

## IDENTIFICATION ET EFFET ANTISEPTIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DES DEUX ESPECES XEROPHYTES CASSIA ACUTIFOLIA ET CASSIA OBOVATA

\*Rouibi Abdelhak, \*Fairouz Saidi, \*Redouane Benfares, \*Hamida Cherif, \*\*E. Luca, \*Houcine Boutoumi

\**Departement de Biologie, Universite Saad Dahlab – Blida - ALGERIE*

\*\**Universite de Sciences Agricoles et Medine Veterinare Cluj-Napoca, Roumanie ; Rouibi Abdelhak, [a\\_rouibi@yahoo.fr](mailto:a_rouibi@yahoo.fr)*

**Abstract :** *The identification and antiseptic effect of essential coal at two xerophytes species, Cassia acutifolia et Cassia obovata. The paper presents a description and the determination of anti bacterial power of essential huiles at two species, Cassia acutifolia et Cassia obovata.*

**Key words:** antiseptic, carvacrol, essentiel huile

### INTRODUCTION

En raison de leur valeur au plan économique ou médical, les chercheurs en chimie organique ou ceux qui s'intéressent aux substances naturelles, ont étudié les métabolites secondaires depuis des siècles. Jusqu'à une époque récente, ces métabolites ont été considérés comme produit du déchet du métabolisme chez les plantes. Durant ces trois dernières décennies, il a été montré que de nombreux métabolites secondaires jouaient un rôle écologique important (Harborne, 1988; Rosenthal et Berenbaum, 1991).

Les huiles essentielles sont aussi une source économique d'une importance capitale. Plus de 3000 huiles essentielles sont reconnues actuellement dont 300 sont commercialisées et utilisées en parfumerie et dans l'univers des cosmétique (Van de Braak and Leijten, 1999). Les propriétés antimicrobiennes des HE sont reconnues depuis longtemps (Guenther, 1948; Boyle.1955), ces propriétés sont dues aux constituants de chaque HE (Guenther, 1948 ; Mahmoud and Croteau, 2002). Antivirales (Bishop., 1995). Antifongiques (Azzouz and Bullerman 1982 ; Akgul and Kivanc, 1988 ; Jayashree and Subramanyam, 1999 ; Mari et al., 2003). Antiparasitaires (Pandey et al. 2000 Pessoa et al., 2002) et insecticides (Konstantopoulou et al., 1992 Karpouhtsis et al., 1998).

De nombreux laboratoires se sont mis à l'élaboration de ces produits aux qualités non discutées. Ainsi de nombreuses techniques différentes ont été mises au point, et sont renforcées tous les jours grâce à la découverte et l'apparition de

nouveaux procédés. Le présent travail vise la caractérisation et la détermination des effets antiseptiques des huiles essentielles de deux espèces xérophyte *Cassia obovata*, et *C. acutifolia*.

## MATERIELS ET METHODE

La récolte des deux espèces de plantes a été faite dans la région d'Ouad-Helledjen (Ahagar) Wilaya de Tamanrasset (Sud Ouest de l'Algérie). L'authentification des deux espèces a été effectuée par le personnel de la station INRF de Tamanrasset. Les feuilles de la plante ont été séchées à l'ombre dans un endroit aéré afin de garder intactes les composés actifs de la plante. L'extraction des HE a été faite par entraînement à la vapeur d'eau suivie d'une détermination de leur rendement.

Caractérisation des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrophotométrie de Masse « GC/MS » :

Afin de déterminer la composition qualitative des constituants des huiles essentielles, une analyse de ces dernières par GC/MS a été réalisée au laboratoire analytique du centre de recherche et développement (CRD) Boumerdes, selon les conditions opératoires suivants :

Les huiles essentielles sont analysées par GC/MS à impact d'électrons (HP/MSD Agilent 5890) opérant dans le mode scan ( $M/Z = 25-300$ ). Les échantillons sont injectés (10 $\mu$ l avec température d'injection 250°C) dans une colonne capillaire HP-5MS (longueur : 30m, d.i : 0.25mm, épaisseur du film 0.25  $\mu$ m) élué par l'hélium à 0.3ml/min avec un rapport Split de 10.

La température de la colonne est programmée en isotherme à 60°C pendant 8 min, ensuite la température est portée à 250°C avec un gradient de 2°C/min. L'analyse est effectuée sous d'ionisation de 70 eV (température du filament : 150°C, courant : 600 mA, potentiel PM : 600V). L'identification est faite par comparaison des spectres de masse avec la banque de données fournies par le logiciel chemstation (NIST 2002 et Wiley version 7.0).

Evaluation de l'activité antibactérienne des HE :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE des feuilles des deux espèces a été réalisée selon la méthode de diffusion sur gélose et l'estimation de diamètre des zones d'inhibition. Une solution contenant 0.2 ml d'huile essentielle a été diluée dans 2 ml de merystate d'isopropyl (solvant apolaire inerte). Nous rappelons que ces huiles essentielles ont été conservées au frais, dans des flacons en verre opaque, hermétiquement fermés.

Afin de déterminer l'effet antiseptique des huiles essentielles plusieurs souches référenciées de bactéries et une levure ont été utilisées (Tableau 1).

Tableau 1

## Les souches microbiennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Souches microbiennes	Références
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 1803
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 6558
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATCC 23308
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATCC 4452
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BCFP 4771
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BCFP 2517
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Pseudomonas sp</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-

- souches non référencées

## Mode opératoire

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes développés sur des milieux de culture bien définie et soumis au contact à des disques imbibés d'huiles essentielles, par la méthode de diffusion sur gélose.

Les milieux de culture utilisés sont la gélose nutritive pour les bactéries, et Sabouraud pour la levure.

La préparation de l'inoculum se fait à partir d'une culture jeune de 18 heures pour les bactéries, et 48 heures pour les levures. Un ensemencement des germes à tester sur le milieu de culture est suivi par un dépôt des disques imbibés d'huiles essentielles. Après 30 min Les boîtes de Pétri sont incubées à 35°C pendant 24 heures pour les bactéries, et à 25°C pendant 48 heures pour la levure. Le diamètre de la zone d'inhibition est estimé.

Selon Leclerc (1975) une souche est dite:

- Sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 15mm.

- Limite lorsque la zone d'inhibition est inférieure à 15mm.

- Résistante lorsque la zone d'inhibition est inexistante. (Pharmacopée Européenne 2002).

## RESULTS

Détermination du rendement des huiles essentielles :

La durée de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, a duré six heures afin de récupérer le maximum d'huiles essentielles. Le rendement en huiles essentielles pour *C. obovata*: est de 0.26 % et celle de *C. acutifolia* est de 0,36% nous remarquons que le rendement en huile essentielle des deux espèce est faible.

Résultat d'analyse et d'identification des huiles essentielles par GC/MS :

### Analyse et identification des huiles essentielles par CG/SM

L'analyse des huiles essentielles de *C. acutifolia* et de *C. obovata*, par CG/SM, nous a permis d'aboutir aux chromatogrammes représentés dans les figures (1) et (2). Le chromatogramme, de *C. acutifolia* présente 12 pics. Dont 6 sont majoritaires. Le chromatogramme, de *C. obovata* présente 09 pics. Dont 4 sont majoritaires.

L'ensemble des pics majoritaires a été soumis à une identification par spectrométrie de masse (Tableau 2 et 3).

Pour *C. obovata* : nous notons la présence du Carvacrol et de son isomère le thymol à des teneurs respectives de 58.02 % et 6.4 %. Un second composé majoritaire est retrouvé à une teneur de 20.98 %, le Diisooctyl phthalate. Les autres composés non identifiés sont présentés à un taux inférieur à 3%.

Pour *C. acutifolia* nous notons la présence des même composés mais à des teneurs différentes : Le carvacrol et le thymol avec des teneur respectives de 43.08 % et 4.53 % ; Le Diisooctyl phthalate avec 13.60 %.

A la lumière de ces résultats nous pouvons déduire que les huiles essentielles des deux espèces sont constituées essentiellement de dérivés phénoliques. Elles présentent une composition chimique similaire avec des teneurs différentes notamment pour le carvacrol. Ce dernier représente un taux de 58.02 % pour *C. obovata* et un taux de 43.08 % pour *C. acutifolia*. Cependant chez *C. acutifolia* nous remarquons la présence de trois composés (le Dihydrocoumarin, 5, 7,8-triméthyl à 4.98 %, le Dihydroactinidiolide à 7.25 % et le p-Vinylguaïacol avec 18.14 %). Ces derniers ne sont pas présents chez *C. obovata*. Néanmoins le p-Cresol, 2,2'-méthylènebis (6-tert-butyl) est présent seulement chez *C. obovata*.

Abundance

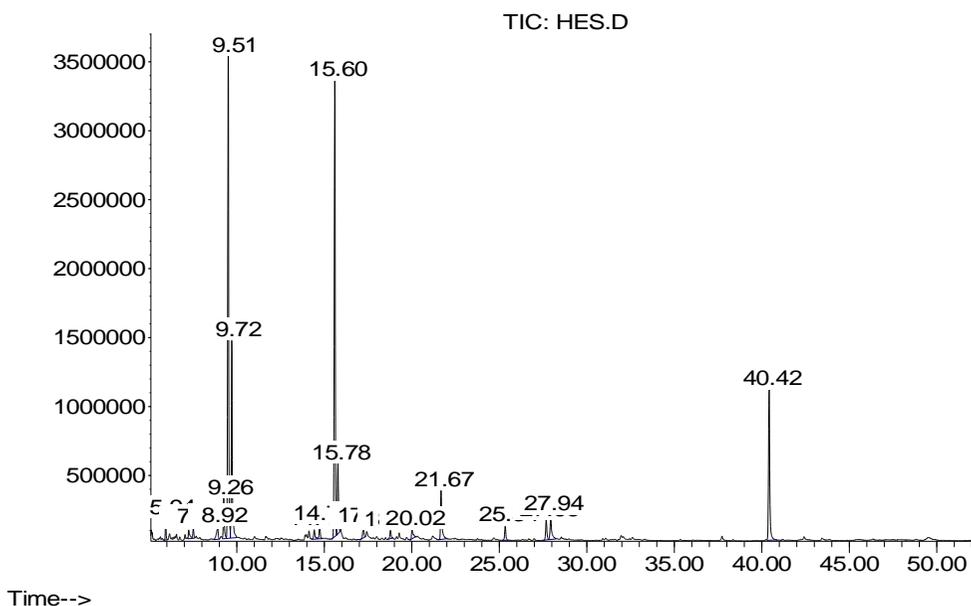


Fig. 1. Chromatogramme de *C. acutifolia*

Abundance

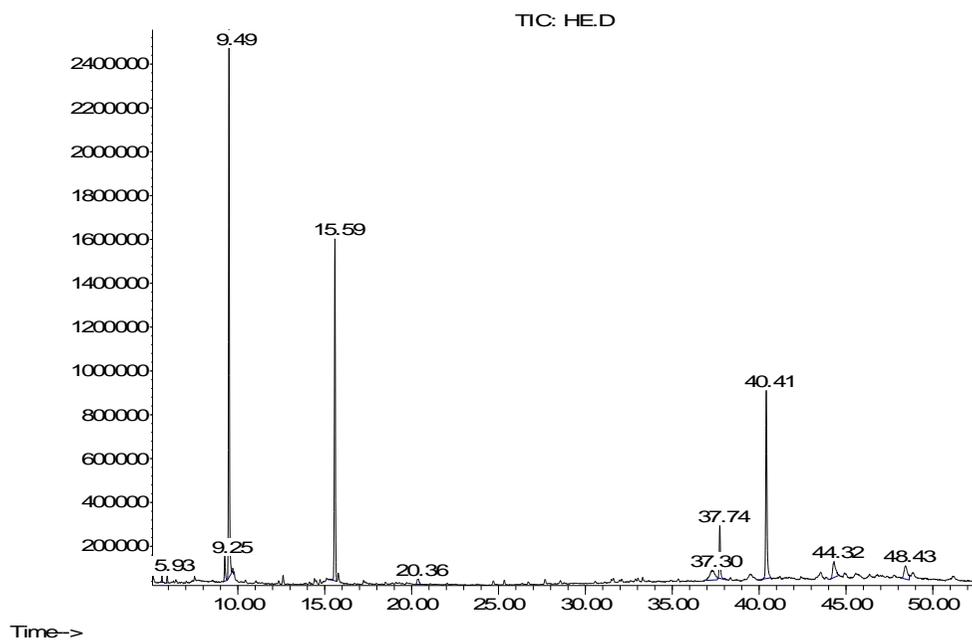
Fig 2. Chromatogramme de *Cassia obovata*

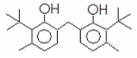
Tableau 2

Composés majoritaires de l'huile essentielle de *C. Acutifolia*

Nr.	Temps de retention (min)	Composés	Pourcentage	Formule brute	Structure
1	9.26	(R) thymol	4.53 %	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	
2	9.51	Carvacrol	43.08 %	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	
3	9.72	p-Vinylguaiacol	18.14 %	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	
4	15.78	Dihydroactinidiolide	7.25 %	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	
5	21.67	Dihydrocoumarin, 5,7,8-trimethyl	4.98 %	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	
6	40.42	Diisooctyl phthalate;	13.60 %	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	

Tableau 3

Composés majoritaires de l'huile essentielle de *C. obovata*

Nr.	Temps de rétention (min)	Composés	Pourcentage	Formule brute	Structure
1	9.25	(R) thymol	6.4 %	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	
2	9.49	Carvacrol	58.02 %	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	
3	37.74	p-Cresol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl	6.7 %	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	
4	40.41	Diisooctyl phthalate;	20.98 %	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	

Le pic correspondant au temps de rétention 15.60 mn est majoritaire dans les deux chromatogrammes. Après analyse de son spectre de masse, il n'est autre que le Butyl hydroxytoluene, composé utilisé comme stabilisateur du solvant par lequel a été faite l'extraction de l'huile essentielle (Cf. appendice E).

Nos résultats montrent que la composition chimique de l'huile essentielle des deux espèces du séné algérien est complètement différente de celle des huiles du séné du Gabon. En effet, ces dernières sont caractérisées par la prédominance en linalool (23.0%), en borneol (8.6%) et en pentadecanal (9.3%), Agnanié. H., 2005.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE des deux espèces par l'estimation du diamètre de la zone d'inhibition a montré que l'huile essentielle des deux espèces présente une activité antimicrobienne qui varie en fonction de la sensibilité des souches utilisées comme test. Une action inhibitrice sur 8 souches parmi 14 souches sélectionnées pour cette étude a été constatée. Néanmoins, cette action est effective mais à des degrés différents (Tableau 4).

Les souches *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ont présentées des zones d'inhibition de 15 à 20 mm. Elles sont donc considérées comme des souches sensibles à l'huile essentielle des deux espèces de séné.

Nous remarquons que les souches d'*Agrobacterium* sont considérées comme des souches limites avec des zones d'inhibition inférieures à 15 mm. Au contraire, les souches *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Serratia marcescens* et *Klebsiella pneumoniae* sont des souches résistantes vis-à-vis des huiles essentielles. Cependant les HE des deux espèces ne présentent aucune action sur les germes d'*E. coli*.

L'activité antimicrobienne des HE est encore prévue être due à leurs constituants majoritaires. En effet les huiles essentielles étudiées sont riches en

carvacrol qui est rapporté être très actif vis-à-vis certains microorganismes et lui revient le pouvoir antibactérien.

La carvacrol est un composé phénolique qui contient le long de sa chaîne moléculaire des groupements hydroxyles ces composés agissent sur la perméabilité membranaire (Lambert et al, 2001).

**Tableau 4**  
**Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. acutifolia* et *C. obovata***

Les souches	Huile essentielle de <i>C. acutifolia</i>	Huile essentielle de <i>C. obovata</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ø = 15	Ø = 16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	–
<i>Escherichia coli</i>	–	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ø = 15	Ø = 16
<i>Bacillus subtilis</i>	Ø = 20	Ø = 18
<i>Candida albicans</i>	–	–
<i>Agrobacterium</i> ATCC 23308	Ø = 13	Ø = 12
<i>Agrobacterium</i> ATCC 4452	Ø = 12	Ø = 10
<i>Agrobacterium</i> BCFP 4771	Ø = 13	Ø = 11
<i>Agrobacterium</i> BCFP 2517	Ø = 11	Ø = 13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ø = 16	Ø = 15
<i>Pseudomonas sp</i>	–	–
<i>Serratia marcescens</i>	–	–
<i>Proteus mirabilis</i>	–	–

Ø : diamètre de la zone d'inhibition en mm.

– : absence de la zone d'inhibition.

Le carvacrol désintègre les membranes des bactéries Gram- négatives en détruisant les lipopolysaccharides (LPS) ce qui augmente la perméabilité membranaire (Helander et al., 1998). Les études sur *B. cereus* ont montrées que le carvacrol interagit avec les constituants de la membrane cellulaire. Le carvacrol se dissout dans la couche phospholipidique entre les chaînes d'acides gras ce qui entraîne la distorsion de la membrane et par la suite une augmentation de la fluidité et la perméabilité passive de cette dernière (Ultee et al 2000).

Les composés phénoliques des huiles sensibilisent les phospholipides membranaires, ce qui conduit à une augmentation de la perméabilité qui entraîne une fuite des constituants intracellulaires entre autres les systèmes enzymatiques bactériens. Singh, N. Singh, R. K., Brunia, A. K., & Stroshine, R. L. (2002).

Plusieurs études réalisées en vue d'élucider le mécanisme d'action antimicrobienne des phénols ont montrées que ces derniers détruisent les constituants de la membrane cytoplasmique (Davidson, 1997).

Selon Nychas 1995, les phénols affectent les bactéries en détruisant la barrière de perméabilité de la membrane cellulaire, ayant pour résultat la perte des constituants cellulaires. Les phénols peuvent induire des modifications dans la teneur et la composition en acides gras et en phospholipides interférant ainsi le métabolisme énergétique, la perturbation du transport des électrons ou la prise des

éléments nutritifs, l'activité ATPasique et la synthèse des acides nucléiques. Denyer et Hugo, 1991, Nychas, 1995, Transter et al ; 1993).

## References

1. Agnani H., 2005. «Essential oil constituents of *cassia alata* (L.) From Gabon». Journal of Essential Oil Research, vol. 17, 2005, 410-412.
2. Akgul A., Kivanc, M., 1988. Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. International Journal of Food Microbiology 6, 263-268.
3. Azzouz M.A., Bullerman, L.B., 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. Journal of Food Protection 45 (14).
4. Bishop C.D., 1995. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. Journal of Essential Oil Research 7 641-644.
5. Boyle W., 1955, Spices and essential oils as preserv. American Perfumer and Essential Oil Rev. 66.
6. Davidson P. M. (1997). Chemical preservative and natural antimicrobial compounds. In M.P. Doyle, L. R, et Beuchat, T J Mont-ville, Food microbiology fundamentals and frontiers . ASM Press.
7. Denyer S.P & Hugo, W. B. (1991). Biocide induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In S. P Denyer & w. b. Hugo. Mechanisms of action of chemical biocides; their study and exploitation (pp. 171-188). The society No 27. Oxford: Oxford Blackwell Scientific Publication.
8. Guenther E., 1948. The Essential oils. D.Van Nostrand, New York.
9. Jayashree T., Subramanyam, C., 1999. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. Letters in Applied Microbiology 28,179-183.
10. Harborne J. Introduction to Ecological Biochemistry. 3rd ed. New York: Academic Press.
11. 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.
12. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 3590-3595.
13. Karpouhtsis L., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P., 1998. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 1111-1115.
14. Konstantopoulou I., V assilopoulou, L., M AVRAGANI-Tsipidou , P., Scouras, Z.G., 1992. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. Experientia 48 (6), 616-619.
15. Lambert R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G., -J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91, 453-462.
16. Leclerc H. Microbiologie générale, Ed Masson. Paris. 1975 : 195p.
17. Mari M., Bertolini, P., Pratella, G.C., 2003. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases .Journal of Applied Microbiology 94, 761-766.
18. Nychas G.J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In G. W. Gould, New methods of food preservation (pp. 58-89). London : Blackie Academic Professional.

19. 18- oil compounds as potent source of nematicidal compounds. *Journal of Phytopathology* 148 (7-8), 501-502.
20. Pessoa L.M., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Luciano, J.H.S., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. And eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 109 (1-2), 59-63.
21. Pharmacopie européenne ; 2000.
22. Singh N. Singh, R. K., Brunia, A. K., & Stroshine, R. L. (2002). Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *E. coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensmittel- Wissenschaft & Technology*, 35, 720-729.
23. Roenthal G. A., M.R. Berenbaum. 1991. *Herbivores: Their interactions with Secondary Metabolites*. Vol. 1. The Chemical Participants. 2 nd ed. San Diego: Academic Press.
24. Transter H. S. , Tassou, C.C., & Nychas G. J. (1993). The effect of the olive phenolic compounds, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Bacteriology* , 74, 253-260.
25. Ultee A. 2000. Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*. A Case Study of a Novel Approach to Mild Food Preservation. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 97pp.
26. Ultee A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E. J., 2000a. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174(4), 233-238.
27. Van de Braak S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J., 1999. *Essential oils and Oleoresinics : A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. CBI, Center for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p.116.