antibiotiques ont toujours été utilisés en priorité dans les cas des TIAC, ils sont considérés comme un moyen efficace pour la santé humaine et la santé animale. Cependant les bactéries sont susceptibles d'acquérir des capacités de résistance aux antibiotiques. La sélection de bactéries multi résistantes constituant actuellement un réel problème d'antibiothérapie et de santé publique notamment avec l'apparition des infections nosocomiales. En effet, ces infections sont de plus en plus difficiles à traiter. Les bactéries les plus souvent mises en cause sont *Escherichia coli* (25 %), *Staphylococcus aureus* (19 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (10 %) (OMS, 2005). Bien que des progrès aient été observés dans la diffusion de certaines bactéries résistantes (*Staphylocoques* résistants à la méticilline, *Pneumocoques* résistants à la pénicilline, etc.), cependant, la situation est en recrudescence pour d'autres : entérobactéries avec la diffusion croissante de souches productrices de bêta-lactamases à spectre étendu et l'émergence de souches productrices de carbapénémases (ANSM, 2014). Cette situation constitue une menace croissante pour la santé publique mondiale, qui exige la prise de mesures à l'échelle de tous les secteurs gouvernementaux et de la société tout entière.

Les extraits des plantes aromatiques, notamment les huiles essentielles, peuvent être exploitées comme alternative dans la lutte contre les TIAC. En effet, l'huile essentielle est le produit de la distillation à la vapeur d'eau d'une plante aromatique. De plus, elles ont chacune des propriétés spécifiques. (Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, ne contiennent aucun corps gras et sont hydrophobes. Les huiles essentielles peuvent être extraites de différentes parties de la plante (écorce, graine, feuille, racine, fleur et bois)). Elles sont isolées des plantes par hydro distillation ou par expression mécanique. De nombreuses huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant, antimicrobien, stimulant, antiseptique, désintoxiquant, revitalisant antiseptique, digestif, etc. Les propriétés de chaque huile essentielle varient en fonction des conditions de récoltes, de la qualité de la distillation, du stockage (Burt, 2004).

Le présent travail est la continuité de l'étude sur les principaux germes pathogènes que l'on retrouve en restauration collective. Nous avons travaillé avec 27 souches de trois principaux bactéries, notamment : 9 souches

d'*Escherichia coli*, 9 souches de *Staphylococcus aureus* et 9 souches de *Salmonella*. Nous avons également utilisé les souches de référence de ses différentes espèces : *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Nous avons ensuite testé leurs sensibilités aux huiles essentielles de plantes médicinales (tels que *Cinnamomum verum*, *Eucalyptus globulus*, et *Glycyrrhiza glabra L*) par des aromagrammes, et à certains antibiotiques couramment utilisés en cas d'intoxication alimentaire par antibiogramme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Choix des Germes : Les germes utilisés ont été caractérisés lors de notre précédente étude sur les principaux pathogènes retrouvés dans la restauration collective. Ils sont parmi les premières causes de TIAC dans le monde (OMS, 2014). En effet nous avons isolé les souches à partir de 3000 échantillons d'aliments issus de la restauration collective et rapide, répartis en quatre grandes classes dont les matières premières, les salades, les plats cuits et les pâtisseries (Oba et al., 2014).

Nous avons également testé des souches de référence avant l'utilisation des souches isolées dans les différentes classes d'aliments. Au total, nous avons:

- Trois souches de référence : *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
- Vingt-sept souches isolées dans les aliments dont 9 souches d'*Escherichia coli*, 9 souches de *Staphylococcus aureus*, et 9 souches de *Salmonella spp.*

Le dénombrement et la recherche des différentes bactéries ont été réalisés selon les normes en vigueur, nous avons ensuite procédé à une identification biochimique à partir des galeries API (Tableau 1).

Tableau 1. Méthode de dénombrement et de recherche des germes dans les aliments

Paramètres Analysés	Normes	Méthodes
Dénombrement d' <i>Escherichia coli</i>	NM 08.0.108 Version 2009	- Isolement des souches d' <i>E coli</i> ont été effectuées sur le milieu TBX (Biokar diagnostics) à 44 °C pendant 24 heures d'incubation. - Confirmation biochimique par galerie API 20E.
Dénombrement des Staphylocoques à <i>coagulase positive</i>	NM ISO 6888-1 Version 2008	- Dénombrement a été réalisé avec le milieu Baird Parker (Oxoid Ltd) puis incubé dans l'étuve à 37 °C pendant 48 h. Ensuite une confirmation par le test de coagulase. - Confirmation biochimique par galerie API 20 Staph.

Recherche de la <i>Salmonella spp.</i>	NM ISO 6579 Version 2012	La recherche se fait en quatre phases : - Préenrichissement dans l'eau peptonée (OXOID Ldt). - Enrichissement dans les milieux Muller Kauffman (MKTTn, Oxoid Ldt) et Rappaport-Vassiliadis (RVS, Oxoid Ldt). - Isolement sur le milieu Xylose-Lysine-Désoxycholate (XLD, Oxoid Ldt) et Salmonella-Shigella (SS, Oxoid Ldt). - Confirmation biochimique par galerie API 20 E.
--	-----------------------------	--

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de Pétrie contenant de la gélose nutritive. Après 18 h d'incubation à 37 °C, des suspensions microbiennes d'une turbidité de 0,5 Mc Farland ont été préparées pour chaque souche, dans 10 ml dans une solution saline (0,9 % NaCl), selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2015).

Choix des Antibiotiques : Selon l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (France), les antibiotiques dans le tableau 2 ont été cités parmi ceux qui sont dits « critiques », sur la base de considérations scientifiques et de santé publique (ANSM, 2013).

Tableau 2. Liste des antibiotiques choisis et les bactéries concernées

Nom	Charge	Disque	Classes	Bactéries(s) utilisée(s)
Rifampicine	30 µg	Bio-Rad	Divers	<i>Staphylococcus aureus</i>
Vancomycine	30 µg	Bio-Rad	Glycopeptides	<i>Staphylococcus aureus</i>
Amikacine	30 µg	Bio-Rad	Aminosides	<i>Staphylococcus aureus</i>
Teicoplanine	30 µg	Bio-Rad	Glycopeptides	<i>Staphylococcus aureus</i>
Amoxicilline	25 µg	Bio-Rad	Pénicillines	<i>Escherichia coli, Salmonella spp</i>
Amoxicilline et acide clavulanique	30 µg	Bio-Rad	Pénicillines	<i>Escherichia coli, Salmonella spp</i>
Cefixime	10µg	Bio-Rad	Céphalosporines	<i>Escherichia coli, Salmonella spp</i>
Ceftriaxone	30µg	Bio-Rad	Céphalosporines	<i>Escherichia coli, Salmonella spp</i>

Extraction des Huiles Essentielles

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par la technique d'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. La distillation dure en moyenne quatre heures et demie. Le distillat récupéré est mis dans une ampoule à décanter dans laquelle nous avons rajouté du dichlorométhane dans le but d'extraire l'huile essentielle de l'eau (Song et al., 2009).

Huiles Essentielles: Les huiles essentielles sélectionnées pour cette étude et leur composition sont indiquées dans le tableau 3. Le choix a été basé sur un équilibre entre efficacités antimicrobiennes, propriétés sensorielles et la

présence des différentes composantes des huiles essentielles décrites dans la littérature.

Tableau 3. Huiles essentielles sélectionnées

Huiles essentielles	Nom scientifique	Composants principaux (%)	Références
Cannelle	<i>Cinnamomum verum</i>	Cinnamaldehyde (87)	Lens-Lisbonne et al., 1987
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	1,8 –cinéole (82)	Vilela et al., 2009
Réglisse	<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	Glycyrrhizine	Baytop, T.,1954

Étude de la Sensibilité des Germes Aux Huiles Essentielles et Aux Antibiotiques

La méthode de diffusion sur disque a été utilisée pour déterminer l'activité antibactérienne, elle s'avère être simple, pratique et reproductible pour la sensibilité et la résistance des bactéries aux huiles essentielles (Maidment et al., 2009). Cette méthode consiste à mettre en évidence la sensibilité des agents microbiens sur un milieu de culture gélosé (Milieu Mueller-Hinton agar) au contact d'huiles essentielles, dans le but d'estimer leur effet antibactérien. Des disques en papier filtre stérilisés, imprégnés d'huiles essentielles (100 µl) sont déposés à la surface du milieu de culture gélosé ensemencés par une suspension des souches bactériennes (ajustée à 10⁸ bactéries/ml), et l'incubation est effectuée à 37 °C pendant 24 h. La sensibilité des bactéries testées vis-à-vis des huiles essentielles est visible grâce à la formation d'un halo clair autour des disques contenant ces huiles. Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles est ainsi évalué par la détermination de l'ampleur du diamètre de la zone d'inhibition formée (Ponce et al., 2003).

La sensibilité de chaque souche aux huiles essentielles a été classée par diamètre des zones d'inhibition comme suit : **Résistant (R)** pour diamètre total inférieur à 6 mm, **Intermédiaire (I)** pour un total de diamètre compris 6 à 13 mm, **Sensible (S)** pour diamètre total plus grand que 13 mm (VG de Billerbeck, 2007).

Les disques d'antibiotiques ont également été déposés à l'aide d'une paire de pince stérile, en respectant la distance entre les disques sur une boîte. L'activité antimicrobienne est observée par la présence d'une zone d'inhibition qui se forme autour du disque imprégné. Chaque test est réalisé trois fois et on procède à la moyenne. L'interprétation des résultats a été faite selon les règles et les recommandations du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. **La cible** est la valeur de diamètre critique, **les limites acceptables** déterminent la limite inférieur et la limite supérieur de la sensibilité de l'antibiotique (CA-SFM, 2015).

RÉSULTATS

Au niveau des tableaux 4 à 10 nous présentons les résultats de chaque souche, les diamètres (en mm) de la zone d'inhibition de croissance aux différentes huiles essentielles et aux antibiotiques testés (n = 3). Les Écarts-types ne sont pas représentés, car ils sont tous ≤ 1 .

Escherichia Coli

Pour les souches d'*Escherichia coli* isolées et la souche de référence, seuls la cannelle et l'eucalyptus montrent des zones d'inhibition (Tableau 4).

Tableau 4. Etude de la sensibilité des souches d'*Escherichia coli* aux différentes huiles essentielles

	Cannelle		Régliasse		Eucalyptus	
	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats
<i>E. coli</i> 1	25 mm	S	0 mm	R	19 mm	S
<i>E. coli</i> 2	24 mm	S	0 mm	R	19 mm	S
<i>E. coli</i> 3	25 mm	S	0 mm	R	18 mm	S
<i>E. coli</i> 4	24 mm	S	0 mm	R	19 mm	S
<i>E. coli</i> 5	25 mm	S	0 mm	R	14 mm	S
<i>E. coli</i> 6	21 mm	S	0 mm	R	15 mm	S
<i>E. coli</i> 7	22 mm	S	0 mm	R	15 mm	S
<i>E. coli</i> 8	20 mm	S	0 mm	R	15 mm	S
<i>E. coli</i> 9	21 mm	S	0 mm	R	14 mm	S
ATCC 25922	25 mm	S	0 mm	R	20 mm	S

Diamètre d'inhibition : < 6 mm : **Résistant (R)** ; entre 6 à 13 mm : **Intermédiaire (I)** ; > 13 mm : **Sensible (S)**

Les résultats du Tableau 4 montrent une grande sensibilité des souches d'*Escherichia coli* à la cannelle. Les diamètres d'inhibition varient de 21 mm à 25 mm. La souche de référence ATCC 25922 est également sensible à l'huile essentielle de la cannelle. L'huile essentielle d'eucalyptus montre une bonne activité antimicrobienne sur les souches d'*Escherichia coli*. Les zones d'inhibition varient de 14 mm à 19 mm. Au niveau de la souche de référence ATCC 25922, la zone d'inhibition est également sensible. Cependant aucune activité antimicrobienne n'a été constatée dans le cas de l'huile essentielle de la réglisse, ni pour la souche de référence.

Tableau 5. Etude de la sensibilité des souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques

	Amoxicilline		Amoxicilline + Acide clavulanique		Cefixime		Ceftriaxome	
	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats
<i>E. coli</i> 1	12	R	30	S	31	S	25	R
<i>E. coli</i> 2	13	R	28	S	29	S	24	R
<i>E. coli</i> 3	12	R	21	I	30	S	24	R
<i>E. coli</i> 4	15	R	22	I	31	S	25	R

<i>E. coli</i> 5	20	I	16	R	25	S	21	R
<i>E. coli</i> 6	20	I	12	R	24	I	22	R
<i>E. coli</i> 7	21	I	15	R	25	I	22	R
<i>E. coli</i> 8	22	I	13	R	25	I	21	R
<i>E. coli</i> 9	20	I	16	R	29	S	30	I
ATCC 25922	23	I	30	S	29	S	29	I

Diamètres d'inhibition : cible (limites acceptables) : **Amoxicilline 22 (19-25); Amoxicilline + Acide clavulanique 21 (18-24); Cefixime 25 (23-27); Ceftriaxome 32 (29-35).**

Au niveau des antibiotiques, le Tableau 5 montre que la majorité des souches d'*Escherichia coli* isolées présentent une résistance aux antibiotiques. Aucune résistance n'a été observée au niveau de la Cefixime dont la plupart des souches sont sensibles (66%), y compris la souche de référence. Par contre nous avons observé une résistance pour la majorité des souches (88%) à la Ceftriaxome, seules les souches *E coli* 9 et la souche de référence présentent des diamètres d'inhibition intermédiaire. Nous pouvons également constater une sensibilité partielle des souches isolées aux autres antibiotiques testés. Les résultats montrent que 44 % des souches sont résistantes à l'Amoxicilline et 55 % sont résistantes à l'Amoxicilline associée à l'acide clavulanique.

Staphylococcus aureus

Les résultats expérimentaux sur les neuf souches isolées, ont montré que parmi les trois huiles essentielles testées sur les souches de *Staphylococcus aureus*, seules la cannelle et l'eucalyptus montrent des zones d'inhibition allant de 20 mm à 22 mm (Sensible) pour la cannelle et de 10 mm à 13 mm (Intermédiaire) pour l'eucalyptus. L'activité de la cannelle est donc plus efficace sur les *S. aureus*, avec des diamètres plus importants par rapport à l'eucalyptus avec des différences significatives ($P < 0,05$). Cependant, aucune activité antimicrobienne n'a été observée pour l'huile essentielle de la réglisse, ni pour la souche de référence (Tableau 6).

Tableau 6. Etude de la sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* aux différentes huiles essentielles

	Cannelle		Réglisse		Eucalyptus	
	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats
<i>S. aureus</i> 1	20 mm	S	0	R	13	I
<i>S. aureus</i> 2	21 mm	S	0	R	12	I
<i>S. aureus</i> 3	20 mm	S	0	R	13	I
<i>S. aureus</i> 4	20 mm	S	0	R	13	I
<i>S. aureus</i> 5	22 mm	S	0	R	11	I
<i>S. aureus</i> 6	21 mm	S	0	R	10	I
<i>S. aureus</i> 7	22 mm	S	0	R	11	I
<i>S. aureus</i> 8	22 mm	S	0	R	10	I
<i>S. aureus</i> 9	21 mm	S	0	R	11	I

ATCC 25923	50 mm	S	0	R	10	I
------------	-------	---	---	---	----	---

Diamètre d'inhibition : < 6 mm : **Résistant (R)** ; entre 6 à 13 mm : **Intermédiaire (I)** ; > 13 mm : **Sensible (S)**

La souche de référence ATCC 25923 et les souches d'aliments de *Staphylococcus aureus* montrent une sensibilité pour l'huile essentielle de la cannelle, avec une variation de diamètre de 20 mm à 22 mm pour les souches isolées et de 50 mm pour la souche de référence. La zone d'inhibition pour l'huile essentielle d'eucalyptus est au niveau intermédiaire, avec des variations entre 10 mm et 13 mm, même au niveau de la souche de référence ATCC 25923.

Tableau 7. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus*

	Rifampicine		Vancomycine		Amikacine		Teicoplanine	
	Diamètre d'inhibition	Résultats						
<i>S. aureus</i> 1	23	R	15	R	31	S	16	I
<i>S. aureus</i> 2	23	R	14	R	30	S	16	I
<i>S. aureus</i> 3	24	R	15	R	30	S	15	I
<i>S. aureus</i> 4	23	R	14	R	31	S	16	I
<i>S. aureus</i> 5	24	R	16	R	31	S	16	I
<i>S. aureus</i> 6	24	R	15	R	30	S	15	I
<i>S. aureus</i> 7	24	R	16	R	30	S	15	I
<i>S. aureus</i> 8	23	R	16	R	31	S	16	I
<i>S. aureus</i> 9	24	R	15	R	24	I	15	I
ATCC 25923	24	R	16	R	29	S	17	I

Diamètres d'inhibition : cible (limites acceptables) : **Rifampicine 37 (34-39); Vancomycine 19 (17-21); Amikacine 21 (18-24); Teicoplanine 18 (15-21).**

Pour les antibiotiques, le Tableau 7 a montré que toutes les souches sont sensibles à l'Amikacine, la souche *S. aureus* 9 présente un diamètre de sensibilité intermédiaire. Par contre, nous avons pu observer une résistance des souches isolées ainsi que la souche de référence à la Vancomycine et à la Rifampicine. Nous avons constaté des diamètres d'inhibition intermédiaire des souches isolées et de la souche de référence à la Teicoplanine.

Salmonella Spp.

Les résultats expérimentaux ont montré que parmi les trois huiles essentielles testées sur les souches de *Salmonella spp.*, la cannelle et l'eucalyptus montrent des zones d'inhibition allant de 22 mm à 26 mm pour la cannelle et de 15 mm à 19 mm pour l'eucalyptus. Il n'y a pas de différence significative de l'activité de la cannelle par rapport à l'eucalyptus sur les *Salmonella spp.* (Tableau 8).

Tableau 8. Etude de la sensibilité des souches de *Salmonella spp.* aux différentes huiles essentielles.

	Cannelle		Réglisse		Eucalyptus	
	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats
<i>Salmonella</i> 1	22 mm	S	0	R	19	S
<i>Salmonella</i> 2	22 mm	S	0	R	19	S
<i>Salmonella</i> 3	23 mm	S	0	R	16	S
<i>Salmonella</i> 4	22 mm	S	0	R	16	S
<i>Salmonella</i> 5	22 mm	S	0	R	15	S
<i>Salmonella</i> 6	21 mm	S	0	R	16	S
<i>Salmonella</i> 7	22 mm	S	0	R	15	S
<i>Salmonella</i> 8	22 mm	S	0	R	16	S
<i>Salmonella</i> 9	21 mm	S	0	R	15	S
ATCC 14028	26 mm	S	0	R	20	S

Diamètre d'inhibition : < 6 mm : **Résistant (R)** ; entre 6 à 13 mm : **Intermédiaire (I)** ; > 13 mm : **Sensible (S)**

Les résultats des souches de la *Salmonella spp.* montrent une sensibilité à l'huile essentielle de la cannelle, pour les souches isolées et la souche de référence ATCC 14028, avec des zones d'inhibition qui varient entre 21 et 23 pour les souches isolées et 26 mm pour la souche de référence. L'huile essentielle de l'eucalyptus a également montré activité antimicrobienne. Nous avons constaté des zones d'inhibition allant de 15 mm à 19 mm pour les souches isolées et une zone d'inhibition de 20 mm pour la souche de référence ATCC 14028. Cependant l'huile essentielle de la Réglisse ne présente aucune activité antimicrobienne.

Tableau 9. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Salmonella spp.*

	Amoxicilline		Amoxicilline + Acide clavulanique		Cefixime		Ceftriaxome	
	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats	Diamètre d'inhibition	Résultats
<i>Salmonella</i> 1	12	R	21	I	22	R	23	R
<i>Salmonella</i> 2	11	R	21	I	22	R	24	R
<i>Salmonella</i> 3	11	R	22	I	22	R	23	R
<i>Salmonella</i> 4	12	R	22	I	21	R	23	R
<i>Salmonella</i> 5	12	R	21	I	22	R	23	R
<i>Salmonella</i> 6	11	R	20	I	21	R	24	R
<i>Salmonella</i> 7	12	R	20	I	21	R	24	R
<i>Salmonella</i> 8	12	R	21	I	21	R	24	R
<i>Salmonella</i> 9	16	R	19	I	22	R	23	R
ATTC 14028	21	I	21	I	23	I	29	I

Diamètres d'inhibition : cible (limites acceptables) : **Amoxicilline 22 (19-25); Amoxicilline + Acide clavulanique 21 (18-24); Cefixime 25 (23-27); Ceftriaxome 32 (29-35).**

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches isolées présentent une résistance à l'amoxicilline, au Cefixime et au ceftriaxome. Cependant nous avons constaté des diamètres d'inhibition de sensibilité intermédiaire pour la souche de référence et pour le mélange Amoxicilline + Ac clavulanique.

Sensibilité Aux Mélanges D'extraits

Pour le mélange d'extrait de plantes, les diamètres varient de 8 mm à 35 mm. Les souches de *Staphylococcus aureus* (10 mm à 35 mm de diamètre) sont plus sensibles que les souches de *Salmonella* (8 mm à 25 mm) et d'*E. coli* (10 mm à 25 mm) de façon significative ($P < 0,05$).

Tableau 10. Etude de la sensibilité des souches isolées d'*Escherichia coli* aux mélanges d'huiles essentielles

	<i>E. coli 1</i>		<i>E. coli 2</i>		<i>E. coli 3</i>		<i>E. coli 4</i>		<i>E. coli 5</i>	
	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C
Cannelle Eucalyptus	23 mm	S	25 mm	S	21 mm	S	21 mm	S	25 mm	S
Cannelle Romarin	23 mm	S	23 mm	S	23 mm	S	22 mm	S	21 mm	S
Cannelle Réglisse	20 mm	S								
Cannelle Romarin Réglisse	22 mm	S	24 mm	S	22 mm	S	23 mm	S	22 mm	S
Cannelle Eucalyptus Réglisse	20 mm	S	20 mm	S	20 mm	S	21 mm	S	20 mm	S
Eucalyptus Réglisse	10 mm	I	10	I	11	I	10 mm	I	11 mm	I

D : Diamètre d'inhibition ; C: Conclusion. S : sensible ($D > 13$ mm), I : intermédiaire ($6 \text{ mm} < D < 13$ mm), R : résistant ($D < 6$ mm).

Les cinq souches d'*E coli* testées montrent une sensibilité à la majorité des mélanges d'huiles essentielles. Les diamètres d'inhibition varient de sensibilité intermédiaire (10 mm) à sensible (25 mm).

Tableau 11. Etude de la sensibilité des souches isolées de *Staphylococcus aureus* aux mélanges d'huiles essentielles

	<i>S. aureus 1</i>		<i>S. aureus 2</i>		<i>S. aureus 3</i>		<i>S. aureus 4</i>		<i>S. aureus 5</i>	
	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C
Cannelle Eucalyptus	30 mm	S	29 mm	S	30 mm	S	29 mm	S	30 mm	S
Cannelle Romarin	30 mm	S	28 mm	S	28 mm	S	30 mm	S	28 mm	S
Cannelle	25 mm	S	28 mm	S						

Réglise										
Cannelle Romarin Réglise	30 mm	S	30 mm	S	30 mm	S	29 mm	S	30 mm	S
Cannelle Eucalyptus Réglise	35 mm	S	32 mm	S	33 mm	S	33 mm	S	30 mm	S
Eucalyptus Réglisse	10 mm	I	12 mm	I	12 mm	I	10 mm	I	12 mm	I

D : Diamètre d'inhibition ; C: Conclusion. S : sensible ($D > 13$ mm), I : intermédiaire ($6 \text{ mm} < D < 13$ mm), R : résistant ($D < 6$ mm).

Les résultats montrent une sensibilité des cinq souches de *Staphylococcus aureus* aux différents mélanges des huiles essentielles. La zone d'inhibition des différents mélanges varie de 10 mm (Intermédiaire) à 30 mm (sensible).

Tableau 12. Etude de la sensibilité des souches de *Salmonella spp.* aux mélanges d'huiles essentielles

	<i>Salmonella 1</i>		<i>Salmonella 2</i>		<i>Salmonella 3</i>		<i>Salmonella 4</i>		<i>Salmonella 5</i>	
	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C
Cannelle Eucalyptus	24 mm	S	23 mm	S	23 mm	S	24 mm	S	23 mm	S
Cannelle Romarin	24 mm	S	23 mm	S						
Cannelle Réglise	23 mm	S								
Cannelle Romarin Réglise	25 mm	S	23 mm	S	25 mm	S	23 mm	S	25 mm	S
Cannelle Eucalyptus Réglise	20 mm	S	20 mm	S	20 mm	S	23 mm	S	23 mm	S
Eucalyptus Réglisse	8 mm	I	10 mm	I	8 mm	I	10 mm	I	10 mm	I

D : Diamètre d'inhibition ; C: Conclusion S : sensible ($D > 13$ mm), I : intermédiaire ($6 \text{ mm} < D < 13$ mm), R : résistant ($D < 6$ mm).

Les résultats montrent une sensibilité des cinq souches de *Salmonella* aux différents mélanges des huiles essentielles. La zone d'inhibition varie de 8 mm à 10 mm (Intermédiaire) pour le mélange des huiles de l'eucalyptus et de la réglisse.

Discussion

Les résultats obtenus du test de l'aromatogramme ont montré que les souches des bactéries isolées dans les matrices alimentaires présentent une sensibilité moyenne vis-à-vis de différentes huiles essentielles, notamment

avec les huiles essentielles de la cannelle et l'extrait d'eucalyptus. Les zones d'inhibition, pour la cannelle et l'eucalyptus, sont plus élevées, sur les bactéries Gram négative (*E. coli*, et *salmonella*) que celle observée sur la bactérie Gram positive (*S. aureus*). Les souches de référence ont été sensibles aux huiles essentielles de la cannelle et de l'eucalyptus, avec différentes diamètres d'inhibition.

Nous n'avons pas observé d'activité au niveau de l'huile essentielle de la réglisse, il est probable que la qualité de cette dernière a été impactée. Il existe aussi la possibilité que les souches bactériennes présentent une résistance à cette huile. Cependant lors des mélanges d'huiles essentielles, nous avons observé un effet de synergie pour la majorité des combinaisons d'huiles.

Les résultats observés avec l'huile essentielle d'*E. globulus* sont semblables à ceux montrés par d'autres travaux sur l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle et confirment ses utilisations traditionnelles (Cermelil et al., 2008; Tyagi & Malik, 2011). Elle atteste d'une activité antibactérienne importante surtout contre les bactéries Gram négatif (*Escherichia coli* et *Salmonella spp.*). Cette activité pourrait principalement être due aux composés majoritaires (Nezhad et al., 2009).

Certaines souches bactériennes présentent une résistance aux antibiotiques comme décrit dans la littérature. Les souches de *S. aureus* présentent une résistance à la vancomycine ce qui peut conduire à des échecs thérapeutiques (Armando & Rahma, 2009), et à la rifampicine dont la résistance se fait essentiellement par mutation survenant à des fréquences élevées (Hiramatsu et al., 1997; Gupta et al., 2003). La résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* et des souches de *Salmonella* a également augmenté (Meyer et al., 2010; Gill et al., 2002), notamment envers les céphalosporines troisième génération (Mourey & Canillac, 2002).

Nous avons également pu observer des zones d'inhibition importantes au niveau des mélanges des huiles essentielles, cela est dû vraisemblable aux huiles essentielles de la cannelle et de l'eucalyptus qui ont influencé la sensibilité des souches dans ces cas (voir le Tableau 10 à 12) au point d'avoir un diamètre de 35 mm. Bien que certaines études aient conclu que les extraits de plantes seuls ont une activité antibactérienne plus importante que les principaux composants mélangés (Ultee et al., 2000; Mejlholm & Dalgaard, 2002), la combinaison de ces composantes majeures avec d'autres composants qui ont une activité plus faible peut avoir un effet de synergie (Cermelil et al., 2008) comme nous avons pu constaté dans le cas des mélanges d'huiles essentielles.

Conclusion

L'impact des extraits de plantes aromatiques et médicinales dans l'activité antimicrobienne est connu depuis l'époque ancestrale. Ces extraits constituent une source riche en molécules antimicrobiennes à la base de médecine et de savoir-faire traditionnels. Cependant, plusieurs études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles de ces extraits dans le domaine alimentaire.

Les huiles essentielles de la cannelle et de l'eucalyptus ont présenté une activité antimicrobienne importante qui permet leur utilisation dans la conservation et l'aromatisation des produits alimentaires.

En Asie, l'huile de cannelle a été utilisée pour améliorer la durée de vie de poisson emballé sous vide en inhibant la bactérie d'altération, *Photobacterium phosphoreum* (Nezhad et al., 2009). Cependant, peu de conservateurs alimentaires contenant des huiles essentielles sont développés sur le marché.

Plusieurs huiles essentielles présentent une activité antimicrobienne in vitro. Mais avant leur adoption en tant qu'agent de conservation alimentaire, il convient de vérifier les résultats expérimentaux dans l'aliment sélectionné. En général, les résultats expérimentaux obtenus en milieu modèle se confirment sur les aliments, mais avec des concentrations d'huiles essentielles un peu plus élevées. Les études faites à travers le monde montrent que les huiles essentielles peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments. Ainsi, les huiles essentielles d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes ; l'huile essentielle de menthe pour les produits frais (salades, yaourts...). Les huiles essentielles à base de carvacrol ou de citral pour les poissons ; les huiles essentielles de thym, de noix de muscade ou de gingembre pour les céréales (plus particulièrement celles riches en carvacrol pour le riz) ; et les huiles essentielles à base de carvacrol ou de cinnamaldéhyde pour les fruits (Tyagi & Malik, 2011).

Dans la lutte contre les bactéries pathogènes et la recrudescence de l'antibiorésistance des souches, il est important de travailler sur la valorisation des biodiversités végétales et microbiennes pour améliorer la qualité et la sécurité sanitaire des aliments.

L'utilisation de ces huiles essentielles présentent des nouvelles perspectives pour une thérapie aussi bien curative que préventive face à la pathogénicité des plusieurs souches bactériennes qui de surcroît présentent une résistance au traitement usuel.

References:

1. ACIA (2013). Agence canadienne d'inspection des aliments. Cause des toxi-infections alimentaires. [Online] Available: <http://www.inspection.gc.ca/aliments/information-pour-les->

[consommateurs/fiches-de-renseignements-et-infographies/empoisonnements-alimentaires/fra/1331151916451/1331152055552](#) (24 -05-2013).

2. ANSM (2014). Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé et InVS : Institut de veille sanitaire. *Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable*. Bilan des données de surveillance, 18 novembre 2014. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire (pp. 10, 2014).
3. ANSM (2013). Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. *Caractérisation des antibiotiques considérés comme « critiques »* Novembre.
4. Aoued, L. (2015). *Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc : Rapport spécifique de toxicovigilance*. Toxicologie Maroc (pp 12).
5. Armando, CC. & Rahma, HY. (2009). Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* in Mbarara district (Uganda). *Rev Colombiana Cienc Anim*; (pp 1:240-249).
6. Bachir Raho, G. & Benali, M. (2012). *Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of Eucalyptus globulus against Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (pp 739-742).
7. Bachheti, RK., Joshi A., & Singh, A. (2011). *Oil content variation and Antimicrobial activity of Eucalyptus leaves oils of three different Species of Dehradun, Uttarakhand, India*. *Int J Chem Tech Res*; 3(2): (pp 625-628).
8. Baytop, T. (1954). *De la Composition Chimique de la Racine et du suc de réglisse d'Anatolie*. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 1(4), (pp 369-371).
9. Bourlioux, P. (2000). *Toxi-infections alimentaires. Objectif nutrition*. Janvier (pp. 49:2-8).
10. Burt, S. (2004). *Essential oils: a review*. *International Journal of Food Microbiology*. (pp 223-253).
11. CA-SFM/EUCAST Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - *Recommandations 2015*.
12. Cermelli, C., Fabio, A., Fabio, G., & Quaglio, P. (2008). *Effect of Eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses*. *Curr Microbiol*; (pp 56:89-92).
13. Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R.A. (2002). *Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham*. *International Journal of Food Microbiology* 73, (pp 83–92).

14. Gupta, A., Fontana, J., Crowe, C., Bolstorff, B., Stout, A., Van Duyne, S., Hoekstra, M.P., Whichard Jean, M., & J. Barrett Timothy (2003). *Emergence of Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serotype Newport Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins in the United States*. The Journal of Infectious Diseases-Volume 188, Issue 11 (pp. 1707-1716).
15. Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., & Von Wright A. (1998). *Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, (pp 3590–3595).
16. Hiramatsu, K., Hanki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., & Tenover, FC. (1997). *Methicillin resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. J Antimicrob Chemother; 40: (pp 135–6).
17. InVS : Institut de Veille Sanitaire (2012). *Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives ; Données de la déclaration obligatoire*.
18. Kahlmeter, G. (2000). *The ECO-SENS Project: a prospective, multinational, multicenter epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens—interim report*. J Antimicrob Chemother; 46 (Suppl 1) : (pp. 15–22).
19. Leclercq, R. (2002). *Résistance des staphylocoques aux antibiotiques*. Ann Fr Anesth Réanim ; 21 : (pp 375-83).
20. Lens-Lisbonne, C., Cremieux, A., Maillard, C., & Balansard, G. (1987). *Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles : application aux essences de thym et de cannelle*. Journal de Pharmacie de Belgique 42 (5), (pp 297 – 302).
21. Maidment, C., Dyson, A., & Beard, J. (2009). *A study measuring the antibacterial activity of lysozyme-containing food*. (Nutr Food Sci.; 39(1): 29-35).
22. Mejlholm, O. & Dalgaard, P. (2002). *Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism Photobacterium phosphoreum in liquid media and fish products*. Lett Appl Microbiol. ; 34 (1): (pp.27-31)
23. Meyer, E., Schwab, F., Schroeren-Boersch, B., & Gastmeier, P. (2010). *Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant E. coli in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008*; 14(3).
24. Mourey, A. & Canillac, N. (2002). *Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers*. Food Control 13, (pp. 289–292).

25. Nezhad, FM., Zeigham, H., Mota, A., Sattari, M., & Yadegar, A. (2009). *Antibacterial activity of eucalyptus extracts on methicillin resistance Staphylococcus aureus*. Res J Biol Sci ; 4(8): 905-908.
26. Oba, M. S., Bezzari, M., Belhouari, A., Kettani, A., Saile, R., & Bennani, H. (2014). *Risques liés à la restauration rapide et collective: présence des germes pathogènes susceptibles de causer des toxi-infections alimentaires*. International Journal of Current Research, Vol. 6, Issue, 01, pp. 4420-4425, January, 2014
27. OMS: Organisation Mondiale de la Santé (2014). *Sécurité sanitaire des aliments, Aide-mémoire N° 399*. Novembre.
28. OMS: Organisation Mondiale de la Santé (2005). *La résistance aux antimicrobiens : une menace pour la sécurité sanitaire mondiale*. 14, (pp 1-6).
29. OMS: Organisation Mondiale de la Santé (2002). *Stratégie mondiale de l'OMS pour la salubrité des aliments ; une alimentation à moindre risque pour une meilleure santé*.
30. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2003). *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. Lebensmittel- Wissenschaft und -Technologie, 36, (pp 679-684).
31. Salari, MH., Amine, G., Shirazi, MH., Hafezi, R., & Mohammadypour, M. (2006). *Antibacterial effects of Eucalyptus globulus leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders*. Clin Microbiol Infect; (pp 12:194-196).
32. Santé Canada : Agence de la santé publique du Canada (2014). *Éclosion d'infection à E. coli O157:H7 associée à de la laitue servie dans des chaînes de restauration rapide dans les Maritimes et en Ontario, Canada, décembre 2012*. Relevé des maladies transmissibles au Canada (RMTTC). (Volume 40 S-1, 9 octobre 2014).
33. Song, A., Wang, Y., & Liu, Y. (2009). *Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of Eucalyptus globulus Labill from China*. Asian J Traditional Med; 4: (pp 134- 140).
34. Vilela, G. R., Almeida, G. S., D'Arce M. A. B. R., Moraes, M. H. D., Brito, J. O., Silva M. F. G. F., et al. (2009). *Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole from Eucalyptus globulus Labill., against the storage fungi Aspergillus flavus link and Aspergillus parasiticus Speare*. Journal of Stored Products Research, 45, (pp 108–111).
35. Tyagi, AK. & Malik, A. (2011). *Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms*. Food Chem; 126(1): 228-235.

36. Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., & Smid, E.J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174 (4), (pp. 233–238).
37. VG De Billerbeck. (2007). *Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques*. *Phytothérapie* 5: 249–253-Springer.