

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTÉ DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

Centre de Recherche et de Formation
Doctorale en Science de la Vie, Santé et
Environnement



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF

MICROBIOLOGY

Centre for Research and Doctoral
Training in Life Sciences, Health
and the Environment

**Formulation d'un bain de bouche aux propriétés
antimicrobiennes capables de limiter la prolifération des
germes pathogènes et la formation des biofilms dans la
bouche**

THESE

« Présentée et soutenue en vue de l'obtention partielle du
Doctorat/Ph.D en Microbiologie »

Par : **NGONGANG TCHAMI Dimitri**
Master en Biochimie

Sous la direction de
ETOA François-Xavier
Professeur
NYEGUE Maximilienne Ascension
Maître de Conférences

Année Académique : 2019-2020



UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

Centre de Recherche et de Formation Doctorale en Sciences de la Vie, Santé et Environnement

Centre for Research and Doctoral Training in Life, Health and the Environment Sciences

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

LABORATORY OF MICROBIOLOGY

Formulation d'un bain de bouche aux propriétés antimicrobiennes capable de limiter la prolifération et la formation des biofilms de certains pathogènes de la cavité buccale

THESE

« Présentée et soutenue en vue de l'obtention partielle du Doctorat/Ph.D en Microbiologie »
Option : Microbiologie Médicale

Par

NGONGANG TCHAMI Dimitri

Matricule : 08R0670

Master en Biochimie

Devant le Jury composé de :

Président : PENLAP BENG Véronique, Professeur, Université de Yaoundé I.

Rapporteurs : ETOA François-Xavier, Professeur, Université de Yaoundé I.


NYEGUE Maximilienne Ascension, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.

Membres : KUIATE Jules Roger, Professeur, Université de Dschang.

GONSU KAMGA Hortense, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.

BOYOMO ONANA, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.

Année académique 2019-2020

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

**LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ
DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I**

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 25 Janvier 2020

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : MBAZE MEVA'A
Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
2	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
3	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
4	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
6	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
7	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
8	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
9	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
10	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
11	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
12	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
13	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
14	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
15	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
16	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
17	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
18	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
19	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
20	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
21	DJOKAM TAMO Rosine	Chargée de Cours	En poste
22	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargée de Cours	En poste
24	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste

25	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
26	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
27	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
28	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargée de Cours	Inspecteur de Service MINESUP
34	PACHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargée de Cours	En poste

37	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
----	---------------------------------	------------	----------

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (44)

1	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
4	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice-Doyen/FMSB/UYI
5	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
6	KAMGANG René	Professeur	C.S. MINRESI
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE

13	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	Vice-Doyen / DSSE
14	DZEUFIEF DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
20	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
16	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
17	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
18	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
19	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
21	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
22	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
24	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
25	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
26	BILANDA Danielle Claude	Chargée de Cours	En poste
27	DJIOGUE Séfirin	Chargée de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
32	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste

34	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
35	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
36	NGOULATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
37	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
38	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
39	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
40	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

43	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (27)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
5	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

6	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
7	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
8	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/UDs
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

16	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
17	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
18	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
19	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
20	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
22	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
23	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
24	NSOM ZAMO Annie Claude épouse PIAL	Chargée de Cours	Expert national/UNESCO
25	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste

26	DJEUANI Astride Carole	Assistante	En poste
27	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	Vice-Recteur Univ. Bamenda
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	Recteur Univ.Ngaoundere
4	GHOOGOMU Paul MINGO	Professeur	Ministre Chargé deMiss.PR
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI/Chef de Département
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	Vice-Doyen Univ.

			Bamenda
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	DOYEN FS UDs

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	Chargée Mission P.R.
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	Vice Chancellor/UB
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beaugard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NDI NSAMI Julius	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	Inspecteur de Service MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (32)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDS
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGACK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	Directeur/UN
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	Directeur/ MINESUP
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	DEPE/ Rectorat/UYI
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	Chef Service DPER
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
17	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
18	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	Doyen /FS/ UYI
20	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
21	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

22	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
23	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
24	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste

25	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
26	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
27	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
28	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Chargé de Cours	Chef Service/MINESUP
29	OUAHOU WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

32	NGNINTEDO Dominique	Assistant	En poste
----	---------------------	-----------	----------

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	Chef Div.MINESUP
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUHEP KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
10	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
11	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolawa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EBELE Serge	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
23	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (28)

1	BITJONG NDOMBOL	Professeur	En poste
2	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste

3	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
4	EMVUDU WONON Yves S.	Maître de Conférences	CD Info/ Chef division MINESUP
5	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
6	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
7	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

8	AGHOUEKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
9	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste

11	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
21	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
26	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
27	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (12)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMP Chef de Département
2	ETOA François Xavier	Professeur	Ex-Recteur Université de Douala

3	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
4	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
5	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

8	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
5	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	Sous-Directeur/ MINRESI
6	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
9	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
10	WOAFO Paul	Professeur	En poste

11	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
12	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste

13	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
14	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	Chef Division. UN
15	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
16	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
17	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
18	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
19	NANA ENGO Serge Guy	Maître de Conférences	Director/Students/Affairs. UB
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	Sous-Directeur/Minresi
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	Sous-Directeur/ MINESUP
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
----	---------------	-----------	----------

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	Doyen / FASA / UDs
2	FOUATEU Rose épse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	MEDJO EKO Robert	Professeur	Conseiller Technique/UYII
5	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DRC
9	GHO GOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/UMa
10	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	CT/ MINIMDT
11	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
12	NGOS III Simon	Maître de Conférences	DAAC/Uma
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	Directeur/Projet Barrage Memve'ele
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste

20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	Chef Div. /MINTP
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	DG/ART
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	Sec. D'Etat/MINMIDT
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	CD/Uma
34	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
35	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
37	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
38	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA/MINRESI
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
40	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	Chef.cell / MINRESI
41	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
43	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	5 (1)	12 (6)	19 (11)	1 (1)	37 (19)
BPA	12 (1)	10 (5)	20 (07)	2 (0)	44 (13)
BPV	5 (0)	10(2)	9 (04)	2(02)	26 (9)
CI	9(1)	9(2)	14 (3)	0 (0)	32 (6)
CO	7 (0)	14 (4)	10 (4)	1 (0)	32(8)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (0)	10 (3)	26 (3)
MAT	2 (0)	4 (1)	19 (1)	2 (0)	27 (2)
MIB	2 (0)	5 (2)	5 (1)	0 (0)	12 (3)
PHY	10 (0)	17(2)	11 (3)	1 (0)	39 (5)
ST	7 (1)	15 (1)	21 (5)	1 (0)	43(7)
Total	61 (4)	97 (25)	141 (39)	19 (6)	318 (75)

Soit un total de **318 (75)** dont :

- Professeurs **62 (4)**
- Maîtres de Conférences **96 (25)**
- Chargés de Cours **141 (39)**
- Assistants **18 (5)**

() = Nombre de Femmes

TABLE DES MATIERES

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I.....	i
TABLE DES MATIERES	ix
DEDICACE.....	xi
REMERCIEMENTS	xii
LISTE DES ABREVIATIONS	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES ANNEXES	xx
RESUME.....	xxi
ABSTRACT	xxii
INTRODUCTION ET OBJECTIFS	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
I.1. Anatomie et physiologie buccale en rapport avec les infections bucco-dentaires.....	4
I.1.1. Anatomie et physiologie buccale	4
I.1.2. Infections bucco-dentaires	7
I.2. Impacts socio-économiques des infections buccodentaires.....	22
I.3. Hygiène quotidienne de la bouche et produit utilisés	22
I.4. Les bains de bouche dans la prévention et le traitement les infections buccodentaires	23
I.4.1. Les composantes de bains de bouche et leurs rôles	23
I.4.2. Les huiles essentielles dans les bains de bouches.....	24
I.5. Généralités sur la médecine traditionnelle et phytothérapie	24
I.5.1. Médecine traditionnelle	24
I.5.2. Intérêt et mode d'utilisation	25
I.5.3. Phyto-aromathérapie	25
I.6. Généralités sur les huiles essentielles des plantes et leurs propriétés biologiques	27
I.6.1. Définition	27
I.6.2. Propriétés physiques des huiles essentielles	27
I.6.3. Composition chimique	28
I.6.4. Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	29
I.6.5. Méthodes d'analyse et d'identification des huiles essentielles.....	30
I.6.6. Combinaisons des huiles essentielles.....	31

I.6.7. Les principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne.....	32
I.6.8. Cibles cellulaires des huiles essentielles.....	33
I.6.9. Travaux antérieurs sur les plantes étudiées.....	35
I.7. Evaluation sensorielle d'un produit.....	37
I.8. Analyse critique de la revue de littérature.....	37
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	39
II.1. MATERIEL.....	39
II.1.1. Fiches de collecte des données.....	39
II.1.2. Matériel biologique.....	39
II.1.3. Milieux de culture.....	39
II.1.4. Matériel végétal.....	40
II.2. METHODES.....	42
II.2.1. Détermination du profil microbien des infections buccodentaires dans la population d'étude.....	43
II.2.2. Extraction et détermination des compositions chimiques des huiles essentielles.....	51
II.2.3. Caractérisation des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs combinaisons.....	54
II.2.4. Formulation et caractérisation des solutions de bain de bouche à base des combinaisons d'huiles essentielles.....	60
II.2.5. Analyses statistiques et représentations graphiques des courbes.....	62
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	63
III.1. RESSULTATS.....	63
III.1.1. Profils microbiologiques des infections buccodentaires dans la population d'étude... 63	63
III.1.2. Rendement d'extraction et compositions chimiques des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles.....	72
III.1.3. Propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs combinaisons.....	77
III.1.4. Caractérisation des solutions de bain de bouche à base des combinaisons d'huiles essentielles.....	88
III.2. DISCUSSION.....	92
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	105
Conclusion.....	105
Perspectives.....	106
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	107
ANNEXES.....	A
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DES TRAVAUX.....	U

DEDICACE

Le présent travail, fruit de longues années
d'efforts et de persévérances grâce à Dieu tout puissant est dédié

À mes précieux parents.

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette thèse n'aurait été possible sans la collaboration et le soutien indéfectible de nombreuses personnes et institutions, que j'ai l'honneur et le plaisir de remercier.

Mes encadreurs,

Professeuse Maximilienne Ascension NYEGUE, qui, comme une maman, a distillée pour moi le lait de la rigueur scientifique depuis le Master jusqu'à ce jour, veuillez trouver ici, l'expression de mes sincères remerciements,

Professeur François-Xavier ETOA, qui, comme un papa et malgré ses multiples occupations a toujours été disponible pour moi. Ce fut pour moi un immense privilège de bénéficier de votre savoir et encadrements scientifiques.

Les membres du jury,

Je remercie grandement les membres du jury de cette thèse pour leur disponibilité et leurs critiques qui permettront d'améliorer ce travail.

Egalement,

J'ai une reconnaissance particulière à l'endroit du Professeur Jean Justin ESSIA NGANG, Chef de département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I, pour tous les sacrifices entrepris pour le bon fonctionnement du Département de Microbiologie et notre formation académique en particulier.

J'exprime aussi ma profonde gratitude au Professeur Chantal MENUT de l'Equipe « Glyco et Nano vecteurs pour le Ciblage Thérapeutique » de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de l'Université de Montpellier, pour sa contribution sans aucune contrainte aux analyses chimiques de l'ensemble des huiles essentielles et combinaisons.

J'ai aussi une reconnaissance particulière au Pr Florentine Marie-Chantal NDOYE FOE du Département de Biochimie, pour son soutien matériel.

Je pense également :

Au Professeur Véronique PENLAP BENG, Chef de Laboratoire de Recherche pour la Tuberculose de l'Université de Yaoundé I, pour m'avoir donné accès à son laboratoire.

Au Professeur GONSU KAMGA Hortense, Chef du Service de Bactériologie du CHUY pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein du laboratoire dont elle a la responsabilité, ainsi que pour la confiance et l'intérêt qu'elle a manifestée, à l'endroit de ce travail.

A Madame FEUKIA Rose et MEFINZA Alain Gyrèsse, pour avoir donné l'autorisation à effectuer des prélèvements à la clinique dentaire 'LA ROSE' de Yaoundé.

A l'Herbier National du Cameroun pour l'identification des plantes utilisées dans ce travail.

Mes remerciements sont également adressés aux Professeurs NJAMEN Dieudonné, Sara RIWOM, Sylvain Leroy SADO KAMDEM, Dieudonné NWAGA et BOYOMO ONANA pour leurs nombreux conseils et leurs disponibilités lors de nos échanges.

Aux Docteurs Maurice BODA, Blaise Pascal BOUGNOM, Roger TCHIKOUA, Jean Paul ASSAM ASSAM et Jacky NDJIKI BIKOÏ à qui, j'exprime une reconnaissance immense pour leurs conseils, encouragements et leur disponibilité constante lors de nos multiples échanges.

Au Dr MONI Esther, qui a assuré l'encadrement technique de ce travail et a œuvré malgré ses multiples occupations à sa finalisation. Merci grande sœur chérie.

Aux enseignants du Département de Biochimie et Microbiologie pour leurs précieux enseignements

A tous les membres du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I pour leur aide, leur amitié, ainsi que leur patience durant la réalisation de ce travail. Particulièrement à mes collègues de laboratoire devenus mes frères Dr, VOUNDI Steve, Dr AFAGNIGNI Alian Désiré, Dr DJOVA Steve Valdi, Dr KENGNE GOUNMADJE Landry, M. TCHAMGOUE NGALANI Eric, M. BETOTE DIBOUE Patrick et M. KAMELA.

A tous mes cadets de laboratoires pour l'aide précieuse apportée sur la paillasse et la bonne humeur chaque jour au laboratoire.

A mes parents TCHAMI Jacques et TCHAPDA Florette pour leurs soutiens financiers.

A tous mes frères et sœurs : Prisca KETCHAZI épouse METUGE, Larissa TCHAMI NJIKE épouse MEKASSI, Ladouce TCHAMI TANWOUO, Sagesse TCHAMI KOUAMOU, Merveilles TCHAMI KOUEGOUA, Cressance BANEN, Ezobio ESSOMO et Lomson LOUMOU pour leurs amours et encouragements au quotidien.

A ma fiancée Sophina, pour son soutien au quotidien et sa présence constante. Je t'aime choupinette.

A mes ami(e)s et collègues de l'hôpital BETHESDA de Yaoundé, particulièrement à ceux du laboratoire d'analyse médicale pour leurs soutiens au quotidien.

A tous les membres de ma congrégation, pour le soutien moral et l'accompagnement spirituel. Soyez d'avantage béni.

Enfin, tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et n'ont pu être cité, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADA	Association Dentaire Américaine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AHL	Acylhomoserine Lactones
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCC	Bouillon Cœur Cervele
BEA	Bile Esculine Agar
BFRT	Biofilm Ring Test
BNG	Bouillon Nutritif supplémenté au Glucose
CHUY	Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPC	Chromatographie en Phase Gazeuse
CPG-FID	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un détecteur par ionisation de flamme
CPG-SM	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrophotométrie de masse
DNase	Désoxyribonucléase
<i>EMB</i>	<i>Eosine Methylene Blue</i>
EPS	Exo-polysaccharides
HEs	Huile Essentielles
IRL	Indice de rétention linéaire
m/z	Masse/charge
<i>MARS</i>	<i>Morphogenic Auto Regulatory Substance</i>
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONP	Orthonitrophénol
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside
PAE	Pellicule Acquise Exogène
pH	Potentiel d'hydrogène
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesion

RCA	Rouge Congo Agar
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
TCP	Technique de culture en plaque
TDA	Tryptophane désaminase
<i>TM</i>	<i>Tube method</i>
UFC	Unités Formant Colonies
UV	Ultraviolet
VP	Vorges Proskauer

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie de la cavité buccale.	4
Figure 2 : Organe dentaire.....	6
Figure 3 : Carie dentaire.....	8
Figure 4 : Évolution de la carie vers l'abcès dentaire.	9
Figure 5 : Granulome apical.....	9
Figure 6 : Pericoronarite.....	10
Figure 7 : Galerie d'identification miniaturisée API 20 E après ensemencement	13
Figure 8 : Galerie classique en tube.	14
Figure 9 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm.....	16
Figure 10 : Formation de biofilm en microplaque:.....	21
Figure 11 : Structures chimiques de quelques composés couramment rencontrés dans les huiles essentielles	29
Figure 12 : Photographie des feuilles de <i>Cymbopogon citratus</i>	40
Figure 13 : Photographie des boutons séchés d' <i>Eugenia caryophylla</i>	41
Figure 14 : Photographie de feuilles de <i>Mentha sp cf piperita</i>	41
Figure 15 : Photographie des racines de <i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon.....	42
Figure 16 : Diagramme synoptique de la démarche méthodologique.....	43
Figure 17 : Milieux de culture en tube	46
Figure 18 : Milieux de culture en tube	47
Figure 19 : Schéma d'identification dichotomique des principaux groupes bactériens.....	48
Figure 20 : Schéma d'identification des isolats fongiques	49
Figure 21 : A = Pourcentage des types microbiens isolés (bactéries ou levures) ; B = Répartition des isolats bactériens en fonction de leur type Gram	65
Figure 22 : Photographie de la formation de slime chez un isolat de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Rouge Congo.....	68
Figure 23 : Photographie de la microplaque montrant la formation de biofilm.....	69
Figure 24 : Formation de biofilm par la méthode TCP	69
Figure 25 : Libération du matériel cellulaire des bactéries absorbant à 260 nm à la CMI des HEs de <i>Pentadiplandra brazzeana</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Eugenia caryophylla</i> et <i>Mentha sp cf piperita</i> pendant 0, 30 et 60 min représenté par les graphes a, b, c, d, e, f et g.....	85
Figure 26 : Photographie des différentes solutions de bain de bouche.	88
Figure 27 : Graphe représentant le parfum de chaque formulation.....	90
Figure 28 : Graphe représentant la note de fraîcheur	90

Figure 29 : Graphe représentant l'acceptabilité du produit..... 91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Galerie d'identification classique des bactéries.	14
Tableau II : Galerie d'identification classique des levures	15
Tableau III : Activités et inconvénients des constituants de bains de bouche.....	24
Tableau IV : Mécanismes d'action antibactérienne de quelques HEs et quelques composés majoritaires.....	34
Tableau V : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP selon	51
Tableau VI : Récapitulatif des essais combinés à partir des huiles essentielles	52
Tableau VII : Fréquence et types d'infections buccodentaires.....	63
Tableau VIII : Microorganismes identifiés en fonction de la pathologie buccodentaire	64
Tableau IX : Fréquence des espèces identifiées dans l'ensemble des isolats obtenus.....	66
Tableau X : Isolats sélectionnés pour l'évaluation de la formation de biofilm	67
Tableau XI : Récapitulatif des résultats de la formation de biofilm par les trois techniques TM, TCP et RCA	71
Tableau XII : Rendements d'extraction des HEs des plantes.....	72
Tableau XIII : Pourcentages et classes chimiques des composés des huiles essentielles.	73
Tableau XIV : Pourcentages des composés des essais combinés avec les huiles essentielles.	75
Tableau XV : Tableau récapitulatif des composés majoritaires des HEs et des combinaisons d'HEs.....	76
Tableau XVI : Effet inhibiteur des HEs étudiées vis-à-vis des isolats à l'état planctonique.	78
Tableau XVII : Paramètres d'inhibition des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles sur les cellules	80
Tableau XVIII : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et combinaisons sur la formation de biofilms	81
Tableau XIX : Recapitulatif des CMI des huiles essentielles et combinaisons sur les cellules	83
Tableau XX : Quantification de biomolécules intracellulaire (ADN, ARN et Proteines) dans le milieu extracellulaire	87
Tableau XXI : Action des solutions de bain de bouche sur la formation des biofilms des isolats.....	89

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Notice d'information.....	A
Annexe 2 : Autorisation administrative du cabinet dentaire « la ROSE »	D
Annexe 3: Autorisation administrative du CHUY	E
Annexe 4: Clairance éthique.....	F
Annexe 5: Questionnaire d'échantillonnage.....	G
Annexe 6: Tableau d'interprétation de la galerie API 20 E et queques schémas et photos à titre indicatif.....	H
Annexe 7 : Fiche pour analyse sensorielle.....	K
Annexe 8 : Formulaire de consentement éclairé.....	O
Annexe 9 : Chromatogrammes des Alcanes, des huiles essentielles et des combinaisons.....	Q

RESUME

La santé bucco-dentaire a des effets directs sur l'être humain ainsi que sur la qualité de sa vie quotidienne. Les lésions de la cavité buccale demeurent à ce jour les pathologies infectieuses les plus répandues au monde, dans lesquels les caries dentaires et les maladies de la gencive sont des exemples édifiants. La présente étude a pour but de formuler des bains de bouches aux propriétés antimicrobiennes à base des combinaisons d'huiles essentielles afin de limiter la prolifération des germes pathogènes et la formation des biofilms bactériens dans la bouche. Les prélèvements buccodentaires ont été réalisés par écouvillonnage des cavités infectieuses des patients admis en consultation au Cabinet dentaire 'LA ROSE' (Yaoundé). La caractérisation des isolats microbiens s'est faite par observation de leurs caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques. Les huiles essentielles ont été obtenues par hydro distillation et analysées par Chromatographie en Phase Gazeuse et couplage à la Spectrométrie de Masse. Avant l'évaluation de l'activité antimicrobienne et anti biofilm des huiles essentielles et de leurs combinaisons par les méthodes d'aromatogramme et de micro dilution, l'aptitude des isolats bactériens à former les biofilms a été démontrée par les méthodes de Rouge Congo Agar et Plaque de Culture de Tissus. La mise en évidence de quelques cibles cellulaires des huiles essentielles a été évaluée par spectrophotométrie. Les bains de bouche contenant les combinaisons d'huiles essentielles comme antimicrobiens ont été formulés. Les résultats obtenus révèlent que 61 isolats au total ont été identifiés avec une prédominance des cocci Gram positifs (34 %) et de bacilles Gram négatifs (30 %). Les levures et bacilles Gram positifs représentaient respectivement 20 % et 16 % des isolats. Les espèces majoritaires obtenues étaient *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Candida sp.1*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans*. En général, les huiles essentielles ont présenté une activité antimicrobienne intéressante. Les Concentrations Minimales Inhibitrices des combinaisons étaient plus petites que celles des huiles essentielles prises individuellement. Toutes les huiles essentielles ont présenté un effet lytique sur la paroi et la membrane plasmique des bactéries testées entraînant la sortie du matériel génétique. Les bains de bouche formulés ont présenté une activité désinfectante sur les isolats testés avec une réduction logarithmique sur les biofilms formés. L'usage des huiles essentielles en combinaison comme principe actif dans les solutions de bain de bouche serait efficace dans la prévention des infections bucco-dentaires.

Mots clés : Profil microbiologique, infection bucco-dentaire, Huiles essentielles, Combinaisons, Activité antimicrobienne, Cibles cellulaires.

ABSTRACT

Oral health has direct effects on people as well as on the quality of their daily lives. Lesions of the oral cavity remain to this day the most widespread infectious pathologies in the world, in which dental caries and gum disease are edifying examples. The purpose of this study is to formulate mouthwashes with antimicrobial properties based on combinations of essential oils in order to limit the proliferation of pathogenic germs and the formation of bacterial biofilms in the mouth. Oral samples were taken by swabbing the infectious cavities of patients admitted for consultation at the dental office 'LA ROSE' (Yaoundé). The characterization of microbial isolates was done by observation of their macroscopic, microscopic and biochemical characters. The essential oils were obtained by hydro distillation and analyzed by Gas Chromatography and coupling to Mass Spectrometry. Before the evaluation of the antimicrobial and ant biofilm activity of essential oils and their combinations by aromagram and micro dilution methods, the ability of bacterial isolates to form biofilms was demonstrated by the methods of Rouge Congo Agar and Plaque of Tissue Culture. The detection of some cellular targets of essential oils was evaluated by spectrophotometry. Mouthwashes containing combinations of essential oils as antimicrobials have been formulated. The results obtained reveal that a total of 61 isolates were identified with a predominance of Gram positive cocci (34 %) and Gram negative bacilli (30 %). Gram positive bacilli and yeasts accounted for 20 % and 16 % of the isolates respectively. The majority species obtained were *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Candida* sp.1, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. In general, essential oils have shown interesting antimicrobial activity. The Minimal Inhibitory Concentrations of the combinations were smaller than those of the essential oils taken individually. All the essential oils showed a lytic effect on the cell wall and the cell membrane of the bacteria tested, causing the exit of the genetic material. The formulated mouthwashes exhibited disinfectant activity on the isolates tested with a log reduction on the biofilms formed. The use of essential oils in combination as an active ingredient in mouthwash solutions would be effective in the prevention of oral infections.

Keywords : Microbiological profile, oral infection, Essential oils, Combinations, Antimicrobial activity, Cellular targets.

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le corps humain est l'hôte d'une diversité de micro-organismes dotés d'une capacité à se regrouper à une surface en formant un consortium de germes appelé biofilm (**Diaz, 2012**). Le biofilm dentaire est défini comme une communauté microbienne complexe composé de bactéries orales organisées en biofilm supra et sous-gingival. Le biofilm le plus accessible est celui de la bouche (la plaque dentaire) comportant environ 700 espèces bactériennes (**Zijng et al., 2012**). Les interactions entre ces microbes sont à l'origine d'infections buccales, dont les plus fréquentes sont les caries dentaires et les maladies parodontales (**Kang et al., 2011**).

Considéré comme un facteur clé pour l'hygiène orale, le contrôle du biofilm buccal (plaque dentaire) peut être réalisé de différentes manières, dont surtout celles faisant appel à une élimination mécanique mais aussi celles utilisant des agents chimiques ayant la capacité de désintégrer le biofilm et de réduire la flore concernée (**Nguyen et Hiorth, 2015**). De nos jours, le bain de bouche est l'une des formulations orales disponibles sur le marché. Un bain de bouche est identifié comme une solution liquide non stérile utilisée principalement pour son action déodorante, rafraîchissante ou antiseptique, et ces rinçages visent également à diminuer les bactéries buccales, à éliminer les particules alimentaires, à diminuer temporairement la mauvaise haleine et à offrir un goût agréable (**Jayana et al., 2012**). Les bains de bouche sont très utiles pour réduire les plaques microbiennes. Il est important de s'assurer que les bains de bouche aqueux formulés procurent une sensation de confort dans la bouche pendant l'utilisation et qu'ils doivent avoir une saveur agréable pour obtenir l'acceptation du consommateur.

Le Chlorure de Cetylpyridinium, la Chlorhexidine et le Fluorures d'amines sont les antimicrobiens présent dans la majorité des bains de bouche, Cependant, ces bains de bouche présentent des effets indésirables (colorations dentaires, altération du goût) et de résistances bactériennes suite à une utilisation prolongée de ces agents chimiques (**Sarma et al., 2014**). D'autre part, d'autres agents antimicrobiens tels que les antibiotiques ont été également préconisée dans le traitement des infections buccales, cependant, au cours de ces dernières décennies, l'émergence d'une résistance antibiotique accrue au sein de la flore parodontale pathogène est apparue et ne cesse de croître en raison d'une utilisation souvent intempestive ou inadaptée de ces antimicrobiens oraux par les patients sans aucune prescription du médecin dentiste (**Rams et al., 2014**).

Pour surmonter ces effets secondaires des médicaments chimiques artificiels, il est recommandé de rechercher des substances naturelles, telles que les extraits de plantes, qui

offrent des médicaments bien tolérés et à faible coût avec des effets secondaires plus faibles (**Dabholkar et al., 2016**). Ces plantes sont utilisées sous forme de décoction, de macération, d'huiles infusées ou essentielles. Ainsi, grâce aux nouvelles techniques d'extraction, l'identification et caractérisation des molécules organiques, plus de 25 à 50 % des médicaments prescrits ont aujourd'hui pour principe actif les molécules bioactives des plantes médicinales (**Yap et al., 2014**). En Afrique et au Cameroun en particulier, l'exploration des composants actifs des plantes pour l'utilisation thérapeutique concentre de plus en plus l'attention ces dernières années. Divers extraits de plantes comme l'huile de clou de girofle, le thé vert, l'*Aloe vera*, le *Punica granatum* ont montré des effets thérapeutiques dans la cavité buccale lorsqu'ils sont utilisés dans les bains de bouche (**Dabholkar et al., 2016**). D'où l'étude de l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles contre les agents pathogènes est très demandée. Nombreuses des études montrent que la combinaison d'huiles essentielles peut conduire à l'optimisation des activités médicales (**De Rapper et al., 2013**).

Ainsi, quatre espèces végétales (*Eugenia caryophylla*, *Pentadiplandra brazzeana*, *Cymbopogon citratus* et *Mentha sp cf piperita*) de la pharmacopée camerounaise ont été sélectionnées sur la base de leurs vertus antimicrobiennes, rafraichissantes et désodorisantes à fin de les combiner et formuler un bain de bouche capable de limiter la formation des biofilms par les microorganismes pathogènes de la cavité buccale.

QUESTION DE RECHERCHE

Comment peut-on exploiter les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles des espèces végétales étudiées pour formuler un bain de bouche capable de limiter la formation des biofilms par les microorganismes pathogènes de la cavité buccale.

HYPOTHESES DU TRAVAIL

- Les microorganismes impliqués dans les maladies buccodentaires sont divers en fonction du type d'infection.
- Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles sont étroitement liées à leurs compositions chimiques, y compris les combinaisons.
- Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles empêchent la formation des biofilms de microorganismes.
- Dans un bain de bouche, les combinaisons d'huiles essentielles gardent leurs propriétés antimicrobiennes en lui conférant des propriétés sensorielles acceptées par le consommateur.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Ce travail avait pour objectif général de formuler un bain de bouche ayant des propriétés antimicrobiennes avec des mélanges d'huiles essentielles comme principes actifs pour lutter contre les infections buccodentaires.

Il s'agissait plus spécifiquement de :

- Définir le profil microbien des infections bucco-dentaires à partir des différents prélèvements pathologiques.
- Déterminer la composition chimique des huiles essentielles et de leurs combinaisons.
- Caractériser les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et déterminer leurs capacités à empêcher la formation des biofilms par certains microorganismes isolés.
- Formuler et caractériser un bain de bouche contenant les combinaisons d'huiles essentielles comme antimicrobiens.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Anatomie et physiologie buccale en rapport avec les infections bucco-dentaires

I.1.1. Anatomie et physiologie buccale

I.1.1.1. Anatomie

La cavité buccale humaine représente le premier segment du tube digestif. Elle est divisée en deux parties : le vestibule et la cavité buccale proprement dits qui sont séparés par l'arcade dentaire (Figure 1). Plus de 700 espèces bactériennes, y compris les non cultivable, vivent dans la cavité buccale humaine. Celles-ci colonisent les surfaces orales où elles forment un consortium microbien appelé biofilm oral (**Takahashi, 2005**). Cet ensemble évolue dans un état d'équilibre interrelationnel. La rupture de cet équilibre sera caractérisée par une modification de la croissance de certaines souches, la disparition de certaines espèces mais aussi l'apparition des métabolites qui seront à l'origine de processus infectieux.

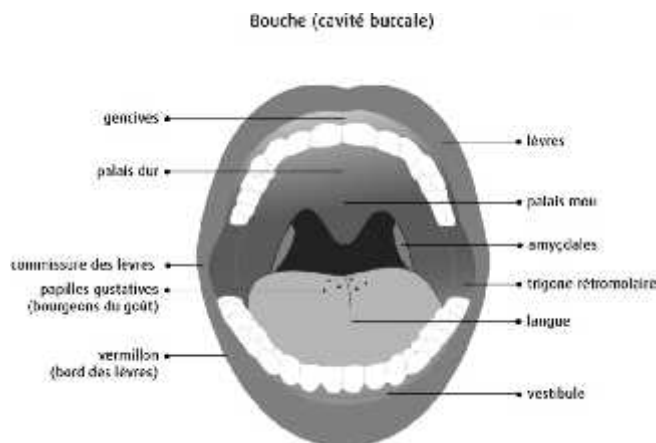


Figure 1 : Anatomie de la cavité buccale (**Ntumba, 2010**).

La cavité buccale est limitée sur les côtés par les faces internes des joues, en haut par le palais, en bas par le plancher de la langue, en arrière par le voile du palais et la luette et en avant par les lèvres. Les arcades dentaires supérieures (dite maxillaire) et inférieure portent les dents qui sont implantées dans l'os alvéolaire.

➤ Vestibule

C'est un espace incurvé en forme de fer à cheval, compris entre les arcades alvéolo-dentaires d'une part, les lèvres et les joues d'autre part. La cavité vestibulaire s'ouvre à l'extérieur par l'orifice buccal. Elle est tapissée par la muqueuse buccale qui prend sur les

arcades le nom de gencive (**Ntumba, 2010**). Le vestibule communique avec la cavité buccale proprement dite par les espaces inter-dentaires.

➤ **Arcades gingivo-dentaires**

Les maxillaires sont revêtus, au voisinage des bords alvéolaires d'une muqueuse très adhérente, épaisse, résistante, de couleur rosée, appelés gencives. Ainsi chaque dent est entourée de cette muqueuse sur tout le pourtour de l'orifice alvéolaire (**Amrane, 2017**). Le sillon gingivo-dentaire (sulcus) sépare la gencive libre de la couronne dentaire. Sa profondeur varie selon les dents et leurs faces de 0,5 à 2 mm. Son fond est occupé par une attache épithélio-conjonctivale, véritable barrière entre le parodonte profond et la flore buccale (**Ntumba, 2010**).

➤ **Organe dentaire**

Il est subdivisé en deux parties : le parodonte et l'odonte (Figure 2)

• **Parodonte**

C'est la structure anatomique et fonctionnelle qui maintient les dents en place sur les mâchoires. Il est subdivisé en deux parties :

- **Le parodonte superficiel « la gencive »**. C'est la partie spécialisée de la muqueuse buccale, qui sertit le collet anatomique des dents et recouvre une partie des procès alvéolaires. A l'examen clinique elle a une coloration rose pâle, ferme, piquetée en peau d'orange et est fermement attachée aux structures sous-jacentes (**Kuffer et al., 2009**).
- **Le parodonte profond** représenté par le desmodonte, le ciment et l'os alvéolaire (**Kuffer et al., 2009**).

- **Odonte** : L'odonte est constitué de trois éléments : l'émail, la dentine et la pulpe.

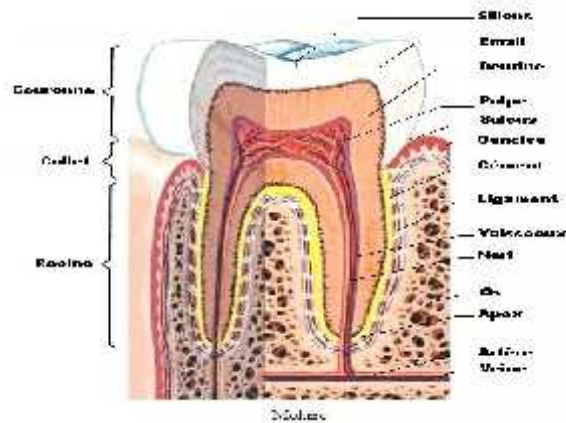


Figure 2 : Organe dentaire (Kuffer *et al.*, 2009).

➤ **Le plancher buccal**

C'est une surface en forme de fer à cheval qui est limitée en dehors par la face intérieure (face linguale) de la mandibule. Il s'étend en arrière de la jonction du pilier antérieur amygdalien et du sillon amygdaloglosse et fusionne en dedans avec la face ventrale de la langue mobile. Il présente un revêtement fin à travers laquelle les parois minces des veines sublinguales sont visibles. Le frein est un repli muqueux qui s'étend le long de la ligne médiane entre les ostia des conduits submandibulaires (Deleyiannis *et al.*, 2007).

I.1.1.2. Physiologie buccale

Dans les conditions physiologiques normales, le milieu buccal est favorable à la croissance de micro-organismes. La température, le pH 6,7 et la pression partielle en dioxyde de carbone (CO₂) sont optimaux. La pression partielle en dioxygène (O₂) varie selon les différents sites et permet aussi bien la multiplication des germes aérobies qu'anaérobies stricts (Iquaqua, 2006). La physiologie de la cavité buccale dépend également des substances produites par la salive. En effet, celle-ci est riche en nutriments nécessaire à la flore bactérienne, mais lutte également contre les produits de fermentation acides de la flore et élimine les déchets inhibiteurs. La production de la salive est assurée, dès le huitième mois *in utero*, par un ensemble de glandes dites majeures (glandes parotides, submandibulaires et sublinguales) et mineures (disséminées dans la muqueuse buccale). Le processus de sécrétion salivaire se déroule en deux phases : l'excrétion des protéines et ultrafiltration ionique au niveau des cellules acineuses (unité élémentaire de sécrétion), puis réabsorption sodique massive au niveau des cellules des canaux excréteurs intra lobulaires (Devoize *et al.*, 2010).

Sa sécrétion moyenne est de 750 mL/24 heures, mais varie selon les personnes et les circonstances : phase de repos, de stimulation alimentaire, de sommeil (**Iquaqua, 2006**).

I.1.2. Infections bucco-dentaires

Les infections buccales sont des affections causées par les microorganismes présents dans la bouche par accumulation de la plaque dentaire et favorisées par plusieurs facteurs (hyposialie, alimentation, manque d'hygiène buccale et l'immunodépression). Elles se manifestent généralement par des douleurs au niveau des dents (caries), du parodonte (parodontite). Non traitées, elles peuvent avoir des conséquences néfastes sur la santé de l'homme car considérées comme un facteur de risque dans de nombreuses affections (**Picard, 2004**).

I.1.2.1. Données épidémiologiques

Les infections buccodentaires requièrent une attention particulière à cause de leur forte prévalence. En effet selon une enquête épidémiologique publiée par l'OMS, 60 à 90 % des enfants et 15 à 20 % des adultes de la population mondiale sont respectivement atteints de caries dentaires et de maladies parodontales sévères (**Petersen, 2003**). Les études effectuées au Cameroun montrent une prévalence de carie dentaire et de parodontite encore très élevée. En effet, **Yotat et al. (2015)** ont mis en évidence une proportion de 69,4 % de caries dentaires et 48,6 % de maladies parodontales chez les adultes (65-94 ans) échantillonnés dans la région de l'Ouest. **Essama et al. (2013)** démontrent des taux de 100 % d'affections parodontales (87,80 % de gingivite et 12,20 % de parodontite) et 43,90 % de carie dentaire chez les patients diabétiques admis au service d'endocrinologie de l'Hôpital Général de Douala. **Trinita (2015)** montre une prévalence de 43 % de saignements gingivaux et 48 % de tartre chez les enfants scolarisés (6 à 12 ans) du département du Mfoundi. **Majoli (2003)** met en relief une prévalence de gingivite de 58,6 % et de carie dentaire 70,9 % chez les enfants du district de santé de Mfou des régions du centre-sud Cameroun.

I.1.2.2. Différents types d'infections en fonctions des zones anatomiques de la bouche

I.1.2.2.1. Carie dentaire

Étymologiquement, le mot carie provient du latin *caries*, qui signifie pourriture, mais la carie dentaire n'est pas une simple lésion dégradant les tissus minéralisés de la dent mais bien une maladie d'origine infectieuse (Figure 3). On classe les atteintes carieuses de la dent

selon l'aspect clinique de la cavité et selon le degré d'atteinte des différents tissus touchés (Ziane, 2016). On distingue :

- ❖ La carie initiale ne présente pas de cavitation. L'aspect clinique est une tache crayeuse ou blanchâtre.
- ❖ La carie superficielle (atteinte de l'émail et/ou le cément),
- ❖ La carie profonde (atteinte de l'émail et la dentine),
- ❖ La carie pénétrante (destruction de l'émail et la dentine),

La carie perforante (destruction des tissus dentaires).



Figure 3 : Carie dentaire (Majolie, 2003).

I.1.2.2.2. Pulpite ou rage de dent

La pulpite est une inflammation de la pulpe dentaire (système endo-canalair, système vasculo-nerveux) due à une agression microbienne issue de la progression d'une carie dentaire. Elle se distingue par l'intensité de la douleur qui est provoquée par des variations thermiques minimales (chaleur ou froid) (Ziane, 2016).

I.1.2.2.3. Abscess dentaire

L'abcès dentaire est une infection purulente localisée au niveau des tissus parodontaux qui peut conduire à la destruction du ligament parodontal et de l'os alvéolaire (Figure 4). Celui-ci nécessite un traitement dentaire compte tenu des risques de complications plus ou moins sérieux. Il se manifeste par une inflammation des gencives et des douleurs lors de la mastication et peut prendre plusieurs formes. S'il provient d'une infection des gencives ou d'un déchaussement de la dent, on parlera d'abcès parodontal, par contre si l'infection survient à la suite d'une carie ou d'une fracture dentaire, on parlera d'abcès apical. Dans un premier temps, il passe inaperçu, mais lorsqu'il atteint le nerf de la dent, une douleur vive apparaît lors de la mastication. Une sensibilité au chaud ou au froid ainsi qu'un mauvais goût

dans la bouche et une mauvaise haleine peuvent être des signes qui indiquent la présence d'un abcès (Yotat *et al.*, 2015).



Figure 4 : Évolution de la carie vers l'abcès dentaire (Hauteville, 2015).

I.1.2.2.4. Granulome apical

C'est une inflammation évoluant sur une longue durée (Figure 5), caractérisée par la présence d'un tissu de granulation majoritairement infiltré par des lymphocytes, des plasmocytes, des macrophages et des microorganismes. La douleur devient alors permanente, lancinante et s'enrichit des signes de l'infection maxillaire et prémaxillaire : la tuméfaction et la fièvre (Lasfargues *et al.*, 2009).



Figure 5 : Granulome apical (Lasfargues *et al.*, 2009).

I.1.2.2.5. Pericoronarite

Les troisièmes molaires peuvent présenter au cours de leur éruption des manifestations inflammatoires locales appelées péricoronarites (Figure 6). Ces dents présentent, au moment de leur émergence dans la cavité buccale, des pseudo-poches parodontales constituées par le sac péricoronaire. La flore microbienne qui se développe dans ces pseudo-poches est considérée comme l'agent étiologique majeur de la péricoronarite se traduisant par une inflammation, avec ou sans suppuration (Mello *et al.*, 2003).

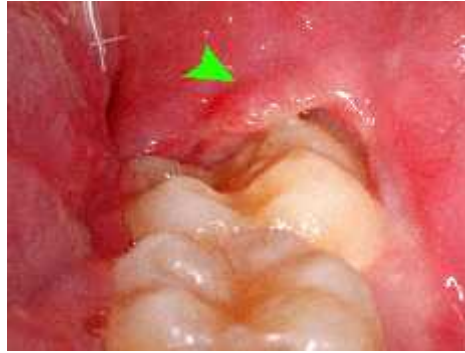


Figure 6 : Pericoronarite (Mello *et al.*, 2003).

I.1.2.3. Hygiène buccodentaires et infections

I.1.2.3.1. La prévention au quotidien

L'hygiène bucco-dentaire vise à préserver la santé bucco-dentaire des patients par la suppression d'influences nocives s'exerçant sur les structures dentaires et muqueuses.

En effet, elle a pour objectifs de :

- retirer par frottement les résidus alimentaires et la plaque dentaire à l'origine de la formation de tartre ;
- protéger l'email dentaire en neutralisant les réactions néfastes.
- polir les dents ;
- rafraîchir l'haleine

Une hygiène bucco-dentaire défailante favorise le développement du tartre et le développement bactérien à l'origine d'affections bucco-dentaires (Estrade, 2006).

I.1.2.3.2. L'importance de l'alimentation et les effets du grignotage sur la santé bucco-dentaire

Il a été démontré qu'il existe un lien direct entre l'alimentation et la survenue de problèmes dentaires. La fréquence de prise d'aliments cariogènes augmenterait d'avantage l'apparition de ces problèmes que la quantité ingérée.

Les sucres comme le glucose, le fructose, le saccharose, le maltose, le lactose ou encore l'amidon, augmentent la production d'acides présents dans un grand nombre d'aliments ingérés quotidiennement. La salive, possède une action antibactérienne de par les immunoglobulines et les enzymes qu'elle contient mais favorise aussi la recristallisation des

minéraux. Lors de prises alimentaires répétées (grignotage), elle n'a ni le temps ni le débit nécessaire pour agir. Le pH au niveau de la plaque dentaire diminue donc, favorisant une dissolution de l'email à l'origine de caries (**Bonnot et Pillon, 2013**).

I.1.2.4. Microbiologie des infections buccodentaires et méthodes d'isolement et d'identification des germes responsables

I.1.2.4.1. Microbiologie des infections buccodentaires

Les phénomènes complexes faisant intervenir l'hôte (surfaces dentaires), ses défenses, l'alimentation et la présence de microbes sont à la base des maladies infectieuses multifactorielles. Les différents groupes de microorganismes les plus rencontrés en pathologie buccodentaire sont : (**Sixou et al., 2007 ; Lasfargues et al., 2009 ; Barrere, 2016**).

- ❖ **Les streptocoques** : groupe de bactéries de type cocci à Gram positif anaérobies facultatifs, impliqués dans la physiopathologie de la carie dentaire. Les espèces les plus rencontrées dans sont : *Streptococcus mutans* (sérotypes c, e, f) et *Streptococcus sobrinus* (sérotypes d et g), *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus anginosus*.
- ❖ **Les staphylocoques et microcoques** : cocci Gram positifs, anaérobies facultatifs. Ce sont des germes commensaux de la cavité buccale. Ceux-ci deviennent pathogènes lorsque les conditions du milieu sont favorables à leurs multiplications. Ils sont rencontrés dans la pathologie dentaire.
- ❖ **Les lactobacilles** : bacilles à Gram positif, anaérobies facultatives qui convertissent le lactose et les autres sucres simples en acide lactique. Les espèces les plus fréquemment isolées dans la cavité buccale sont *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus salivarius*.
- ❖ **Candida albicans** : champignon microscopique, habituellement inoffensif et retrouvé au niveau des voies génitales, du tube digestif, de la bouche et sur la peau. Il est capable d'adhérer aux surfaces dentaires et de produire l'acide qui détériore la dent.
- ❖ **Les Entérobactéries** : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* sont retrouvées dans la flore pathogène de la cavité buccale au niveau des caries du cément, de l'endocanal, des abcès péri-apicaux, des cellulites et pericoronarites et surtout au niveau des glandes salivaires.

- ❖ *Porphyromonas gingivalis* : est un coccobacille à Gram négatif anaérobie stricte, présent dans les sites actifs et c'est la bactérie la plus fréquemment rencontrée dans les poches parodontales de plus de 5 mm.
- ❖ *Treponema denticola* : c'est un spirochète de la famille de bactéries hélicoïdales, responsable de 92,8 % des patients atteints de parodontites. Plus la poche est profonde, l'atteinte grave, plus cette bactérie sera présente.
- ❖ *Prevotella intermedia* : c'est un bacille à Gram négatif pouvant être retrouvé dans les gingivites ulcéro-nécrotiques et dans des parodontites chroniques progressives.
- ❖ *Fusobacterium nucleatum* : il s'agit d'une fusobactérie à Gram négatif anaérobie et c'est l'espèce la plus fréquemment isolée dans les cultures de plaques sous-gingivales.
- ❖ *Campylobacter rectus* : c'est un vibriac à Gram négatif anaérobie, retrouvé majoritairement dans les sites actifs et dans les sites ne répondant pas au traitement.
- ❖ *Eubacterium* : c'est un bacille pléomorphe Gram positif anaérobie stricte, retrouvé dans les sites atteints des parodontites sévères principalement.

I.1.2.4.2. Méthodes d'identification des germes impliqués

I.1.2.4.2.1. Observation macroscopique des isolats

L'étude macroscopique consiste à une observation à l'œil nu des colonies bactériennes présentes dans les boîtes de pétri afin de décrire ses caractéristiques (odeur, forme, taille, relief, consistance, surfaces, présence de pigmentations, présence ou absence d'hémolyse).

I.1.2.4.2.2. Observation microscopique des isolats

Cet examen consiste à visualiser la morphologie des microorganismes au moyen d'un microscope optique. Il comprend, l'état frais et l'état coloré.

➤ Etat frais

L'étalement entre lame et lamelle du prélèvement permet de visualiser la présence éventuelle de bactéries, leur forme, leur mode de regroupement et leur mobilité.

➤ Coloration de Gram

L'examen microscopique des frottis après coloration de Gram oriente sur le groupe bactérien (Gram positif ou Gram négatif). Il permet également d'observer la forme de la bactérie (cocci, bacilles, coccobacilles et spirochètes), le mode de regroupement (tétrade, amas, diplocoque ou chaînette) et la présence ou non des spores.

I.1.2.4.2.3. Identification biochimique

L'identification du genre et de l'espèce d'une souche doit se poursuivre par la recherche des caractères biochimiques du métabolisme glucidique et protidique. Pour ce faire, les méthodes d'ensemencement dans un ensemble de milieux de culture appelé galerie sont utilisées. Celles-ci peuvent se présenter soit en tubes (macro-galerie), soit en système miniaturisé. Outre ces tests biochimiques, les tests à la catalase et à l'oxydase sont réalisés en complément.

➤ Système miniaturisé (API)

La galerie miniaturisée API (Analysis Profil Index) ci-dessous (Figure 7) est un ensemble de tubes prêts à l'emploi permettant l'identification des microorganismes par réalisation rapide et facile des tests biochimiques. Elle utilise plusieurs types de test à savoir l'étude de la fermentation de divers glucides, l'auxanogramme et la recherche directe d'enzymes. La lecture des réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture (voir Annexe 1) et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

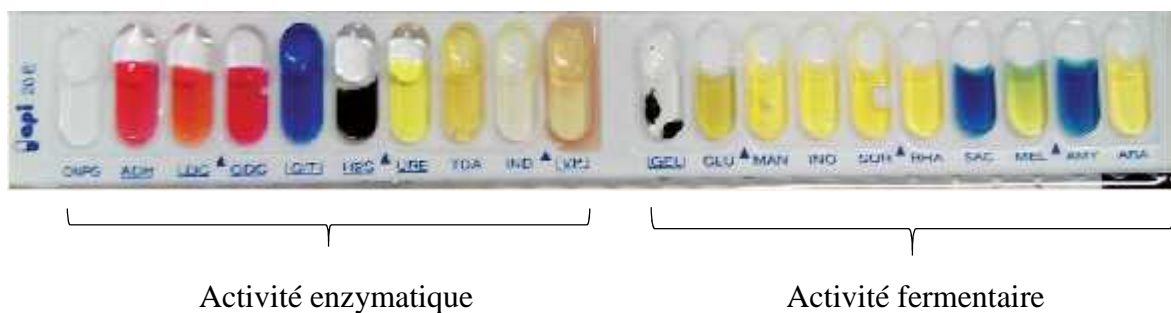


Figure 7 : Galerie d'identification miniaturisée API 20 E après ensemencement

➤ Galerie d'identification classique

Le tableau I ci-après présente l'ensemble des milieux de culture que peut comprendre une galerie d'identification classique et met en exergue les caractères qui peuvent être lus. Une fois ces différents critères déterminés à l'aide des techniques appropriées, l'identification fait appel à une base de données c'est-à-dire un catalogue contenant les caractères des différents taxons, et revient à déterminer dans cette base le(s) taxon(s) compatible(s) avec les résultats obtenus. Deux méthodes sont proposées (Joffin et Leyral, 2005) :

- **Une méthode dichotomique** : les caractères sont hiérarchisés afin de construire des schémas d'identification que l'on suit pas à pas en fonction des résultats obtenus.
- **Une méthode probabiliste** basée sur le principe de l'égalité des caractères : chacun est considéré comme ayant la même valeur discriminatrice.

Tableau I : Galerie d'identification classique des bactéries (Joffin et Leyral, 2005).

Milieux	Caractères lus
Milieu Hajna Kliger	Catabolisme du glucose (culot jaune), lactose (pente jaune), production du H ₂ S (précipité noir), gaz (présence de bulle)
Citrate de Simmons	Utilisation du citrate comme seule source de carbone (pente bleue)
Urée-tryptophane	Uréase (virage de l'indicateur au rouge phénol), TDA (précipité marron foncé), production d'indole (complexe coloré en rouge)
Mannitol Mobilité Nitrate	Nitrate-réductase (complexe rouge), catabolisme du mannitol (milieu jaune), mobilité (diffusion des bactéries dans la gélose)
Gélose Viande Foie	Test respiratoire
Gélose à l'esculine	Esculinase (diffusion d'un pigment noir sur la gélose)

La figure 8 ci-dessous illustre en image quelques milieux de la galerie classique.



Figure 8 : Galerie classique en tube (Droguet, 2016).

I.1.2.4.2.4. Identification des levures

I.1.2.4.2.4.a. Examen morphologique

La culture sur milieu Sabouraud permet une orientation dans l'identification, en particulier par l'aspect des colonies observées. Ainsi, parmi les levures d'intérêt médical :

- Les espèces du genre *Candida* donnent des colonies crémeuses, de type « S » ;
- Les colonies de *Cryptococcus* sont souvent muqueuses, parfois de type « S », blanchâtres, se pigmentant en ocre au bout d'une semaine d'incubation ;
- *Geotrichum* et *Trichosporum* forment des colonies crémeuses et filamenteuses ; *Rhodotorula rubrum* produit des colonies pigmentées en rose.

La culture sur un milieu RAT (Crème de riz –agar-tween) ou PCB (pomme de terre-carotte–bile) permet le développement de chlamydospores, caractéristiques des levures du genre *Candida*. La production de tubes germinatifs en sérum ou en milieu pour blastèse n'est

observée que pour *Candida albicans* et constitue un excellent critère d'identification de cette espèce. Une identification plus précise, en particulier des espèces du genre *Candida* autre qu'*albicans* implique l'ensemencement de galeries adaptées (Joffin et Leyral, 1998).

I.1.2.4.2.4.b. Identification biochimique

Les tests biochimiques sont réalisés soit en ensemençant dans un ensemble de milieux de culture soit en utilisant des galeries miniaturisées.

➤ Galeries miniaturisées

Différentes galeries sont proposées pour l'identification des microorganismes d'intérêt médical. Ces galeries grâce aux tests biochimiques qu'elles offrent, permettent de différencier certaines espèces de champignons (principalement des levures). On peut citer entre autre les galeries API 20C AUX (bioMérieux sa), ID32 C (bioMérieux sa), API *Candida* (bioMérieux sa) utilisées pour l'identification des espèces de *Candida*.

➤ Galerie d'identification classique

Le tableau II ci-après présente l'ensemble des milieux de culture que peut comprendre une galerie d'identification classique de levures et met en exergue les caractères qui peuvent être lus.

Tableau II : Galerie d'identification classique des levures (Joffin et Leyral, 1998).

Milieux	Caractères lus
Gélose de réisolement (gélose Sabouraud)	Aspect des colonies, pureté, catalase, examens microscopiques (état frais, Gram, coloration des spores)
Milieu Urée-Tryptophane	Uréase (si l'on soupçonne <i>Cryptococcus</i>)
Gélose Viande Foie	Test respiratoire
Milieu Cystine Trypticase Agar	Catabolisme du glucose, de la xylose, du mannitol et de l'arabinose

I.1.2.5. Formation des biofilms dans les infections buccodentaires

I.1.2.5.1. Définition

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides adhésive et protectrice (appelée slime) qu'ils secrètent (Jain *et al.*, 2011). C'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (Espinasse *et al.*, 2010).

Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes (**Behlau et Gilmore, 2008**).

Dans la cavité buccale en particulier, les biofilms buccaux sont constitués de plusieurs espèces de bactéries, empêtrées dans une matrice extracellulaire riche en polysaccharide (**Keijser et al., 2008**). Ces biofilms microbiens spécialisés ont évolué pour supporter l'environnement défavorable de la surface dentaire et de l'épithélium gingival. Pour cette raison, leur développement est le résultat de nombreuses interactions physico-chimiques complexes entre des substrats du tissu oral, des micro-organismes et des macromolécules adsorbées (**Frias-Lopez et Duran-Pinedo, 2012**).

I.1.2.5.2. Etapes de formation des biofilms

La formation de la plaque dentaire peut se décrire schématiquement selon une séquence d'évènements : l'adhésion des bactéries pionnières, la prolifération des bactéries buccales, la formation des microcolonies et le détachement (Figure 9) (**Hojo et al., 2009**). Cependant, le biofilm dentaire est en constant remaniement. Il s'agit d'un processus dynamique dans lequel l'adhésion, la croissance, l'élimination et le rattachement sont continus (**Bouchard, 2015**).

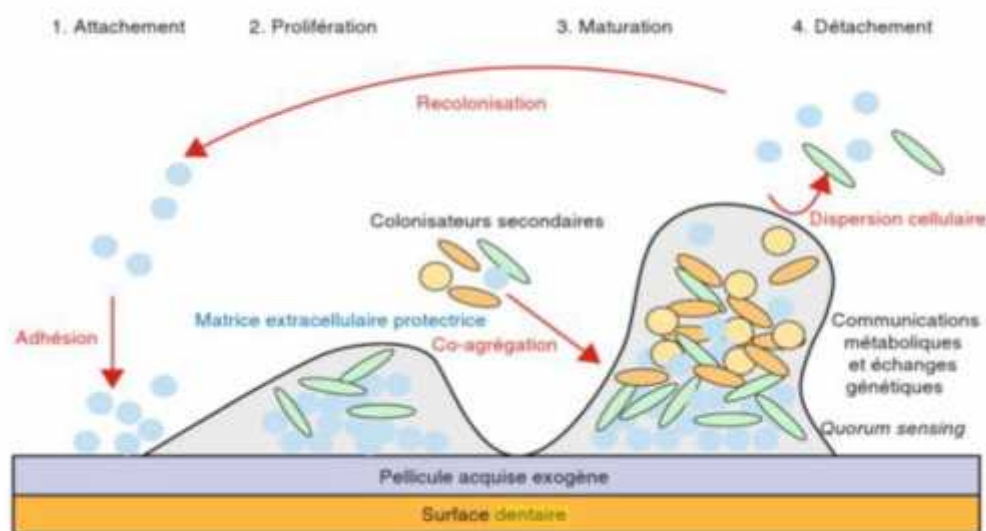


Figure 9 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm (**Socransky et Haffajee, 2002**).

I.1.2.5.2.1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)

L'élaboration de la plaque dentaire dépend préalablement de la capacité des bactéries à adhérer aux surfaces dentaires. Cette colonisation se fait par l'intermédiaire d'un film organique d'origine salivaire recouvrant les surfaces dentaires : la pellicule acquise exogène (PAE). Celle-ci se forme spontanément dès l'éruption des dents et en quelques minutes après leur nettoyage prophylactique. La PAE est principalement composée de glycoprotéines et de protéines salivaires qui se lient à l'hydroxyapatite de la surface minérale. Si son rôle est de protéger les dents des agressions mécaniques et acides, elle favorise néanmoins l'installation de la plaque dentaire (**Bouchard, 2015**).

I.1.2.5.2.2. L'adhérence réversible

Une adhésion réversible peut s'établir entre la PAE et les bactéries grâce à des interactions physicochimiques non spécifiques (forces de Van der Waals et forces de répulsion électrostatiques). Les micro-organismes sont alors facilement détachables par rinçage (**Bouchard, 2015**).

I.1.2.5.2.3. L'adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries (**Høiby, 2011**) et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les streptococcus buccaux se lient aux protéines de la PAE telles que la stathérine, les mucines, les agglutinines, l' - amylase et les protéines riches en proline, aux moyens de différentes adhésines de la famille des antigènes I/II de la famille Lral et des protéines fixant l'amylase. De leur côté, les actinomycètes possèdent deux types majeurs d'adhésines portées par des fimbriae : le type 1 se lie aux protéines riches en proline et la stathérine de la PAE ; le type 2 est impliqué dans l'adhérence inter bactérienne permettant le recrutement de colonisateurs secondaires (**Bouchard, 2015**).

I.1.2.5.2.4. Le développement précoce du biofilm

Une fois fixées sur la PAE, les bactéries pionnières contribuent rapidement à la croissance de la plaque dentaire par division cellulaire. C'est la phase de prolifération bactérienne. De nombreux streptocoques sécrètent une matrice extracellulaire (glycocalyx) composée de polysaccharides, laquelle participe à l'ancrage de la structure en assurant un rôle protecteur et nutritif. La division des cellules adhérentes produit des cellules filles qui vont

soit être incluses dans la matrice, soit être libérées dans le milieu environnant (**Bouchard, 2015**).

I.1.2.5.2.5. La maturation du biofilm

Les bactéries pionnières vont ensuite permettre l'agrégation de nouvelles bactéries qui n'étaient pas capables de se fixer directement à la PAE. Ces conglomerats bactériens s'organisent en micro colonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm dentaire.

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (**Clutterbuck et al., 2007**), permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Tenke et al., 2004**). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoquent la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permettent ainsi la libération de nutriments (**Jacobsen et al., 2008**).

Concernant *Candida albicans*, lorsque la confluence des levures est atteinte, une transition des blastospores vers les formes filamenteuses (hyphes et pseudohyphes) qui forment un réseau complexe emprisonné dans la matrice d'exopolysaccharides (**Kumamoto et Vines, 2005**).

I.1.2.5.2.6. Le détachement de bactéries

Lorsque la plaque dentaire est épaisse, elle peut subir un phénomène de détachement bactérien. Sous l'effet de forces de cisaillement, comme celles exercées lors de la mastication ou de la phonation, des microcolonies peuvent se dissocier du biofilm. Par ailleurs, dans des conditions environnementales défavorables, certaines bactéries sont capables de se détacher elles-mêmes de la plaque dentaire. *Streptococcus mutans* peut synthétiser des enzymes qui hydrolysent ses liaisons avec les protéines de surface. Retournant à l'état planctonique dans la salive, les bactéries peuvent coloniser alors des milieux plus propices (**Bouchard, 2015**). Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé *quorum sensing* (**Behlau et Gilmore, 2008**). Ce système est fondé sur la production de molécules diffusibles par les bactéries, par exemples les acyl-homoserine lactones chez les bactéries à Gram négatif, qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné (**Filloux et Vallet, 2003**).

I.1.2.5.3. Facteurs favorisant la formation des biofilms

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels : la surface, le milieu et les microorganismes (**Branger et al., 2007**).

➤ **Les caractéristiques de la surface**

La rugosité, les propriétés physicochimiques et la formation préalable d'un film protéique sur une surface influencent l'attachement des bactéries à cette surface et par conséquent la formation d'un biofilm. De manière naturelle, plusieurs phénomènes favorisent l'accumulation du biofilm dentaire, il s'agit : du tartre- supra et sous gingival, de la jonction émail cément, les projections d'émail, de l'entrée de furcations, les fissures et les fossettes dentaires, les caries radiculaires ou de collets, les encombrements et les malpositions des dents (**Herbert et al., 2004**).

➤ **Les caractéristiques du milieu**

Comprenant les conditions environnementales telles que : la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température) (**Marchal, 2010**).

➤ **Les caractéristiques des microorganismes**

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influence l'attachement des bactéries sur une surface ; moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (**Liesse Iyamba, 2012**). Cette association stable avec la surface s'établit grâce à des structures adhésives telles que des adhésines filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule) (**Perrin, 2009**).

I.1.2.5.4. Evolution du biofilm vers le tartre

Le tartre est défini comme la minéralisation du biofilm produisant des cristaux de différents phosphates de calcium. Le tartre dentaire est principalement composé de minéral, de composants organiques et inorganiques. Les phospholipides représentent 10 % des lipides totaux avec des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylinositols. Ces derniers jouent un rôle important dans la minéralisation de la plaque dentaire. Ils proviennent à la fois de la salive et des constituants membranaires des bactéries (**Gracieux et al., 2006**).

I.1.2.5.5. Méthodes d'identification de la capacité des bactéries à former des biofilms

Bien que la standardisation des méthodes d'étude des biofilms soit aujourd'hui nécessaire, plusieurs stratégies *in vitro* permettent de modéliser les biofilms. La grande majorité des études sur les biofilms est réalisées en monoculture. C'est-à-dire que l'on étudie des biofilms formés d'une seule espèce de microorganisme. La monoculture sur un support comme de l'hydroxyapatite ou sur un film salivaire permet d'identifier des facteurs d'adhésion, de caractériser l'organisation spatiale du biofilm. Les résultats de ces essais sont comparés à des cultures planctoniques. L'inconvénient est que la technique de monoculture ne reflète pas la vie des micro-organismes dans les biofilms hétérogènes. Aussi, aujourd'hui, des techniques utilisent plusieurs espèces microbiennes sont utilisées. Ces techniques dites « polycultures » ou « plurimicrobiennes » sont plus complexes à mettre en œuvre mais sont plus proche de la réalité biologique (**Bouchard et al., 2015**).

Les méthodes utilisées sont soit des méthodes statiques (culture en plaques de microtitrages et analyse après coloration au Crystal violet), soit des méthodes dynamiques comme des chambres en flux. Cette méthode présente l'avantage de disposer les bactéries de différentes espèces de façon séquentielle, comme cela se passe dans la plaque dentaire. Les biofilms formés sont continuellement approvisionnés en nutriments. Les biofilms formés sont soit observés par différentes techniques de microscopies, soit collectés pour des analyses de biologie moléculaire ou autre (**Bouchard et al., 2015**).

I.1.2.5.5.1. Méthodes des microplaques de titration

Cette technique consiste à faire adhérer la suspension cellulaire au fond et sur les parois d'une plaque « 96 puits » Figure (10). Elle est qualifiée de technique « haut débit » car elle permet une lecture rapide et automatisée des résultats, et est notamment utilisée pour réaliser des criblages, par exemple pour évaluer la sensibilité de biofilms à une palette d'antibactériens ou d'antifongiques selon le biofilm considéré (**Ramage et al., 2001**).

La coloration par le cristal violet est souvent utilisée pour la quantification du biofilm pour cette méthode de microplaque de titration, car c'est une méthode simple et non couteuse. Elle est principalement basée sur la rétention d'une quantité du cristal violet proportionnel à la biomasse adhéree. La méthode du cristal violet est une méthode semi-quantitative, puisque le cristal violet est retenu par toute entité adhéree sur le support quel que soit sa nature.

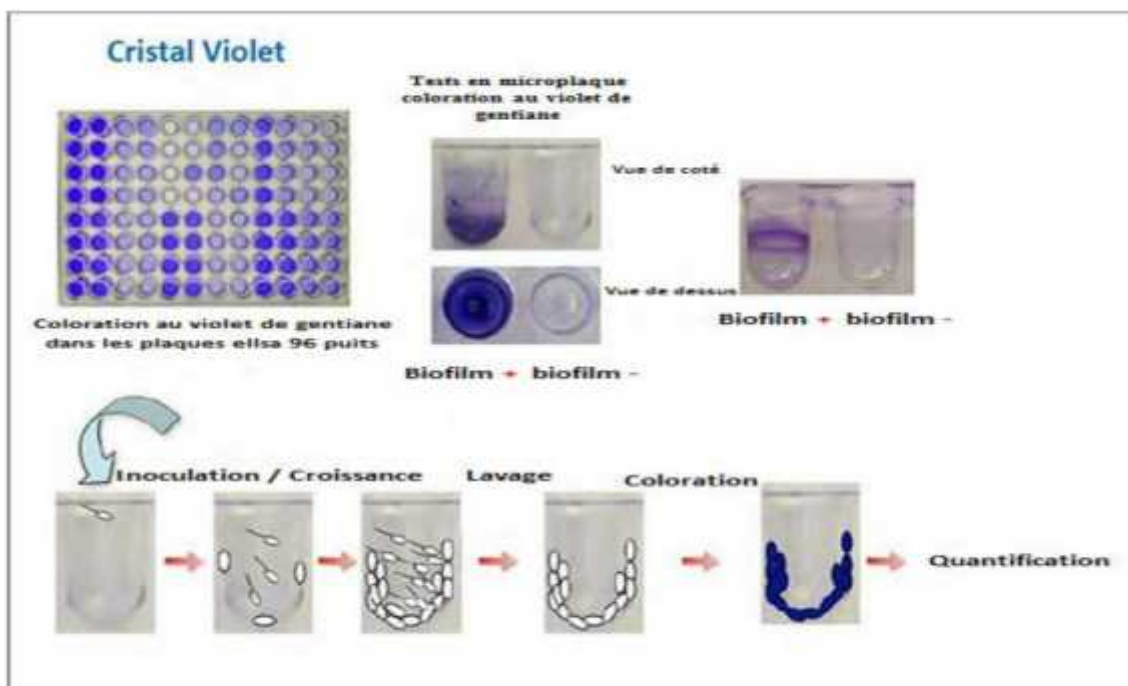


Figure 10 : Formation de biofilm en microplaque: (Bellifa, 2014).

I.1.2.5.5.2. Méthode de Rouge Congo

La gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime (matrice d'exo-polysaccharide adhésive). Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesion) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives (Ziebuhr *et al.*, 2001).

I.1.2.5.5.3. La méthode en tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par Christensen *et al.*, (1982).

A partir d'une culture de 18 à 24 heures, une colonie est ensemencée dans de BCC supplémenté de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 heures. Les tubes sont lavés avec du PBS puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré par le CV.

La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube (Mathur *et al.*, 2006).

I.2. Impacts socio-économiques des infections buccodentaires

Les affections bucco-dentaires touchent de manière disproportionnée les personnes pauvres et socialement défavorisées. Il y'a une association nette et systématique entre la condition socioéconomique (revenu, profession et niveau d'instruction) et la prévalence et la gravité des affections bucco-dentaires (**Petersen, 2010**). Cette association s'observe tout au long de l'existence, depuis la petite enfance jusqu'à la vieillesse et au sein de toutes les populations dans les pays à revenu élevé, intermédiaire et faible.

En raison de la répartition inégale des professionnels de la santé bucco-dentaire et de l'absence de services de santé adéquats dans la plupart des pays, l'accès aux services de santé bucco-dentaire primaire est souvent insuffisant. Il ressort d'une enquête que l'accès aux services de santé bucco-dentaire pour les adultes qui disent en avoir besoin s'échelonne entre 35 % dans les pays à bas revenu, 60 % dans les pays à revenu intermédiaires de la tranche inférieure, 75 % dans les pays à revenu intermédiaire de la tranche supérieure et 82 % dans les pays à haut revenu (**Habib, 2011**). En outre, même dans les pays à revenu élevé, les traitements dentaires coutent cher, représentant en moyennes 5 % des dépenses de santé totale et 20 % des dépenses de santé à la charge du patient (**Petti et al., 2018**). Les efforts en vue de l'instauration de la couverture sanitaire universelle peuvent contribuer à orienter le dialogue politique afin de renforcer les services de santé bucco-dentaire primaires et de réduire les dépenses considérables à la charge du patient liées aux soins bucco-dentaires dans de nombreux pays.

I.3. Hygiène quotidienne de la bouche et produit utilisés

➤ **Le brossage**

Eventuellement précédé ou suivi d'un bain de bouche, le brossage mécanique des dents a pour but d'éliminer la plaque bactérienne. Il doit s'effectuer après chaque repas, pendant 3 minutes environ, à l'aide d'une brosse à dent avec une tête courte et étroite adaptée à la cavité buccale, à brins synthétiques arrondis à leurs extrémités. La brosse sera changée tous les 3 mois au minimum. La brosse à dent est manuelle ou électrique; cette dernière est animée de mouvements automatiques qui assurent un brossage régulier de la gencive vers les dents. La brosse non mouillée au préalable est imprégnée de dentifrice (**Pillot et Pillon, 2014**).

➤ **Les dentifrices**

Les dentifrices sont utilisés avec une brosse à dents pour nettoyer les dents et réduire la plaque microbienne. Ils laissent une sensation agréable dans la cavité buccale. Les

dentifrices existent sous différentes formes, les pâtes étant les plus fréquentes. Mais quelle que soit sa forme (pâte, liquide ou gel), la formule d'un dentifrice comporte des excipients et des principes actifs :

- ❖ Les principaux types d'excipients sont les agents polissants (comme les silices), les agents moussants (la molécule de fluorure d'amine), les agents humectants issus de la famille des polyols, les agents épaississants (alginates, goémon), les arômes (sachant que le goût d'un dentifrice joue un rôle dans la stimulation salivaire) et les agents colorants comme la chlorophylle.
- ❖ Les principales substances actives ont des actions spécifiques, et ce sont elles qui vont conditionner l'action du dentifrice. Par exemple,
 - l'ensemble des dentifrices fluorés auront une action anticarie ;
 - Arthrodont contenant de l'énoloxone à une activité anti-inflammatoire;
 - la chlorophylle contenue dans Halita et Veadent agit contre la mauvaise haleine;
 - le fluorure d'amine (dans Elmex sensitive, Colgate sensitive) va lutter contre l'hypersensibilité dentinaire ;
 - Elgydium blancheur contient du bicarbonate de sodium, qui a une action anti-tâche ;
 - le Ginko biloba et la vitamine E associés dans Elgydium protection carie ont une action antiâge (**Bonnot et Pillon, 2013**).

I.4. Les bains de bouche dans la prévention et le traitement les infections buccodentaires

Le bain de bouche est une préparation médicamenteuse d'utilisation locale externe. Il joue un rôle dans le traitement préventif, curatif et dans la maintenance de l'hygiène dans diverses affections stomatologiques et pharyngées. Les bains de bouche possèdent des actions principales qui peuvent être les anti-carieuse, antibiotique, antiseptique, anti-inflammatoire, antalgique et cicatrisante. Ils peuvent également avoir des effets adjuvants tel que l'effet désodorisant (**Bonnot et Pillon, 2013**).

I.4.1. Les composantes de bains de bouche et leurs rôles

Plusieurs constituants entre dans la constitution d'un bain de bouche et cela permet de classer les bains en plusieurs catégorie, on a les bains de bouche antiseptique, les bains de bouche anti-inflammatoires, les bains de bouche antibiotique, les bains de bouche fluores et les bains de bouche neutralisant de la mauvaise haleine. Ces bains de bouche contiennent des constituants tels que le Chlorhexidine, le Chlorure de cétylpyridinium, le polyvidone iodée, l'hexétidine et le bicarbonate de sodium qui ont un effet sur les microorganismes de la flore

buccale pour prévenir les infections bucco-dentaire (**Bonnot et Pillon, 2013**). Le tableau III représente quelques rôles.

Tableau III : Activités et inconvénients des constituants de bains de bouche

Antiseptiques	Rôles
Chlorhexidine	Action sur les bactéries Gram positifs en particulier Streptocoque et les champignons
Chlorure de cétylpyridinium	Action sur les bactéries Gram positif et un peu moins sur les Gram négatif
Polyvidone iodée	Action sur les bactéries Gram positif et négatif et aussi sur les levures
Hexétidine	Action sur les bactéries Gram positif et négatif
Bicarbonate de sodium	Action sur les bactéries Gram positif et négatif et aussi sur les levures

I.4.2. Les huiles essentielles dans les bains de bouches

Grâce à leurs propriétés aromatisantes et antiseptiques, les HEs ont été expérimentés dans les bains de bouche. Les préparations à base du Menthol sont parmi les préparations les plus utilisées depuis longtemps dans le monde, surtout aux États-Unis. Cependant, c'est juste en 1987 que les bains de bouche préparés à base d'HEs ont été approuvés par l'association dentaire américaine (ADA), attribuer à leurs efficacités antimicrobiennes et leurs sûretés (**Stoeken et al., 2007**). Parmi les bains de bouche les plus connus au monde, on donne l'exemple de la Listerine® qui est une solution constituée de composé d'HE tel que le Thymol et Menthol utilisée pour le lavage de la cavité orale (**Kato et al., 1990**). Les HEs peuvent être utilisées dans les bains de bouche en exerçant une action curative, mais aussi préventive.

I.5. Généralités sur la médecine traditionnelle et phytothérapie

I.5.1. Médecine traditionnelle

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. L'OMS l'a définie comme étant « l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour la prévenir, diagnostiquer, soulager des maladies physiques et mentales (**OMS, 1998**). A

l'heure actuelle cette médecine est largement utilisée dans les pays du Sud où elle génère des revenus non négligeables (**Lusakibanza, 2012**).

I.5.2. Intérêt et mode d'utilisation

À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant toutes ont pour objectif de vaincre la douleur, la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. Alors qu'il existe une demande de plus en plus forte pour des traitements par les plantes, beaucoup considèrent encore ceux-ci comme des survivantes des « pratiques populaires », la plupart de bon sens, certes, mais seulement employées pour attendre un rendez-vous chez son praticien. Il existe, cependant une phytothérapie médicale (dont buccodentaire).

I.5.3. Phyto-aromathérapie

I.5.3.1. Définition

La phytothérapie et l'Aromathérapie sont deux expressions qui désignent la médecine basée sur l'utilisation des extraits, les principes actifs naturels et les HEs de plantes pour le bien être en général, aussi bien dans la prévention que le traitement des maladies. On peut la distinguer en trois types de pratiques :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne, et basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme la médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement (**Franchomme et Penoel, 2011**).

- Une pratique de prophylaxie déjà utilisée dans l'antiquité. C'est notamment le cas l'usage des plantes pour des applications dentaire. Divers enquêtes, ici ou là, ont montré que les connaissances à propos des plantes médicinales buccodentaires sont toujours d'actualité dans un large public.

- Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques recherchées dans les extraits actifs des plantes. Cette pratique débouche suivant les cas sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou médicaments traditionnels améliorés (MTA) ou de phytomédicaments (**Kaloustian et Hadji-minaglou, 2012**).

I.5.3.2. Importance et dangers de la phytothérapie

La phytothérapie est une médecine alternative qui est complémentaire à la médecine conventionnelle et qui attire de plus en plus l'attention dans le contexte de l'offre de soins de santé et de la réforme du secteur sanitaire (**Dibong et al., 2011**). Dans les pays développés, elle gagne en popularité en occupant une place importante dans certains centres hospitaliers, dans l'automédication notamment avec l'utilisation des HEs et avec la production des phytomédicaments (**Hortvarth et Acs, 2015**). En effet, un des grands atouts de la phytothérapie par rapport à la médecine conventionnelle est l'exceptionnelle tolérance des plantes médicinales lorsqu'elles sont choisies en respectant les indications des posologies du fabricant ou du phytothérapeute ce qui permet de diminuer la fréquence d'apparition des effets secondaires au cours du traitement. La phytothérapie trouve sa justification dans la pharmacognosie qui explore l'aspect multidisciplinaire de la connaissance du végétal et de ses propriétés (**Gahbiche, 2009**). Cependant, certaines plantes contiennent des principes actifs qui peuvent être extrêmement toxiques à faible dose ou après association à une autre (**OMS, 1998**).

I.5.3.3. Les étapes du développement d'un phytomédicament

Le développement d'un médicament est un processus complexe, qui nécessite des investissements considérables qui sont regroupés en quatre grandes étapes. Ce processus commence par le choix des plantes ou composés actifs d'une plante qui peut se faire par diverses approches à savoir : l'approche aléatoire, l'approche chimiotaxonomique ou le criblage phytochimique, l'approche ethno-guidée, et la bio-informatique appliquée (**Queiroz et al., 2009**).

La deuxième étape est la réalisation des études précliniques c'est-à-dire l'évaluation de l'activité biologique *in vitro* et *in vivo* du médicament et du mécanisme d'action du principe actif. Elle consiste aussi à évaluer l'efficacité et les effets indésirables du médicament.

Lorsque les résultats des tests précliniques sont satisfaisants, la troisième étape consistera à réaliser des études cliniques sur des patients atteints d'affection ciblée (cas des infections bucco-dentaire dans notre étude) après formulation du principe actif. Cette troisième étape permet d'établir le rapport bénéfice/risque du médicament dans l'indication ciblée, à grande échelle à long terme, et de préciser les précautions d'emploi.

Enfin la dernière étape qui est un dossier déposé auprès des autorités de santé pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM), et qui s'accompagne d'une pharmacovigilance du profil d'efficacité et de tolérance du médicament produit en évaluant ses effets dans des sous-groupes de patients spécifiques non étudiés auparavant, ou en le comparant à de nouveaux produits de référence. Cette phase se déroule en parallèle du suivi de sécurité du produit par les programmes de pharmacovigilance.

I.5.3.4. Choix des plantes pour le développement d'un phytomédicament

En Afrique, en particulier au Cameroun l'approche ethno-guidée est la stratégie la plus utilisée dans le choix des plantes pour le développement des médicaments à base de plantes non seulement parce que la majorité de la population a recours à la médecine traditionnelle mais aussi parce qu'elle est simple et moins coûteuse. Cette approche met en évidence, l'ethnobotanique, l'ethnomédecine et l'ethnopharmacologie. Récemment, l'ethnopharmacie a été structurée de manière à fournir une interface entre sciences pharmaceutiques et la phytothérapie populaire où les espèces de plantes médicinales peuvent être sélectionnées pour le développement de phytomédicaments (**Barbosa et al., 2011**). L'ethnobotanique est l'approche la plus utilisée et la mieux élaborée. Par définition, l'ethnobotanique est l'exploration scientifique des plantes médicinales provenant des connaissances et pratiques traditionnelles que les différentes cultures utilisent à des fins thérapeutiques ou de diagnostic pour modifier l'état d'un organisme vivant (**Barbosa et al., 2011**).

I.6. Généralités sur les huiles essentielles des plantes et leurs propriétés biologiques

I.6.1. Définition

Les HEs sont des mélanges complexes de substances organiques, aromatiques et liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des végétaux. Elles sont concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur (**AFNOR, 2000**).

I.6.2. Propriétés physiques des huiles essentielles

A l'état liquide et à température ambiante, les HEs sont généralement claires ou troubles (zeste de mandarine, vétiver), jaunes (thym, citronnelle), jaunes citron (citronnelle) ou jaunes pâle. Toutes les HEs sont volatiles, odorantes et leur densité est le plus souvent inférieure à 1. A notre connaissance, seules les HEs de cannelle, de girofle et de saffran ont une densité supérieure à celle de l'eau.

Par ailleurs, les HEs sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les alcools et la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (**Bakkali et al., 2008**).

I.6.3. Composition chimique

Les HEs sont des mélanges complexes de substances phytochimiques (environ 45 composés) de faible poids moléculaire, appartenant principalement à deux grandes familles chimiques:

- les composés terpéniques (hydrocarbures terpéniques et terpenoïdes);
- les composés aromatiques (dérivés du phénylpropène) et aliphatiques (**Azevedo et al., 2001**).

I.6.3.1. Hydrocarbures terpéniques

Les hydrocarbures terpéniques sont des composés ayant pour formule de base $(C_5H_8)_n$. Ils dérivent de l'acide mévalonique et sont constitués d'un assemblage d'isoprène (C_5H_8). On distingue principalement les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$), les diterpènes ($C_{20}H_{32}$) et les triterpènes ($C_{30}H_{48}$). Les mono et les sesquiterpènes sont les plus courants dans les HEs à cause de leur masse moléculaire faible. Les sesquiterpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques dû à un réarrangement complexe du squelette hydrocarboné, conduisant à des molécules plus intéressantes sur le plan olfactif et biologique. Le cymène, le limonène, le terpinène, le sabinène et le pinène illustrés à la figure 11 ci-dessous sont quelques exemples de terpènes hydrocarbonés fréquemment rencontrés dans les HEs (**Hyldgaard et al., 2012**).

I.6.3.2. Terpenoïdes

Les terpenoïdes sont des terpènes dont le groupement méthyl a été substitué par une hétéro-groupement (généralement oxygéné) via une réaction enzymatique (**Caballero et al., 2003**). La présence d'un atome d'oxygène permet de diversifier les terpenoïdes en alcools, esters, aldéhydes, cétones, éthers et époxydes. Le thymol et son isomère conformationnel le carvacrol, le linalol, le linalyl acétate, le citronellal et les citrals (neural et de géranial) (Figure 11) sont quelques exemples de terpenoïdes rencontrés (**Hyldgaard et al., 2012**).

I.6.3.3. Phénylpropènes

Les phénylpropènes constituent un groupe de composés aromatiques synthétisés à partir de la phénylalanine. Ils tiennent leur nom du groupement phénolique et des 3 carbones du propène en substitution (Figure 11). Les phénylpropènes sont moins abondants que les dérivés terpéniques et comprennent des composés odorants tels que la vanille, l'eugénol, l'anéthol et l'estragole (Hellal, 2011).

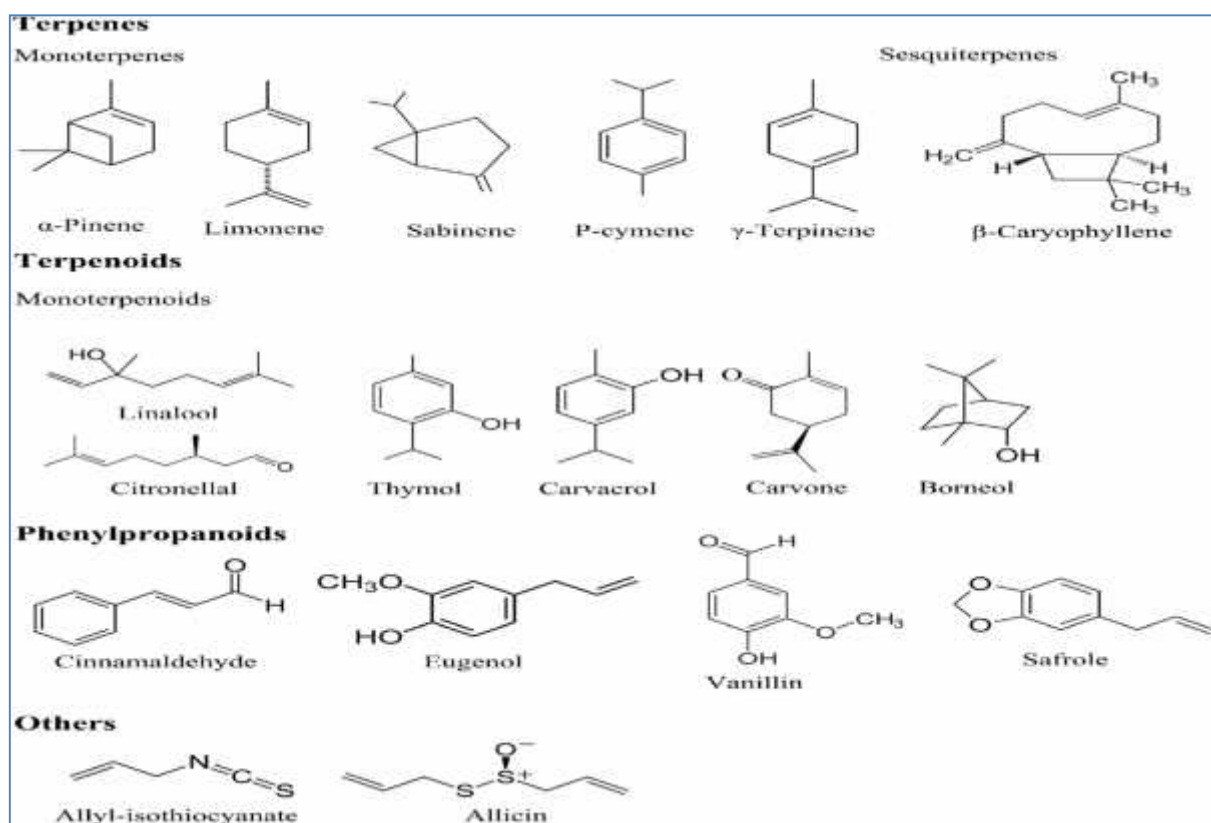


Figure 11 : Structures chimiques de quelques composés couramment rencontrés dans les huiles essentielles (Hyldgaard *et al.*, 2012)

I.6.4. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Les techniques d'extraction des HEs sont nombreuses et leur mise en œuvre, plus ou moins facile. Certaines sont utilisées depuis longtemps par l'Homme, d'autres sont le résultat d'avancées récentes ; cependant toutes ont pour but de récupérer une substance ou une molécule pure à partir d'un mélange. En fonction du matériel végétal utilisé, on distingue plusieurs techniques d'extractions des HEs (AFSSAPS, 2008).

- Extraction par hydrodistillation : C'est la technique la plus employée à cause de, sa simple faisabilité et son efficacité. Le principe général est basé sur le fait que les vapeurs d'eau pénètrent dans les tissus du matériel végétal et entraînent par la suite les composés volatils sous forme de vapeurs qui sont condensés dans le réfrigérant, pour être récupérés en

phase liquide dans un vase florentin (ou essencier) constituant ainsi l'HE qui est séparée de l'eau par décantation.

- **Distillation sèche** : L'HE est obtenue par distillation des bois, d'écorces ou de racines, sans addition d'eau ou de vapeur d'eau.

- **Extraction par pression à froid** : C'est un mode d'extraction qui ne s'applique qu'aux agrumes (*Citrus spp*). En effet il consiste à broyer à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les saccules ou des poches sécrétrices d'HE afin de libérer l'essence. Le mélange obtenu est appelé essence car on note la présence de plusieurs composés hydrosolubles.

- **L'enfleurage** : On étale des pétales de fleurs sur de la graisse. Celle-ci extrait les parfums et les odeurs de la plante et une fois saturée, elle est traitée à l'alcool. Celui-ci est ensuite évaporé sous vide. Il reste alors un résidu très parfumé qui servira à la fabrication des parfums. On distingue l'enfleurage à froid (pour les plantes délicates : jasmin, violette) de l'enfleurage à chaud (la graisse est chauffée entre 60 °C et 70 °C).

I.6.5. Méthodes d'analyse et d'identification des huiles essentielles

I.6.5.1. Chromatographie en phase gazeuse

La CPG est une technique de séparation qui permet la détermination quantitative et qualitative des constituants chimiques d'une substance. Il s'agit d'une technique d'analyse de mélange de composés volatils ou susceptibles d'être volatilisés sans être décomposés par une élévation de température.

I.6.5.2. Couplage chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Le couplage CPG-SM permet une identification plus poussée des composés en tenant compte de leur structure moléculaire. En effet, dans cette technique, le détecteur du chromatographe est le spectromètre de masse. Cet appareil comprend également trois modules : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur

1) **La source d'ions** est la partie du spectromètre où sont produits les ions gazeux ; elle est maintenue à une température élevée pour éviter la condensation de l'analyte.

2) **L'analyseur** est la partie qui possède quatre paramètres. A savoir : la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de rapport (masse/charge) balayée et la transmission.

L'analyseur grâce à ces paramètres sert à trier ou à séparer les ions en fonction de leur rapport m/z.

3) **Le détecteur** dont le rôle est de compter les ions en faisant correspondre leur rapport m/z et de fournir un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés. L'enregistreur est intégré à ce système pour traiter le signal et permettre la visualisation des spectres.

Durant tout ce processus, un système de calibrage est mis en place pour permettre l'étalonnage entre la grandeur réelle mesurée et le rapport m/z.

La comparaison de l'indice de rétention calculé et du spectre de masse avec les données de la littérature permet en général l'identification des composés (**Adams, 2012**).

I.6.6. Combinaisons des huiles essentielles

Les effets antimicrobiens des combinaisons d'HEs, comme pour les associations d'antibiotiques, peuvent se définir selon quatre interactions possibles (**Piribi, 2005**) :

- Indifférence : lorsque l'activité d'une HE (A) mélangée à celle de l'HE (B) n'est pas affectée par l'autre.
- Addition : lorsque l'activité d'une HE (A) mélangée à celle de l'HE (B) donne un effet d'association qui est égal à la somme des activités de chaque HE étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- Synergie : lorsque l'activité d'une HE (A) mélangée à celle de l'HE (B) donne un effet significativement supérieur à la somme de chaque HE étudiée isolément, à la même concentration.
- Antagonisme : lorsque l'activité d'une HE (A) mélangée à celle de l'HE (B) aboutit à la diminution de l'activité de l'une ou l'autre. Cet effet est inférieur à la somme des effets de chaque HE prise séparément.

Ces effets interactifs sont souvent mis en œuvre pour optimiser généralement l'action des HEs sur des germes mis en cause. Ainsi quelques études ont mis en exergue l'action combinée des HEs entre elles et celle des HEs avec les antibiotiques. C'est le cas des travaux de **Voundi et al. (2013)** qui ont effectué des combinaisons entre HEs et évaluer l'effet inhibiteur de celle-ci sur la croissance des spores et aussi ceux de **Moni et al. (2013)** qui ont effectué des combinaisons d'HEs et optimisé l'action de celles-ci sur des germes diarrhéiques avec une gamme de CMI de 0.39-12,5 mg/mL pour les HEs à 0,195-6,25 mg/mL pour les combinaisons.

I.6.7. Les principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne

Plusieurs méthodes sont aujourd'hui disponibles pour déterminer l'activité antimicrobienne des extraits/HEs de plantes. Le choix du test à utiliser dépend non seulement de la nature de la substance à tester, du microorganisme mais également des paramètres recherchés. **Vanden et Vlietinck (1991)** ont regroupé ces différents tests en deux catégories :

- Les tests qualitatifs, permettant de déterminer la présence ou non des substances à activité antimicrobienne.
- Les tests quantitatifs, permettant de déterminer les paramètres d'inhibition (CMI, CMB) et le profil bactériologique d'un extrait contre un germe.

I.6.7.1. Méthodes qualitatives

I.6.7.1.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est une technique utilisée en bactériologie médicale, basée sur le principe de l'antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande utilité dans le choix des HEs testées. Elle s'applique à un très grand nombre d'espèces bactériennes. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité de donnée d'HE (**Fauchere et Avril, 2002**).

I.6.7.1.2. Technique par contact direct

La technique par contact direct consiste à mettre en présence de l'HE, les microorganismes pendant un temps précis, puis à observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide (**Bousbia, 2004**). Cette méthode peut à la fois évaluer qualitativement et quantitativement l'activité antimicrobienne réelle des HEs.

I.6.7.2. Méthodes quantitatives

Elles font référence aux méthodes de détermination des paramètres d'inhibitions (CMI, CMB et CMF) et aux rapports CMB/CMI pour les bactéries et CMF/CMI pour les levures.

I.6.7.2.1. La méthode de dilution en milieu liquide

L'inoculum bactérien/fongique est cultivé en présence d'une série de concentrations décroissantes d'extrait selon une dilution géométrique de raison 2. Cette méthode présente

plusieurs variantes selon que la série de dilution des extraits se fait dans une série de tubes (macrométhode de dilution) ou dans des cupules d'une microplaque (microméthode de dilution) contenant le milieu de culture. L'inoculum bactérien ou fongique est équitablement distribué dans chaque tube ou cupule. Deux témoins sont réalisés : un témoin positif (bouillon nutritif + microorganisme) et un témoin négatif (bouillon nutritif + extrait). Après incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus petite concentration ayant inhibé toute croissance visible à l'œil nu (**Fauchere et Avril, 2002 ; NCCLS, 2008**). La croissance bactérienne se traduit par le trouble du milieu ou par le changement de couleur d'un indicateur coloré ou redox qu'on introduit dans le bouillon.

I.6.8. Cibles cellulaires des huiles essentielles

Une fois qu'un antimicrobien est sélectionné, l'étape suivante consiste à caractériser son action sur les structures bactériennes telles que la cellule, le matériel génétique, et/ou la synthèse des protéines, habituellement par des tests phénotypiques (**Santos et al., 2016**). Plusieurs outils existent pour illustrer le mécanisme d'actions d'une substance vis-à-vis d'un germe. Ce pendant ce mécanisme peut être spécifique et approfondi ou illustratif suivant la méthode utilisée et la cible. Les méthodes utilisent les outils des technologies moléculaires (l'étude génomique, transcriptomique, protéomique et métabolique) et la microscopie (optique et électronique) pour mettre en évidence les effets des antimicrobiens. En général, le mécanisme est déduit par comparaison phénotypique entre les cellules saines et cellules traitées aux concentrations de l'antimicrobien égales, inférieures et supérieures à la CMI (**Santos et al., 2016**).

I.6.8.1. Action des huiles essentielles sur la paroi ou la membrane

Pour mettre en évidence les dommages au niveau de la paroi ou la membrane, on peut mettre en évidence la présence des altérations morphologiques de la membrane cellulaire par microscopie électronique et/ou à fluorescence en utilisant un colorant fluorescent tel que le bromure d'éthidium ou l'iodure de propidium (**Babii et al., 2018**). Dans les travaux de **Jayanta et Kwang-Hyun (2016)**, cette méthode montre une altération des membranes (lyse) des cellules traitées avec l'antimicrobien d'une part et d'autre part, des membranes uniformes et sans lyse pour les cellules traitées au dimethylsulphoxide pris comme témoins négatif.

Alternativement, divers tests sont effectués pour évaluer l'intégrité de la membrane. Un test simple mesure la fuite de matériel cellulaire qui absorbe à 260 nm de longueur d'onde le surnageant des cellules traitées. En effet, les acides nucléiques et les composés associés

(tels que les pyrimidines et les purines) ont une absorbance maximale de lumière UV à cette longueur d'onde. L'augmentation de ce matériel dans le surnageant indique une paroi cellulaire et/ou une membrane endommagée (**Santos *et al.*, 2016**).

Le tableau IV présente les principaux mécanismes d'action de quelques HEs ont été synthétisés par **Langeveld *et al.* (2013)**.

Tableau IV : Mécanismes d'action antibactérienne de quelques HEs et quelques composés majoritaires (**Langeveld, 2013**)

HE ou composants	Mode d'action	Type mode d'action
Origan	Réduction de l'activité de la lipase et de la coagulase	Directe, cible spécifique
Carvacrol	Perturbation de la membrane cellulaire, inhibition de l'activité ATPase	Directe, cible spécifique et non spécifique
Thymol	Perturbation de la membrane cellulaire, perturbation du métabolisme du citrate	Directe, cible spécifique et non spécifique
Cinnamaldéhyde	Inhibition de l'activité ATPase	Directe, cible spécifique
Melaleuca	Inhibition d'évènements métaboliques localisés sur la membrane	Directe, cible spécifique
- terpinene	Perturbation de la membrane	Directe, cible non spécifique

I.6.8.2. Action des huiles essentielles sur le matériel génétique

L'action d'un composé sur l'intégrité de l'ADN peut être évaluée par analyse de liaison à l'ADN, dans laquelle un échantillon d'ADN purifié (ADN plasmique habituel) est mélangé avec différentes concentrations du composé testé. Après une période d'incubation, la réaction est soumise à une analyse électrophorétique (**Santos *et al* 2016**).

La mise en évidence du mécanisme d'action des HEs sur l'ADN par comptage du nombre de bandes présent sur le gel après électrophorèse a été menée par **Hend (2009)** ; **Xu *et al.*, (2016)**. Le profil électrophorèse est réalisé dans le but de conclure à une éventuelle inhibition et fragmentation de l'ADN des cellules exposées aux CMI par comparaison du nombre de bandes présentes sur le gel électrophorétique des cellules non traitées.

I.6.8.3. Action des huiles essentielles sur la synthèse protéique

Pour étudier les effets d'un antimicrobien sur les protéines, deux méthodes peuvent être utilisées :

- La méthode d'incorporation de précurseurs radioactifs de la synthèse de protéine qui sera par la suite mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (**Santos *et al.*, 2016**).

- La méthode de quantification par mesure des spots après électrophorèse sur gel polyacrylamide (Deracinois, 2012 ; Xu *et al.*, 2016).

I.6.9. Travaux antérieurs sur les plantes étudiées

I.6.9.1. *Eugenia caryophylla*

➤ Caractères généraux de la plante

E. caryophylla ou le giroflier est une plante de la famille des Myrtaceae originaire de la partie Sud des Philippines et de l'Indonésie, mais actuellement cultivée dans plusieurs pays tropicaux d'Afrique. C'est un très bel arbre à feuillage persistant pouvant atteindre 12 à 15 m de haut. Avant l'épanouissement, ses boutons floraux appelés communément clou de girofle sont récoltés et séchés. Ils sont caractérisés par une forte odeur aromatique et une saveur brûlante (Goetz et Ghedira, 2012).

➤ Travaux antérieurs

A ce jour, *E. caryophylla* est considéré comme une plante de haute importance économique dans le monde. Les HEs des boutons d'*Eugenia caryophylla* ont démontré une activité antibactérienne et antifongique *in vitro* (Nyegue *et al.*, 2014 ; Kengne *et al.*, 2019). *E. caryophylla* est de plus en plus utilisé dans les cabinets dentaires à cause de leurs propriétés antalgiques et antimicrobiens dues à la forte concentration en eugenol.

I.6.9.2. *Mentha sp cf piperita*

➤ Caractères généraux de la plante

Mentha sp cp pipérita est une plante herbacée, très odorante et mesurant entre 30 et 90 cm de haut. C'est une plante vivace par son rhizome qui s'accroche dans la terre, et elle se propage par ses stolons ou drageons (branches basses qui développent des racines au contact du sol). Elle est caractérisée par son odeur mentholée et par ses feuilles dentées, ovales et vertes foncées (Saha et D'Mello, 2004). L'étude de la composition chimique de l'HE de menthe a été effectuée. Deux composés majoritaires ont été mis en évidence, le menthol et le menthone (Derwich *et al.*, 2010). Les travaux de Nyegue *et al.* (2014) ont montré que le composé majoritaire de la menthe utilisée dans leurs travaux est la pipéritone.

➤ Travaux antérieurs

Les HEs de menthe ont montré qu'elles possèdent les propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, et antioxydantes (Burt, 2004). L'HE de *mentha sp cf piperita* s'est avérée fortement efficace contre *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*

et *Escherichia coli* (Sartoratto *et al.*, 2004). La sensation de fraîcheur que l'on éprouve lorsqu'on mâche des feuilles fraîches de cette plante est due à l'engourdissement des muqueuses, d'où son intérêt pour les inflammations buccales. Pour atténuer les douleurs gingivales, on peut aussi faire appel, en bains de bouche à une décoction de feuilles de menthe séchées (Lamendin *et al.*, 2008).

I.6.9.3. *Cymbopogon citratus*

➤ Caractères généraux de la plante

C. citratus (*Poaceae*) ou la citronnelle est une plante herbacée pérenne, à longues feuilles linéaires de 90 cm à 2 m de long, à bords rugueux et coupants, poussant en touffes denses pouvant atteindre 0,5 à 1,5 m de haut. Sa couleur est verte et son odeur est agréable et relaxante. Les tiges sont creuses, bulbeuses à la base et enveloppées dans la gaine des feuilles (Manvitha et Bidya, 2014).

➤ Travaux antérieurs

Koba *et al.* (2004) ont déterminé la composition chimique de quatre espèces de *Cymbopogon* et évalué l'activité antimicrobienne de leurs HEs *in vitro* puis *in vivo* sur des germes pathogènes d'animaux de compagnie. Moni *et al.* (2013) ont montré l'activité antibactérienne de cette HE sur bactéries responsables de diarrhées infantiles. De même cette HE a été utilisée en association pour un bain de bouche contre les germes buccaux (Farid *et al.*, 2012).

I.6.9.4. *Pentadiplandra brazzeana*

➤ Caractères généraux de la plante

P. brazzeana est un arbuste ou liane atteignant 3 à 20 m de haut. Les feuilles sont largement elliptiques, oblongues, ovales à lancéolées, aiguës ou arrondies à la base, obtuses et longuement acuminées, mesurant 5 à 15 cm de long et de 1 à 7 cm de large. C'est une plante très répandue et assez commune (anciennes cultures, forêts secondaires, forêt primaires). Son aire s'étend du Cameroun au Congo et à l'Angola (Ndoyé, 2001).

➤ Travaux antérieurs

Plusieurs études ont été menées sur l'HE de *P. brazzeana* et ceux de Nyegue *et al.*, (2010) ont montré des dérivés isothiocyanates et thiocarbamates, ainsi que leurs structures chimiques identifiées. Egalement, les travaux de Ndoyé (2001), Nyegue *et al.* (2010) et

Betote (2016) ont montrés une prédominance d'isothiocyanate de benzyle (66,4 à 92,7 %), ainsi qu'une activité antimicrobienne à de faibles concentrations.

I.7. Evaluation sensorielle d'un produit

L'analyse sensorielle est un examen des propriétés organoleptiques d'un produit par les organes des sens. Elle permet de définir, mesurer, analyser et interpréter les caractéristiques d'un produit. L'homme, appelé juge ou répondant, est considéré comme instrument de mesure chaque fois qu'il n'existe pas le capteur physique capable de réaliser avec son équivalent sensorielle (**Totté, 2008**).

L'analyse des caractéristiques sensorielles des produits est la clé pour répondre aux attentes des consommateurs. Elle apparaît comme un outil complémentaire aux mesures physico-chimiques couramment utilisées pour identifier les caractéristiques intrinsèques des produits (**Ledauphin, 2005**).

Les résultats d'une telle analyse peuvent être utiles à la comparaison de produits en vue de leur commercialisation ou encore à la mise en place d'un standard de qualité. Mais ils peuvent également permettre d'améliorer le produit au travers de corrections gustatives, olfactives ou esthétiques (**Birca et al., 2005**).

I.8. Analyse critique de la revue de littérature

Cette étude de par son originalité, trouve une place très importante dans la recherche, les possibles implications sur le plan de la recherche fondamentale est que cette étude vient compléter une panoplie d'étude sur la place qu'occupe les extraits de plante comme alternative des antibiotiques dans le traitement et la prévention des infections bucco-dentaire.

De même les possibles implications de cette étude sur le plan de la recherche appliqué au Cameroun est que les résultats pourrons être applicables dans le but de prévenir les infections buccales qui ne cesse d'être grandissant dans notre pays. Cette étude vient donc contribuer à la valorisation des plantes médicinales camerounaises en particulier et africaine en générale, car cette étude permet de mettre en évidence là l'action synergique des huiles essentielles et de comprendre leurs rôles dans l'activité antimicrobienne qui est la leur.

De même, l'isolement et la caractérisation de certains microorganismes de la sphère buccale nous sera bénéfique, car cela permettra de mettre en évidence ces microorganismes qui pourraient être à l'origine des infections bucco-dentaires.

Dans le souci d'apporter notre modeste contribution dans la santé bucco-dentaire au Cameroun, nous envisageons dans cette étude expérimenter des formules de bain de bouche à base d'extraits de plantes comme principe actif afin de pouvoir aider dans la prévention des maladies tel la carie dentaire, la mauvaise haleine, les candidoses buccales, les gingivites et parodontopathies.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Dans ce deuxième chapitre, nous décrivons le matériel ainsi que les méthodes utilisées ayant servi à la réalisation de cette étude.

II.1. MATERIEL

II.1.1. Fiches de collecte des données

Une fiche de collecte des données (Annexe 3) a été mise à la disposition des patients pour recueillir les informations préliminaires sur leurs situations bucco-dentaires. Egalement une fiche de collecte de données (Annexe 2) a été fournie pour l'analyse sensorielle des formulations.

II.1.2. Matériel biologique

Les isolats utilisés dans ce travail proviennent des prélèvements effectués dans la cavité buccale des patients ayant acceptés de participer à l'étude.

II.1.3. Milieux de culture

Dans cette étude, plusieurs milieux de culture ont été utilisés :

- La gélose Mueller Hinton (Scharlau, Espagne)[®], supplémentée à la Nystatine (15mg / 500 ml), utilisée pour le renouvellement des souches bactériennes et la détermination de leur sensibilité aux HEs ;
- La gélose Sabouraud Dextrose Agar (SDA) supplémentée au Chloramphénicol 0,5g (Acumedia, Michigan)[®], utilisée pour l'isolement et le renouvellement des levures ;
- La gélose Eosine Bleu de Méthylène (Oxoid, Angleterre)[®], utilisée pour l'isolement des bacilles Gram négatif ;
- La gélose Columbia supplémentée de 5 % de sang de mouton, utilisée pour l'isolement des bactéries anaérobies facultatifs ;
- La gélose Chapman (Oxoid, Angleterre)[®], utilisée pour l'isolement des cocci Gram positifs ;
- Le bouillon Cœur Cerveille (Tm media, India)[®], utilisé pour le transport des échantillons prélevés de la clinique dentaire pour le laboratoire de bactériologie du CHUY ;

II.1.4. Matériel végétal

Dans ce travail, quatre plantes ont été utilisées. La sélection de ces plantes s'est faite en fonction de certains critères ; notamment leurs utilisations comme épices et condiments dans les préparations culinaires. Egalement leurs utilisations anecdotiques par les populations locales dans la médecine traditionnelle.

Les échantillons de plantes ont été récoltés et/ou achetés dans des localités et ville du Cameroun. Il s'agit de *Cymbopogon citratus* (*Poaceae*) récoltée au quartier Biyem-assi dans la ville de Yaoundé, région du centre Cameroun, d'*Eugenia caryophylla* (*Myrtaceae*) achetée au village Bamendjou, région de l'ouest Cameroun, de *Mentha* sp cf *piperita* (*Lamiaceae*) achetée au marché du Mfoundi dans la ville de Yaoundé, région du centre Cameroun et de *Pentadiplandra brazzeana* Baillon (*Pentadiplandraceae*) récolté dans la ville de Dschang, région de l'ouest Cameroun. L'identification botanique des espèces a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun où des spécimens des plantes sont déposés.

- *Cymbopogon citratus* (*Poaceae*) : Les feuilles fraîches de *Cymbopogon citratus*, communément appelées citronnelle (Français) ; *fimba grass* (Bangangté) ; *Ossanga* (Bassa), ont été récoltées en Avril 2017 (Figure 12). L'identification a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison au spécimen déposé sous numéro d'identification 48536/SFR/Cam.



Figure 12 : Photographie des feuilles de *Cymbopogon citratus* (Photo Ngongang).

- *Eugenia caryophylla* (*Myrtaceae*) : Les boutons floraux secs d'*Eugenia caryophylla* communément appelés clous de girofle (Français), ont été achetés en Mai 2017 (Figure 13). La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison au spécimen déposé sous le numéro 506167/SRF/Cam.



Figure 13 : Photographie des boutons séchés d'*Eugenia caryophylla* (Photo Ngongang).

- *Mentha sp cf piperita (Lamiaceae)* : les feuilles fraîches de *Mentha sp cf piperita* communément appelées menthe (Français), fraîchement cueillies ont été achetées en Juillet 2017 (Figure 14). L'identification a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison au spécimen déposé sous numéro d'identification 25t45/SFR/Cam.



Figure 14 : Photographie de feuilles de *Mentha sp cf piperita* (Photo Ngongang).

- *Pentadiplandra brazzeana Baillon. (Pentadiplandraceae)* : Les racines de *P. brazzeana (Pentadiplandraceae)* encore appelées *Mgba ndick* (Ewondo) ; *Osika* (Batéké); *Difeuh* (Bangangté) ; *Tcham* (Bangantou) ; *Kiémo* (Kako), ont été récoltées en Mai 2017 (Figure 15). L'identification a été effectuée à l'Herbier National du Cameroun en comparaison au spécimen portant le numéro d'identification 42918/SRF/Cam.



Figure 15 : Photographie des racines de *Pentadiplandra brazzeana* Baillon (Photo Ngongang).

II.2. METHODES

La figure 16 ci-dessous est un résumé synoptique de l'organigramme de la méthodologie expérimentale permettant une compréhension de l'ensemble du travail.

Le travail a débuté par la détermination du profil microbien des infections buccodentaires dans la population d'étude. Il s'agissait ici de réaliser des prélèvements, ensuite effectuer des mises en culture et évaluer la capacité des isolats à former des biofilms.

Dans la seconde phase du travail, il s'agissait de déterminer la composition chimique des HEs après extraction de celles-ci par Chromatographie en phase gazeuse au détecteur par ionisation de flamme et par Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse.

La troisième partie a consisté à déterminer les paramètres d'inhibition des HEs et de leurs combinaisons sur les isolats. Pour chaque HE, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) sur les cellules planctoniques et sur les isolats capables de former des biofilms. Egalement l'identification des cibles cellulaires des HEs sont recherchées sur les isolats. Les effets des HEs aux CMI sur l'enveloppe membranaire (la paroi et la membrane) des isolats choisis a été évalués par dosage spectrophotométrique de l'ADN, de l'ARN et des protéines présent dans le milieu après lyse cellulaire en utilisant le JENWAY 6305 et le Nanodrop 1000.

Dans la quatrième partie, la formulation et la caractérisation des solutions de bain de bouche à base de combinaisons d'HEs a été effectuée, ainsi qu'une analyse sensorielle afin d'obtenir un bain de bouche qui allie à la fois propriété antimicrobienne et fraîcheur après usage.

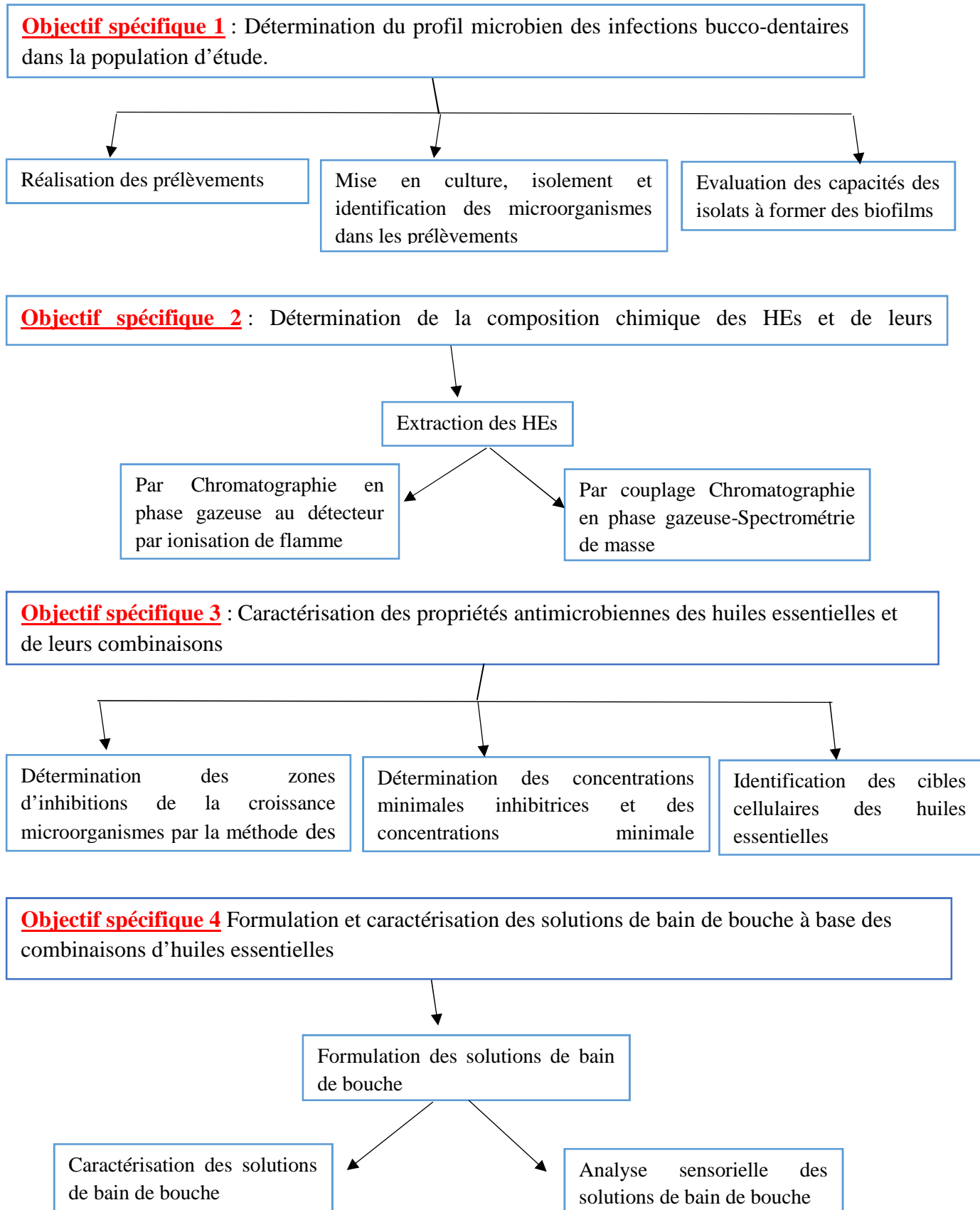


Figure 16 : Diagramme synoptique de la démarche méthodologique (Schéma réalisé par Ngongang)

II.2.1. Détermination du profil microbien des infections buccodentaires dans la population d'étude

II.2.1.1. Réalisation des prélèvements

➤ Autorisations et considération éthiques

En prélude à cette étude, les autorisations administratives ont été obtenues (Annexes 6 et 7). Egalement le Comité National d'éthique et de la Recherche pour la Santé Humaine a émis un avis favorable pour la collecte des prélèvements (Annexe 5). Egalement une notice d'information a été mise à la disposition des patients pour les informer des objectifs de l'étude et des implications de leurs participations (Annexe 8).

➤ Critères d'inclusion et d'exclusion

• Critères d'inclusion

- Patients ayant une infection buccale identifiée,
- Patients consentants,
- Patients n'étant pas sous antibiothérapie.

• Critères de non inclusion

- Patients non consentant,
- Patients sous antibiothérapie dans les derniers 3 mois,
- Patients ayant utilisés un produit d'hygiène buccale dans les 2 heures qui précèdent le prélèvement.

➤ Collecte d'échantillon

Les prélèvements cliniques ont été réalisés pendant une période de 6 mois chez des patients venus en consultation à la clinique dentaire 'La ROSE' situé au quartier Etoug-ébé (Yaoundé) de Juin à Décembre 2017. Les différents prélèvements ont été effectués par le technicien dentiste et ceci selon le type d'infection, soit par écouvillonnage des joues et des gencives dans les cas de caries dentaires, soit à l'aide des tiges spéciales en cas des traitements endodontiques. Chaque écouvillon et tige était introduits dans 1 mL de bouillon cœur cerveau stérile et transportés au laboratoire de bactériologie du CHUY dans une glacière contenant des packs à glace 2 h après le prélèvement. Une fois au laboratoire, les prélèvements ont été mixés au vortex avant d'êtreensemencés dans les différents milieux de culture.

II.2.1.2. Mise en culture, isolement et identification des microorganismes dans les prélèvements

II.2.1.2.a. Mise en culture des prélèvements sur milieu de culture

Après avoir passé les échantillons au vortex, on a ensemencé par strie à l'aide d'une oese les différents milieux de culture. Il s'agissait de la gélose nutritive, qui est un milieu permettant la culture des bactéries peu exigeantes. De la gélose Chapman, qui est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif. De la gélose EMB, qui est un milieu d'isolement des bacilles Gram négatif. De la gélose Sabouraud + chloramphénicol qui constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures saprophytes ou pathogènes. De la gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton (gélose au sang), qui est un milieu d'isolement enrichi, sur lequel les Streptocoques se développent bien. Il permet la lecture du caractère hémolytique. Les boîtes de Pétries ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures à l'exception de la gélose au sang qui a été mise dans une jarre avant incubation.

II.2.1.2.b. Isolement et identification des microorganismes dans les prélèvements

Après incubation, les milieux de culture étaient contrôlés visuellement pour éliminer les boîtes contaminées. Ensuite, un deuxième repiquage était effectué pour obtenir des isolats de cultures pures. Une fois l'isolement réalisé, l'identification des isolats s'est réalisée selon le type de microorganisme. Celle-ci est basée sur des critères macroscopiques, microscopiques et biochimiques des différents isolats à identifier.

➤ Identification phénotypique des isolats bactériens

Les isolats bactériens ont été identifiés à l'aide des techniques de microbiologie décrites par **Joffin et Leyral (2005)** (Figure 19). Cela consistait à réaliser la coloration de Gram pour chaque isolat obtenu, ensuite ensemencer ces isolats sur des milieux de cultures en tube (Figure 17 et 18) telles que le milieu Hajna-Kliger qui est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae* ; le milieu citrate de Simmons qui est un milieu qui utilise le citrate comme seule source de carbone ; le milieu urée-indole qui est un milieu qui permet la recherche de l'uréase, du tryptophanase et de la désaminase ; le

milieu Mannitol-mobilité qui est un milieu permettant l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de dégradation du mannose. Egalement une identification biochimique à partir des galeries classiques et miniaturisées (API) a été réalisée, ainsi que des tests enzymatiques tels que le test à la catalase, le test de la coagulase, le test de la DNASE, le test de l'ONPG et le test de l'oxydase. Une fois ces différents critères déterminés, les résultats obtenus sont comparés à ceux de la base de données de la littérature, c'est-à-dire un catalogue contenant les caractères des différents taxons.



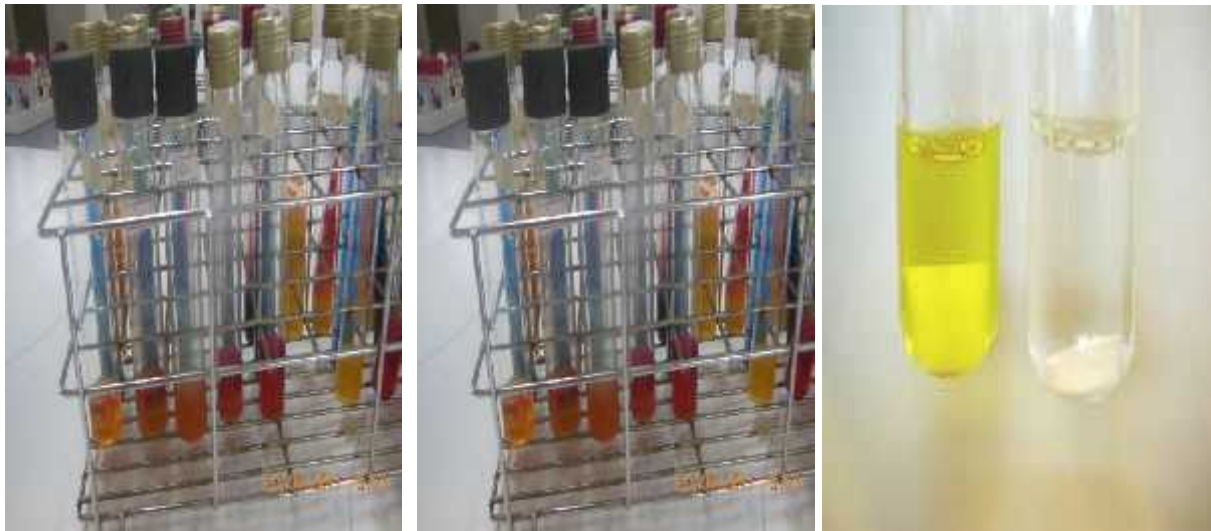
Milieu Hajna-Kliger

- H₂S (+) : Culot noir ; - Gaz (+) : Décollement ou bulle d'air dans la gélose ;
- Glucose (+) : Culot jaune ; - Lactose (+) : Pente jaune ;
- Lactose (-) : Pente rouge ou de couleur inchangée.

Milieu Citrate-Simmons

- Citrate (+) : Pente bleue ;
- Citrate (-) : Pente verte.

Figure 17 : Milieux de culture en tube (**Photographie Ngongang**)



Milieu Mannitol Nitrate

- Mannitol (+): Culot jaune;
- Mannitol (-): Culot rouge.

Milieu Urée-Indole

- Urée (+) : Coloration rose du milieu;
- Urée (-) : Coloration jaune du milieu;

Test de l'ONPG

- ONPG (+) : Coloration jaune de la suspension microbienne ;
- ONPG (-) : Coloration incolore de la suspension microbienne

Figure 18 : Milieux de culture en tube (Photo Ngongang)

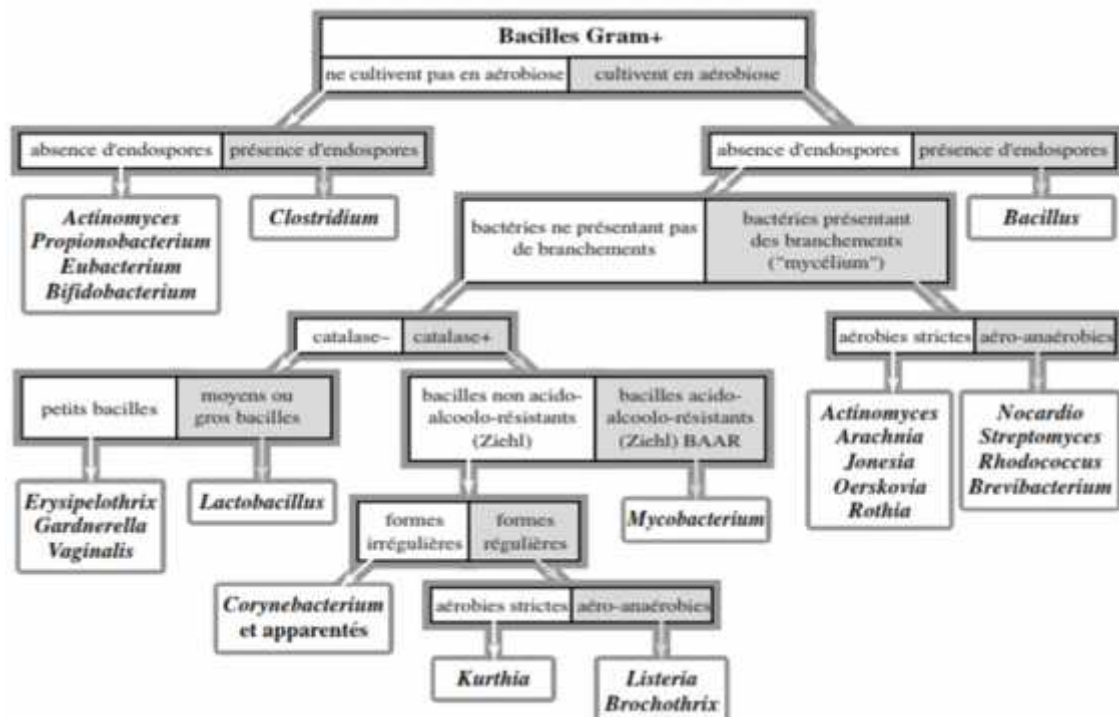


Figure 19 : Schéma d'identification dichotomique des principaux groupes bactériens (Joffin et Leyral, 2005).

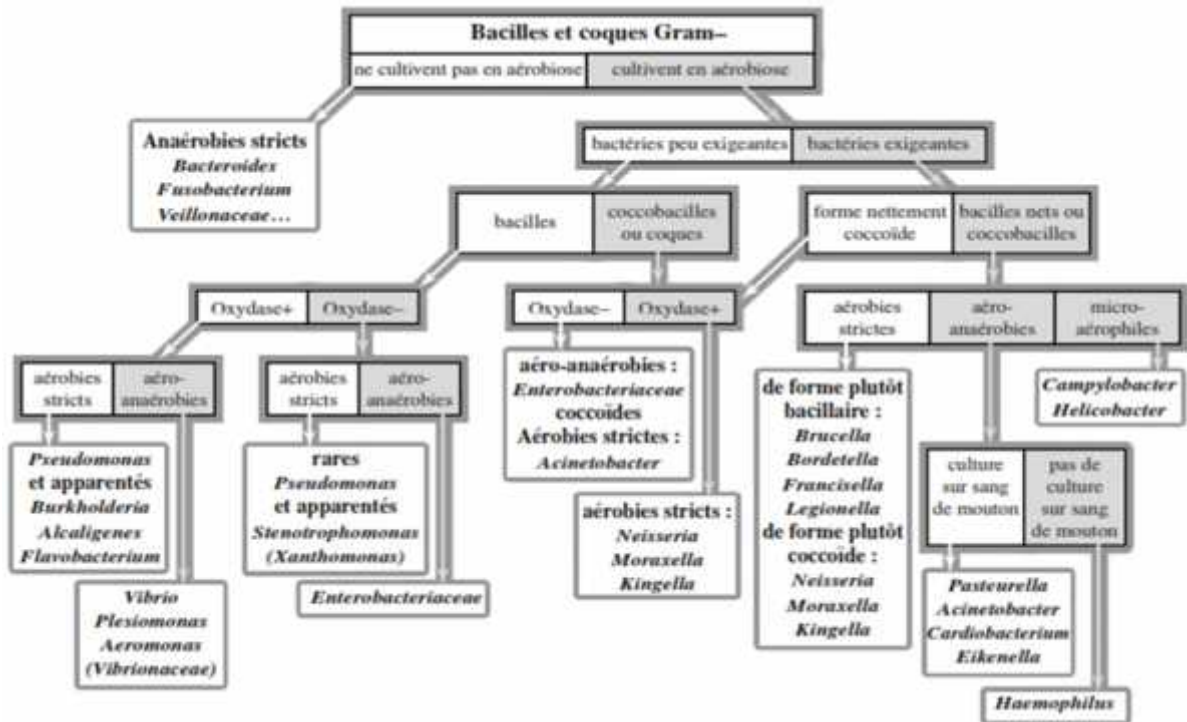
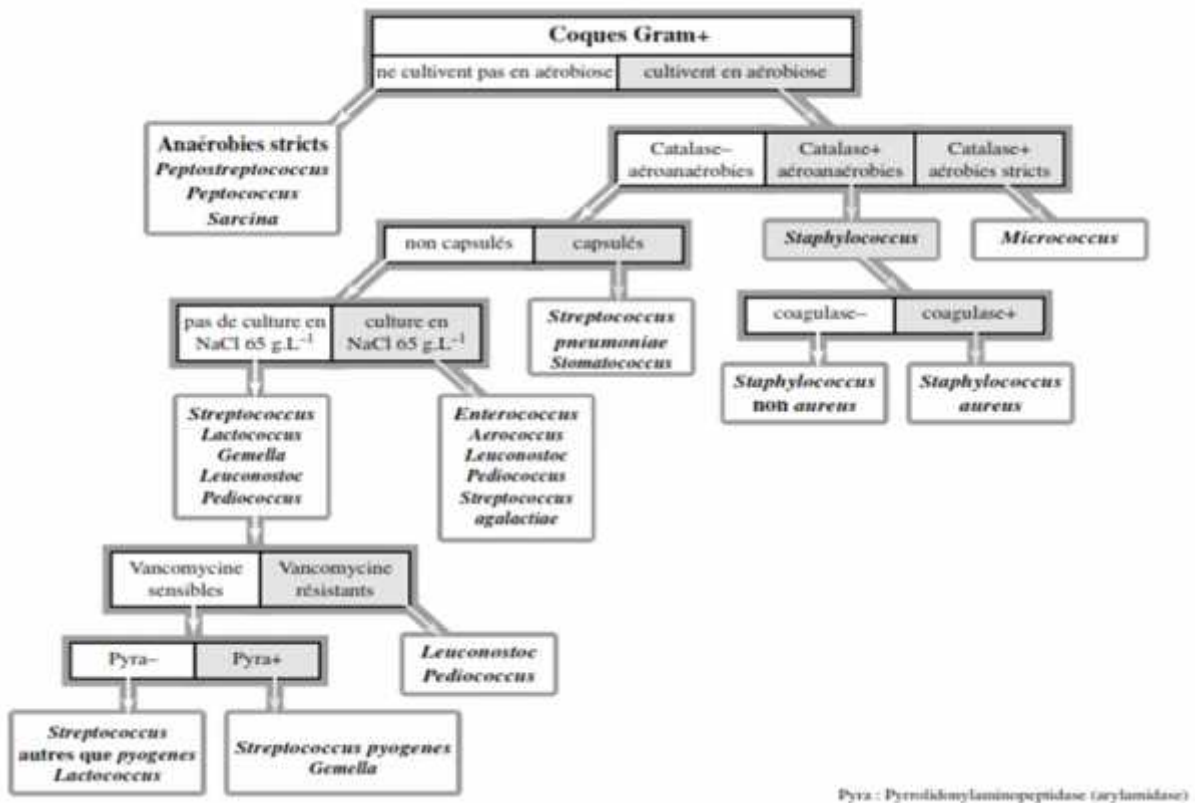


Figure 19 : Schéma d'identification dichotomique des principaux groupes bactériens (Joffin et Leyral, 2005).



Pyra : Pyrroliidonylaminopeptidase (arylamidase)

Figure 19 : Schéma d'identification dichotomique des principaux groupes bactériens (Joffin et Leyral, 2005).

➤ Identification phénotypique des isolats fongiques

L'identification des souches fongiques a été faite grâce à la clé d'identification de **Dufresne (2014)** (Figure 20). La démarche d'identification était basée essentiellement sur l'observation des caractères :

- Macroscopiques (aspect de colonie au verso et au revers, le relief, la taille, la couleur des colonies et la présence ou non d'un pigment);
- Microscopique en effectuant un test de blastère qui est un test d'identification des levures du genre *Candida albicans*.

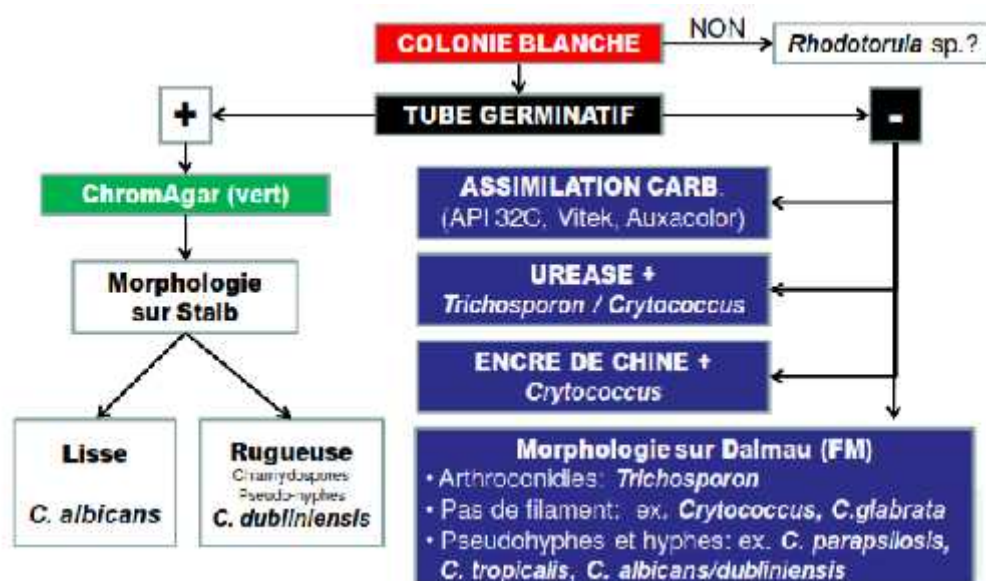


Figure 20 : Schéma d'identification des isolats fongiques (**Dufresne, 2014**)

➤ Conservation des isolats

Les isolats ont été conservés dans les créotubes stériles contenant du glycérol à une température de 4° C (ces isolats sont placés dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

II.2.1.3 Evaluation des capacités des isolats à former des biofilms

Afin de mettre en évidence la capacité de formation d'un biofilm chez les isolats obtenus, trois méthodes ont été utilisées à savoir : la méthode en tube et la méthode de culture sur gélose au Rouge Congo (RCA) qui sont des méthodes qualitatives, ainsi que la méthode de coloration au cristal violet sur microplaques (TCP) qui est une méthode quantitative.

II.2.1.3.a. La méthode en tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm. A partir d'une culture de 24 heures, ensemencer une colonie dans 10 mL de Bouillon Cœur Cerveau (BCC) supplémenté de 2 % de saccharose puis incubé à 37 °C pendant 24 heures. Les tubes ont été lavés avec du PBS (pH 7,3) puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré par le cristal violet (0,1 %) pendant 15 min. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes sont lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée (Mathur *et al.*, 2006).

La formation du biofilm est considérée comme positive quand on observe un film visible qui recouvre le mur et le bas du tube. La formation de biofilms est notée comme (-) pour absente, (+) pour modérée et (+++) pour forte (Mathur *et al.*, 2006).

II.2.1.3.b. La méthode du Rouge Congo Agar

La gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime ou glycocalyx (matrice d'exo-polysaccharide adhésive). Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (*Polysaccharide Intercellular Adhesion*) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négative (Nasr *et al.*, 2012). Le milieu a été préparé avec 37 g/L BCC, 50 g/L de saccharose, 10 g/L d'agar et 0,8 g/L du Rouge Congo Agar, puis autoclavé à 121 °C pendant 15 minutes. Le milieu RCA est ensemencé avec une anse de platine. La lecture a été faite après 24 heures d'incubation à 37 °C (Nasr *et al.*, 2012).

Les souches productrices de slime donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Nasr *et al.*, 2012).

II.2.1.3.c. La méthode de coloration au cristal violet sur microplaques (TCP)

Les microplaques utilisées étaient en polystyrène comportant 96 puits sur lesquelles les bactéries/levures vont adhérer et former un biofilm. La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits a été réalisée selon les recommandations de Christensen *et al.* (1982) avec une durée d'incubation prolongée à 48 heures. Les bactéries ont été cultivées en milieu BCC et incubées toute une nuit à 37 °C. Chaque culture jeune a été ajustée pour l'obtention de 10⁸ UFC/mL et diluée au 1/100^{ème} dans le même milieu. Chaque puits de la plaque est rempli avec 0,2 mL de cette dilution. Les

microplaques sont recouvertes, scellées stérilement et incubées pendant 48 heures à 37 °C. Après incubation, les puits des microplaques sont vidés, rincés 3 fois avec 200 µL d'eau distillée, séchées en position inversée et colorées avec 200 µL de cristal violet à 0,5 % (p : v). Après 30 min d'incubation, l'excès du cristal violet est éliminé par 5 lavages successifs avec 300 µL d'eau distillée stérile. Le colorant incorporé par les cellules ayant adhéré ou ayant formé un biofilm est solubilisé avec 200 µL d'éthanol à 95 % (v/v). La quantité de cristal violet solubilisé est mesurée par la lecture de la DO à 570 nm dans un lecteur ELISA AutoReader. Nous nous sommes référées à la classification de **Mathur et al., (2006)** basée sur les valeurs de la DO selon le tableau V.

Tableau V : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP selon **Mathur et al. (2006)**.

Valeurs DO	Adhérence	Formation de biofilm
< 0,120	Non adhérente	Non formatrice
0,120 – 0,240	faiblement adhérente	Faiblement formatrice
> 0.240	fortement adhérente	Fortement formatrice

II.2.2. Extraction et détermination des compositions chimiques des huiles essentielles

II.2.2.1. Extraction des huiles essentielles

Les HEs ont été extraites par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Cette méthode repose sur l'entraînement à la vapeur (eau) des composés volatils contenus dans la matière végétale sujette aux traitements thermiques modérés.

Pour sa réalisation, 1000 g de matériel végétal (préalablement concassé uniquement pour les écorces de *P. brazzeana* et les boutons de *E. caryophylla*) sont introduits dans un alambic en inox de 30 L. Un volume d'eau distillée submergeant l'ensemble du matériel végétal est ensuite ajouté. Le Clevenger est par la suite monté sur l'alambic et relié à un recycleur puis, l'alambic est déposé sur une source de chaleur. L'ensemble est porté à ébullition pour libérer les vapeurs chargées d'HEs qui traversent le réfrigérant et se condensent dans une ampoule à décanter de l'appareil. Le procédé d'extraction est arrêté après 5 heures d'hydrodistillation. L'HE est séparée du mélange eau-HE par décantation puis, introduite dans un flacon sombre (**AFSSAPS, 2008**). Après pesée, le flacon d'HE est étiqueté et conservé à 4°C jusqu'à utilisation (**AFSSAPS, 2008**). Les rendements d'extraction des HEs exprimés en pourcentage (%) ont été calculés suivant la formule ci-contre.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'HE (g)}}{\text{Masse du matériel végétal (g)}} \times 100$$

➤ Réalisation des combinaisons d'huiles essentielles

Il consiste à mélanger de façon proportionnée, des produits d'origine naturelle (HEs) afin d'obtenir un résultat équilibré dans le cas d'un accord ou d'une base et de créer une forme olfactive originale dans le cas d'une fragrance (Laruelle, 2007).

La méthode utilisée dans le cadre de notre travail est celle de la formulation pratique décrite par Laruelle en 2007. Cette méthode a été utilisée pour la formulation des quatre combinaisons de différents parfums. Tout d'abord, on établit une feuille de formulation. Dans la colonne de gauche, on aligne les noms des HEs, dans la colonne de droite, sont portés les pourcentages de chaque HEs. Les HEs sont mélangées de façon proportionnée en ajoutant chaque HEs goutte à goutte à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire jetable en plastique. Ceci est fait de manière à obtenir différentes notes de fraîcheur et gamme de fragrance (Tableau VI).

Tableau VI : Récapitulatif des essais combinés à partir des huiles essentielles

HE \ Combi (%)	Combinaison 1	Combinaison 2	Combinaison 3	Combinaison 4
<i>Cymbopogon citratus</i>	60	20	10	10
<i>Eugenia caryophylla</i>	20	60	20	20
<i>Mentha</i> sp cf <i>piperita</i>	10	10	60	10
<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	10	10	10	60
Total	100	100	100	100

II.2.2.2. Détermination des compositions chimiques des huiles essentielles et combinaisons

A travers une collaboration établie entre le Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etudes des Plantes Médicinales du Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I et l'Université de Montpellier, les analyses chimiques des HEs et des combinaisons d'HEs ont été effectuées à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) par l'équipe «Glyco et Nanovecteurs pour le Ciblage Thérapeutique».

Ces analyses ont été effectuées par Chromatographie en Phase Gazeuse au détecteur par ionisation de flamme (CPG-FID) et une analyse complémentaire par couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG / SM) pour s'assurer des identifications complètes des HEs et combinaisons d'HEs.

➤ **Par Chromatographie en phase gazeuse au détecteur par ionisation de flamme**

Les analyses sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse de type TRACE 1300 Thermo scientific équipé de deux colonnes capillaires en silice, une colonne apolaire de TG-5MS (5 % phenyl methylpolysiloxane), 30cm x 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur de film et une colonne polaire TG-WAWMS (polyethylene glycol), colonne capillaire de 30 m x 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur du film. Le gaz vecteur est l'azote (N₂) avec un débit constant de 0,5 mL/min une injection de 2µL d'une solution d'HE diluée au 10/100 diethyl ester, l'injecteur en mode a été split 1 : 20 réglé à 220 °C, le détecteur réglé à 250 °C et un programme de température de 60 à 220 °C à raison de 3 °C/min puis maintenu à 220 °C pendant 17 min. les informations sur l'ordre d'élution des composés et leurs pourcentages sont obtenus grâce au profil chromatographique de la colonne capillaire DB-5(Kemegne *et al.*, 2018).

La détermination des Indices de Rétention Linéaire (IRL) expérimentaux (suivant la formule ci-après) de chacun des composés a permis de les identifier en comparant les valeurs obtenues à celles de la littérature (Adams, 2012), ainsi qu'à celles de la banque de données du Laboratoire de l'IBMM, Equipe Glycochimie et nanovecteurs de l'Université de Montpellier.

$$IRL = 100 \frac{Tr(i) - Tr(n)}{Tr(n) - Tr(n-1)} + 100 \times n$$

Légende : IRL = Indices de rétention linéaire ; Tr(i) = Temps de rétention du composé inconnu ; Tr(n) = Temps de rétention du n-alcane directement élué avant i ; Tr (n+1) = Temps de rétention du n-alcane directement élué après i.

➤ **Par chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse**

Cette dernière a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Agilent 5977 série MSD équipé de deux colonnes capillaires en silice : une colonne apolaire HP-5 MS (30 m x 250 µm diamètre intérieur et 0,25 µm épaisseur du film), (5 % phenyl-methylpolysiloxane) et une colonne polaire HP-ONNOWAX (20 m x 250 µm de diamètre intérieur et 0,25 µm d'épaisseur du film). Le détecteur de masse est de type quadripôle, la température source était de 230 °C et celle du quadripôle de 150 °C. Le programme de température a été 60 °C pendant 2 minutes, 60 à 240 °C à raison de 3 °C/min puis maintenu à 240 °C pendant 8 minutes. La température de l'injecteur a été de 240 °C et la température de

transfert de 250 °C. Le gaz vecteur est l'Hélium avec un débit de 0,7 mL/min, et une injection de type split 20:1 (1µL d'une solution d'HE est diluée à 10 % de dichlorméthane) et l'énergie d'ionisation utilisée était de 70 eV (electromultiplicateur 1000 eV, rapport de masse 33 à 400 amu, taux de balayage 1,56 scan/s).

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leur indice de rétention linéaire déterminé par rapport au temps de rétention relatif d'une série de n-alcanes et sur leur spectre de masse obtenu par CPG/SM (Adams, 2012).

II.2.3. Caractérisation des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs combinaisons

Plusieurs méthodes sont aujourd'hui disponibles pour déterminer l'activité antimicrobienne d'une substance. Le choix du test à utiliser dépend non seulement de la nature de la substance à tester et de celle du microorganisme mais également des paramètres recherchés. La CLSI (2012) a regroupé ces différents tests en deux catégories :

- Les tests qualitatifs *in vitro*, permettant de déterminer la présence ou non des substances à activité antimicrobienne par la détermination des diamètres de zones d'inhibition.
- Les tests quantitatifs *in vitro*, permettant de déterminer les paramètres d'inhibition (CMI, CMB et CMF).

Après isolement et identification des différents isolats microbiens, la caractérisation des propriétés antimicrobiennes des HEs a été effectuée sur quelques isolats sélectionnés. Les critères de sélection des isolats étaient fonction de leur représentativité et de leur capacité à former des biofilm.

Les isolats retenus étaient :

- Isolats bactériens : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter* sp, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*.
- Isolats fongiques : *Candida albicans*, *Candida* sp.

➤ **Préparation de l'inoculum microbien**

Pour chaque microorganisme à tester, des colonies bactériennes provenant d'une culture pure de moins de 24 heures ensemencée sur un milieu gélosé Mueller Hinton Agar et

incubée à 37°C ont été mises en suspension dans les tubes à essai contenant 5ml d'eau physiologique. Egalement une colonie pure de 24 heures de chaque isolat fongique sujet du test, a été mise en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension a été par la suite lue au spectrophotomètre (JENWAY 6305) à la longueur d'onde de 625 nm pour les bactéries et 553 nm pour les levures.

II.2.3.1. Détermination des zones d'inhibitions de la croissance microorganismes par la méthode des disques

Les solutions mères ont été préparées à une concentration de 50 mg/ml (Pour la préparation de cette concentration, 50 µL d'HE sont dissout dans 950 µL d'une solution de tween 40 (7 %, v/v). Des disques en papier Whatman (No. 3) de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 µL de chaque solution mère ont été déposés à la surface d'une gélose pré-ensemencée par la suspension microbienne (1×10^5 UFC/mL pour les levures et 1×10^8 UFC/mL pour les bactéries) en boîte de Pétri. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les isolats bactériennes et pendant 48 heures pour les levures. Des antibiotique de références Gentamicine® à 10 µg/disque et l'Amphotericine B® à 10 µg/disque ont été testés dans les mêmes conditions. Après incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés en millimètres, disques inclus, à l'aide d'un pied à coulisse. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

La souche sera qualifiée de résistant (-) pour les diamètres inférieurs à 8mm ; Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm ; Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm ; Extrêmement sensible (++++) pour les diamètres plus de 20 mm (**Moreira et al., 2005**).

II.2.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimale microbicides

Une solution mère de chaque HE et combinaison à tester a été préparée à une concentration de 5 mg/mL (15 µL d'HE à dissoudre dans 2985 µL d'une solution tween 40 (7 %, v/v). Celle de la Gentamicine® pour les bactéries et l'Amphotericine B® pour *Candida albicans* à 1 mg/mL chacun.

A partir de 100 µL de chaque solution mère, une série de dilutions géométriques de raison 2 est réalisée dans 100 µL de bouillon nutritif supplémenté de 10 % de glucose (BNG) contenu dans les cupules de la microplaque (96 puits). La série de dilutions permet d'obtenir une gamme de concentration allant de 2,5 mg/mL jusqu'à 0,019 mg/mL pour les HEs et les

combinaisons, et de 0,5 à 0,015 mg/mL pour la Gentamicine[®] et l'Amphoteric B[®]. Ensuite 100 µL d'inoculum de charge $1,5 \times 10^8$ UFC/mL pour les bactéries et $1,5 \times 10^5$ UFC/mL pour la levure ont été par la suiteensemencé. Cet inoculum est standardisé par dosage à la longueur d'onde de 625 nm pour les bactéries et 553 nm pour les levures avec une densité optique comprise entre 0,08 – 0,13 (Nancy *et al.*, 2000). Les gammes finales de concentrations étaient de 1,25 à 0,0097 mg/mL pour chaque HE ou combinaison, de 0,25 à 0,0078 mg/mL pour la Gentamicine[®] et l'Amphoteric B[®].

Deux témoins ont été ajoutés à la série, un témoin positif (bouillon nutritif + microorganisme) et un témoin négatif (bouillon nutritif + solution d'HE). Les tests ont été réalisés en triplicate et les microplaques incubées pendant 24 heures à 37 °C pour les bactéries et pendant 24-48 heures à 35 °C pour la levure.

Après incubation, la croissance microbienne est mise en évidence dans chaque puit à l'aide de 20 µL (par puits) d'une solution de blue Alamar, à l'exception des puits qui serviront à la détermination de la CMB ou CMF. Le changement de coloration du milieu du bleu au rose indique la croissance. La CMI est définie comme la plus petite concentration en HEs, pour laquelle il n'y a pas eu croissance microbienne visible (CLSI, 2012).

Les concentrations bactéricides et fongicides sont déterminées en ajoutant à 150 µL de BNG dans 50 µL des préparations provenant des puits aux concentrations supérieures ou égales à la CMI. Après 24 heures d'incubation pour les bactéries et 48 heures d'incubation pour les levures, les concentrations où aucun changement de couleur n'étaient observé après ajout de 20 µL d'une solution de blue Alamar, et sont considérées comme concentrations bactéricides pour les bactéries et fongicides pour la levure. La plus petite de ces concentrations est considérée comme concentration minimal bactéricide (CMB) et concentration minimal fongicide (CMF) (CLSI, 2012).

Le calcul du rapport CMB/CMI a permis de déterminer l'effet bactéricide (CMB/CMI= 1 ou 2), bactériostatique ($4 < \text{CMB/CMI} < 16$), ou tolérante (CMB/CMI >32) des HEs ou des combinaisons d'HEs (CLSI, 2012). De même le rapport CMF/CMI a permis de déterminer l'effet fongicide (CMF/CMI= 1 ou 2), fongistatique ($4 < \text{CMB/CMI} < 16$), ou tolérante (CMF/CMI >32) des HEs ou des combinaisons d'HEs (Nyegue, 2006 ; CLSI, 2012).

II.2.3.3. Activité anti-biofilms des huiles essentielles et des combinaisons d'huiles essentielles

Les CMI de la formation de biofilms homogènes ont été déterminées selon la méthode de **Nostro *et al.* (2007)** avec quelques modifications. Dans un premier temps, une microplaque de 96 puits est remplie par 100 µL de bouillon renfermant une charge bactérienne de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL pour les bactéries et $1,5 \times 10^5$ UFC/mL pour la levure, puis incubée à 37 °C pendant 24 heures et 48 heures respectivement. Après incubation, les cellules microbiennes flottantes sont éliminées des puits par aspiration à l'aide d'une seringue stérile, et les puits sont ensuite rincés trois fois par un tampon phosphate salin (PBS) pour éliminer les cellules faiblement adhérentes. En même temps, dix concentrations de chaque HE sont préparées dans de l'eau distillé plus Tween 80 à 3,33 %. Ensuite, les puits de la microplaque sont remplis par 70 µL de bouillon stérile (Muller–Hinton/Sabouraud) avec 30 µL de chaque concentration, sauf deux rangés sont remplies par 100 µL de bouillon stérile et qui sont considérées comme des témoins. Les concentrations finales de l'HE dans les puits sont comprises entre 12,5 et 0,01 mg/mL et la concentration finale de Tween 80 est à 1 % dans chaque puit. La microplaque est de nouveau ré-incubée dans les mêmes conditions. Après ré-incubation, la révélation de la formation du biofilm est réalisée par ajout d'un volume de 100 µL de cristal violet à 0,1 % et laissé pendant 15 min pour colorer les biofilms. Les puits sont ensuite rincés trois fois par un tampon phosphate salin (PBS) pour éliminer le cristal violet non lié et séchés à 37 °C pendant 2 heures. Après l'ajout d'un volume de 100 µL d'éthanol à 95 % (v/v) dans chaque puits, la plaque est agitée pendant 10 min afin de libérer la coloration à partir des biofilms. Les CMI de la formation de biofilms sont déterminées en tant que les plus faibles concentrations du produit à tester (HE/combo) pour laquelle la coloration n'est pas observée à l'œil nu.

II.2.3.4. Identification des cibles cellulaires des huiles essentielles

Cette partie est réalisée dans le but de déterminer les cibles cellulaires sur lesquelles les HEs agissent afin d'expliquer l'effet inhibiteur de la croissance des bactéries. L'étude s'est essentiellement centrée sur deux cibles cellulaires à savoir : La paroi et la membrane plasmique.

II.2.3.4.a. Expérience de la lyse cellulaire

Principe

Cette méthode permet de déterminer une éventuelle action lytique des HEs sur la membrane des microorganismes par mesure de l'absorbance à 260 nm. En effet, la présence du matériel génétique (ADN et ARN) qui absorbe à 260 nm à l'extérieur des cellules microbiennes caractériserait un effet lytique des HEs sur la membrane du microorganisme. Il y'aura donc bactériolyse si l'absorbance à 260 nm augmente au cours du temps selon (**Carson et al., 2002**).

Mode opératoire

L'analyse de la perte du matériel cellulaire des cellules bactériennes absorbant à 260 nm a été réalisée selon la méthode de **Carson et al., (2002)** avec quelques modifications. Deux colonies bactériennes, ensemencées la veille, ont servi à inoculer 400 mL de milieu MHB. La culture a été incubée à 37 °C, pendant 24 heures. Les bactéries ont ensuite été séparées du milieu de culture par centrifugation à 3500 g, pendant 10 minutes.

Le culot bactérien a ensuite été lavé 2 fois avec du tampon phosphate de sodium (PBS) puis remis en suspension dans du PBS-Tween 80 (0,01%, v/v). La suspension bactérienne obtenue a été standardisée à $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. Ensuite cette suspension a été traitée avec différentes concentrations (1/2 MIC, MIC et $2 \times$ MIC) d'huiles essentielles pendant 1 heure ou à une concentration fixe (MIC) à différents intervalles de temps (30, 60, 90 et 120 min).

La suspension non traitée a été utilisée comme contrôle négatif et la Gentamicine® a été considérée comme contrôle positif. Après traitement des échantillons, l'absorbance du surnageant a été lue à 260 nm utilisant un spectrophotomètre à UV (JENWAY 6305).

II.2.3.4.b. Evaluation de l'intégrité de la membrane cellulaire et de la paroi

Pour confirmer l'effet des HEs sur la membrane et sur la paroi des microorganismes, les biomolécules intracellulaires retrouvés dans le milieu extracellulaire ont été quantifiés. Il s'agit ici d'utiliser le NanoDrop 1000 qui est un spectrophotomètre à spectre complet (220-750 nm) qui mesure 1 µL d'échantillon à haute précision et reproductibilité. Il utilise une technologie de rétention d'échantillon brevetée qui utilise uniquement la tension de surface pour contenir l'échantillon en place (Desjardins et Conklin, 2010). Le contenu des 50 µL est homogénéisé au vortex avant quantification par dosage spectrophotométrique au Nanodrop 1000.

Principe

Le système de rétention NanoDrop microvolume (Thermo Scientific NanoDrop) combine les fonctions de technologie des fibres optiques et les propriétés naturelles de tension de surface pour capturer et retenir des quantités infinies d'échantillon. Par ailleurs, le système utilise la longueur des trajets plus courts, ce qui résulte dans une large gamme de mesures de concentration d'acides nucléiques, éliminant la nécessité d'effectuer des dilutions et réduisant le volume d'échantillon requis pour l'analyse spectroscopique (Desjardins et Conklin, 2010).

Protocole

Après ouverture du logiciel de l'appareil, le paramètre à mesurer a été sélectionné (ADN, ARN, ou protéines). L'essai à blanc a été réalisé dans le but de calibrer l'appareil, cette opération s'est effectuée par dépôt d'1 µL du milieu extérieur contenant les cellules qui pour nous a été le milieu de culture de base préparé, sur la partie inférieure optique et le bras de levier a été abaissé puis l'opération « *blank* » a été sélectionné. Cette opération a été faite deux fois selon les recommandations données par l'appareil. Une fois le calibrage terminé, les deux surfaces optiques ont été nettoyées avec du papier absorbant et il s'en est donc suivit la mesure de la quantité des différents paramètres présents dans les échantillons. Puis, 1 µL d'échantillon a été pipeté et déposé sur la partie inférieure optique, le bras de levier abaissé et l'opération « *measured* » a été sélectionné. Après chaque mesure l'opération de calibrage est effectuée.

Le rapport de l'absorbance de l'échantillon à 260 et à 280 nm a été utilisé pour évaluer la pureté par rapport à l'ADN. Un échantillon dont ce ratio est compris entre 1,8 et 2 est généralement considéré comme « pur » pour l'ADN ; si le rapport est sensiblement inférieur,

il peut indiquer la présence de protéines, de phénol ou d'autres Contaminants qui absorbent fortement à près de 280 nm (Desjardins et Conklin, 2010).

Les résultats du NanoDrop nous ont donc permis d'évaluer la présence ou l'absence de biomolécules hors de la cellule, et de conclure à une perturbation de l'intégrité membranaire et une diminution de la rigidité de la paroi cellulaire par les HEs.

II.2.4. Formulation et caractérisation des solutions de bain de bouche à base des combinaisons d'huiles essentielles

II.2.4.1. Formulation des solutions pour bain de bouche à base des combinaisons d'huiles essentielles

Les combinaisons d'HEs et d'autres composants ont permis de formuler les solutions de bains de bouche selon le protocole de Farid *et al.* (2012) avec quelques modifications. Ces composants étaient constitués de l'acide citrique, de l'Aspartam (Canderel®), du bicarbonate de Sodium, du méthyl Salicylate, du Tween 80, de l'alcool (éthanol à 95°) et de l'eau distillée stérile. Ceci nous a permis d'obtenir quatre formules (F1, F2, F3, F4) à partir des quatre combinaisons préalablement obtenues.

II.2.4.2. Biofilms dentaires et leurs traitements avec les solutions de bain de bouche

Les biofilms ont été établis selon le modèle de biofilm Zürich avec quelques modifications (Guggenheim *et al.*, 2001), qui a décrit un modèle de biofilm supragingival dans lequel les cellules sont cultivées dans un milieu à base de la salive sur des disques d'hydroxyapatites. Dans cette étude, les incisives de bœuf ont été utilisées comme support pour la formation du biofilm et l'eau physiologique stérile comme milieu réactionnel.

Traitement des dents : Après leur extraction, les dents ont été raclées puis trempées dans une solution d'hyperchlorite de sodium (NaClO) à 5 % pendant 2 heures, afin d'éliminer les débris organiques attachés à la racine. La solution de NaClO a été renouvelée toutes les 30 min (3 renouvellements ont été réalisés). Après élimination des débris, les dents sont ensuite rincées abondamment à l'eau distillée et stérilisées à 120 °C pendant 20 min, puis conservées à 4 °C jusqu'à utilisation.

Préparation des isolats microbiennes : Les isolats bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* (Sa 2), *Streptococcus* sp (St 1) ont été maintenues sur MHA à 37 °C dans des boîtes de Pétri. Après vérification de la pureté microscopique, chaque

inoculum a été préparé dans 10 mL de MHB et ajustée à une DO de 625 nm qui correspond à environ $1,5 \times 10^8$ UFC/mL avec une densité optique comprise entre 0,08 – 0,13 (Nancy *et al.*, 2000). L'incubation a ensuite été effectuée pendant 15 heures à 37 °C. Les cultures de semences de chaque espèce (200 µL) ont été préparées à partir des pré-cultures dans 10 mL de bouillon et incubées à 37 °C pendant 7 heures.

Préparation des biofilms : Les dents préparées et stérilisées ont été placées dans les tubes contenant de l'eau physiologique stériles pendant 4 heures. Ensuite 1,6 mL d'eau physiologique ont été prélevés de chaque tube et remplacée par 1,6 mL de mélange (800 µL eau physiologique + 800 µL bouillon), puis ajouter 200 µL de la culture de semence. Les tubes ont été incubés par la suite à 37 °C pendant 16 heures 30 min pour les biofilms jeunes et 64 heures 30 min pour les biofilms matures. Concernant les biofilms matures, les milieux d'incubation ont été remplacés à 16 heures 30 min par aspiration du milieu utilisé et ajout du milieu frais (800 µL eau physiologique + 800 µL bouillon). Ce remplacement a eu lieu chaque 24 heures et les tubes sont incubés à 37 °C à chaque fois.

Traitement des biofilms avec les bains de bouche : Après leur durée d'incubation désignée, les dents sont transférées dans de nouveaux tubes contenant 1 mL de solution de bain de bouche. Une solution physiologique saline stérile a été utilisée comme contrôle négatif. Après l'exposition d'une minute, les dents sont rincées 3 fois dans 2 mL de solution saline physiologique (10 secondes par immersion), puis transférées dans 1,6 mL du milieu frais contenant (800 µL eau physiologique + 800 µL bouillon) et incubées à 37 °C. La procédure a été répétée après 4 heures et ensuite après 8 heures de temps plus tard. Dans ces deux derniers temps d'exposition les milieux d'incubation n'ont pas été remplacés. Après la 3^{ème} exposition d'une minute, les dents ont été incubées à 37 °C pendant 16 heures (à la fin de toute l'expérimentation, l'âge des biofilms jeunes était de 40 heures 30 min (moins de 2 jours) et celle des biofilm matures est de 88 h 30 min (moins de 4 jours).

Récolte de biofilm : Après leur durée d'incubation désignée, les dents ont été rincées puis agitées doucement dans du sérum physiologique stérile afin d'éliminer les bactéries faiblement adhérentes. Pour récolter le biofilm formé, chaque dent a été placée dans une boîte de Pétri stérile et la surface de la dent a été raclée à l'aide d'une lame de bistouri stérile. Le produit obtenu après raclage de la dent a été rincées avec 1 mL d'eau physiologique stérile et la suspension a été vigoureusement mélangée pendant 2 min au vortex. Des dilutions en séries ont été réalisées, puis 100 µL de chaque dilution ont été étalés sur le milieu MHA. Les

milieux de cultures sont ensuite placés en incubation à 37 °C et après 72 heures d'incubation, le nombre des UFC (unités formant colonies) ont été comptées.

II.2.4.3. Analyse sensorielle des solutions des bains de bouche

Principe

Les solutions sont présentées à un panel juge selon un plan d'expérience défini en fonction des objectifs qui vise à évaluer la qualité, l'acceptabilité, et le type de produit que nous avons pris le soin de formuler en vue de donner un produit qui combine à la fois les qualités organoleptiques et antimicrobiennes acceptables. Les panelistes apportent leurs réponses sur des questionnaires spécifiques à chaque test, afin de mettre en évidence les qualités et les défauts en termes de parfum et fraîcheur des bains de bouche à tester selon la fiche d'analyse sensorielle (Annexe 2).

Sélection et formation du jury

Un jury constitué de 30 personnes a été sélectionné au hasard et formé à l'évaluation sensorielle des bains de bouche formulés. Cette formation consistait à leur expliquer le but du travail et comment effectuer l'analyse sensorielle.

Préparation à l'analyse

Avant d'effectuer l'analyse, le panel juge a été informé des différentes étapes de l'analyse et entraîné.

Protocole expérimental

Il était question de décrire et d'évaluer chaque bain de bouche en termes de parfum qui se dégage, la note de fraîcheur et l'acceptabilité du produit. Ainsi, les mouillettes sont imprégnées des solutions et placées près du nez du paneliste afin donner son appréciation en remplissant le questionnaire mis à sa disposition (Lefebvre, 2003).

II.2.5. Analyses statistiques et représentations graphiques des courbes

Les représentations graphiques ont été obtenues en utilisant le Tableur Windows Microsoft Excel 2013 et le logiciel GraphPad/Prism 7. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant les logiciels GraphPad/Prism 7 et ANOVA Windows SPSS 23, student t-test, avec un seuil de significativité $p < 0,05$.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESSULTATS

III.1.1. Profils microbiologiques des infections buccodentaires dans la population d'étude

III.1.1.1. Répartition et fréquences des microorganismes en fonction des types d'infections buccodentaires

III.1.1.1.1. Répartition des différentes infections buccodentaires en fonction du sexe.

Les prélèvements bucco-dentaires ont été effectués sur les échantillons provenant de 31 patients dont 18 femmes et 13 hommes venus en consultation à la clinique dentaire 'La ROSE' situé au quartier Etoug-ébé (Yaoundé) de Juin à Décembre 2017. Les types d'infections ont été notés pour chaque malade et la valeur du nombre total de patients atteints a été exprimée en pourcentage. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Fréquence et types d'infections buccodentaires

Patients	Infections buccodentaires						Total
	Carie dentaire	Pulpite	Abcès parodontal	Granulome apical	Péricoronarite	Poche parodontale	
Femmes	9	5	1	0	1	2	18
Hommes	6	4	1	2	0	0	13
Total patients	15	9	2	2	1	2	31
Fréquences de patients (%)	48,39	29,0	6,46	6,46	3,22	6,46	100

Il ressort que, la carie dentaire est la maladie la plus représentée avec une fréquence de 48,39 %, avec 9/15 femmes et 6/15 hommes. La seconde pathologie buccodentaire est la pulpite avec une fréquence totale de 29 %, avec 5/9 femmes et 4/9 hommes diagnostiqués. Les cas d'abcès parodontaux, de granulome apical et de poche parodontale sont également notés avec une fréquence égale à 6,46 % chacun.

III.1.1.1.2. Répartition des microorganismes en fonction des types d'infections buccodentaires

III.1.1.1.2.a. Genres ou espèces microbien (nes) identifié (es) de chaque type d'infection

À l'issue des différentes techniques utilisées, plusieurs types de microorganismes ont été identifiés. Le tableau VIII représente pour chaque infection, les genres et espèces microbien(ne)s obtenu(e)s et regroupé(e)s selon leurs types microbiens et leurs formes.

Tableau VIII : Microorganismes identifiés en fonction de la pathologie buccodentaire

Types d'infections	Types Gram	Types microbiens	Noms des genres ou des espèces microbiens retrouvés
Caries dentaires	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> sp, <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> .
		Bacilles	<i>Listeria murrayi</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp.
	Bactéries Gram -	Bacilles	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> .
	-	Levures	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida</i> sp.
Pulpites	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> sp, <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> .
		bacilles	<i>Corynebacterium striatum</i> , <i>Bacillus cereus</i> ,
	Bactéries Gram -	bacilles	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Actinobacillus</i> sp. <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Actinobacillus sius</i> , <i>Aeromonas</i> sp, <i>Actinomyces</i> sp.
		-	levures
Abcès gingival	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus</i> sp, <i>staphylococcus simulans</i>
Granulome apical	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus</i> sp.
	Bactéries Gram -	bacille	<i>Proteus mirabilis</i>
Péricoronarite	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus</i> sp.
	Bactéries Gram -	bacille	<i>Pasteurella</i> sp.
Poche parodontale	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus</i> sp, <i>Streptococcus mutans</i> .
	Bactéries Gram -	bacilles	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter amnigenus</i> 1, <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
Abcès gingival	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus</i> sp, <i>staphylococcus simulans</i>
Granulome apical	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus</i> sp.
	Bactéries Gram -	bacille	<i>Proteus mirabilis</i>
Péricoronarite	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus</i> sp.
	Bactéries Gram -	bacille	<i>Pasteurella</i> sp.
Poche parodontale	Bactéries Gram +	Cocci	<i>Staphylococcus</i> sp, <i>Streptococcus mutans</i> .
	Bactéries Gram -	bacilles	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter amnigenus</i> 1, <i>Klebsiella pneumoniae</i> .

Il ressort de ce tableau que dans chaque pathologie buccodentaire, sont retrouvées les bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif à l'exception de l'abcès gingival où l'on observe uniquement les Gram +. Les cocci et les bacilles constituent les formes bactériennes représentatives de toutes les infections, excepté les cas d'abcès gingivaux où l'on observe uniquement les cocci.

En ce qui concerne la diversité microbienne, la carie dentaire et la pulpite sont les maladies qui présentent une diversité étiologique plus importante avec respectivement 8 et 11 genres identifiés. Par ailleurs nous notons que le genre *Staphylococcus* est présent dans tous

les types d'infections, tandis que le genre *Candida* est retrouvé uniquement dans les cas de carie dentaire et de pulpite. L'espèce *Streptococcus mutans* qui est fréquemment citée comme agent causal dans les pathologies buccodentaires est retrouvée dans les cas de carie dentaire, de pulpite et de poche parodontale. Egalement sont retrouvés le genre *Bacillus* et les entérobactéries du genre *Klebsiella* et *Enterobacter* dans les cas carie dentaire, pulpite et poche parodontale.

Dans cette étude, les genres *Citrobacter*, *Listeria* et *Proteus* presque pas cités dans les pathologies buccodentaires sont identifiés dans les cas de pulpite et de poche parodontale, de carie dentaire, de pulpite et granulome apical respectivement.

III.1.1.1.2.b. Répartition des isolats identifiés selon le type microbien

Au terme de la phase d'isolement des microbes responsables des affections buccodentaires chez 31 patients, 61 germes microbiens ont été isolés et identifiés. Ceux-ci ont été répartis selon leur type microbien (bactérie ou levure) et leur type Gram. La figure 21 ci-dessous donne l'ensemble des résultats obtenus de cette répartition.

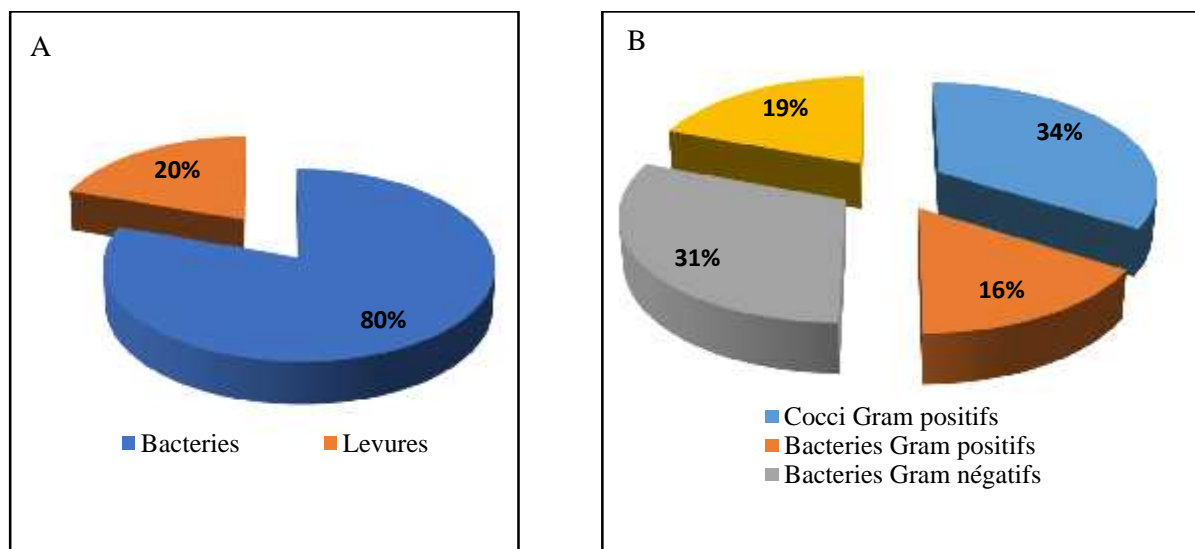


Figure 21 : A = Pourcentage des types microbiens isolés (bactéries ou levures) ; B = Répartition des isolats bactériens en fonction de leur type Gram

Il ressort de cette figure que les bactéries sont les plus représentées comparativement aux levures avec des proportions de 80 et 20 % respectivement. Parmi les isolats bactériens identifiés, les cocci Gram positifs sont les plus représentés avec une fréquence de 34 %. Ensuite viennent les bacilles Gram négatifs avec une proportion de 30 % et enfin les bacilles Gram positif avec un 16 %.

III.1.1.1.2.c. Fréquences des espèces identifiées

La fréquence de chaque espèce microbienne a été déterminée pour l'ensemble des isolats obtenus (tableau IX). Il ressort que dans l'ensemble des isolats, l'espèce majoritaire est le *Candida albicans* avec une fréquence de 13,08 %, suivi des espèces *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* avec une fréquence de 8,20 % chacune. Les espèces *Streptococcus viridans* et *Enterobacter cloacae* sont également bien représentées dans nos isolats microbiens car elles obtiennent une fréquence de 6,56 % chacune. Les espèces telles que *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida sp 1* ont chacune une fréquence de 4,92 %. D'autres espèces telles que *Bacillus subtilis* et *Klebsiella oxytoca* obtiennent une fréquence de 3,28 %. Enfin, les espèces les moins représentées avec une fréquence de 1,64 % sont : *Enterococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Listeria murrayi*, *Corynebacterium sp*, *Corynebacterium striatum*, *Actinobacillus sp*, *Actinomyces sp*, *Aeromonas sp*, *Proteus rettgerii* et *Candida sp 2*.

Tableau IX : Fréquence des espèces identifiées dans l'ensemble des isolats obtenus

Types de microorganismes	Espèces identifiées	Fréquence des espèces identifiées (%)
Cocci Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	8,20
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,56
	<i>Staphylococcus hominis</i>	4,92
	<i>Staphylococcus simulans</i>	4,92
	<i>Streptococcus mutans</i>	6,56
	<i>Enterococcus sp</i>	1,64
	<i>Streptococcus sp</i>	1,64
Bacilles Gram +	<i>Bacillus cereus</i>	8,20
	<i>Bacillus subtilis</i>	3,28
	<i>Listeria murrayi</i>	1,64
	<i>Corynebacterium sp</i>	1,64
	<i>Corynebacterium striatum</i>	1,64
	<i>Citrobacter freundii</i>	1,64
Bacilles Gram -	<i>Actinobacillus sp</i>	1,64
	<i>Actinobacillus sius</i>	1,64
	<i>Actinomyces sp</i>	1,64
	<i>Aeromonas sp</i>	1,64
	<i>Enterobacter cloacae</i>	6,56
	<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	1,64
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3,28
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,92
	<i>Proteus mirabilis</i>	3,28
<i>Proteus rettgerii</i>	1,64	
Levures	<i>Candida albicans</i>	13,08
	<i>Candida sp 1</i>	4,92
	<i>Candida sp 2</i>	1,64

III.1.1.2. Résultat de l'évaluation de la formation de biofilm par les isolats

L'évaluation de l'aptitude des isolats à former les biofilms a été réalisée sur les isolats bactériens choisis pour la réalisation des tests antimicrobiens (22 au total, plus une souche de référence, Tableau X). Cette capacité de former des biofilms par ces souches ont été testées par trois techniques différentes : la méthode du Rouge Congo Agar (RCA), la méthode en tube (MT) et la méthode de culture en plaque (TCP).

Tableau X : Isolats sélectionnés pour l'évaluation de la formation de biofilm

Isolats	Nombres
<i>Staphylococcus aureus</i>	05
<i>Streptococcus</i> sp	01
<i>Bacillus cereus</i>	03
<i>Bacillus subtilis</i>	02
<i>Enterobacter clocae</i>	02
<i>Klepsiella pneumoniae</i>	02
<i>Klepsiella oxytoca</i>	02
<i>Candida albicans</i>	03
Candidat sp 1	01
Candidat sp 2	01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	01

III.1.1.2.1. Technique Rouge Congo Agar (RCA)

La recherche de la production de slime ou glycocalyx (matrice d'exo-polysaccharide adhésive) sur milieu rouge Congo a révélé que 09/22 isolats sont producteurs de slime contre 10/22 non producteurs. Soit 02 *Staphylococcus aureus*, 01 *Streptococcus* sp, 02 *Enterococcus clocae*, 01 *Klebsiella pneumoniae*, 01 *Klebsiella oxytoca*, 02 *candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Egalement 03 isolats ont montrés un aspect intermédiaire de la formation de biofilm. La figure 22 montre la formation de slime par un isolat de *Staphylococcus aureus* sur le milieu RCA. En A nous avons l'aspect du milieu RCA coulé en boîte de Pétri, les colonies non formatrices de biofilms représentées en B ont une coloration rouge. En C les colonies intermédiaires ou moyennement formatrices de biofilms ont un centre noir et des contours rouges et en D les colonies fortement formatrices de biofilms quant à elles ont une coloration noir sur milieu RCA.

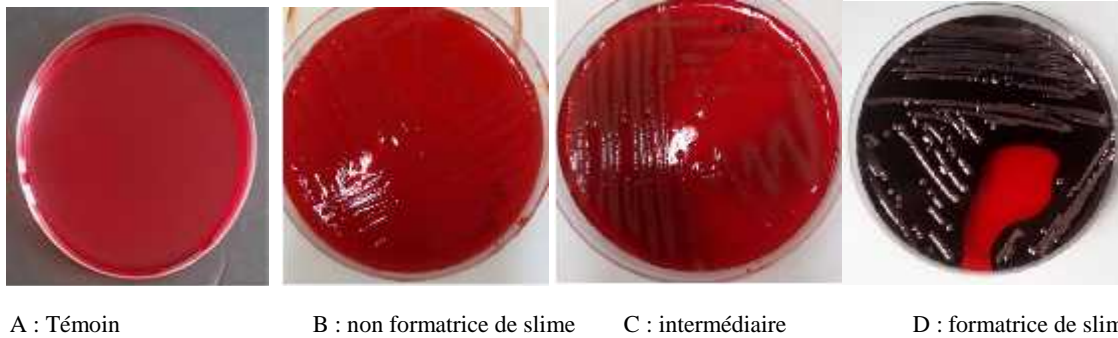


Figure 22 : Photographie de la formation de slime chez un isolat de *Staphylococcus aureus* sur milieu Rouge Congo (**Photo ngongang**)

III.1.1.2.2. Technique en Tube (TM)

Selon la technique TM et sur l'ensemble des souches testées (22), 7/22 isolats ont été fortement formatrice du biofilm. Soit 01 *Bacillus subtilis*, 01 *Staphylococcus aureus*, 01 *Streptococcus* sp, 02 *Bacillus cereus*, 01 *Enterococcus clocae*, 01 *Klebsiella oxytoca* et *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

III.1.1.2.3. Technique de Culture en plaque (TCP)

La détermination quantitative de la formation de biofilm par les différents isolats utilisés a été réalisé par la technique sur microplaques TCP. Après 24 heures d'incubation à 37° C, la formation des biofilm a été mesurée par absorbances à 570 nm du colorant incorporé par les cellules formants des biofilms. Avec des valeurs de DO_{570} (moyenne \pm écartype) qui varient entre $0,28 \pm 0,04$ et $1,15 \pm 0,07$ (Figure 24).

Cette figure montre que les 15/22 isolats ont montrés une capacité à former le biofilm avec une $DO_{570} > 0,240$. Soient 3/5 isolats de *Staphylococcus aureus* (Sa 2, Sa 3 et Sa 5), 1/1 isolat de *Streptococcus* sp (St 1), 2/3 isolats de *Bacillus cereus* (Bc 2 et Bc 3), 1/2 isolat de *Bacillus subtilis* (Bs 1), 2/2 isolats d'*Enterobacter cloacae* (Ec 1 et Ec 2), 1/2 isolat de *Klebsielle pneumoniae* (Kp 2), 2/2 isolats de *Klebsiella oxytoca* (Ko 1 et Ko 2), 2/3 isolats de *Candida albicans* (Ca 2 et Ca 3), 1/1 isolats de *Candida* sp 1 (C sp 1) et la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Ps ATCC 27853). La figure 23 nous présente l'aspect des biofilms formés en microplaque après coloration au cristal violet.

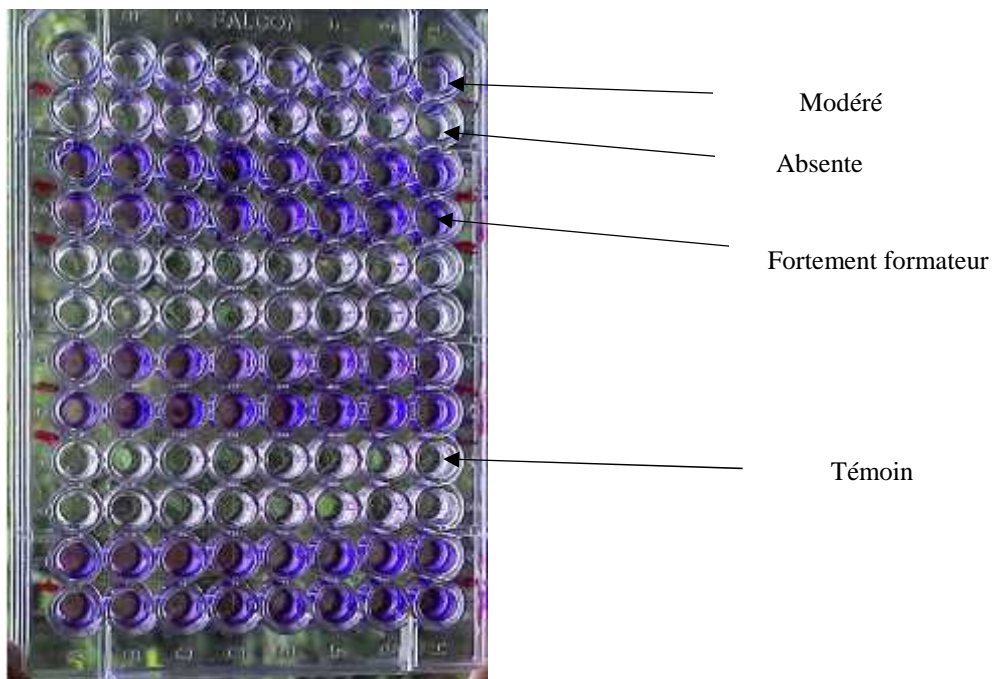
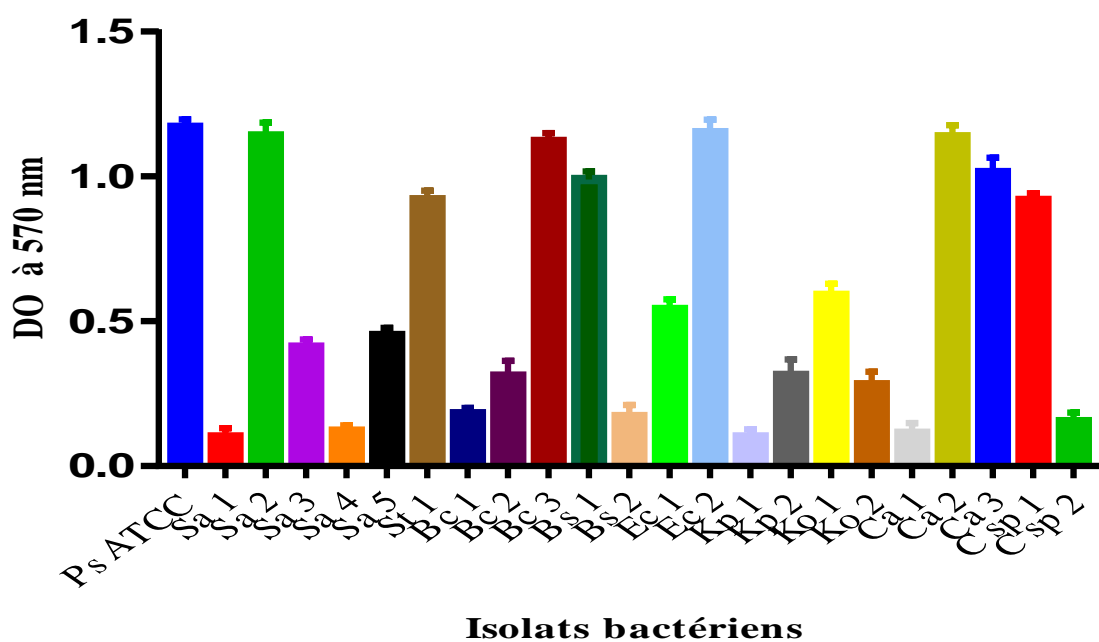


Figure 23 : Photographie de la microplaque montrant la formation de biofilm (**Photo ngongang**).



Do : Densité optique

Figure 24 : Formation de biofilm par la méthode TCP

Le tableau XI ci-contre nous présente le récapitulatifs des résultats de la formation de biofilm par les techniques RCA, TM et TCP. Il ressort que les isolats présentaient les phénotypes variables. Les isolats ayant présentés la formation de slime par la méthode RCA ont également présentés la capacité de former le biofilm par la méthode et TCP. Mais certains isolats ayant montrés leurs capacités à former un biofilm pas TCP ne le sont pas toujours en utilisant la méthode RCA et TM.

Tableau XI : Récapitulatif des résultats de la formation de biofilm par les trois techniques TM, TCP et RCA

Technique	Isolats		
	Fort	Modéré	Absence
RCA	09 02 <i>Staphylococcus aureus</i> , 01 <i>Streptococcus</i> sp, 02 <i>Enterococcus clocae</i> , 01 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 01 <i>Klebsiella oxytoca</i> , 02 <i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	03 01 <i>Staphylococcus aureus</i> , 01 <i>Klebsielle pneumoniae</i> , 02 <i>Klebsiella oxytoca</i> .	10 02 <i>Staphylococcus aureus</i> , 02 <i>Bacillus cereus</i> , 01 <i>Bacillus suptilus</i> , 02 <i>Enterobacter cloacae</i> , 01 <i>Candida albicans</i> , 01 <i>Candida</i> sp 1, 01 <i>Candida</i> sp 2.
TM	07 01 <i>Staphylococcus aureus</i> , 01 <i>Streptococcus</i> sp, 01 <i>Bacillus suptillus</i> , 02 <i>Bacillus cereus</i> , 01 <i>Enterococcus cloca</i> , 01 <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	09 04 <i>Staphylococcus aureus</i> , 01 <i>Bacillus suptillus</i> , 01 <i>Bacillus cereus</i> , 01 <i>Enterococcus cloca</i> , 01 <i>Klebsiella oxytoca</i> , 01 <i>Klebsielle pneumoniae</i> .	06 01 <i>Klebsielle pneumoniae</i> , 03 <i>Candida albicans</i> , 01 <i>Candida</i> sp 1, 01 <i>Candida</i> sp 2.
TCP	15 03 <i>Staphylococcus aureus</i> , 01 <i>Streptococcus</i> sp, 02 <i>Bacillus cereus</i> , 01 <i>Bacillus suptilus</i> , 02 <i>Enterobacter cloacae</i> , 01 <i>Klebsielle pneumoniae</i> , 02 <i>Klebsiella oxytoca</i> , 02 <i>Candida albicans</i> , 01 <i>Candida</i> sp 1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	03 01 <i>Bacillus cereus</i> , 01 <i>Bacillus suptilus</i> , 01 <i>Candida</i> sp 2.	04 02 <i>Staphylococcus aureus</i> , 01 <i>Klebsielle pneumoniae</i> , 01 <i>Candida albicans</i> .

III.1.2. Rendement d'extraction et compositions chimiques des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles

III.1.2.1. Rendement d'extraction des huiles essentielles

Au terme des extractions, les HEs ont été pesées et les rendements d'extraction déterminés en rapportant la masse de l'HE à celle du matériel végétal hydrodistillé. Les valeurs obtenues sont mentionnées dans le tableau XII ci-dessous. Les rendements en HEs obtenus par hydrodistillation des échantillons végétaux variaient de 0,043 % à 1,7 %. *E. caryophylla* avait le plus fort rendement à 1,7 %.

Tableau XII: Rendements d'extraction des HEs des plantes

Plantes	Rendements (%)
Pb	0,043
Ec	1,70
Cc	0,28
Mp	0,047

Légende : **Pb :** *Pentadiplandra brazzeana* ; **Ec :** *Eugenia caryophylla* ; **Cc :** *Cymbopogon citratus* ; **Mp :** *Mentha* sp cf *piperita*

III.1.2.2. Composition chimique des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles

Après analyse de la composition chimique des différentes HEs, les résultats ont été consignés dans le tableau XIII ci-dessous.

Le tableau présente les différents composés majoritaires et leurs pourcentages. Il ressort de celui-ci que l'HE d'*Eugenia caryophylla* possède plusieurs composés. L'eugénol est le composé majoritaire avec un pourcentage de 70 %, suivi de l'acétate d'eugénol et le -caryophyllène avec des pourcentages respectifs de 16,2 % et 5,2 %. De l'HE de *Cymbopogon citratus*, nous notons 5 composés majoritaires dont les plus importants sont le géraniol et le néral avec des pourcentages respectifs de 33,8 % et de 24 %. Ils sont suivis du nérol, géraniol et myrcène qui représentent des pourcentages presque similaires de 8,5 %, 7,3 % et 6,9 % respectivement. L'HE de *Mentha* sp cf *piperita* possède de 4 composés majoritaires avec un pourcentage élevé de 50,7 % de piperitone. Il est suivi du -phallandrène et de l'acétate de menthyl avec des proportions presque similaires de 21 % et 19,3 % respectivement. L'HE de *Pentadiplandra brazzeana* est fortement composée d'isothiocyanate de benzyle avec un

pourcentage élevé à 86,8 %. Elle contient également le p-méthoxybenzaldéhyde et le phénylacétonitrile avec des pourcentages moins élevés de 9,1 % et 2,7 % respectivement.

Tableau XIII : Pourcentages et classes chimiques des composés des huiles essentielles.

Composés	IRL	Pourcentage des composés (%)			
		<i>P. brazzeana</i>	<i>M. sp cf piperita</i>	<i>E. caryophylla</i>	<i>C. citratus</i>
-Pinène	940	-	0,6	0.4	2.4
Camphène	943	-	-	-	0.3
Sabinène	957	-	-	-	1.8
Benzaldéhyde	963	0.2	-	-	-
-Pinène	985	-	0.7	0.7	1.0
Myrcène	995	-	1.4	-	6.9
(Z)- -Ocimène	1038	-	-	0.6	-
-Phellandrène	1043	-	21.0	-	-
Hydrate de <i>trans</i> -sabinène	1047	-	-	-	1.3
(E)- -Ocimène	1049	-	0.2	-	0.3
Hydrate de <i>cis</i> -sabinène	1062	-	0.1	-	-
Terpinolène	1090	-	-	1.7	1.0
Linallol	1103	-	-	-	1.5
2,3 Octa-3,4-diéнал	1115	-	-	-	0.2
Phénylacétonitrile	1143	2.7	-	-	-
Camphre	1144	-	-	-	0.8
Citronellal	1151	-	-	-	0.3
Hydrate de <i>cis</i> -Pinène	1161	-	0.3	-	-
Bernéol	1164	-	-	-	1.2
Menthol	1170	-	0.3	-	-
Terpinen-4-ol	1183	-	-	-	2.6
<i>p</i> -Menth-1,5-diène-8-ol	1186	-	0.4	-	-
Nérol	1248	-	-	-	8.5
Acétate de Linalol	1252	-	-	0.3	-
Acétate de Menthyle	1257	-	19.3	-	-
Néral	1262	-	-	-	24.0
Géranol	1279	-	-	-	7.3
Pipéritone	1277	-	50.7	-	-
<i>Trans</i> -sabinyl acétate	1289	-	-	0.7	-
Géranial	1297	-	-	-	33.8
Acétate de Géranyl	1301	-	-	-	0.3
-Terpineol acetate	1344	-	0.1	-	-
Acétate de dihydrocarvéol néosi	1355	-	0.1	-	-
<i>p</i> -Méthoxybenzaldéhyde	1370	9.1	-	-	-
(E)-Caryophyllène	1377	-	-	-	0.2
Undécanol <n->	1388	-	0.3	-	-

β-Cubunène	1391	-	0.1	-	-
Isothiocyanate de benzyle	1403	86.8	-	-	-
-Humulène	1424	-	0.7	-	-
Eugénol	1440	-	-	70.0	-
Trans propanoate de Carvyl	1447	-	0.3	-	-
Muuroène	1456	-	0.1	-	-
-Amorphène	1465	-	0.2	-	-
β-Caryophyllène	1469	-	0.1	5.2	-
(E)- -Ionone	1484	-	-	-	0.5
Germacrène	1486	-	0.9	0.2	0.4
< >-Cadinène	1510	-	-	0.7	-
-Cadinène	1521	-	0.1	-	0.2
Trans hydrate de Sesquisabinène	1536	-	0.1	-	-
Acétate d'Eugénol	1537	-	-	16.2	-
Sesquithujène	1595	-	0.1	-	0.3
Naphtalène <2- acetyl->	1597	-	-	0.6	-
p-Méthoxy isothiocyanate de benzyle	1603	1.0	-	-	-
Cinamaldehyde<hydro->	1615	-	0.1	-	-
Epoxyde de β-Cedène	1637	-	0.1	-	-
Selin-11-en-4 -ol	1970	-	-	0.6	-
Total (%)		99.8	98.4	97.9	97.1

Après avoir combiné les HEs, les composés précédemment présents dans chaque HE ont diminués en pourcentage. Le tableau XIV ci-dessous présente les différents composés majoritaires et leurs pourcentages. Il ressort de ce tableau que la combinaison 1 (en majorité constitué de 60 % d'HE de *Cymbopogon citratus*) comprend 4 composés majoritaires avec un pourcentage élevé de 26,2 % pour l'isothiocyanate de benzyle, suivi du géraniol, linalol et carvone avec des proportions respectives de 18,4 % , 5,6 % et 4,8 %. La combinaison 2 (en majorité constitué de 60 % d'HE d'*Eugenia caryophylla*) possède 5 composés majoritaires dont les plus importantes sont l'eugénol, le nérol, le géraniol, l'isothiocyanate de benzyle et le carvone avec des pourcentages respectifs de 33,9 %, 12,6 %, 11,9 %, 9,2 % et 7,3 %. La combinaison 3 (en majorité constitué de l'HE de *Mentha* sp cf *piperita*) est composée en majorité de carvone avec un pourcentage de 43,2 %, suivi de l'eugénol et l'isothiocyanate de benzyle avec des pourcentages de 17,4 % et 9,7 % respectivement. De même dans la combinaison 4 (en majorité composé de l'HE de *pentadiplandra brazzeana*), 3 composés majoritaires sont relevé à savoir l'eugénol avec un pourcentage de 39,5 %, suivi de l'isothiocyanate de benzyl et le carvone avec des pourcentages respectifs de 35,0 % et 5,9 %.

La composition chimique des combinaisons montre que l'activité antimicrobienne pourra bien être fonction des composés présents.

Tableau XIV : Pourcentages des composés des essais combinés avec les huiles essentielles.

Composés	IR	Pourcentage des composés (%)			
		Combinaison 1	Combinaison 2	Combinaison 3	Combinaison 4
-Méthyl-5-heptane-2-one	953	-	-	-	0.1
-Pinène	980	-	0.2	-	-
Myrcène	987	3.7	1.6	0.6	0.2
<i>p</i> -Methylanisol	1017	-	0.5	-	-
-limonène	1020	0.9	-	3.5	0.4
Cinéole	1025	0.1	0.9	-	-
Linalol	1002	5.6	5.6	4.6	2.4
Benzyl isocyanate	1123	1.0	2.1	0.8	0.7
Phénylacétonitrile	1139	0.2	0.4	0.3	1.2
Acétate de benzyle	1162	0.2	1.5	1.3	0.7
Terpinen-4-ol	1171	-	-	0.2	-
Carvéol	1193	1.1	0.2	2.2	0.3
Géranial	1253	18.4	11.9	0.5	3.6
Carvone	1258	4.8	7.3	43.2	5.9
Nérol	1280	23.1	12.6	4.2	3.4
Anéthol	1285	-	-	-	0.1
Eugénol	1415	0.2	33.9	17.4	39.5
Isothiocyanate de benzyle	1442	26.2	9.2	9.7	35.0
- Caryophyllène	1467	2.6	1.1	2.4	2.3
Acétate de Cinnamyl	1470	0.3	-	-	0.1
-Humulène	1489	0.5	0.4	0.3	0.3
D-Germacrène	1501	0.2	0.2	0.6	0.3
Acétate d'Eugenyl	1533	1.3	2.5	0.9	1.0
Oxide de Caryophyllène	1591	0.5	1.1	0.3	0.3
Murolol	1655	-	0.2	0.2	-
Cadinol	1671	0.2	-	-	0.1
Fornésol	1710	0.3	0.4	0.3	0.1
Benzoate de benzyle	1767	1.2	1.3	1.3	0.7
Total (%)		92.6	95.1	94.8	98.7

Les différentes combinaisons étant constituées de l'ensemble d'huiles essentielles à des proportions variées, nous avons estimé judicieux de faire ressortir un récapitulatif des composés majoritaires des huiles essentielles prises individuelles et ceux des combinaisons,

ainsi que leurs pourcentages. Le tableau XV ci-dessous représente le récapitulatif. Il en ressort que, les proportions des composés majoritaires dans les combinaisons diminuent comparées aux huiles essentielles individuelles. On note par exemple dans la combinaison 1 constituée de 60 % d'HE de *Cymbopogon citratus* un pourcentage en géraniol (composé majoritaire) de 18,4 %, par contre ce pourcentage est de 33,8 % dans l'HE de *Cymbopogon citratus*. Egalement, on observe la formation de deux nouveaux composés dans cette combinaison. Il s'agit du linalool à 5,6 % et du carvone à 4,8 %. On note aussi dans la combinaison 3 constituée de 60 % d'HE de *Mentha* sp cf *piperita* que le carvone, l'eugénol et l'isothiocyanate de benzyle sont apparus comme composés majoritaires de ce dernier. Alors que le pipéritone, le -Phéllandrène et l'acétate de menthyle composés majoritaires de *Mentha* ont totalement disparus.

Tableau XV : Tableau récapitulatif des composés majoritaires des HEs et des combinaisons d'HEs

Huiles essentielles	Composés majoritaires	(%)	Combi	Composés majoritaires	Pourcentage (%)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Géraniol	33,8	Combi 1	Linalool	5,6
	Nérol	23,4		Géraniol	18,4
	Nérol	8,5		Carvone	4,8
	Géraniol	7,3		Isothiocyanate de benzyle	26,2
	Myrcène	6,9			
<i>Eugenia caryophylla</i>	Eugénol	70,0	Combi 2	Géraniol	11,9
	Acétate d'eugénol	16,2		Carvone	7,3
	-Caryophyllène	5,2		Nérol	12,6
				Eugénol	33,9
				Isothiocyanate de benzyle	9,2
<i>Mentha</i> sp cf <i>piperita</i>	Pipéritone	50,7	Combi 3	Acétate d'eugényle	2,5
	-Phéllandrène	21		Carvone	43,2
	Acétate de menthyle	19,3		Nérol	4,2
	Myrcène	1,4		Eugénol	17,4
				Isothiocyanate de benzyle	9,7
<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	Isothiocyanate de benzyle	86,8	Combi 4	- Caryophyllène	2,4
	p-Méthoxybenzaldéhyde	9,1		Géraniol	3,6
	Phénylacétonitrile	2,7		Carvone	5,9
				Eugénol	39,5
				Isothiocyanate de benzyle	35,0

III.1.3. Propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs combinaisons

III.1.3.1. Inhibition de la croissance des isolats par les disques contenant les huiles essentielles

Le screening de l'activité antimicrobienne des HEs de *Cymbopogon citratus*, d'*Eugenia caryophylla*, de *Mentha* sp cf *piperita* et de *Pentadiplanda brazzeana* a été effectué sur 10 souches sélectionnées.

Les HEs ont induit des inhibitions variables sur les isolats testées (tableau XVI). Il ressort que l'HE de *P. brazzeana* est la plus active sur *Candida albicans* et *Candida* sp 1 avec des valeurs respectives de $50 \pm 0,57$ et $48 \pm 0,57$ mm, mieux que l'Amphotéricine B. Elle a été aussi plus active sur les bactéries comparativement aux autres HEs, avec ça et là des activités significativement plus importantes que la Gentamicine[®]. Les HEs de *C. citratus* a été plus active sur *Klebsiella pneumoniae* et *candida* sp 1 qui présentaient des diamètres d'inhibition plus importants se chiffrants à $20 \pm 0,57$ et $17 \pm 1,15$ mm respectivement. Mais moins que celui de l'antibiotique et l'antifongique de référence. L'HE de *Mentha* sp cf *piperita* était la moins active car elle inhibe moins les isolats testés.

Tableau XVI : Effet inhibiteur des HEs étudiées vis-à-vis des isolats à l'état planctonique.

Isolats microbiens	Diamètres d'inhibition en mm					
	Amphotéricine B	Gentamicine	<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	<i>Eugenia caryophylla</i>	<i>Cymbopogon citratius</i>	<i>Mentha sp cf piperita</i>
<i>Candida albicans</i>	20 ± 0,57 ^c	nt	50 ± 0,57 ^d	16,5 ± 1,44 ^b	12,5 ± 1,44 ^b	0 ± 0 ^a
<i>Candida sp 1</i>	24 ± 0,57 ^c	nt	48 ± 0,57 ^d	14,5 ± 2,02 ^b	17 ± 1,15 ^b	11,5 ± 0,28 ^{a,b}
<i>Bacillus cereus</i>	nt	31,5 ± 0,28 ^c	35,5 ± 0,28 ^c	10,5 ± 0,28 ^b	13,5 ± 0,28 ^b	0 ± 0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	nt	30,5 ± 0,28 ^d	25 ± 2,88 ^c	12,5 ± 1,44 ^b	14,5 ± 2,02 ^b	4 ± 2,30 ^a
<i>Enterobacter cloacae</i>	nt	28,5 ± 0,86 ^c	39,5 ± 6,06 ^d	12 ± 0,57 ^b	10,5 ± 0,28 ^b	8 ± 0,57 ^a
<i>Enterococcus sp</i>	nt	30,5 ± 0,28 ^d	21,5 ± 2,02 ^c	14,5 ± 0,28 ^b	11 ± 0,57 ^{a,b}	9,5 ± 0,28 ^a
<i>Klebsiella oxytoca</i>	nt	40 ± 0,57 ^d	24 ± 0,57 ^c	11,5 ± 0,28 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	nt	32 ± 1,15 ^c	42 ± 6,92 ^d	11,5 ± 0,28 ^a	20 ± 0,57 ^b	14,5 ± 1,44 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	nt	32,5 ± 1,44 ^c	43,5 ± 3,17 ^d	9,5 ± 0,28 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
<i>Streptococcus sp</i>	nt	32 ± 1,15 ^d	20 ± 0,57 ^c	9,5 ± 0,28 ^a	14,5 ± 0,86 ^b	16 ± 1,15 ^b

Légende : Les valeurs qui ont les mêmes lettres sont statistiquement identiques tandis que celles qui ont des lettres différentes sont statistiquement différentes avec un seuil de significativité $p < 0,05$. La lecture se fait horizontalement.

nt :

non

testé.

III.1.3.2. Paramètres d'inhibition de la croissance microbienne par les huiles essentielles et leurs combinaisons

En ce qui concerne les paramètres d'inhibition des HEs sur les cellules planctoniques, les résultats sont représentés dans le tableau XVII ci-après. Il ressort du tableau que toutes les HEs testées ont présenté une activité sur l'ensemble des isolats utilisés avec des CMI allant de 0,07 à 1,25 mg/mL. En effet *Eugenia caryophylla* et *Pentadiplandra brazzeana* étaient bactéricides sur l'ensemble des isolats testées à l'exception de *Klebsiella oxytoca* qui était bactéricide avec les plus petites CMI comprise entre 0,15 et 0,62 mg/mL. De même, les HEs *Eugenia caryophylla* et *Pentadiplandra brazzeana* ont été fongicides sur *C. albicans* et *C. albicans* sp 1 avec de CMI comprissent entre 0,15 et 0,62 mg/mL. Quant à l'HE de *Cymbopogon citratus*, elle a été bactériostatiques sur *C. albicans* sp 1 Cependant, la Gentamicine[®] était bactéricide sur l'ensemble des souches bactériennes avec des CMI comprises entre 0,12 et 0,25 mg/mL et l'Amphotéricine B[®] fongicides sur *C. albicans* et *C. albican* sp 1 avec une CMI de 0,25 mg/mL.

Egalement, les paramètres d'inhibition des combinaisons d'HE sur la croissance des microorganismes montrent que les combinaisons d'HEs présentent une activité plus intéressante que les HEs testées individuellement. La majorité des combinaisons a montré un effet bactéricide caractérisé par les rapports CMB/CMI = 1 ou 2 pour les bactéries et CMF/CMI = 1 ou 2 pour la levure. La gamme de CMI comprise entre 0,07-1,25 mg/mL pour les HEs testées individuellement a diminué et est de 0,038-0,310 mg/mL pour les combinaisons.

Tableau XVII : Paramètres d'inhibition des huiles essentielles et combinaisons d'huiles essentielles sur les cellules

Isolats microbiens	Paramètres d'inhibition (mg/mL)	Huiles essentielles/ Combinaisons								Antifongique / mg/mL	Antibiotique
		Pb	Combi 1	EC	Combi 2	CC	Combi 3	Mp	Combi 4	Amp B	Genta
<i>Candida albicans</i>	CMI	0,15	0,15	0,62	0,07	1,25	0,31	nt	0,15	0,25	nt
	CMF	0,31	0,15	0,62	0,15	Id	0,31	nt	0,15	0,25	nt
	CMF/CMI	2	1	1	2	Id	1	1	1	1	1
<i>Candida sp 1</i>	CMI	0,15	0,15	0,62	0,07	0,31	0,31	1,25	0,15	0,25	nt
	CMF	0,15	0,31	0,62	0,15	1,25	0,31	Id	0,15	0,25	nt
	CMF/CMI	1	2	1	2	4	1	Id	1	1	1
<i>Bacillus cereus</i>	CMI	0,31	0,15	0,31	0,07	nt	0,07	0,62	0,03	nt	0,25
	CMB	0,62	0,15	0,62	0,07	nt	0,15	Id	0,03	nt	0,25
	CMB/CMI	2	1	2	1	2	Id	1	1	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	CMI	0,31	0,15	0,62	0,07	1,25	0,07	0,62	0,15	nt	0,25
	CMB	0,62	0,15	1,25	0,15	Id	0,15	Id	0,15	nt	0,25
	CMB/CMI	2	1	2	2	Id	2	Id	1	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CMI	0,62	0,07	1,25	0,15	nt	0,15	nt	0,07	nt	0,12
	CMB	1,25	0,15	1,25	0,15	nt	0,31	nt	0,07	nt	0,25
	CMB/CMI	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2
<i>Enterococcus sp</i>	CMI	0,62	0,07	0,31	0,15	1,25	0,31	nt	0,15	nt	0,12
	CMB	1,25	0,15	0,62	0,15	Id	0,31	nt	0,15	nt	0,25
	CMB/CMI	2	2	2	1	Id	1	1	1	1	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CMI	0,62	0,15	0,62	0,15	1,25	0,07	1,25	0,03	nt	0,12
	CMB	Id	0,31	Id	0,15	Id	0,15	Id	0,03	nt	0,25
	CMB/CMI	Id	2	Id	1	Id	2	Id	1	1	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMI	0,15	0,31	0,07	0,07	0,62	0,15	0,62	0,15	nt	0,25
	CMB	0,31	0,31	0,07	0,07	0,62	0,31	0,62	0,15	nt	0,25
	CMB/CMI	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMI	0,31	0,15	0,62	0,31	1,25	0,07	nt	0,15	nt	0,12
	CMB	1,25	0,15	1,25	0,31	Id	0,15	nt	0,15	nt	0,25
	CMB/CMI	4	1	2	1	Id	2	1	1	1	2
<i>Streptococcus sp</i>	CMI	0,15	0,31	0,31	0,31	0,62	0,31	1,25	0,15	nt	0,12
	CMB	0,15	0,31	0,62	0,31	0,62	0,31	1,25	0,15	nt	0,12
	CMB/CMI	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1

Légende : Pb : *pentadiplandra brazzeana* ; Ec : *Eugenia caryophylla* ; Cc : *Cymbopogon citratus* ; Mp : *Mentha sp cf piperita* ; Amp B : Amphotéricine B ; Genta : Gentamicine ; Combi : Combinaison ; Id : indéterminé ; nt : non testé.

Tableau XVIII : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et combinaisons sur la formation de biofilms

Biofilms	Huiles essentielles/ Combinaisons CMI (mg/mL)							Antifongique/ mg/mL	Antibiotique	
	Pb	Combi 1	EC	Combi 2	CC	Combi 3	Mp	Combi 4	Amp B	Genta
<i>Candida albicans</i>	0,15	0,31	0,62	0,15	1,25	0,31	/	0,15	>0,25	nt
<i>Candida sp 1</i>	0,15	0,15	0,62	0,15	0,31	0,31	1,25	0,15	>0,25	nt
<i>Bacillus cereus</i>	0,62	0,31	0,62	0,15	/	0,15	/	0,07	nt	>0,25
<i>Bacillus subtilis</i>	0,31	0,31	0,62	0,15	1,25	0,15	1,25	0,15	nt	>0,25
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,62	0,15	1,25	0,31	/	0,31	/	0,15	nt	0,25
<i>Enterococcus sp</i>	0,62	0,15	0,31	0,31	1,25	0,62	/	0,31	nt	>0,25
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,62	0,31	1,25	0,15	/	0,15	/	0,07	nt	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,31	0,62	0,31	0,15	1,25	0,62	1,25	0,15	nt	>0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,62	0,31	1,25	0,31	1,25	0,15	/	0,15	nt	0,25
<i>Streptococcus sp</i>	0,62	0,62	0,62	0,31	1,25	0,62	1,25	0,31	nt	0,25

Légende : **Pb** : *pentadiplandra brazzeana* ; **Ec** : *Eugenia caryophylla* ; **Cc** : *Cymbopogon citratus* ; **Mp** : *Mentha sp cf piperita* ; **Amp B** : Amphotéricine B ; **Genta** : Gentamicine ; **Combi** : Combinaison ; **Id** : indéterminé ; **nt** : non testé ; **(/)** : non déterminé ; **Combi** : Combinaison.

III.1.3.2.3. Paramètre d'inhibition des huiles essentielles et des combinaisons sur la formation de biofilms

Dans la sphère buccale, les bactéries sont également présentes sous forme de biofilm, qui est une forme de résistance aux antibiotiques et aux désinfectants. Il a été jugé important d'évaluer l'activité antibiofilm des HEs et des combinaisons. Les résultats obtenus pour les CMI des HEs sur la formation de biofilms sont enregistrés dans le tableau XVIII. On remarque que les CMI de la formation de biofilms varient de 0,15 – 1,25 mg/mL pour les levures et de 0,31-1,25 mg/mL pour les bactéries. L'HE de *pentadiplandra brazzeana* est la plus active par rapport aux autres HEs étudiées avec une CMI de 0,15 mg/mL sur les biofilms de *Candida albicans*. *Cymbopogon cytratus* et *Mentha* sp cf *piperita* ont été les HEs les moins actives avec une CMI de 1,25 mg/mL sur la majorité des biofilms testées. On note que les CMI des HEs sur les cellules planctoniques (0,07 – 1,25 mg/mL) étaient proches de celles des HEs sur la formation biofilms.

Egalement, On remarque que les CMI de la formation de biofilms varient de 0,078 – 0,625 mg/mL pour les bactéries et de 0,156-0,312 mg/mL pour les levures. La plus petite CMI a été obtenue par l'essai 4 contre les biofilms de *Bacillus cereus* et de *Klebsiella oxytoca*. On note que les combinaisons ont inhibées la formation de biofilms avec des CMI moins importantes que celles obtenues sur les cellules planctoniques.

Le tableau XIX ci-contre présente l'ensemble des résultats des CMI obtenus par l'action des HEs et des combinaisons sur les cellules et sur les biofilms. Ce tableau permet de constater que les combinaisons ont données de meilleures CMI à la fois sur les cellules planctoniques que sur les biofilms. L'exception a été observée sur les isolats de *Candida albicans* dont les CMI obtenues à la fois pour les HEs et les combinaisons sur les cellules et les biofilms sont resté inchangées. Cette ensemble d'observation ont permis d'utiliser les combinaisons d'HEs pour formuler les solutions de bain de bouche.

Tableau XIX : Récapitulatif des CMI des huiles essentielles et combinaisons sur les cellules

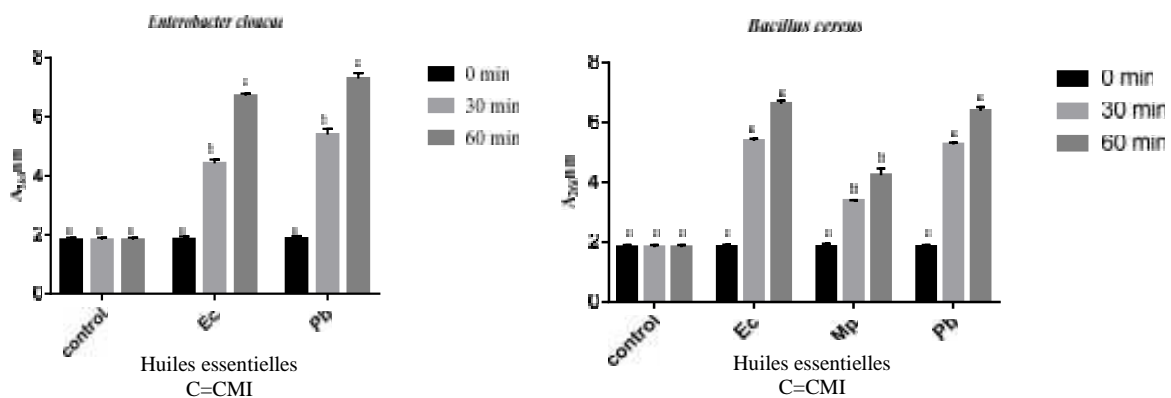
Isolats HEs /Combinaisons	CMI sur les cellules (mg/mL)	Biofilm CMI (mg/mL)
<i>Candida albicans</i>		
Pb/Combi 4	0,15/0,15	0,15/0,15
Ec/Combi 2	0,62/0,07	0,62/0,15
Cc/Combi 1	1,25/0,15	1,25/0,31
Mp/Combi 3	nd /0,31	nd /0,31
<i>Candida sp 1</i>		
Pb/Combi 4	0,15/0,15	0,15/0,15
Ec/Combi 2	0,62/0,07	0,62/0,15
Cc/Combi 1	0,31/0,15	0,31/0,15
Mp/Combi 3	1,25/0,31	1,25/0,31
<i>Bacillus cereus</i>		
Pb/Combi 4	0,31/0,03	0,62/0,07
Ec/Combi 2	0,31/0,07	0,62/0,15
Cc/Combi 1	nd /0,15	nd/0,31
Mp/Combi 3	0,62/0,07	nd/0,15
<i>Bacillus subtilis</i>		
Pb/Combi 4	0,31/0,15	0,31/0,15
Ec/Combi 2	0,62/0,07	0,62/0,15
Cc/Combi 1	1,25/0,15	1,25/0,31
Mp/Combi 3	0,62/0,07	1,25/0,15
<i>Enterobacter cloacae</i>		
Pb/Combi 4	0,62/0,07	0,62/0,15
Ec/Combi 2	1,25/0,15	1,25/0,31
Cc/Combi 1	nd /0,07	nd /0,15
Mp/Combi 3	nd /0,15	nd /0,31
<i>Enterococcus sp</i>		
Pb/Combi 4	0,62/0,15	0,62/0,31
Ec/Combi 2	0,31/0,15	0,31/0,31
Cc/Combi 1	1,25/0,07	1,25/0,15
Mp/Combi 3	nd /0,31	nd /0,62
<i>Klebsiella oxytoca</i>		
Pb/Combi 4	0,62/0,03	0,62/0,07
Ec/Combi 2	0,62/0,15	1,25/0,15
Cc/Combi 1	1,25/0,15	nd /0,31
Mp/Combi 3	1,25/0,07	nd /0,15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Pb/ Combi 4	0,15/0,15	0,31/0,15
Ec/Combi 2	0,07/0,07	0,31/0,15
Cc/Combi 1	0,62/0,31	1,25/0,62
Mp/Combi 3	0,62/0,15	1,25/0,62
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Pb/Combi 4	0,31/0,15	0,62/0,15
Ec/Combi 2	0,62/0,31	1,25/0,31
Cc/Combi 1	1,25/0,15	1,25/0,31
Mp/Combi 3	nd /0,07	-nd/0,15
<i>Streptococcus sp</i>		
Pb/Combi 4	0,15/0,15	0,62/0,31
Ec/Combi 2	0,31/0,31	0,62/0,31
Cc/Combi 1	0,62/0,31	1,25/0,62
Mp/Combi 3	1,25/0,31	1,25/0,62

Légende : **Pb** : *pentadiplandra brazzeana* ; **Ec** : *Eugenia caryophylla* ; **Cc** : *Cymbopogon citratus* ; **Mp** : *Mentha sp cf piperita*.

III.1.3.3. Effet des huiles essentielles sur l'intégrité de la membrane cellulaire des bactéries

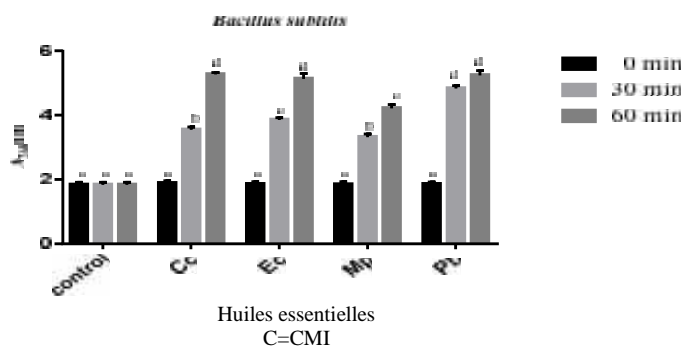
III.1.3.3.1. Libération du matériel cellulaire absorbant à 260 nm

La fuite du contenu cellulaire (ADN, ARN) à travers la membrane plasmique des bactéries a été déterminée pour évaluer l'effet des HEs sur la membrane des bactéries mises au contact de ces HEs. Après avoir suivi la libération de biomolécules intracellulaires après 0 min; 30 min et 60 min, la figure 25 représentant les résultats pour cette expérience montre que toutes les HEs testées dans cette étude avaient un effet lytique sur la membrane cellulaire de toutes les bactéries utilisées après 30 min d'exposition contrairement au contrôle. Les dommages causés à la membrane des bactéries par les HEs ont été marqués par une augmentation de l'absorbance à 260 nm par rapport au contrôle sans HEs, ce qui implique une lyse de la membrane ainsi que la libération de biomolécules (ADN, ARN) dans le milieu extracellulaire.

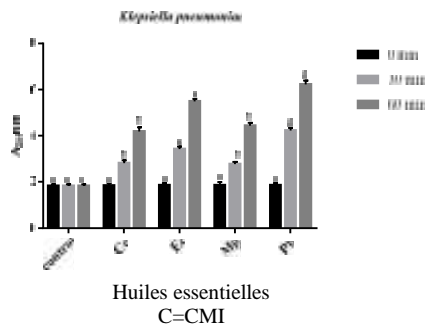


a)

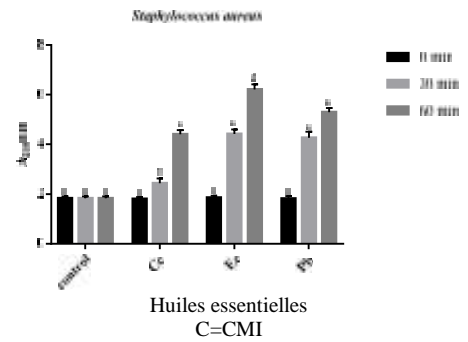
b)



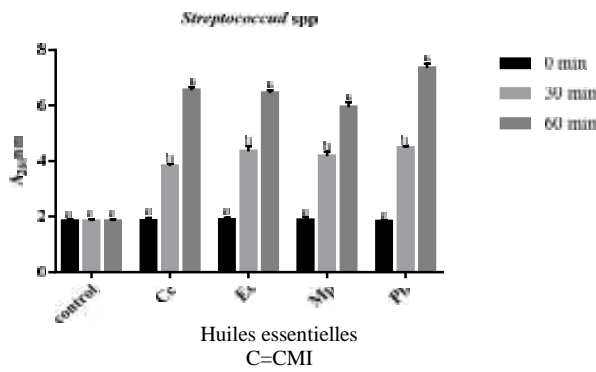
c)



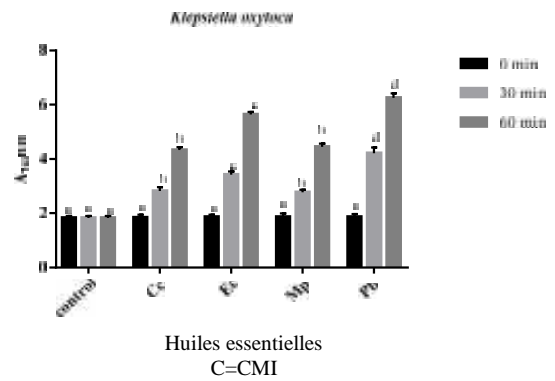
d)



e)



f)



g)

Légende : Cc : *Cymbopogon citratus* ; Ec : *Eugenia caryophylla* ; Mp : *Mentha sp cf piperita* ; Pb : *Pentadiplandra brazzeana*. A : absorbance. Les valeurs qui ont les mêmes lettres sont statistiquement identiques tandis que celles qui ont des lettres différentes sont statistiquement différentes avec un seuil de significativité $p < 0,05$.

Figure 25 : Libération du matériel cellulaire des bactéries absorbant à 260 nm à la CMI des HEs de *Pentadiplandra brazzeana*, *Cymbopogon citratus*, *Eugenia caryophylla* et *Mentha sp cf piperita* pendant 0, 30 et 60 min représenté par les graphes a, b, c, d, e, f et g.

III.1.3.3.2. Quantification des biomolécules intracellulaires dans le milieu extracellulaire

Pour confirmer l'effet des HEs sur la paroi et la membrane des bactéries testées, une quantification des biomolécules libérées a été réalisée (tableau XX). Toutes les HEs ont montré un effet sur la paroi et la membrane à partir de leurs CMI. Ces dommages sur la paroi et la membrane sont marqués par la libération des biomolécules (ADN, ARN et protéines) dans le milieu extracellulaire que l'on a quantifié par spectrophotométrie au NanoDrop 1000.

Les résultats obtenus montrent des grandes quantités de biomolécules intracellulaires libérées dans le milieu extracellulaire dès leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) avec une différence significative ($P < 0,05$). Cette libération significative révèle que toutes les huiles essentielles ont rompu l'intégrité membranaire. On note que le contrôle est composé de bactéries non traitées avec des HEs ne présentait aucun contenu intracellulaire (ADN, ARN et Protéines) dans le milieu extracellulaire. Les concentrations de matériel intracellulaire libérée dans le milieu extracellulaire variant de $186,56 \pm 2,35$ ng / μL à $766,6 \pm 2,84$ ng / μL pour l'ADN, $158,06 \pm 1,87$ ng / μL à $628,53 \pm 2,05$ ng / μL pour l'ARN et $695,9 \pm 2,11$ ng / μL à $1234,33 \pm 2,97$ ng / μL pour les protéines. Les protéines sont les plus libérées alors que l'ARN est la molécule la moins retrouvée dans le milieu extra cellulaire.

Tableau XX : Quantification de biomolécules intracellulaire (ADN, ARN et Protéines) dans le milieu extracellulaire

Isolats	Biomolécules (ng/μL)	Huiles essentielles				control
		C. c	E. c	M.p	P. b	
<i>Bacillus cereus</i>	ADN	/	529,06±2,41 ^{f, g, h, i, j}	353,63±3,7 ^{b, c, d, e}	563±7,44 ^{h, i, j}	0±0 ^a
	ARN	/	431,03±2,11 ^{f, g, h, i}	163,96±4,99 ^{b, c}	459,16±4,93 ^{h, i}	0±0 ^a
	Protéines	/	1092,03±3,7 ^{e, g, h}	937,30±6,87 ^{f, g}	1100,36±2,07 ^{g, h}	0±0 ^a
<i>Basillus subtilis</i>	ADN	186,56±2,35 ^b	357,9±2,89 ^{b, c, d, e, f}	276,85±3,88 ^{b, c, d}	643,82±2,45 ^{i, j, h}	0±0 ^a
	ARN	158,06±1,87 ^{b, c}	245,9±2,84 ^{b, c, d, e}	196,4±3,95 ^{b, c, d}	517,67±2,15 ^{i, j}	0±0 ^a
	Protéines	695,9±2,11 ^b	736,26±2,25 ^{b, c, d}	703,2±1,83 ^{b, c}	1101,67±2,64 ^{g, h}	0±0 ^a
<i>Enterobacter cloacae</i>	ADN	/	480,4±4,81 ^{e, f, g, h, i}	/	575,96±1,47 ^{h, i, j}	0±0 ^a
	ARN	/	379,7±4,12 ^{e, f, g, h, i}	/	448,3±1,73 ^{g, h, i}	0±0 ^a
	Protéines	/	1063,56±1,6 ^{f, g, h}	/	1121,6±2,9 ^{g, h}	0±0 ^a
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ADN	290,8±2,48 ^{b, c, d}	358±2,16 ^{b, c, d, e, f}	302,53±2,57 ^{b, c, d}	435,76±2,49 ^{d, e, f, g, h}	0±0 ^a
	ARN	222,43±3,06 ^{b, c, d}	238,30±1,65 ^{b, c, d, e}	285,40±1,75 ^{c, d, e, f}	298,33±4,68 ^{c, d, e, f, g}	0±0 ^a
	Protéines	948,03±4,75 ^{e, f, g}	785,6±5,36 ^{b, c, d, e}	704,6±2,35 ^{b, c}	1046,10±3,21 ^{f, g, h}	0±0 ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ADN	671,16±2,02 ^{j, h}	766,6±2,84 ^h	314,13±3,99 ^{b, c, d, e}	532,76±2,3 ^{g, h, i, j}	0±0 ^a
	ARN	424,23±1,7 ^{f, g, h, i}	628,53±2,05 ^j	292,76±6,4 ^{c, d, e, f}	482,96±2,75 ^{h, i, j}	0±0 ^a
	Protéines	1125,23±2,15 ^{g, h}	1234,33±2,97 ^h	735,73±2,45 ^{b, c, d}	701,86±1,51 ^{b, c}	0±0 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	ADN	241±2,15 ^{b, c}	189,40±3 ^b	/	369,86±1,62 ^{c, d, e, f, g}	0±0 ^a
	ARN	186,63±1,71 ^{b, c}	303,33±2,35 ^{c, d, e, f, g}	/	291,33±2,51 ^{c, d, e, f}	0±0 ^a
	Protéines	876,9±2,13 ^{b, c, d, e, f}	785,03±2,51 ^{b, c, d, e}	/	825,43±1,68 ^{b, c, d, e}	0±0 ^a
<i>Streptococcus sp.</i>	ADN	566,06±2,89 ^{h, i, j}	435,53±3,15 ^{d, e, f, g, h}	482,63±3,30 ^{e, f, g, h, i}	195,36±2,11 ^{b, c}	0±0 ^a
	ARN	345,56±3,4 ^{d, e, f, g, h}	239,83±3,4 ^{b, c, d, e}	387,23±3,33 ^{e, f, g, h, i}	126,76±1,74 ^b	0±0 ^a
	Protéines	894,16±1,47 ^{d, e, f}	899,80±1,6 ^{d, e, f}	1060,26±1,7 ^{f, g, h}	888,3±1,77 ^{c, d, e, f}	0±0 ^a

Légende : **Pb** : *pentadiplandra brazzeana* ; **Ec** : *Eugenia caryophylla* ; **Cc** : *Cymbopogon citratus* ; **Mp** : *Mentha sp cf piperita* ; (/) : non déterminé. Les valeurs qui ont les mêmes lettres sont statistiquement identiques tandis que celles qui ont des lettres différentes sont statistiquement différentes avec un seuil de significativité p < 0,05. La lecture se fait verticalement.

III.1.4. Caractérisation des solutions de bain de bouche à base des combinaisons d'huiles essentielles

III.1.4.1. Formulation des solutions pour bain de bouche

Les composants suivants ont servi à formuler les solutions de bain de bouche (Figure 26), il s'agit : des combinaisons d'HEs, de l'acide citrique, du Canderel[®], du bicarbonate de Sodium, du methyl Salicylate, du Tween 80 et de l'éthanol 95°. Ceci a permis d'obtenir 4 formules différentes à partir des combinaisons préalablement effectuées noté de F₁ à F₄.



Figure 26 : Photographie des différentes solutions de bain de bouche (**Photo Ngongang**).

III.1.4.2. Propriétés antimicrobiennes

➤ Formation des biofilms jeunes

Les valeurs des UFC (unités formant colonies) pour les biofilms jeunes après traitement varient entre $6,4 \cdot 10^3$ et $10,9 \cdot 10^3$ UFC pour les quatre bains de bouche par rapport à un contrôle négatif de $31,4 \cdot 10^3$ UFC (Tableau XXI). L'exposition aux bains de bouche a donné un taux de réduction du nombre des UFC de $25 \cdot 10^3$ pour la formule 2 (F₂) et $23,5 \cdot 10^3$ pour la formule 4 (F₄), en comparaison avec le contrôle négatif $31,4 \cdot 10^3$ UFC. Le taux de réduction a été de $21,2 \cdot 10^3$ et $20,5 \cdot 10^3$ pour les deux formules (F₁) et (F₃) respectivement, par rapport au contrôle négatif $31,4 \cdot 10^3$ UFC.

➤ Formation des biofilms matures

Les valeurs des UFC pour les biofilms matures après traitement varient entre $11,7.10^3$ $24,0.10^3$ UFC pour les quatre bains de bouche par rapport à un contrôle négatif de $53,9.10^3$ UFC (Tableau XXI). L'exposition a donné un taux de réduction de $42,2.10^3$ pour la formule 2 (F₂) et $41,6.10^3$ pour la formule 4 (F₄) en comparaison avec le contrôle négatif $53,9.10^3$ UFC. L'exposition a donné un taux de réduction des valeurs des UFC de $36,7.10^3$ et $29,9.10^3$ pour les deux formules (F₁) et (F₃) respectivement par rapport au contrôle négatif $53,9.10^3$ UFC.

Tableau XXI : Action des solutions de bain de bouche sur la formation des biofilms des isolats

	Formule 1	Formule 2	Formule 3	Formule 4
Biofilm jeune non traité (UFC)	$31,4.10^3$	$31,4.10^3$	$31,4.10^3$	$31,4.10^3$
Biofilm jeune traité (UFC)	$10,2.10^3$	$6,4.10^3$	$10,9.10^3$	$7,9.10^3$
Taux de réduction du nombre des UFC	$21,2.10^3$	25.10^3	$20,5.10^3$	$23,5.10^3$
Biofilm mature non traité (UFC)	$53,9.10^3$	$53,9.10^3$	$53,9.10^3$	$53,9.10^3$
Biofilm mature traité (UFC)	$17,2.10^3$	$11,7.10^3$	24.10^3	$12,3.10^3$
Taux de réduction du nombre des UFC	$36,7.10^3$	$42,2.10^3$	$29,9.10^3$	$41,6.10^3$

III.1.4.3. Perception sensoriel du bain de bouche par un panel entraîné

Après évaluation, les résultats obtenus sont illustrés aux figures 27, 28 et 29. Les paramètres d'évaluation à savoir : à quoi renvoi le parfum de chaque formulation ?, l'intensité de fraîcheur de chaque formulation, l'acceptabilité du produit. Les chiffres obtenus ayant permis de tracer les différents graphes sont regroupés dans la fiche de formulation (Annexe 2).

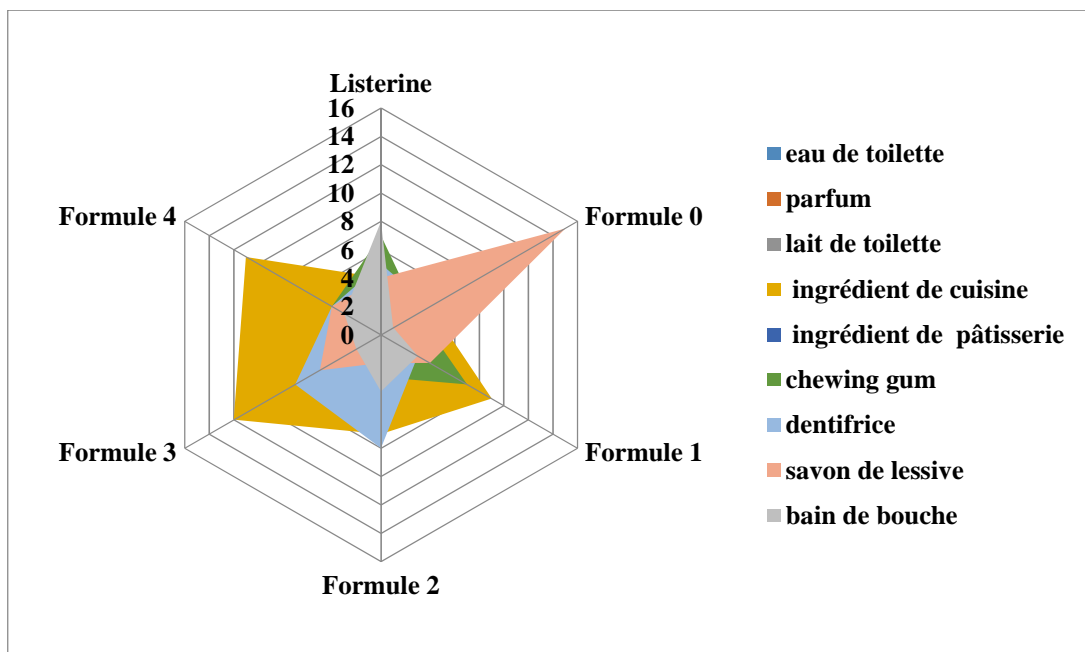


Figure 27: Graphe représentant le parfum de chaque formulation

D'après l'appréciation des consommateurs, il ressort que la majorité des formules dégageaient une odeurs qui renvoyaient aux ingrédients de cuisines et ceci est représenté sur la figure par un pic à 12, 11 et 09 respectivement pour les formules 4, 3 et 1 sur un échantillon de 30 personnes, soit 40 %, 36,6 % et 30 % (Figure 27).

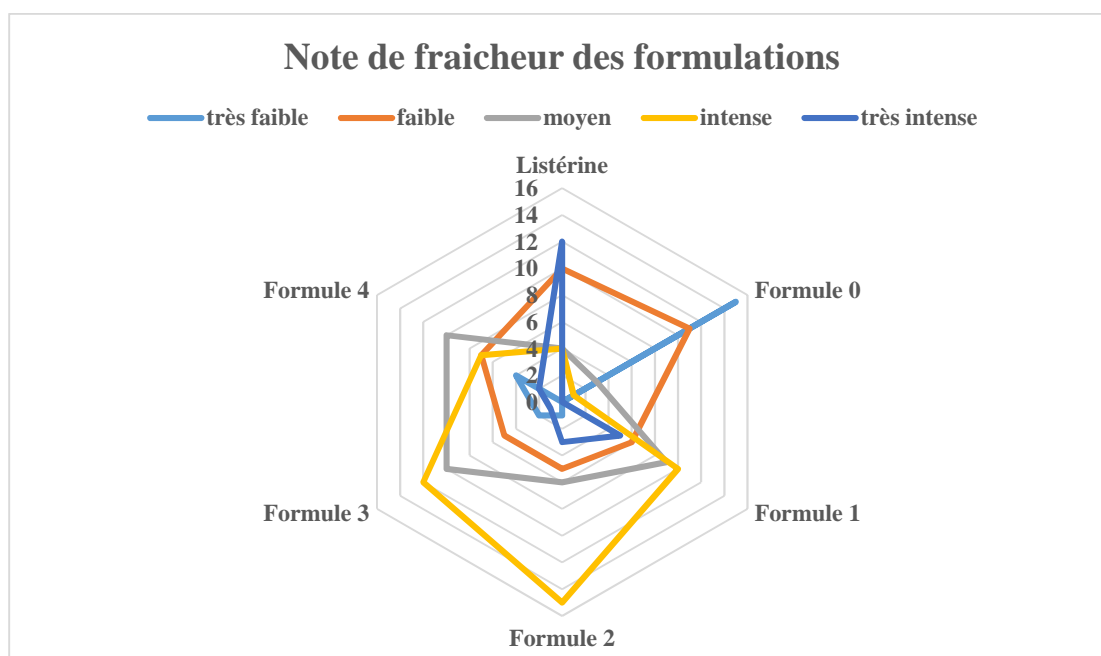


Figure 28 : Graphe représentant la note de fraîcheur

La Figure 28 ci-dessus indique la note de fraîcheur attribuée aux différentes formulations par le panel. Il ressort que celle-ci varie d'un consommateur à l'autre. Néanmoins, le graphe montre que les formulations 2, 3 et 1 présentaient une note de fraîcheur intense, soit respectivement 50 %, 40 % et 33,3 %. De même la Listérine a présenté une note de fraîcheur très intense, soit 40 %.

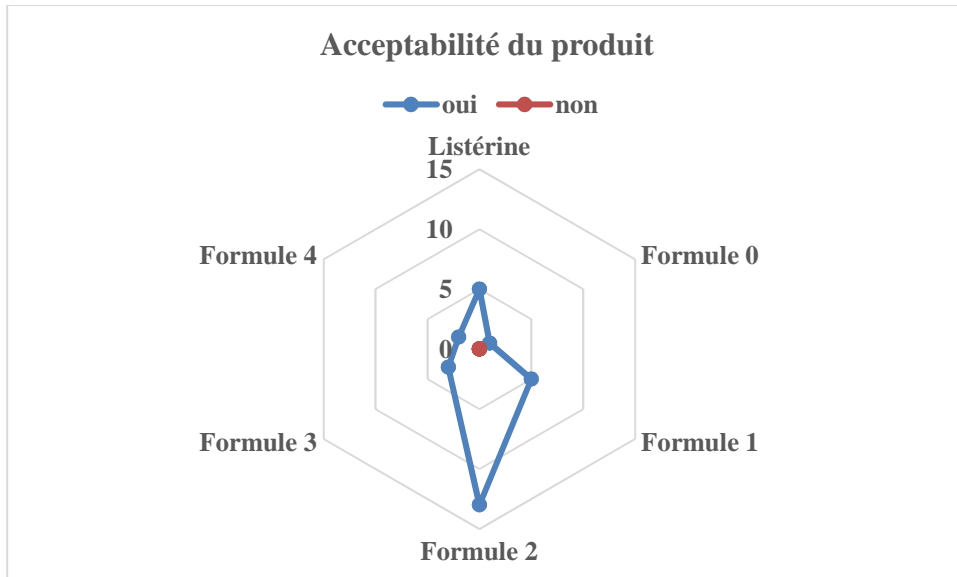


Figure 29 : Graphe représentant l'acceptabilité du produit

La figure 29 ci-dessus illustre l'acceptabilité de l'une des formulations de bain de bouche par le panel. Il est à noter que la formulation la plus prisée était la formule 2 avec 43,3 % d'acceptabilité, ensuite viennent les Listérine et la formulation 1 avec 16,7 %. La formulation la moins appréciée était la formule 0 avec 3,3 % d'acceptabilité.

III.2. DISCUSSION

La grande fréquence des infections bucco-dentaires, leur retentissement sur l'état général et sur la qualité de vie, ainsi que leur répartition très inégale dans la population, en font une question de santé publique à part entière. Dans l'ensemble des prélèvements effectués durant cette étude, les infections les plus représentées étaient les caries dentaires et la pulpite avec 48,39 et 29,0 % respectivement. Ces résultats rejoignent ceux de **Yotat et al. (2015)** qui avaient obtenus 73,4 % et 68,9 % respectivement, ce qui met en évidence une forte proportion de caries dentaires chez les adultes (65-94 ans) échantillonnés dans la région de l'Ouest Cameroun. Egalement elles rejoignent ceux d'**Essama et al. (2013)** qui montrent une prévalence de 43,90 % de carie dentaire chez les patients diabétiques du service d'endocrinologie de l'Hôpital Général de Douala. La forte prévalence de ces infections buccodentaires serait due aux mauvaises habitudes alimentaires avec un régime riche en glucides, l'inaccessibilité aux soins buccodentaires et une mauvaise hygiène bucco-dentaire (**Majoli, 2003**).

Les microorganismes identifiés dans cette étude appartenaient aux groupes des bactéries et des levures avec 71 et 29 % respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Kammogne (2010)** qui a obtenu une fréquence importante de 55 % de *staphylococcus* dans les échantillons cliniques. Certains auteurs ont indiqué que ces 2 genres bactériens sont majoritairement isolés de la flore buccale et elles joueraient un rôle important dans le processus infectieux des pathologies buccales (**Robertson et al., 2009**).

Les espèces *Staphylococcus aureus* étaient les plus représentatifs avec 24 % suivi des espèces de *Staphylococcus epidermidis* avec 19 %. Ces résultats s'identifient à ceux de **Schupbach et al. (1995)** qui ont rapporté les fréquences d'isolement du *Staphylococcus aureus* dans des lésions carieuses primaires et avancées (4.4 % et 15.5 % respectivement). **Smith et al. (2003)**, et **Storoe et al. (2001)** quant à eux, ont mis en évidence la présence significative du *S. aureus* dans les infections dentoalvéolaires et les infections odontogènes entraînant un gonflement du visage ou du cou. **Jussara et al. (2004)**, quant à eux ont obtenu un taux de 42,17 % de *Staphylococcus epidermidis* chez 88 patients atteints d'infections parodontales. Dans cette étude, l'espèce *Streptococcus mutans* était la plus représentée du groupe des streptocoques avec 19 %. Ce résultat est en accord avec l'étude de **Fowell et al. (2012)** qui stipule que *S. mutans* peut être retrouvé dans la majorité des pathologies de la

cavité buccale tels que les caries (émail, dentine et cément), les infections endodontiques, les cellulites, les gingivites, les pericoronarites, les infections des glandes salivaires et l'abcès dentaire. Son implication dans les infections buccodentaires serait expliquée par le fait que c'est un pathogène opportuniste capable d'initier un état pathologique suite aux déséquilibres de la flore endogène (Simon, 2007 ; Guillaume *et al.*, 2011). Selon Peterson *et al.* (1999), *S. mutans* est en cause de 30 % des cas d'infection précédant une atteinte dentaire, et jouerait un rôle essentiel avec *S. aureus* dans l'installation d'une parodontite suppurative.

Les bacilles Gram positifs identifiés dans cette étude étaient faiblement représentés. Les deux espèces majoritaires obtenues des prélèvements cliniques étaient le *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* avec 50 % et 20 % respectivement. Ce sont des pathogènes opportunistes émergents, généralement associés aux toxi-infections alimentaires ou à des infections locales de l'œil et du parodonte. Leur implication dans le processus infectieux de la cavité buccale n'est pas parfaitement décrite. Néanmoins, il se pourrait que l'espèce *Bacillus cereus* contribue à la formation du biofilm oral en adhérant aux surfaces pour former la plaque dentaire (Peng *et al.*, 2001).

La cavité orale peut servir de réservoir potentiel aux entérobactéries, qui dans certaines conditions, sont des facteurs prédisposant et aggravant des pathologies buccodentaires (Gomes *et al.*, 2010). Il a été indiqué que la prévalence des bacilles entériques dans la cavité buccale est en rapport avec la santé buccale (Sedgley *et al.*, 1994). Dans cette étude, la proportion des entérobactéries était assez élevée avec 79 %. Les espèces majoritairement isolées et identifiées étaient : *Enterobacter cloacae* (21 %), *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* 16 % chacun. Ce résultat s'assimile à celle de Nelson (2004), qui stipule que les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être retrouvées dans les sites sous gingivaux des patients atteints de parodontites. Santos *et al.* (1998) a rapporté que les espèces *Enterobacter cloacae* et *Klebsiella pneumoniae*, étaient les plus rencontrées chez les individus ayant des atteintes dentaires. Les résultats de l'identification des germes responsables d'abcès dentaires dans l'étude de Ghada (2016) a révélé la présence des espèces microbiennes telles que *Proteus mirabilis*, *Listeria grayi*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Il a été suggéré que certaines espèces de ce groupe d'organismes peuvent être des cofacteurs dans la parodontite destructrice. Ces bactéries sont souvent récupérées à partir du microbiote sous-gingival de

patients considérés comme cliniquement réfractaires au traitement parodontal mécanique et antibiotique (**Dumitrescu et al., 2010**).

L'espèce *Candida albicans* était également fortement représentée avec 67 %. Ce résultat est en accord avec celui de **Baumgartner et al. (2000)** qui a obtenu une fréquence de 21 % de *Candida albicans* des infections primaires (parodontites apicales aiguës primaires). **Orstavik et al. (2008)** stipulent que les fongiques tels que *Candida albicans* sont beaucoup plus fréquents dans les infections secondaires endodontiques dans 3 à 18 % des cas. La présence du *Candida albicans* dans les infections buccodentaires serait due au fait qu'il peut devenir un pathogène opportuniste de la cavité orale lorsque les conditions lui sont favorables.

L'aptitude des isolats bactériens à former les biofilms a été évaluée par trois méthodes à savoir : la méthode en tube et la méthode de culture sur gélose au Rouge Congo (RCA) qui sont des méthodes qualitatives, ainsi que la méthode de coloration au cristal violet sur microplaques (TCP) qui est une méthode quantitative. Sur l'ensemble des isolats obtenus durant cette étude, 22 isolats ont été utilisés pour évaluer leurs capacités à former un biofilm et une souche de référence, il s'agit de 06 isolats à cocci Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp), 05 isolats à bacille Gram positif (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*), 06 isolats à bacille Gram négatif (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*), 05 isolats de levures (*Candida albicans*, *Candidat* sp 1) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En générale, Toutes les bactéries résident de manière prédominante sous la forme d'un biofilm (**Nagant, 2013**). L'évaluation de la formation de biofilm des différents isolats a montré que selon la recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo on note que 09/22 isolats, soit 40,9 % sont producteurs de slime contre 13/22, soit 59,1 % non producteurs. Les isolats producteurs de slime avaient un phénotype variable ou positif. Selon la technique TM et sur les 22 isolats testés, 7/22 isolats, soit 31,81 % ont été fortement formatrices du biofilm. Selon la technique sur la microplaque TCP, 15/22 isolats, soit 68,18 % forment un biofilm avec des valeurs de DO_{570} (moyenne \pm écart type) qui varient entre $0,28 \pm 0,04$ et $1,15 \pm 0,07$. Il s'agit entre autres des isolats de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* et la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui ont montrées une forte capacité à former le biofilm avec une $DO_{570} > 0,240$. Dans cette étude, La technique TM semble facile à réaliser mais la lecture des résultats peut-être difficile, car plusieurs auteurs stipulent que la formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible recouvre le mur et le bas du

tube alors que d'autres considère que la formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm (**Mathur et al., 2006**). La technique TM présentait une bonne corrélation avec la technique TCP pour les isolats fortement producteurs de biofilm. Par conséquent, une grande variabilité a été observée quant à la classification en biofilm positif et négatif par la méthode TM. De même, il était difficile de différencier entre les isolats faiblement producteurs de biofilm et non producteurs. Nous confirmons l'hypothèse déjà formulée par plusieurs auteurs dont **Mathur et al. (2006)** que la technique en tube ne peut pas être recommandée en routine. Par contre, la technique TCP est la plus largement utilisée et est considérée comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm. Cette méthode a été rapportée comme étant la plus sensible, précise et reproductible pour la détermination de la formation de biofilm. Elle permet une détermination quantitative pour comparer l'adhésion des différents isolats et aussi examiner un grand nombre d'isolat simultanément (**Rasha et al., 2012**). C'est une technique quantitative pratique et économique pour l'identification des facteurs et des conditions de cultures optimales pour la formation de biofilm. Cependant, elle peut être moins précise pour déterminer la capacité des souches à sécréter le slime bactérien (**Castro Melo et al., 2013**). Pour cette raison **Rasha et al. (2012)** ont proposé la méthode de culture sur RCA comme une alternative à la méthode TCP pour le dépistage de la formation de biofilm par la production du slime car étant plutôt facile à réaliser, elle prend moins de temps, elle est sensible et spécifique.

Les HEs obtenues par hydrodistillation des échantillons végétaux ont présentés des rendements variant de 0,043 % pour l'HE de *P. brazzeana* à 1,7 % pour l'HE d'*Eugenia caryophylla*. Ces résultats montrent que la proportion en HE présente dans une plante varie non seulement d'une famille botanique mais aussi d'une espèce à une autre (**Mohamedi, 2006**). Le résultat du rendement d'extraction de l'HE de *Pentadiplandra brazzeana* (0,043 %) est en accord avec ceux de **Nyegue (2006)**, **Betote (2016)** et **Kamela (2017)**. En effet, ceux-ci avaient obtenu des valeurs de rendement d'extraction comprises entre 0,02 et 0,2 %. Ce résultat justifie le fait qu'il aurait une relation claire liant le lieu et la période de récolte de cette plante aux rendements d'extraction comme l'avait déjà mentionné **Nyegue (2006)**. Par contre, le résultat du rendement d'extraction de l'HE d'*E. caryophylla* (1,7 %) est en désaccord avec celui obtenu par **Hockmeni (2011)** qui était de 5,6 %. Cette différence serait expliquée par la durée de conservation, les traitements subis, et la divergence des lieux de récolte des boutons floraux (**Crouzet et al., 1982**). De même, le résultat du rendement

d'extraction de l'HE de *Cymbopogon citratus* (0,28 %) est en désaccord avec celui de **Kamela (2017)** qui était deux fois supérieure (0,4 %) et celui de *Mentha sp cf piperita* (0,047 %) est largement inférieur à celui de **Benayad (2008)** qui a obtenu 1,7 %. Cette différence dans le rendement d'extraction serait due à l'impact exercé par les facteurs environnementaux tels que le type de sol, la pluviométrie, la période de récolte et le type d'organe récolté. Elle pourrait aussi être relative aux facteurs propre à la plante tels que le cycle végétatif de la plante et l'état du matériel végétal mais aussi au procédé d'extraction et le temps d'hydrodistillation (**Bruneton, 1993 ; Nyegue et al., 2018**).

Les HEs des plantes utilisées dans ce travail ont déjà fait l'objet d'études au Cameroun et dans d'autres pays. Les compositions chimiques déterminées ici permettent de comparer du point de vue chimique nos échantillons à ceux des travaux antérieurs issus des mêmes plantes. L'analyse de la composition chimique de ces HEs a montré que les composés majoritaires étaient principalement des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés.

L'HE de *P. brazzeana* était constituée majoritairement d'isothiocyanate de benzyle à 86,81 %. Ces résultats sont similaires à ceux de **Nyegue (2010)**, et **Kamela (2017)** qui avaient obtenu le même composé majoritaire avec des taux respectifs de 78 % et de 91,27 %. La formation de l'isothiocyanate dépend du pH du milieu. S'il est neutre, il se forme un isothiocyanate très réactif, volatil, à forte odeur et à goût amer. S'il est acide, il se forme du nitrile. S'il est basique, il se forme du thiocyanate (**Borek et al., 1996**).

L'HE d'*Eugenia caryophylla* était principalement constituée d'eugénol (70,0 %), d'eugénol acétate (16,2 %) et de -caryophyllène (5,2 %). Cette composition s'apparente à celle obtenue par **Hockmeni (2011)** qui a montré que les HEs des boutons d'*Eugenia caryophylla* provenant de différents lieux de récolte conserveraient le même profil et que la composition de l'HE des boutons d'*Eugenia caryophylla* se situerait entre 70-90 % d'eugénol, 17 % d'eugénol acétate et 12-15 % pour le -caryophyllène. Sa composition chimique varierait très peu malgré les différents lieux de récolte.

L'analyse chromatographique de l'HE de *Cymbopogon citratus*, révèle des teneurs en géraniol (33,76 %), néral (23,82 %), nérol (8,47 %), géraniol (7,25 %), terpinen-4-ol (2,26 %), camphre (1,22 %), linalol (1,19 %). Ces résultats se rapprochent de ceux généralement trouvés dans la littérature. Cette composition s'apparente à celle de **Kpoviessi et al. (2014)**

qui ont obtenu de l'HE de *C. citratus* les constituants principaux : geranial, neral, -pinene, cis-geraniol, cis-verbenol et le geranyl acetate. **Ndoye et al. (2001)** ont montré que les phénotypes de *C. citratus* de Lomié, de Longtsimbi se rapprochaient de celui de Batourie en taux de citral. Ceci nous montre que le type de composé majoritaire et sa teneur est très peu variable en fonction du lieu de récolte du matériel végétal.

Enfin, l'HE de *Mentha* sp cf *piperita* était constituée en majorité de pipérotine (50,7 %), de -phallandrène (21 %), menthyl acétate (19,3 %), myrcène (1,4 %). Le composé majoritaire obtenu à savoir le pipéritone est aussi celui obtenu par **Nyegue et al., (2014)**, mais différent du composé majoritaire obtenu par **Benayad (2008)** qui était le menthol. Cette variabilité de composé majoritaire pourrait être dû à l'origine géographique de la plante (**Mohamedi, 2006**).

Concernant les combinaisons, l'analyse de la composition chimique obtenus montre pratiquement les mêmes composés chimiques que celles des HEs prises individuelles, mais à des proportions différentes selon l'HE majoritaire dans la combinaison. Ceci s'expliquerait par le fait que toutes les combinaisons sont constituées de l'ensemble des quatre HEs. Dans la combinaison 1, constituée de 60 % d'HE de *cymbopogon citratus*, on note la présence de quatre composés majoritaires à savoir l'isothiocyanate de benzyle (26,2 %), géranial (18,4 %), linalol (5,6 %) et carvone (4,8 %). On remarque que le géranial majoritaire dans l'HE de *cymbopogon citratus* (33,8 %) a diminué dans la combinaison 1 et y est représenté à 18,4 %. Dans la combinaison 2, constituée de 60 % d'*Eugenia caryophylla* possède 5 composés majoritaires dont les plus importants sont L'eugénol, le nérol, le géranial, l'isothiocyanate de benzyle et le carvone avec des pourcentages respectifs de 33,9 %, 12,6 %, 11,91 %, 9,2 % et 7,3 %. On note que l'eugénol majoritaire dans l'HE d'*Eugenia caryophylla* (70 %) a été diluée et est de 33,9 %. Dans la combinaison 3, constituée de 60 % d'HE de *Mentha* sp cf *piperita*, on note une absence de la pipéritone (50,6 %) composé majoritaire de l'HE de *Mentha* mais plutôt la présence du carvone (43,2 %) en majorité qui a également été retrouvé dans toutes les autres combinaisons. En effet le carvone a une structure proche de la pipéritone et semblerait provenir d'une interconversion de celle-ci après association entre les HEs. Dans la combinaison 4, constituée de 60 % d'HE de *P. brazzeana*, on note la présence de trois composés majoritaires à savoir l'eugénol (39,9 %), l'isothiocyanate de benzyle (26,2 %) et le carvone (5,9 %). Il ressort que l'isothiocyanate de benzyle majoritaire dans l'HE de

P. brazzeana à 86,8 % a diminué et est de 35,0 % dans la combinaison. Ces résultats sont d'autant plus intéressants parce qu'aucune étude avec cette forme de combinaison n'a été démontrée auparavant. Ces combinaisons sont réalisées dans l'objectif de rechercher des éventuels effets synergiques entre HEs mais surtout pour la complémentarité des différentes activités biologiques et des qualités organoleptiques. Ceci permet d'introduire ces combinaisons dans les formulations de bain de bouche afin que ces derniers soient à la fois acceptables sur l'aspect organoleptique et antimicrobiens.

Les tests de sensibilité des HEs sur les microorganismes utilisés ont montré qu'elles étaient presque toutes sensibles aux HEs. Les résultats montrent que l'HE de *Pentadiplandra brazzeana* présentait des zones d'inhibition plus larges sur les espèces *Candida albicans* et *Candida sp 1* avec $50 \pm 0,57$ mm et $48 \pm 0,57$ respectivement. Les résultats obtenus à partir de cette HE sont deux fois supérieurs à ceux de **Kamela (2017)** qui a rapporté des diamètres de 22 mm. Cette divergence de résultats serait due aux différentes concentrations utilisées pour chaque étude. En effet, celui-ci avait utilisé une concentration de 30 mg/mL de l'huile essentielle de *P.brazzeana* pour la réalisation des tests antimicrobiens alors que durant notre étude, la concentration de l'huile essentielle utilisée était de 50 mg/mL. Les souches bactériennes telles que *Entérobactérie cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* étaient également très sensibles à cette HE. Le pouvoir antimicrobien de cette plante proviendrait de ses composants bioactifs à savoir l'isothiocyanate de benzyle et le *p*-méthoxybenzaldéhyde et le phénylacétonitrile. De même, l'HE d'*Eugenia caryophylla* et de *Cymbopogon citratus* ont montré des valeurs de zones d'inhibition assez proches statistiquement ($P < 0,05$). Cette activité s'expliquerait par la composition chimique des HEs qui sont riches en composés antibactérien et antifongique comme le phénol, l'eugénol, le géraniol et l'isothiocyanate de benzyle. Ces métabolites agissent en induisant la dénaturation des protéines et lipides membranaires, l'inhibition de la réplication de l'ADN et la perturbation du potentiel membranaire (**Dorman et Deans, 2000**). Néanmoins, il est important de signaler qu'il y a des paramètres qui peuvent influencer sur la largeur des zones d'inhibitions autres que l'activité antimicrobienne des HEs, on cite notamment leurs diffusions et viscosités (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Par conséquent, on note que la méthode de diffusion sur gélose ne soit pas la technique idéale pour l'évaluation du potentiel antimicrobien des HEs sur les microorganismes à l'état planctonique. Son utilisation reste uniquement pour des criblages rapides. Par contre, la détermination des CMI est une

technique plus fiable, car cette méthode permet la quantification de l'activité antimicrobienne de l'agent testé.

En ce qui concerne les CMI obtenues, les HEs les plus actives contre les microorganismes testés à l'état planctonique sont celles d'*E. caryophylla* et *P. brazzeana* avec des CMI qui varient de 0,07 à 1,25 mg/mL. En effet, *E. caryophylla* était bactéricide sur l'ensemble des souches bactériennes testées à l'exception de *Klebsiella oxytoca* tandis que *P. brazzeana* était bactéricide sur toute les souches sauf *Klebsiella oxytoca* et *Staphylococcus aureus* avec les plus petites CMI comprise entre 0,15 et 0,62 mg/mL. De même, les HEs *Eugenia caryophylla* et *Pentadiplandra brazzeana* étaient fongicides sur *C. albicans* et *C. albicans sp 1* avec de CMI comprissent entre 0,15 et 0,62 mg/mL. Quant à l'HE de *Cymbopogon citratus*, elle a été bactériostatique sur *C. albicans sp 1*. La bactéricidie de l'HE d'*Eugenia caryophyllata* serait lié à sa proportion en composés phénoliques (70,0%). En effet des études ont montrées que les composés phénoliques sont des substances antibactériennes importantes (Hellal, 2011). Les travaux de Kamela (2017) ont montré les effets bactéricides de *P. brazzeana* sur les souches *candida* avec des CMIs allant de 7,81 µg/mL à µg/mL 62,3 µg/mL et ceux de Voundi (2017) ont montré les effets bactéricides sur les quatre spores de *Bacillus* avec des CMIs allant de 4,88 µg/mL à 9,76 µg/mL. Concernant la relation entre l'activité antimicrobienne et la composition chimique des HEs, on constate que les HEs riches en phénol sont les plus actives et ceci est dû à leur structure (noyau aromatique lié au groupement hydroxyle dans différentes positions). Cette structure leur permet de former des liaisons hydrogène avec les groupes-SH dans les sites actifs des enzymes cibles, ce qui entraîne la désactivation de ces enzymes chez les microorganismes (Ultee *et al.*, 2001). Les terpènes phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amines et hydroxylamines des protéines membranaires de la cellule microbienne en provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite de contenus intracellulaires (Carson *et al.*, 2002). D'autre part, il est nécessaire de signaler d'après les résultats obtenus et les informations tirées de la littérature, que l'activité antimicrobienne des HEs est beaucoup plus semblable à celle des désinfectants et des antiseptiques que celle des antibiotiques pour plusieurs raisons : Premièrement, la cible des HEs n'est pas encore bien élucidée, puisqu'elles semblent agir d'une façon non ciblée sur la déstabilisation et la fragilisation des membranes cytoplasmiques des cellules procaryotes (Burt, 2004). Alors que les antibiotiques ont une cible bien déterminée dans les cellules bactériennes à l'échelle moléculaire. Ceci permet à ces substances d'agir envers le

microorganisme cible d'une façon spécifique et à des très faibles concentrations (**Walsh, 2003**). Deuxièmement, les HEs comme les antiseptiques agissent sur toutes les phases de croissance des microorganismes, quelle que soit la phase de multiplication, de latence et même l'état VNC (viable non cultivable) (**Thormar, 2011**). Au contraire, les antibiotiques agissent généralement sur des bactéries en phase de multiplication (**Walsh, 2003**). Troisièmement, les HEs de même que les antiseptiques ont un spectre d'activité antimicrobienne très large, envers tous les types des microorganismes, non seulement les bactéries, les champignons et même les virus (**Thormar, 2011**). Tandis que le spectre d'activité des antibiotiques est généralement limité à un type de microorganisme, par exemple bactérien, et même vis-à-vis d'une famille ou une espèce bien particulière (**Walsh, 2003**).

Les HEs obtenues dans ce travail ont été combinées proportionnellement de façon à avoir dans chaque combinaison, une HE majoritaire à 60 %. L'activité antimicrobienne de chaque combinaison a été déterminée et comparé à l'HE majoritaire dans la combinaison. On note que les combinaisons d'HEs ont présenté une activité plus intéressante que les HE testées individuellement sur les bactéries et les levures avec réduction considérable des CMI sur l'ensemble des isolats microbiens. La majorité des combinaisons ont montrés un effet bactéricide et fongicides caractérisé par les rapports CMB/CMI = 1 ou 2 pour les bactéries et CMF/CMI = 1 ou 2 pour les levures. Hormis l'utilisation d'HE dans des huiles gras comme support, la plupart des HEs sont utilisées dans des mélanges ou des combinaisons de deux huiles ou plus (**Lawless, 1995**). Ces mélanges sont considérés comme un art dans lequel les HEs sont soigneusement sélectionnées et combinées avec l'intention de guérir de manière holistique l'individu «tout entier» en fonction de ses symptômes. L'objectif du mélange étant de créer un effet thérapeutique synergique lorsque la combinaison d'HEs est supérieure à la somme de chaque HE prise individuelle (**Harding, 2008**). La synergie peut être obtenue si les composés de l'huile peuvent affecter des sites cibles différents, ou ils peuvent interagir les uns avec les autres pour augmenter la solubilité, améliorant ainsi la biodisponibilité (**Suliman et al., 2010**). L'objectif étant de mettre au point un traitement à plusieurs cibles pour réduire la mutation de l'agent pathogène et retarder ainsi le développement de la résistance. La formulation combinée peut également réduire la toxicité et les effets secondaires indésirables en diminuant la dose requise (**Cottarel et Wierzbowski, 2007, Inui et al., 2007**).

Les HEs et combinaisons ont présentés des activités intéressantes sur les biofilms bactériens et fongiques malgré une résistance de ceux-ci compte tenu de leurs capacités à

résister aux antimicrobiens conventionnels, tels que les antibiotiques (**Kavanaugh et Ribbeck, 2012**). Par contre, à travers des recherches effectuées récemment, les HEs sont avérées très efficaces contre des biofilms microbiennes, où elles peuvent agir de plusieurs façons. D'après **Niu et Gilbert (2004)**, les HEs à faible concentration inhibent la formation des biofilms bactériens par plusieurs mécanismes. Notamment, l'activation des gènes de réponse contre-stress qui à leur tour diminuent la production des polysaccharides extracellulaires (le constitue majoritaire de l'EPS). En plus, les HEs peuvent interagir avec les protéines des surfaces bactériennes ce qui inhibe leur fixation et du coup, la formation du biofilm. En outre, les HEs ont la particularité d'agir directement sur des biofilms déjà formés, contrairement à la majorité des agents antimicrobiens. D'après **Niu et Gilbert (2004)**, les HEs ont la possibilité d'éradiquer les biofilms microbiennes par solubilisation de leur matrice extracellulaire. D'autres auteurs indiquent que les HEs sont aptes de diffuser à travers la matrice polysaccharidique du biofilm et de la déstabiliser, en raison de leur forte propriété antimicrobienne intrinsèque (**Ouhayoun, 2003**).

La recherche de l'efficacité des HEs de plante et la détermination des cibles cellulaires sont des défis majeurs pour la valorisation de l'aromathérapie. Plusieurs travaux ont démontré l'activité antibactérienne et antifongique des HEs, mais la compréhension de leurs mécanismes d'action et principalement leurs cibles cellulaires viendra à coup sûr compléter et classifier leurs activités. C'est dans ce sens que nous avons évalué l'effet des différentes HEs utilisées dans le cadre de ce travail sur l'intégrité de la membrane des bactéries sélectionnées justifiant l'inhibition de leur croissance. Ainsi, la fuite du matériel génétique à travers la membrane plasmique des bactéries a été déterminée pour évaluer l'effet des HEs sur la membrane des bactéries mises au contact de ces HEs. Après avoir suivi la libération de biomolécules intracellulaires après 0 min; 30 min et 60 min, on note que toutes les HEs testées dans cette étude avaient un effet lytique sur la membrane cellulaire de toutes les bactéries utilisées après 30 min d'exposition, contrairement au témoin. Les dommages causés à la membrane des bactéries par les HEs, plus précisément par leurs composés ont été marqués par une augmentation de l'absorbance à 260 nm par rapport au contrôle sans HEs, ce qui implique une lyse de la membrane ainsi que la libération de biomolécules (ADN, ARN) dans le milieu extracellulaire. **Xu et al.** ont aussi fait le même constat sur les cellules de *Staphylococcus aureus* avec l'HE du clou de girofle testée à 1/2x CMI ; 1xCMI et 2xCMI dont l'activité a conduit à une modification de la morphologie bactérienne suivie d'une lyse

cellulaire seulement à partir de la CMI (**Xu et al., 2016**). Egalement **Rhayour** a montré que la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm augmente progressivement en fonction de la concentration en HE ce qui se traduit par l'ampleur des dommages observés (**Rhayour, 2002**). Pour confirmer l'effet des HEs sur la paroi et la membrane des bactéries testées, une quantification des biomolécules libérées a été réalisée. Les résultats obtenus mettent en évidence des grandes quantités de biomolécules intracellulaires libérées dans le milieu extracellulaire à la CMI avec une différence significative ($P = 0,05$). On note que le contrôle composé de bactéries non traitées avec des HEs ne présentait aucun contenu intracellulaire (ADN, ARN et Protéines) dans le milieu extracellulaire. Les concentrations de matériel intracellulaire libérée dans le milieu extracellulaire variant de $186,56 \pm 2,35 \text{ ng} / \mu\text{L}$ à $766,6 \pm 2,84 \text{ ng} / \mu\text{L}$ pour l'ADN, $158,06 \pm 1,87 \text{ ng} / \mu\text{L}$ à $628,53 \pm 2,05 \text{ ng} / \mu\text{L}$ pour l'ARN et $695,9 \pm 2,11 \text{ ng} / \mu\text{L}$ à $1234,33 \pm 2,97 \text{ ng} / \mu\text{L}$ pour les protéines. Cette quantification des biomolécules au Nanodrop 1000 a permis la mise en évidence d'une quantité significative d'ADN, ARN et protéines dans le milieu extracellulaire des cellules traitées aux HEs comparées aux cellules saines ($P = 0,05$). Nous pouvons dire que les HEs ont la capacité de traverser la paroi et la membrane plasmique des bactéries et ainsi occasionner un désordre structural fatal pour la bactérie par diminution de sa rigidité et perturbation de son intégrité (**Bajpaj et al., 2017**). La membrane bactérienne constitue une barrière physiologique et de ce fait, joue un rôle dans la protection et maintien de l'homéostasie cellulaire puisqu'elle contrôle l'entrée et la sortie de plusieurs substances. Cependant, la principale caractéristique des molécules présentes dans les HEs est leurs hydrophobicités qui leur confèrent la capacité de traverser la paroi lipidique riche en acide mycolique et provoquer au niveau de la membrane cytoplasmique une perturbation du potentiel et une désorganisation des phospholipides qui s'accompagnent d'une perte d'ions, d'ATP et de biomolécules intracellulaires (**Lambert et al., 2001 ; Xu et al., 2016**). Ce caractère lipophile des HEs les rend capables de s'accumuler entre les phospholipides, entraînant des changements de conformation et éventuellement un manque de régulation de la membrane cellulaire, ce qui perturbe ainsi le transport membranaire des substances nutritives (**Cox et al., 2001**). Son altération due à la présence de substances antibactériennes peut conduire à la lyse complète et pourrait de ce fait être fatal pour la bactérie qui verra alors son contenu cytoplasmique relargué dans le milieu extracellulaire et son métabolisme arrêté. Nous pensons donc que c'est ce qui explique la grande quantité de ces biomolécules dans le milieu extracellulaire pour les cellules traitées aux

HEs par rapport aux cellules saines. Lorsque la perte de matériel est trop importante, cela va entraîner une déformation morphologique du cytoplasme de la bactérie conduisant à sa mort par lyse cellulaire (**Guinoiseau, 2010**).

Le développement des modèles *in vitro* de biofilm représente une avancée majeure, car ils permettent une meilleure compréhension de la nature du biofilm dentaire et de ses aspects physiologiques, ainsi que les interactions entre les espèces microbiennes dans les biofilms. Les organismes qui composent les biofilms ne sont pas des voisins passifs, ils sont impliqués dans un large éventail d'interactions physiques, métaboliques et moléculaires (**Marsh, 2004**). Ce modèle de biofilm *in vitro* a été choisi parce que la cible des antimicrobiens lorsqu'ils sont utilisés en bain de bouche, est principalement le biofilm dentaire supra-gingival. C'est un modèle techniquement simple à préparer, et qui permet d'obtenir l'exposition à court terme du biofilm à certaines substances comme cela est courant dans les procédures d'hygiène buccale. Le modèle utilisé a été basée sur une approche de culture de lot, sur des disques d'hydroxyapatite tel qu'il est décrit par **Guggenheim et al. (2001)**. Dans ce modèle, ils ont utilisé trois espèces bactériennes à Gram positif et deux espèces à Gram négatif. Ce modèle de biofilm supra-gingival *in vitro* a été repris par **Shapiro et al. (2002)** et **Guggenheim et al. (2004)**, en incluant en plus des cinq espèces bactériennes une levure (*Candida albicans*). Les trois espèces que nous avons incluses dans cette étude sont *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* (Sa 2) et *Streptococcus sp* (St 1), espèces microbiennes qui ont démontré une forte capacité à former le biofilm. La réalisation des biofilms dans cette étude était faite sur des dents de bœuf de par leur disponibilité et leur morphologie de base similaire à celle des dents humaines (**Haapasalo et al., 1987**). Le taux de réduction des UFC des biofilms jeunes après exposition a donné 25.10^3 pour la formule 2 (F₂) et $23,5.10^3$ pour la formule 4 (F₄), en comparaison avec le contrôle négatif $31,4.10^3$ UFC. Egalement le taux de réduction a été de $21,3.10^3$ et $20,5.10^3$ pour les deux formules (F₁) et (F₃) respectivement, par rapport au contrôle négatif $31,4.10^3$ UFC. De même L'exposition a donné un taux de réduction de $42,2.10^3$ pour la formule 2 (F₂) et $41,6.10^3$ pour la formule 4 (F₄) en comparaison avec le contrôle négatif $53,9.10^3$ UFC. Egalement l'exposition a donné un taux de réduction des valeurs des UFC de $36,7.10^3$ et $29,9.10^3$ pour les deux formules (F₁) et (F₃) respectivement par rapport au contrôle négatif $53,9.10^3$ UFC. On peut donc déduire que les différents bains de bouche formulée ont un effet sur les microorganismes du biofilm dentaire du model *in vitro*, aussi bien pour les biofilms

jeunes que pour les biofilms matures. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par **Guggenheim et al. (2001)** qui ont développé le modèle de biofilm supra-gingival et qui permet l'exposition à court terme des biofilms à certaines substances antibactériennes. Nos résultats étaient aussi proches de ceux de **Shapiro et al. (2002)**. Le but de leur étude était d'évaluer et de comparer l'effet de différentes solutions de bains de bouche, incluant la Chlorhexidine à 0.1 % sur le modèle *in vitro* de la plaque supra-gingival précédemment décrit par **Guggenheim et al.** Tous les bains de bouche ont montré une réduction significative du nombre des bactéries dans les biofilms *in vitro* en comparaison avec le contrôle négatif. Une étude réalisée par **Guggenheim et al. (2004)** a utilisé le même modèle de biofilm supra-gingival pour démontrer un certain nombre d'applications, ayant un impact direct ou indirect sur la dentisterie prophylactique : l'organisation spatiale et le comportement associatif de diverses espèces dans les biofilms, utilisation du modèle de biofilm pour prédire l'efficacité *in vivo* des antimicrobiens de façon fiable. Les résultats de cette étude ont montré que la Chlorhexidine à 0.1 % a réduit significativement le taux des biofilms composés de cinq espèces bactériennes en comparaison avec le contrôle négatif. Une étude menée par **Farid et al. (2012)**, a montré que les bains de bouche avec les HEs comme antimicrobiens peuvent être utilisés comme alternative à la Chlorhexidine à 0.1 % dans l'inhibition de la plaque supragingivale et la réduction de l'inflammation gingivale. Une telle application peut être bénéfique pour les patients qui font une allergie à la Chlorhexidine, et aussi aux effets secondaires notamment la coloration des dents et les vomissements. L'analyse sensorielle montre que le parfum des solutions de bain de bouche était majoritairement celles des ingrédients de cuisine avec 46,7 %, 40 % et 33,3 % respectivement pour les formules 0, 3 et 4. Ceci peut s'expliquer par le fait que les plantes utilisées dans ce travail sont majoritairement les épices utilisées en cuisine par les populations et ces parfums leurs sont familières. De même selon le panel, les solutions de bain de bouche exprimaient une note de fraîcheur qui variait d'un consommateur à un autre. Néanmoins, une note de fraîcheur intense a été retenue avec des fréquences de 50 %, 40 % et 33,3 % respectivement pour les solutions 2,3 et 1. Selon notre panel, la listérine utilisée comme bain de bouche présentait quant à elle une note de fraîcheur très intense. Cette note de fraîcheur intense ou très intense proviendrait de l'HE de *Mentha sp cf piperata* qui a une propriété rafraichissante. Il a été noté que la formulation 2 était la plus appréciée avec 43,3% d'acceptabilité et suggérée comme celle pouvant être utilisée comme solution pour bain de bouche.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

La santé bucco-dentaire a des effets directs sur l'être humain ainsi que sur la qualité de sa vie quotidienne. Les lésions de la cavité buccale demeurent à ce jour les pathologies infectieuses les plus répandues au monde, dans lesquels les caries dentaires et les maladies de la gencive sont des exemples édifiants. D'où ce travail qui avait pour objectif de formuler un bain de bouche ayant des propriétés antimicrobiennes avec des mélanges d'huiles essentielles comme principes actifs pour lutter contre les infections buccodentaires.

- La carie dentaire et la pulpite étaient les infections buccodentaires les plus observées. L'identification des microorganismes responsables d'infections buccodentaires a révélé une forte proportion de cocci Gram positifs (34 %) et de bacilles Gram négatifs (30 %), tandis que les levures et les bacilles Gram positifs ne représentaient qu'un taux de 20 % et 16 % respectivement. Les espèces majoritaires identifiées et ayant montré une bonne capacité à former le biofilm étaient *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Candida sp.1*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans*.
- Toutes les HEs ont présenté des propriétés antimicrobiennes mais les plus actives sont celles de *P. brazzeana* et *E. caryophylla*. les combinaisons ont présenté des meilleures activités que les HEs présent individuellement tant sur les cellules que sur les biofilms. Ces propriétés proviennent du mélange complexe en composés antimicrobiens contenu dans les HEs. De plus, Toutes les HEs des plantes testées agissent à la fois sur la paroi bactérienne et la membrane cytoplasmique par fragilisation de celles-ci entraînant une libération extracellulaire des biomolécules.
- Les HEs et les combinaisons ont été capables d'inhiber la formation de biofilm à des concentrations variées.
- Les différentes formulations de bain de bouche ont présenté un bon pouvoir désinfectant et la formule 2 a été celle retenus car elle présentait à la fois une bonne activité et des propriétés organoleptiques acceptables après analyse sensorielle.

Perspectives

L'originalité de ce travail était la proposition des nouvelles solutions de bain de bouche face aux problèmes des infections bucco-dentaires persistantes. L'utilisation des formulations à base des HEs diluées dans les excipients présente une bonne alternative des antiseptiques chimiques utilisés actuellement, tels que la Chlorhexidine. Vu les résultats obtenus, il serait très intéressant :

- d'effectuer les tests *in vivo*,
- de déterminer la toxicité *in vitro* et *in vivo* des HEs utilisées et de leurs combinaisons,
- de valoriser et de commercialiser des solutions de bain de bouche à base de combinaison d'HEs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams R. P. (2012). Identification of essential oils by Gas Chromatography Quadrupole Mass Spectroscopy. 4th Edition Allured Publishing Corporation Carol Stream. P: 9-698.
- AFNOR (2000). Recueil des Normes Françaises des Huiles essentielles. Tome 2. Vol 1. 79p.
- AFSSAPS (2008). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles: Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. <http://www.afssaps.santé.fr>. P : 18.
- Amrane C. Y. (2017). Cours cavité buccale amrane cy. P : 1-4.
- Azevedo N. R., Campos I. F., Fereira H. D., Prtes T. A., Santos S. C., Seraphin J. C., Paula J. R., Ferri P .H. (2001). Chemical variability in the essential oil of *Hyptis Suaveolens*. *Phytochemistry*. 57, 733 - 736.
- Babii C., Mihalache G., Bahrin L. G, Neagu A. N., Gostin I., Mihai C. T., Sarbu L. G., Birsa L. M., Stefan M. (2018). A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: *In vitro* activity and proposed mode of action. *PLoS ONE*. 13 (4).
- Bajpai V.K., Shukla S., Paek W.K., Lim J., Kumar P., Kumar P., Na M. (2017). Efficacy of (C)-Lariciresinol to control bacterial growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8: 804-811
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2):446-75.
- Barbosa W. L. R., Soares do Nascimento M., Lucianna do Nascimento P., Costa Maia F. L., Sousa A. J. A., Silva J. O. C. Jr, Monteiro M. M. and Ribeiro de Oliveira D. (2011). Chapter 1: Selecting medicinal plants for development of phytomedicine and use in primary health care; in bioactive compounds in phytomedicine, Edited by Iraj Rasooli, Published by Intech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, ISBN 978-953307-805-812.
- Barrere S. (2016). Le point sur les relations entre infections dentaires et infections de protheses articulaires, Thèse, Universite Toulouse III – Paul Sabatier, P : 43.
- Baumgartner J. C, Watts C. M, Xia T. (2000). Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontology*. 26: 695-98.
- Behlou I. et Gilmore M. S. (2008). Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases. *Archives Ophthalmoogyl*. 126, 1572-1581.
- Thèse de doctorat/ph.d, redigée par NGONGANG TCHAMI Dimitri*

- Benayad N. (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Thèse, Université Mohammed V – Agdal. P : 61.
- Betote (2016).** Etude chimique et activité anti-mycobactérienne des huiles essentielles et extraits de trois plantes camerounaises sur *mycobacterium tuberculosis*. Mémoire de master en biochimie université de Yaoundé 1. 93p.
- Bonnot J. et Pillon F. (2013).** Une bonne hygiène bucco-dentaire pour prévenir les caries. Actualités pharmaceutiques. 524 : p39-44.
- Bouchard P. (2015).** Odontologie Parodontologie Dentisterie implantaire. Vol.1. médecine parodontale, Lavoisier paris.
- Bruneton J. (1993) :** Phytobiochimie des plantes médicinales : les huiles essentielles. Pharmacognosie, techniques et documentation. 2ème Edition. *Tec et Doc. Lavoisier*, Paris. pp 401-404.
- Burt S. A. (2004).** Essential oils: Their anti-bacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 94: 223-253p.
- Branger A., Richer M., Roustel S. (2007).** Microbiochimie et alimentation. *Edition Educagri*. 343p.
- Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (2003).** Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Amsterdam, Academic Press.
- Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V. (2002).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 1914-20.
- Castro Melo P., Ferreira L .M., Filho A. N., Zafalon L. F., Godoy Vicente H .I., de Souza V. (2013).** Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian journal of microbiology*. 44 (1): 1517-8382.
- Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. (1982).** Adherence of slimeproducing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infectiology and Immunology*. 37: 318-326.

- Clutterbuck A. L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochrane C. A., Percival S. L. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 121(1) : 1-17.
- CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2012).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved standard **M27-A9**, Wayne. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Clinique*, 32 : 12-28p
- Cottarel G. and Wierzbowski J. (2007).** "Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy". *Trends in Biotechnology*, 25 : 547-555.
- .-Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L. (2001).** Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*. 91 : 492-499.
- Crouzet J. et Muchamad M. (1982).** Composition de l'huile essentielle de clous de girofle de différentes provenances. VIIIth International Congress on essential oils. Fedarom, Cannes-Grasse. P: 255-258.
- Dabholkar C., Shah M., Kathariya R., Bajaj M., Doshi Y. (2016).** Comparative evaluation of antimicrobial activity of pomegranate-containing mouthwash against oral-biofilm forming organisms: An invitro microbial study. *Journal of Clinical Diagnostic Reseach*. 10(3):65–9.
- De Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., & van Vuuren, S. (2013).** The *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Other Aroma-Therapeutic Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–10.
- Deleyiannis F., Dunklebarger J., Lee E., Gastman B., Lai S., Ferris R., Myers E. N., Johnson J. (2007).** Reconstruction of the marginal mandibulectomy defect: an update. *American Journal of Otolaryngology Head Neck and Medical Surgery*. P: 6-363.
- Deracinois B. (2012).** Analyse protéomique différentielle des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique : identification de protéines induites par les cellules gliales. Thèse de doctorat, université d'Artois, France. 288p.
- Desjardins et Conklin P. D. (2010).** NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*. 45:265-273.

- Devoize L., Darell R. (2010).** Salivation, Research Gate.
- Diaz P.I. (2012).** Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities. *Front Oral Biol.* P: 17-40.
- Dibong S. D., Mpondo M. E., Ngoye A., Kwin N. F., Betti J. L. (2011).** Ethnobotanique et phytomédecines des plantes médicinales vendues sur les marchés de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences.* 37 : 2496-2507.
- Dorman H. J. D. et Deans S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* Vol 88 : 308-316p.
- Droguet (2016).** Identification bactérienne. Site internet : [http:// droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activités-technologiques-1ere-2015-2016/at20-identification-bactérienne.html](http://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activités-technologiques-1ere-2015-2016/at20-identification-bactérienne.html) électroniques .Université Laval. Québec, Canada.
- Dumitrescu, A. L., et Ohara M. (2010).** Periodontal Microbiology. In Dumitrescu, A. L. (ed.), *Etiology and Pathogenesis of Periodontal Disease*, Berlin and Heidelberg, Allemagne: Springer-Verlag. P: 39-76.
- Dufresne P. (2018).** Identification des moisissures d' intérêt médicale. Laboratoire de santé publique Québec, 59p
- Espinasse F., Page B., Cottard-Bouelle B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires.* 426,51-63.
- Essama Enon Belinga L., Bell Nan W., Koultouk Mouliez J. S., Choke S. P. (2013).** Évaluation de la Santé Bucco-dentaire des Patients Diabétiques Camerounais. *Heath Sciences and Diseases:* Vol 14 (3), Available at www.hsd-fmsb.org.
- Estrade M.N. (2006).** Conseil en cosmétologie. Wolters Kluwer France. 2 : p 110-119.
- Farid B. M., Adolphe A., Eugène S., Attakpa, Lysette K., Joachim D., Gbénou, A. K., Simeon O., Kotchoni, Alphonse S., Fatiou., Toukourou, et Lamine B. M. (2012).** Antimicrobial activity of three essential oils from Benin on five oral germs: Test of mouth baths. *Annals of Biological Research.* Vol 3 (11): 5192-5199p.
- Fauchère J. L. et Avril J. L. (2002).** Bactériologie générale et médicale. Edition Ellipses. P: 365.

- Filloux A, Vallet I. (2003).** Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Medecine sciences: M/S.* 19(1): 77-83.
- Fowell C., Igbokwe B., MacBean A. (2012).** The clinical relevance of microbiology specimens in orofacial abscesses of dental origin. *Annual Research of the College Surgeons England.* P: 2-490.
- Franchomme P., Jallois R., Penoel D. (2011).** Aromathérapie exactement (Encyclopédie de l'utilisateur thérapeutique des extraits aromatique). Eds Roger Jollois; 21-74; 190-245.
- Frias-Lopez J. et Duran-Pinedo A. (2012).** Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *Journal of Bacteriology.* 194 : 2082–2095.
- Ghada A. (2016).** Coherence et intérêt de l'antibiothérapie prescrite par les praticiens dentistes du Liban dans le cas d'un abcès dentaire. *Medecine humaine et pathologie.* Université du Droit et de la Santé - Lille II, P : 36.
- Goetz P. and Ghedira K. (2012).** Phytothérapie anti-infectueuse. *Edition Springer, France* 382p
- Gomes-Filho IS, Passos J. S., Seixas da Cruz S. (2010).** Respiratory disease and the role of oral bacteria. *Journal of Oral Microbiology.* 2 : 5811.
- Gracieux P., Robert J.C. et Bonnaure-Mallet M. (2006).** Les biofilms buccaux. *Microbiologie en odonto-stomatologie.* Chardin H., Barsotti O. et Bonnaure-Mallet M. Paris: France, Maloine: 141–160.
- Guggenheim B., Guggenheim M., Gmur, Giertsen, Thurnheer (2004).** Application of the Zürich Biofilm Model to Problems of Cariology. *Caries Resaerch.* 38: 212 222
- Guggenheim B., Giertsen E., Sschupbach P., Shapiro S. (2001).** Validation of an *in vitro* Biofilm Model of Supragingival Plaque. *Journal of dental research.* 80: 363-370.
- Guillaume G. N. et Marc C. L. (2011).** *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Review of canada Microbiology.* P: 1–20.
- Guinoiseau E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat, université de Corse, France. 222p.

- Haapasalo M. et Orstavik D. (1987).** In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of Dental Research*. 66: 1375-1379.
- Habib B. (2011).** *Paysage des ONG dentaires*, Santé bucco-dentaire et santé générale – Enjeux d’intégration de coopération et de développement- AOI, sous la direction de Bernard Decroix, p68. 69-70.
- Hellal Z. (2011).** Contribution à l’étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Diplôme de Magister en Sciences Alimentaires, Université Mouloud Mameri de Tizi-ouzou, Algerie. 85p.
- Hend A. H. (2009).** Monitoring of Antimicrobial Activity of Essential Oils Using Molecular Markers. *The Open Biotechnology Journal*. 3: 103-107.
- Herbert F., Wolf E. M., Rateitschak H. (2004).** Parodontologie, 3eme édition. [s.l]: Elsevier Masson. P: 30-145.
- Hockmeni T. C. (2011).** Composition chimique et évaluation de l’activité antifongique des huiles essentielles de *Syzyuim arnaticum* et *Mentha sp cf piperita* sur quelques germes pathogènes à l’homme. *Mémoire de Master en Biochimie*, Université de Yaoundé I. P : 58.
- Høiby N., Ciofu O., Johansen H. K., Song Z. J., Moser C., Jensen P., Bjarnsholt T. (2011).** The clinical impact of bacterial biofilms , *International Journal of Oral Sciences*. 3 (2): 55-65.
- Hojo k., Nagaoka S., Ohshima T., Maeda N. (2009).** Bacterial interactions in dental biofilm development. *Journal of Dental Research*. 88: 982-990.
- Horváth G., Ács K. (2015).** Essential oil in the traitement of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: Review. *Flavour Fragrance Journal*. 30: 331–334.
- Hyldrgraad M., Mygird T., Meyer R. L. (2012).** Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and Interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. 3 : 1 - 24.
- Inui T., Wang Y., Deng S., Smith D.C., Franzblau S.G. and Pauli G.F. (2007).** "Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical". *Journal of Chromatography A*, 1151 : 211-215.

- Iquaqua J. (2006).** Extractions dentaires intempestives sur site tumoral malin, Faculte de Medecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie, Thèse, Universite CHEIKH ANTA DIOP de DAKAR. P: 1-99.
- Jacobsen S. M., Stickler D. J., Mobley M. L., Shitiliff M.E. (2008).** Complicated Catheterassociated urinary tract infections due to Echerichia coli and Proteus mirabilis. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 26-59.
- Jain A., Marsili E., Bhosle N. B. (2011).** The Biofilm Returns: Microbial Life at the Interface . *Microbes and Microbial Technology*. Springer, New York. P. 59-85.
- Jayana R., Shree B., Rao D., Nagar P. (2012).** Clinical features, diagnosis andmanagement of oral lichen planus in children. *Journal of Dentistry and Oral Bioscience*. 3:47-50.
- Jayanta K .P., Kwang-Hyun B. (2016).** Antibacterial Activity and Action Mechanism of the Essential Oil from *Enteromorpha linza L.* against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Botanical Studies*. 56 : 13.
- Joffin J. et Leyral G. (1998).** Microbiologie technique 2 : Documentation technique, 2e éd.- Bordeaux : CRDP d'Aquitaine. (Biologie technique). P : 1-200.
- Joffin J. et Leyral P. (2005).** Microbiologie Technique 1: Dictionnaire des techniques, 3^{ème} Edition CRDP Aquitaine. 97-203.
- Jussara Cia S. Loberto, Clélia Ap. de Paiva M., Silvana S. Ferreira dos Santos, Cortelli J. R., Antonio Olavo Cardoso Jorge (2004).** Staphylococcus spp. in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. P: 64-68.
- Kalemba D. et Kunicka A. (2003).** "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." *Current Medical Chemistry*. 10 (10): 813–829.
- Kaloustian J., Hadji-minaglou F. (2012).** La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie (Entre science et tradition pour application médical raisonnée). Collection phytothérapie pratique ; *Springer* Paris : 12, 101-113, 162 p.
- Kamela K.H.T. (2017).** Effet de trois huiles essentielles et de leurs combinaisons sur la croissance des levures responsables des candidoses. Mémoire de Master en Biochimie, Université de Yaoundé I, Cameroun.

- Kammogne Christophe Constant Chechom. (2010).** Profil bactériologique des infections en stomatologie et chirurgie maxillo-faciale, mémoire, UFR de sciences médicales-Abidjan-Côte d'Ivoire. P : 1-70.
- Kang M. S., Oh J. S., Lee H. C., Lim H. S., Lee S. W., Yang K. H., Choi N. K., Kim S. M. (2011).** Inhibitory effect of *Lactobacillus reuterion* periodontopathic and cariogenic bacteria, *Journal of Microbiology*. P: 193–199.
- Kato T., Iijima H., Ishihara K., Kaneko T., Hirai K., Naito Y. et Okuda K. (1990).** "Antibacterial effects of Listerine on oral bacteria. *The Bulletin Tokyo Dental College*. 31(4): 301–307.
- Kavanaugh N. L. et Ribbeck K. (2012).** Selected anti-microbial essential oils eradicate *Pseudomonas sp* and *Staphylococcus aureus* biofilm. *Applied environmental biology*. 78(11): 4057-61.
- Keijser B. J., Zaura E., Huse S. M., van der Vossen J. M., Schuren F. H., Montijn R. C., Cate J. M. et Crielaard W. (2008).** Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *Journal of Dental Research*. 87(11):1016-20.
- Kemegne G.A, Nyegue M.A, Sado K.S.R, Etoa F-X and Menu C. (2018).** Mangifera indica bark essential oil: chemical composition and biological activities in comparison with aqueous and ethanol extracts. *Natural Product Communications*, 13(7): 903 -990.
- Kengne G. L., Nyegue M. A., Djuidje C., I. Ngonsu K. and Etoa F-X, E. (2018).** Assessment of Indoor Microbial Quality of Library's Premise: Case of Central Library of the University of Yaoundé I. *Open Journal of Preventive Medicine*, 8, 109-120. <https://doi.org/10.4236/ojpm.2018.84011>
- Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y. A., Millet J. et Chaumont J.P., (2004).** Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp*. Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annal of Emmergency Médedecine Véterinary*, 148: 202-206p.
- Kpoviessi S., Bero J., Agbani P., Gbaguidi F., Kpadonou-Kpoviessi B., Sinsi B., Accrombessi G. (2014).** Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *Journal of Ethnopharmacology*. ScienceDirect. 151: 652–659.

- Kuffer R., Lombardi T., Husson-bui C., Courrier B., Samson J. (2009).** La muqueuse buccale de la clinique au traitement. Paris: MED'COM. P: 13-18.
- Kumamoto C. A. et Vinces M. D. (2005).** Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surface. *Annual Review of Microbiology*. 59: 113-33.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. (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.
- Lamendin H., Boullard B. et Dubois A. (2008).** Plantes médicinales bucco-dentaires de Normandie (Connaissances d'hier et d'aujourd'hui) *Chirurgie Dentaire*. France. 1366, 32-39p et 1367, 46-51p.
- Laruelle R. (2007).** Initiation à la formulation des parfums. 3^{ème} édition. Ayrel. Belgique. 17-100p.
- Lasfargues J. J. et Machtou P. (2009).** Pathogénèse des Lésions Périapicales. *Realites Cliniques*. 12(2). P : 139-148.
- Lefebvre A. (2003).** L'analyse sensorielle, une méthode de mesure au service des acteurs de la conception : ses avantages, ses limites, ses voies d'amélioration. Application aux emballages. 10^e séminaire CONFERE, Belfort-France. 3-11p.
- Iyamba L. J. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
- Majoli S. (2003).** Santé et hygiène buccodentaires au Cameroun: étude préliminaire pour la mise en place d'un programme de prévention chez des écoliers, Thèse de Doctorat en médecine dentaire, Université de GENEVE, P : 4-34.
- Manvitha K. et Bidya B. (2014).** Review on pharmacological activity of *Cymbopogon citratus*. *International Journal of Herbal Medicine*. 1 (6) : 5-7.
- Marchal M. (2010).** Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. France.
- Marsh P.D. (2004).** Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Reseach*. 38:204–21.

- Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay U. P., Fatma F., Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24 (1): 25-9.
- Mello G., Sixou J. L., Jeandot J., Duran D. (2003).** Etude comparative de l'association spiramycine-métronidazole et de l'amoxicilline dans le traitement des périodontites de l'adulte, EDP sciences, <http://www.mbcjournal.org>, *Medecine Buccale Chirurgie Buccale*. P : 65-159.
- Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydants des huiles essentielles des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Thèse, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen. P: 140.
- Moni E., Nyegue M., Ndoyé F. Fl., Voundi ., Essia Ngang J.J., Etoa F-X. et Menut C., (2013).** Profil chimique et tests antibactériens de neuf huiles essentielles et leurs combinaisons sur les bactéries responsables sur les diarrhées infantiles. *15^{ème} Symposium Phyt'Arome*. Grasse 7, 8 et 9 Juin.
- Moreira M.R., Ponce A.G., de Valle C.E., Roura S.I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie-L*
- Nagant C. (2013).** Contribution à la recherche de nouveaux agents antibactériens actifs sur les biofilms de *P. aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
- Nasr S. A., AbuShady H. M., Hussein H. S. (2012).** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 1110-8630.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2008).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2nd edition approved standard M27 –A2, Wayne,PA, USA, 30-413p.
- Ndoyé F. C. (2001).** Etude chimique et évaluation des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des huiles essentielles d'espèces aromatiques tropicales en provenance d'Est du Cameroun. Thèse, Université de Montpellier. P: 319.
- Nelson W. (2004).** How Poor Oral Health Promotes Systemic Diseases Report. *Mag*. P: 61-62.

- Nguyen, S. et Hiorth, M. (2015).** Advanced drug delivery systems for local treatment of the oral cavity. *Therapeutic Delivery*, 6(5), 595–608.
- Niu C. et Gilbert E. S. (2004).** Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied environmental biology*. 70(12): 6951-6.
- Nostro A., Sudano Roccaro A., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A., Pizzimenti F.C., Cioni P.L., Procopio F. et Blanco A.R. (2007).** "Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Journal of Medical Microbiology*. 56 (4): 519–523.
- Ntumba Kabongo E. (2010).** Les odontalgies, la bactériologie buccale et la santé, Mémoire, Université de Lubumbashi – Graduat, P : 1-80.
- Nyegue M. A., Montaut S., De Nicola G. R., Pollin P. Menut C. (2018).** Applying the hydrodistillation process to *Pentadiplandra brazzeana* Bail. Root: a chemical assessment. *Natural products research*; ISSN: 1478-6427.
- Nyegue M. A., Ndoyé-Foe M. C., Riwom E. S., Hockmeni T. C., Etoa F. X. et Menut C. (2014).** Chemical composition of essential oils of *Eugenia caryophylla* and *Mentha sp cf piperata* and their *in vitro* antifungal activities on six human pathogenic fungi. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM)*, vol 11, No 6. 15p.
- Nyegue M., Sado K.S.L., Ndoyé F.C., Essia N.J.J., Gardini I., Etoa F-X. (2010).** Huile essentielle de *Eryngium foetidum* (Apiacées) ; étude chimique et optimisation de son activité antibactérienne sur *Listéria monocytogène* et *staphylococcus aureus*. 12^{ème} Symporium International d’Aromathérapie et plantes Médicinales. Grasse 26-27et 28 Mars.
- Nyegue M.A. (2006).** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de quelque plantes aromatiques et/ou médicinales du Cameroun: évaluation de leurs activités antiradicalaires, antiinflammatoires et antimicrobiennes, Thèse, Universités de Montpellier II et Yaoundé I. Cameroun. P: 46-143.
- OMS. (1998).** Réglementation des médicaments à base de plantes : la situation dans le monde. WWHO/TRM/98.1.

- Orstavik D., Pitt Ford T. (2008).** Essential Endodontology. Prevention and Treatment of Apical Periodontitis. 2nd edition. Blackwell Munksgaard, ch.5, P: 96-135.
- Ouhayoun J. P. (2003).** Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. *Journal of Clinical periodontology*. 30 (5): 12-14.
- Peng J-S, W-C Tsai and C-C Chou. (2001).** Surface characteristics of Bacillus cereus and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* ; P: 105-111.
- Perrin, C. (2009).** Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'Escherichia coli K-12. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France.
- Petersen P. E and Kwan S. (2010).** 7th WHO global Conference on Health Promotion – towards integration for oral health (Nairobi, Kenya 2009), Community Dental Health.
- Petersen P. E. (2003).** Continuous improvement of oral health in the 21st century the approach of the WHO Global Oral Health Programme. 36p.
- Peterson L. R., Thomson R. B. (1999).** Use of the clinical microbiology laboratory for the diagnosis and management of infectious diseases related to the oral cavity. *Journal of oral infection*. P : 95-775.
- Petti S., Glendor U., Andersson L. (2018).** World traumatic dental injury prevalence and incidence, a meta-analysis – One billion living people have had traumatic dental injuries. *Dental traumatology*. 43. 235-240.
- Pibiri M. C. (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen des huiles essentielles. Sujet de Thèse des sciences. Lausanne, 161 p.
- Picard D. (2004).** Pourquoi et comment dépister la plus fréquente des infections buccale? *Le médecin de Québec*. 39(7) : 57p.
- Pillot G et Pillon F. (2014).** Le blanchiment des dents, un acte sous contrôle des professionnels de santé. *Actualités pharmaceutiques*. 2014, 533 : p 49-52.
- Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. (2012).** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical Human and Genetic* .13: 269–274.

- Ramage G., Vande Walle K., Wickes B. L., Lopez-Ribot J. L. (2001).** Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*. 45: 2475–2479.
- Rams T. E., Degener J. E., van Winkelhoff A. J. (2014).** Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *Journal of Periodontology*. 85(1) P: 9-160.
- Rhayour K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* Thèse de doctorat, université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc.
- Robertson D. et Smith A. (2009).** The microbiology of the acute dental abscess. *Journal of Medical Microbiology*. P: 62-155.
- Saha P. et D'Mello P. M. (2004).** A review of medicinal uses and pharmacological effect of *Mentha piparita*. *Natural product Radiance*. 3(4): 214-221.
- Santos B. S., Silva L. C. N., Silva T. D., Rodrigues J. F., Grisotto M. A., Correia M. T., Napoleão T. H., Silva M. V. et Paiva P. M. (2016).** Application of omics technologies for evaluation of antibacterial mechanisms of action of plant-derived products. *Frontiers in Microbiology*. 7:1466.
- Sartoratto A., Machado A. L. M., Delarmelina C., Figueira G. M., Duarte M. C. T. et Rehder V. L. G. (2004).** Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 34(4): 1517-1520p.
- Schupbach P., Osterwalder V. et Guggenheim B. (1995).** Human root caries: microbiota in plaque covering sound carious arrested carious root surfaces, *Caries Research*. P : 95-382.
- Sedgley C. M. and Samaranayake L. P. (1994).** The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in Hong Kong Chinese. *Archives Oral Biology*. P: 66-459.
- Shapiro S., Giersten E., Guggenheim B. (2002).** An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Resaerch*. 36 (2): 93-100.
- Sharma R, Hebbal M, Ankola AV, Murugaboopathy V, Shetty SJ. (2014).** Effect of two herbal mouthwashes on gingival health of school children. *Journal ef Traditional and Complementary Medecine*. 4(4):272–8.

- Simon L. (2007).** The role of *Streptococcus mutans* and oral ecology in the formation of dental caries. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*. p.2
- Sixou M., Diouf A., Alvares D. (2007).** Biofilm buccal et pathologies buccodentaires, *Antibiotiques*. P: 8-181.
- Smith A. J., Robertson D., Tang M. K. (2003).** *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *British Dental Journal*. Vol. 195, P: 701-703.
- Socransky S. S. et Haffajee A. D. (2002).** Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 28:12–55.
- Stoeken J. E., Paraskevas S. et Van Der Weijden G. A. (2007).** "The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review." *Journal of Periodontology*. 78(7): 1218–1228.
- Storoe W., Haug R. H., Lillich T. T. (2001).** The changing face of odontogenic infections. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 59: 739-748.
- Sulimanv S.F., van Vuuren, and Viljoen A.M. (2010).** "Validating antimicrobial combination therapy in African traditional medicines-a case for *Artemisia afra*". *South African Journal of Botany*, 76 : 655-661.
- Takahashi N. (2005).** Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*. P: 103-112.
- Tenke P., Jackel M., Nagy E. (2004).** Prevention and Treatment of Catheter-Associated Infections: Myth or Reality? *EAU Update Series*. 2:106-115.
- Thormar H. (2011).** Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. New Delhi: India, John Wiley & Sons, Ltd.
- Trinita Y. I. (2015).** Epidémiologie des caries dentaires et des parodontopathies chez les enfants scolarisés âgés de 6 et 12 ans dans le département du Mfoundi. *Health Sciences and Diseases*. Vol 19 (1): 31p.
- Ultee A. et Smid E. J. (2001).** "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*." *International Journal of Food Microbiology*. 64(3): 373–378.

- Wagner H. (2006).** "Multitarget therapy-the future of treatment for more than just functional dyspepsia". *Phytomedicine*, 13 : 122-129.
- Vanden B. D. A. et Vlietinck. (1991).** Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. 47-58 p.
- Voundi S., Nyegue M., Ndoye F., Menut C., Etoa F.-X. (2013).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Drypetes gossweileri*, *Ocimum gratissimum* et *Zingiber officinale* sur la croissance de quatre *Bacillus* et sur la germination de leurs spores. *15^{ème} Conférence internationale d'Aromathérapie et des plantes médicinales*, du 7-9 juin 2013; Grasse, France.
- Voundi O.S.H, (2017).** Etudes des huiles essentielles des plantes pour le contrôle des spores de *Bacillus* dans les produits alimentaires, Thèse de Doctorat Ph.D, Université de Yaoundé I, Cameroun, 160p.
- Walsh C. (2003).** Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. Washington DC. *American Society for Microbiology* (ASM). 345 pp.
- Xu J-G., Liu T., Hu Q-P., Cao X-M. (2016).** Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 21(9): 1194.
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014).** Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8, 6–14.
- Yotat M. L., Agbor Ashu M., Ntumba H., Djachechi F., Bolenge J. (2015).** Oral Health Status of the Elderly at Tonga, West Region, Cameroon, Dental Department, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, *International Journal of Dentistry*, 9p.
- Ziane Manel (2016).** Etude de la flore constitutive de la plaque supra-gingivale chez les adultes sains et cariés. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Mémoire, Université de TLEMCEM, P : 1-56.
- Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. (2001).** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*. 336: 195-203.
- Zijng V., Ammann T., Thurnheer T. et Gmür R. (2012).** Subgingival biofilm structure, *Frontiers of Oral Biology*. P: 1-16.

ANNEXES

Annexe 1: Notice d'information

NOTICE D'INFORMATION

Titre : “ EFFET DES HUILES ESSENTIELLES SUR LA CROISSANCE ET LA FORMATION DE BIOFILM DE CERTAINS PATHOGENES DE LA CAVITE BUCCALE”

Investigateur : NGONGANG TCHAMI Dimitri

Nous venons au travers de cette notice d'information vous invitez à participer à une recherche scientifique. Il s'agit d'une étude descriptive et expérimentale qui vise à identifier les microorganismes pathogènes de la flore buccale et trouver des solutions pour mieux les combattre.

Comme vous le savez, la flore orale est un écosystème complexe riche en microorganismes commensaux et saprophytes, qui deviennent pathogènes dans certaines conditions (tabagisme, manque d'hygiène dentaire). Ceux-ci peuvent être à l'origine de nombreuses infections dont les plus fréquentes sont la carie dentaire, les maladies parodontales, et les candidoses buccales. Les antibiotiques ont considérablement réduit la prévalence des maladies buccodentaires. Malheureusement de nos jours, l'émergence de bactéries résistantes à ceux-ci a mis un terme à cette vague d'optimisme.

Ces ainsi que les extraits de plantes médicinales, peuvent être considérées comme une bonne alternative en thérapie buccodentaire.

Objectifs de la recherche

- Evaluer le profil microbien des infections bucco-dentaires, caractériser les isolats cliniques et évaluer la capacité des isolats à former des biofilm ;
- Déterminer la composition chimique des HEs des plantes utilisées et leurs combinaisons;
- Evaluer l'activité antimicrobienne des HEs sur la croissance microbienne, ainsi que sur la formation de biofilm et ressortir quelques effets des HEs sur les potentielles cibles cellulaires ;
- Formuler des solutions pour bain de bouche à partir des combinaisons d'HEs, évaluer leurs activités et évaluer leurs analyses sensorielles.

Période de l'étude et population cible

L'étude que nous allons mener débutera de juin 2017 et prendra fin en Avril 2019. La population cible sera constituée des individus des deux sexes et ayant au moins 18 ans, venu pour une première consultation chez le dentiste pour problème bucco-dentaire.

Procédure

Les prélèvements seront effectués par écouvillonnage des lésions de la cavité orale avec du matériel stérile. Les collections biologiques obtenues seront introduites dans des milieux de transport qui porteront un anonymat par attribution d'un code, et acheminées au laboratoire d'analyses médicales pour ensemencement et isolement des microorganismes. Ainsi des tests microbiologiques seront effectués sur les isolats obtenus avec les huiles essentielles préalablement hydro distillées et caractérisées.

Au terme de la recherche, les échantillons seront conservés pour une utilisation ultérieure pour enrichir le laboratoire d'analyses médicales en germes d'une part, et pour mener des travaux beaucoup plus approfondis d'autre part afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

La participation du patient à cette recherche n'engendrera pour lui aucun frais supplémentaire par rapport à ceux qu'il aura consenti dans le suivi habituel de sa maladie. Il sera libre de participer ou non à cette étude. Le patient peut demander le droit à tout moment d'interrompre sa participation sans que cela ne lui porte préjudice et sans avoir à en donner les raisons.

Considérations éthiques

Risques potentiels

Le patient qui accepte participer sera inclus dans cette étude. Pendant sa consultation avec le dentiste des questions lui seront posées sur son état de santé buccal et des prélèvements y seront effectués par écouvillonnage. Lors du prélèvement, aucun risque pour le patient car il est indolore et toutes les mesures d'hygiène seront prises. Néanmoins le patient pourra ressentir des douleurs lors du prélèvement buccal s'il y a présence d'une inflammation.

Bénéfices

Durant l'étude, la participation de chaque patient est gratuite et les analyses effectuées sur les échantillons seront communiquées au dentiste traitant. Ceci permettra au dentiste de mieux vous prendre en charge.

Confidentialité et respect de la vie privée des participants

Le centre et les personnes qui participent à cette étude s'engagent à strictement respecter l'anonymat des informations (c'est-à-dire, le nom, l'adresse, téléphone ne seront pas connus du centres impliqué dans l'étude et les noms seront remplacé par un) tout au long de l'étude et lors de la communication des résultats.

Les données seront enregistrées dans un fichier informatique. Le comité d'éthique, les autorités de santé Camerounaise ou l'investigateur de l'étude pourront avoir accès à ces données afin de vérifier que l'étude est menée en accord avec les lois et règlements en vigueur. Si le participant retire son consentement de l'étude, les données collectées avant le traitement, pourront toujours être utilisées. Il aura le droit d'accéder à l'information médicale le concernant.

Coût

Votre participation à l'étude est entièrement gratuite

Si vous avez des questions sur l'étude, veuillez contacter à tout moment et pendant la durée de l'étude

➤ l'investigateur principale : NGONGANG T. Dimitri => tel : 675231879/697489868

Pour toute autre information ou vérification, vous pourriez contacter le COMITE NATIONALE D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE (CNERSH) => tel : 243 67 43 39, E-mail : cnethique_minsante@yahoo.fr

Annexe 2 : Autorisation administrative du cabinet dentaire « la ROSE »

REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland
FACULTE DES SCIENCES
Faculty of Science

REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland
FACULTE DES SCIENCES
Faculty of Science

Yaoundé le 02 Juin 2017

NGONGANG TCHAMI Dimitri
Doctorant/ Microbiologie
08R0670
675231879

Accordée

A
Madame la responsable de la Clinique dentaire 'la ROSE'

Objet : Demande d'autorisation de collecte d'échantillon buccodentaire

Madame,

J'ai l'honneur de venir auprès de votre haute personnalité solliciter une autorisation de collecte d'échantillon dans votre Clinique dentaire 'la ROSE' situé à Etoug'éré (Yaoundé).

Doctorant au département de Microbiologie en Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et dans le cadre de mes travaux de recherche sur **l'effet des huiles essentielles sur la croissance et la formation de biofilm de certains pathogènes de la cavité buccale**, sous l'encadrement du Professeur NYEGUE Maximilienne ascension. Je souhaiterais effectuer un stage au sein de votre clinique dentaire durant la période de juin à Décembre 2017 afin d'y effectuer des prélèvements bucco-dentaires.

Dans l'attente d'une suite favorable, veuillez agréer Madame l'expression de ma haute considération

PJ :

- Une photocopie de mon certificat de scolarité 2016-2017
- Une photocopie de ma carte d'identité

NGONGANG T. Dimitri



Annexe 3: Autorisation administrative du CHUY

<p>REPUBLIQUE DU CAMEROUN Paix – Travail – Patrie</p> <p>MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE</p> 	<p>REPUBLIC OF CAMEROON Peace – Work – Fatherland MINISTRY OF PUBLIC HEALTH</p> <p>CENTRE HOSPITALIER ET UNIVERSITAIRE DE YAOUNDE UNIVERSITY HOSPITAL CENTER YAOUNDE Tél. 231 21 03 / 231 25 66 Fax 231 25 67</p> <p>DIRECTION GENERALE DIRECTION MEDICALE ET TECHNIQUE</p>
<p>N° <u>763</u> AR/CHUY/DG/DGA/DMT</p>	<p>14 MARS 2017</p>
<p><u>AUTORISATION DE RECHERCHE</u></p>	
<p>Le Directeur Général du CHUY autorise Monsieur NGONGANG TCHAMI Dimitri, étudiant en Microbiologie à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, à mener ses travaux de recherche au CHUY, sur le thème « Effet des huiles essentielles sur la croissance et la formation de biofilm de certains pathogènes de la cavité buccale ».</p>	
<p>Ces travaux s'effectueront au CHUY, sous la supervision de Madame le Professeur GONSU KAMGA Hortense.</p>	
<p>Copie :</p> <ul style="list-style-type: none">- DG (ATCR)- DGA- PR GONSU- B/STAGE- CHRONO	<p>LE DIRECTEUR MEDICAL ET TECHNIQUE</p>  <p><i>Prof. Dadou Njoya</i></p>

Annexe 4: Clairance éthique

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTÉ HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2018/02/L/CNERSH/SP

Yaoundé, le 02 février 2018

Cnethique_minsante@yahoo.fr

LETTRÉ D'INFORMATION

Le Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session extraordinaire du 02 février 2018, a examiné le projet de recherche intitulé: «**Activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles sur la croissance et la formation de biofilm de quelques microorganismes responsables des infections buccodentaires**» soumis par **Monsieur NGONGANG TCHAMI Dimitri**, Investigateur Principal, étudiant à la Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I.

Le Comité a formulé les observations et suggestions suivantes :

- A la session du 18 mai 2017, le Comité d'Éthique vous a demandé de présenter les études précliniques. Vous ne l'avez pas encore fait
- De plus, le Professeur François-Xavier ETOA, Professeur titulaire, doit être le Directeur et le Professeur Maximilienne Ascension NYEGUE Co-Directeur.

Le Comité a émis un **avis favorable** sous réserve de l'intégration des suggestions faites par les membres du comité avant la délivrance de la clairance éthique.

Ampliations

- MINSANTE



président

Dr Lazare KAPTUE

Annexe 5: Questionnaire d'échantillonnage

Numéro anonymat :

Date :

Noms :

Prénoms :

Age :

Sexe :

Profession :

Adresse ou numéro de téléphone :

Répondre en cochant la case correspondante

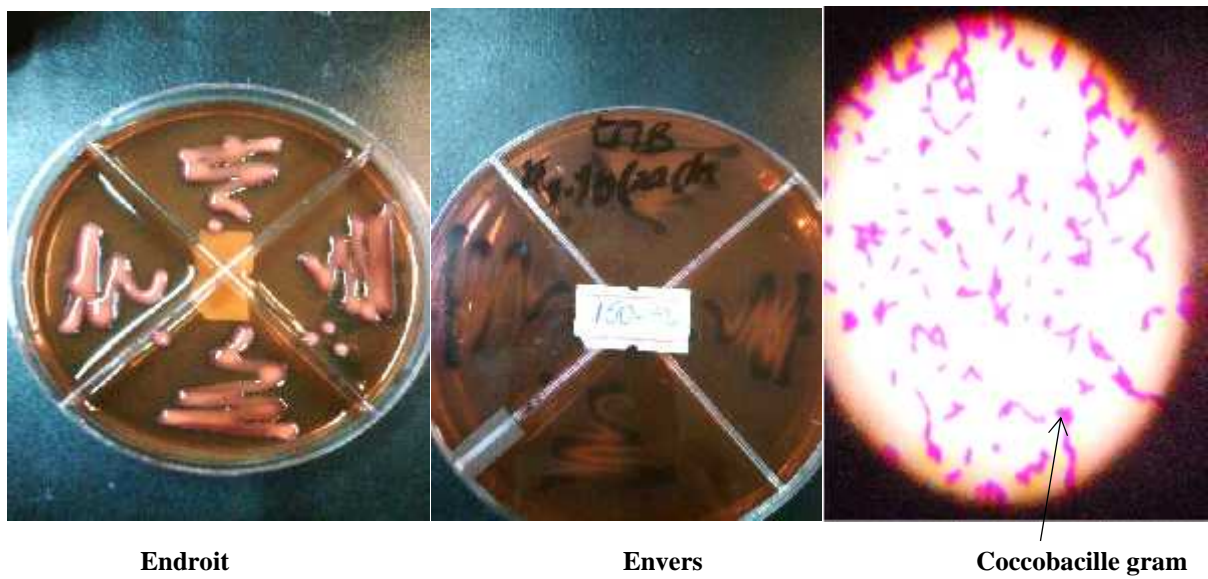
Questions	Oui	non
Etes-vous fumeur / fumeuse ?		
Etes-vous enceinte ?		
Etes-vous sous traitement d'antimicrobien (antibiotique, antifongiques, antiseptiques) ?		
Avez-vous mangé ou bu une boisson ces 2 dernières heures ? Dernier aliment ou boisson consommé(e)?		
Avez-vous brossé vos dents ces 2 dernières heures ?		
Avez-vous utilisé un désinfectant de bouche ou pâte dentifrice?		
Diagnostic du médecin dentiste		
Le/la patient(e) souffre-t-il (elle) d'une candidose buccale ?		
Le/la patient(e) souffre-t-il (elle) de carie dentaire?		
Le/la patient(e) souffre-t-il (elle) d'une pathologie parodontale ? Autres affections ou infections		

Annexe 6: Tableau d'interprétation de la galerie API 20 E et quelques schémas et photos à titre indicatif

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	REACTIONS-ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-BD-galactopyranoside	β -galactosidase (Ortho NitroPhényl-BDGalactopyranosidase)	incolore	jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	rouge - orangé
<u>LDC</u>	L-lysine	Lysine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine	Ornithine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
<u>CIT</u>	trisodium citrate	utilisation du CITrate	vert pâle - jaune	bleu-vert – bleu
<u>H2S</u>	sodium thiosulfate	production d'H2S / H2S production	incolore - grisâtre	dépôt noir - fin liseré
<u>URE</u>	Urée	UREase	Jaune	rouge - orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DésAminase	Jaune	Marron – rougeâtre
IND	L-tryptophane	production d'INDole	JAMES-immédiat	
			Incolore-vert pâle-jaune	rose
	sodium pyruvate	production d'acétoïne	incolore - rose pâle	rose - rouge
	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase (GELatine)	Absence de diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	fermentation - oxydation (GLUcose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
MAN	D-mannitol	fermentation - oxydation (MANnitrol)	bleu - bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	fermentation - oxydation (INOsitrol)	bleu - bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	fermentation - oxydation (SORbitol)	bleu - bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	fermentation - oxydation (RHAmnose)	bleu - bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	fermentation - oxydation (SACcharose)	bleu - bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	fermentation - oxydation (MELibiose)	bleu - bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	fermentation - oxydation (AMYgdaline)	bleu - bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	fermentation - oxydation (ARAbinose)	bleu - bleu-vert	Jaune
OX	(voir notice du test oxydase)	cytochrome-Oxydase	(voir notice du test oxydase)	
Réduction des nitrates tube GLU	potassium nitrate	production de NO2 réduction au stade N2	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min	
			Jaune	rouge



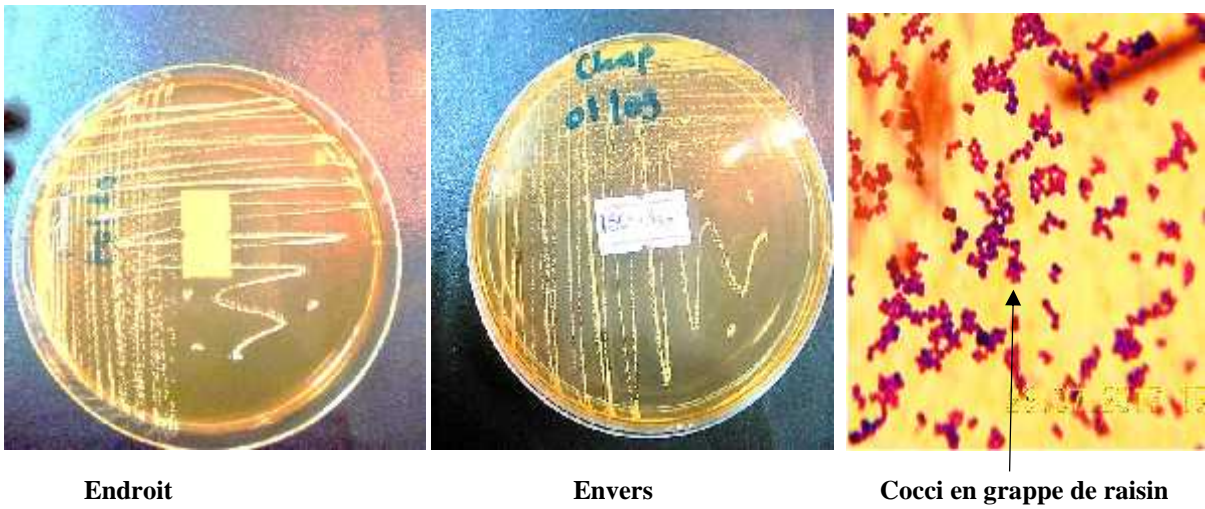
Photographie de la culture sur Gélose Sabouraud et observation microscopique de l'isolat de *Candida albicans* au grossissement X 400 après culture sur milieu RAT.



Photographie de la culture et observation microscopique après coloration de Gram de l'isolat 74 (*Klebsiella pneumoniae*) au grossissement X1000.



Photographie de la culture et observation microscopique après coloration de Gram de l'isolat 33 (*Bacillus cereus*) au grossissement X1000.



Endroit

Envers

Cocci en grappe de raisin

Photographie de la culture et observation microscopique après coloration de Gram de l'isolat 16 (*Staphylococcus aureus*) au grossissement X1000.

Annexe 7 : Fiche pour analyse sensorielle

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
BIOCHEMESTRY

REPUBLIC OF CAMEROON
Peace – Work - Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF

Laboratoire de Microbiologie

TRAVAUX DE THESE DE DOCTORAT / Ph.D. (2013- 2014)

FICHE D'EVALUATION SENSORIELLE

Analyse Sensorielle des bains de bouche formulés

Informations relatives aux huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) de *Cymbopogon citratus*, *Eugenia caryophylla*, *Mentha* sp cf *piperita* et *Pentadiplandra brazzeana* ont été extraite par hydrodistillation au sein du Laboratoire de Phytobiochimie et des Plantes Médicinales du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I. La composition chimique respective de chaque HE a été déterminée par CPG-FID et CPG-SM à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de l'Université de Montpellier.

Objectif du test

Le présent test vise à évaluer la qualité, l'acceptabilité, et le type de produit que nous avons pris le soin de formuler en vue de donner un produit qui combine à la fois les qualités sensorielle et antimicrobienne.

Procédure à suivre

Ici sera mis en exergue le talent du nez du consommateur en vue de l'évaluation des différentes formules. : Pour mener à bien ce travail, un questionnaire guidé vous sera proposés pour avoir une idée sur ce que chacun d'entre vous exprime vis-à-vis des bains de bouche.

Acceptation

J'ai pris connaissance du projet; toutes les informations m'ont été données par les investigateurs et j'en suis satisfait(e).

Date & signature

critères d'évaluation / Formulations	Listerine	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
1) Odeur ou parfum se dégageant des formulations :						
1 : eau de toilette	0	3	1	2	1	1
2 : parfum	1	0	0	2	0	3
3 : lait de toilette	0	0	2	2	1	0
4 : produit alimentaire	4	4	9	7	12	11
5 : ingrédient de pâtisserie	1	0	1	0	0	0
6 : chewing gum	7	3	7	3	2	4
7 : dentifrice	5	4	3	8	7	4
8 : savon de lessive	4	15	4	2	5	4
9 : bain de bouche	8	1	3	4	2	3
2) Note de fraîcheur des formulations:						
1 : très faible	0	_15	0	1	2	4
2 : faible	10	11	6	5	5	7
3 : moyenne	4	3	9	6	10	10
4 : intense	4	1	10	15	12	7
5 : très intense	12	0	5	3	1	2
3) acceptabilité du produit						
oui	5	1	5	13	3	3
Non	0	0	0	0	0	0

Annexe 8 : Formulaire de consentement éclairé

Je soussigné(e) Mr/Mme/Mlle, (nom(s) et prénom(s)).....

Certifie avoir lu et compris le document d'information qui m'a été remis et avoir eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais à:

.....

Je comprends les objectifs, les contraintes, les risques et les bénéfices potentiels liés à ma participation à cette étude.

J'ai eu l'assurance que les décisions qui s'impose pour ma santé seront prise à tout moment, conformément à l'état des connaissances sur la prise en charge de l'infection bucco-dentaire.

J'accepte qu'une partie de mes produits biologiques qui me seront prélevés soit utilisée dans l'étude. Ces échantillons seront utilisés pour isoler certains microorganismes et vérifier éventuellement certaines données de l'étude, réaliser des tests et effectuer, si possible des recherches biologiques complémentaires. J'ai la possibilité de demander que mon prélèvement soit détruit à tout moment.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement informatisé. J'ai bien noté que je pourrai avoir accès à ces données à tout moment en m'adressant à :.....

J'accepte que tout médecin ou scientifique impliqué dans le déroulement de cette recherche, ainsi que les Représentants des autorités de santé aient accès à l'information dans le respect le plus strict de la confidentialité.

J'accepte librement de participer à cette étude dans les conditions précisées dans la notice d'information. Je pourrais à tout moment si je le désire, interrompre ma participation sans avoir à justifier ma décision mais, je ferai mon possible pour en informer.....

Cette interruption ne remettra pas en cause la qualité des soins ultérieurs.

Fait à.....le.....

Nom et prénom.....

Signature :

Je soussigne(e)..... certifie avoir communiqué toute information utile concernant cette étude. Je m'engage à faire respecter les termes de cette note de consentement, conciliant le respect des droits et libertés individuelles et les exigences d'un travail scientifique.

Fait à..... Le.....

Nom de l'enquêteur

Annexe 9 : Chromatogrammes des Alcanes, des huiles essentielles et des combinaisons.

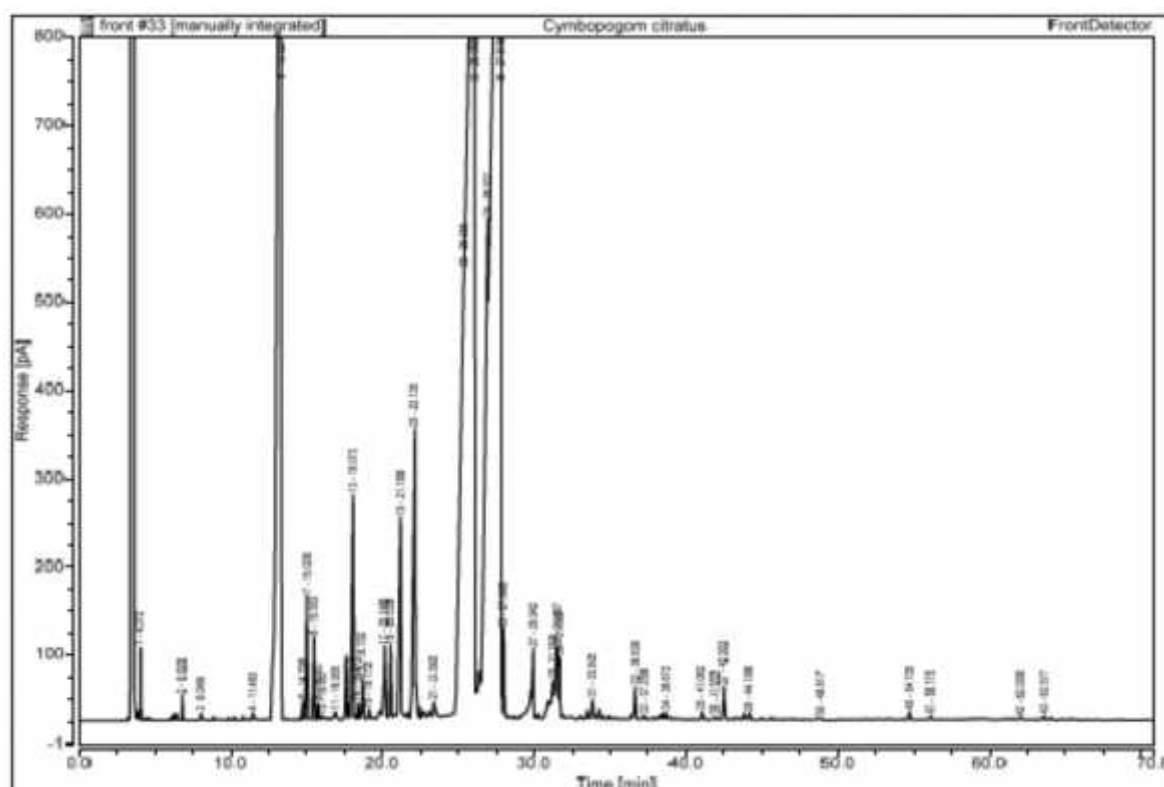
Alcanes sur front

TRn	TRn+1	n
9.235	13.205	9
13.205	17.925	10
17.925	22.993	11
22.993	27.96	12
27.96	32.785	13
32.785	37.358	14
37.358	41.587	15
41.587	46.053	16
46.053	49.962	17
49.962	53.7795	18
53.7795	57.593	19
57.593	63.253	20
63.253	68.913	21
68.913		22

Alcanes sur back

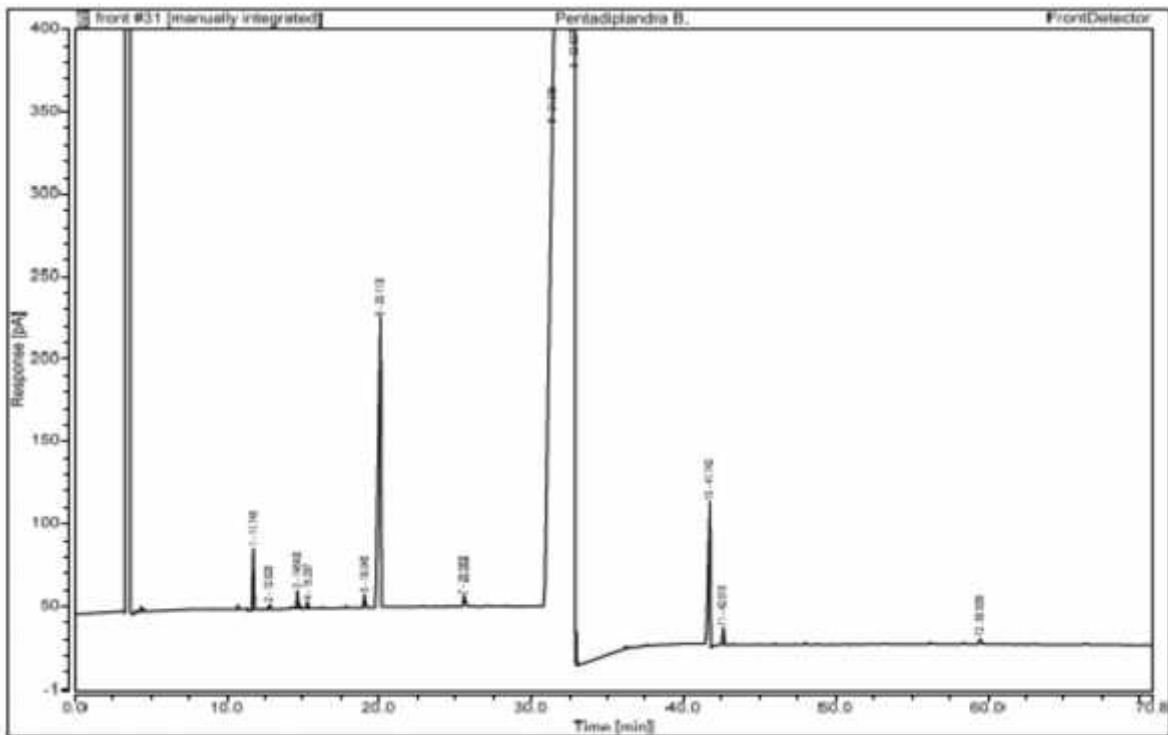
TRn	TRn+1	n
3.98	4.998	9
4.998	6.745	10
6.745	9.385	11
9.385	12.797	12
12.797	16.728	13
16.728	20.898	14
20.898	25.028	15
25.028	29.328	16
29.328	33.32	17
33.32	37.035	18
37.035	40.75	19
40.75	44.1725	20
44.1725	47.595	21
47.595		22

-Chromatographe de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*.



-Chromatographe de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophylla*

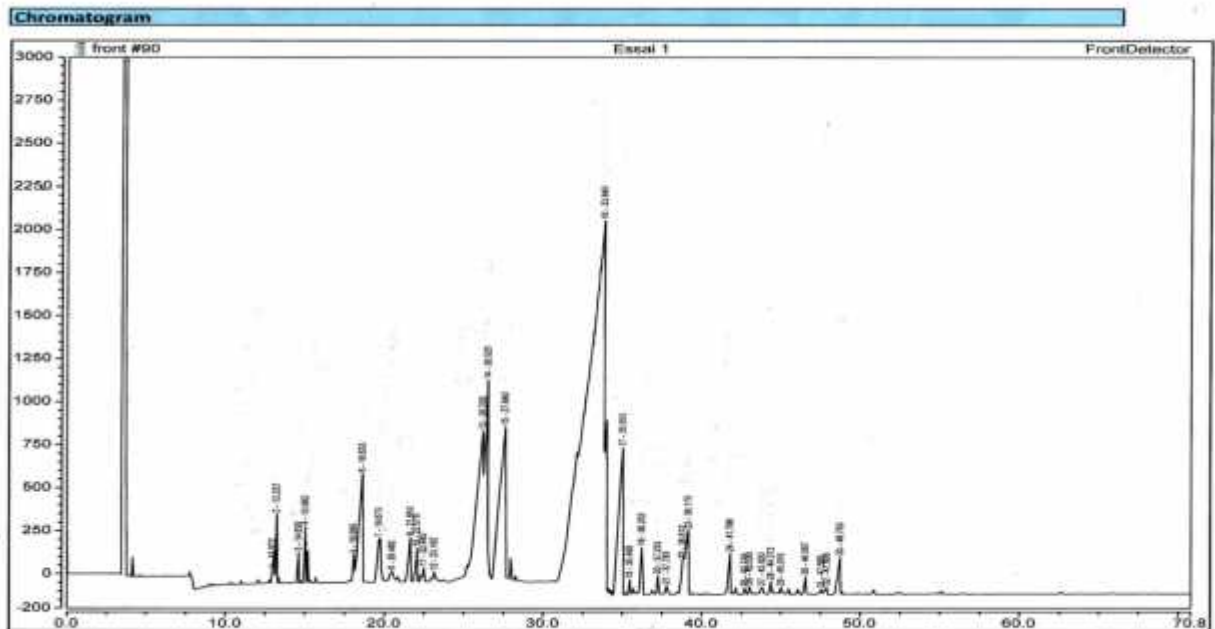
-Chromatographe de l'huile essentielle de *Pentadiplandra brazzeana baillon*



-Chromatographe Combinaison 1

Instrument: GC Sequence: front

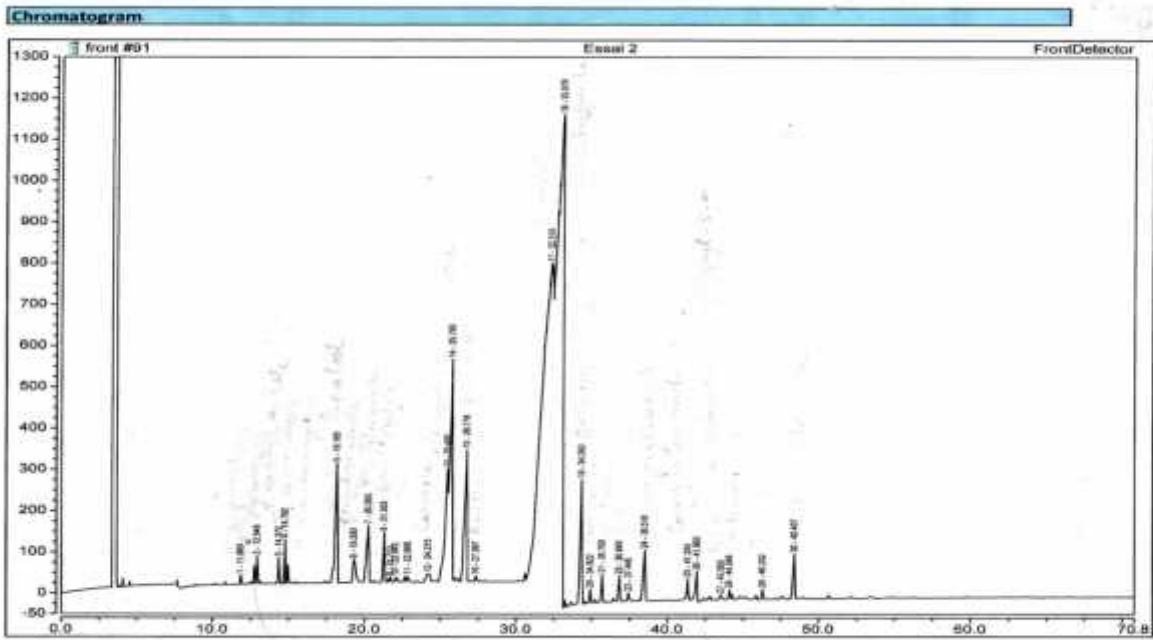
Page 1 of 2



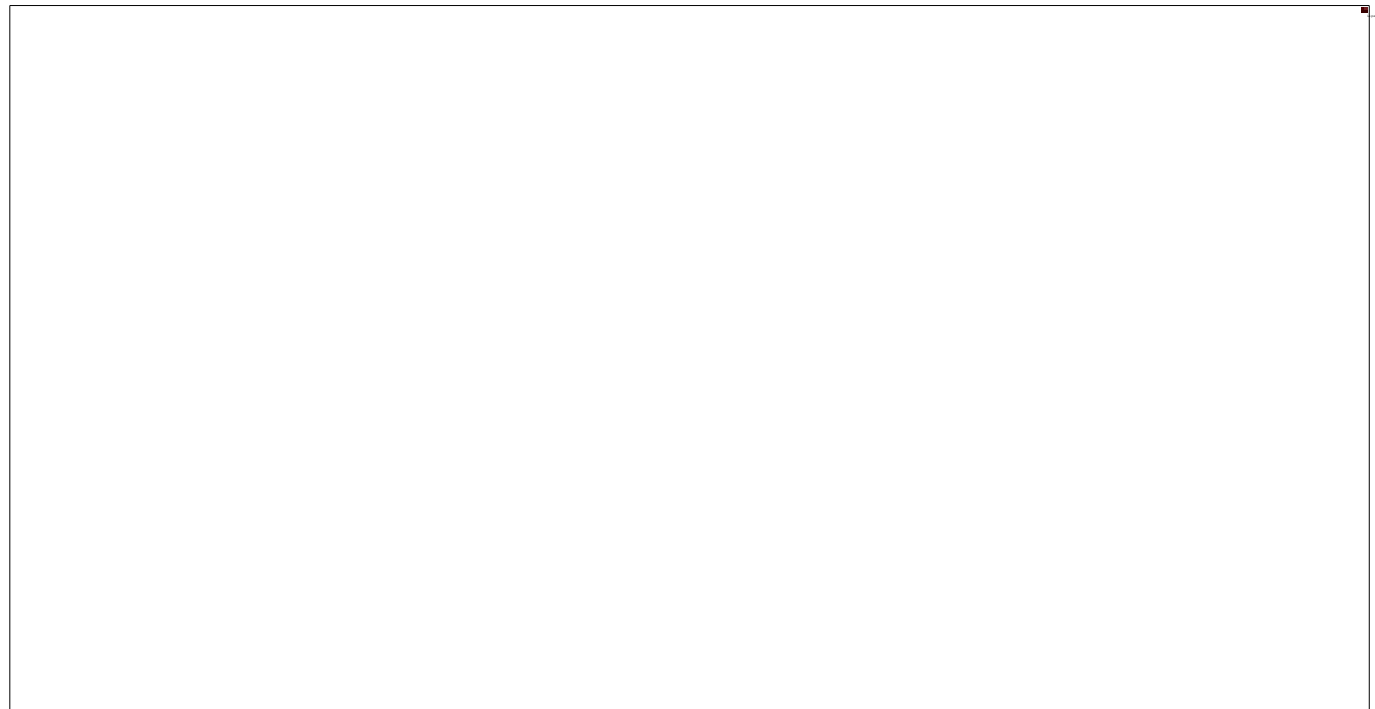
-Chromatographe Combinaison 2

Instrument: GC Sequence: front

Page 1 of 2



-Chromatographe Combinaison 4



PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DES TRAVAUX

1- Ngongang Tchami Dimitri, Nyegue Maximilienne Ascension, Djondji Metissa Fleuriane, Gonsu Kanga Hortense, Moni Ndedi Esther Del Florence and Etoa François-Xavier. Assessment of four essential oils against bacterial species isolated from patients with oral infection. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences* 2018; 6(2): 44-57.

2-Ngongang Tchami Dimitri, Nyegue Maximilienne Ascension, Moni Ndedi Esther Del Florence, Kenne landry and Etoa François-Xavier. Effect of four essential oils on cells release membrane and biofilm formation of clinical bacterial isolated from oral infection. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 2019; 9(6):28-35.

3- Ngongang Tchami Dimitri, Nyegue Maximilienne Ascension, Moni Ndedi Esther Del Florence, Penlap veronique and Etoa François-Xavier. Formulation and antimicrobial evaluation of mouthwash formulated with combine essential oils. *Journal of Herbmeed Pharmacology*. **En cours**