



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



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID DE TLEMEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement
« LAMAABE »

THESE

Présentée par : Mr. Fethi BENBELAID

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie

Option : Microbiologie

Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur *Enterococcus faecalis* responsable d'infections d'origine dentaire

Soutenue publiquement le 28/10/2015

Devant le jury

Président	M ^{me}	H. Hassaïne	Professeur	Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen
Examinatrice	M ^{me}	D. Bouziane	Professeur	Université d'Oran
Examineur	M ^r	Z. Mehdadi	Professeur	Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbes
Examineur	M ^r	D. E. Abdelouahid	Professeur	Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen
Examineur	M ^r	M. Yousfi	Professeur	Université Amar Telidji de Laghouat
Directeur de thèse	M ^r	M. Bendahou	Professeur	Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen

Année universitaire 2014–2015

Dédicaces

A l'aide de mon dieu ALLAH j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:

Aux êtres les plus chers à mon cœur, mes parents qui ont fait preuve de beaucoup de compréhension et qui n'ont cessé de me soutenir et m'encourager durant mes études.

À mes chers frères et sœurs.

À la jumelle de mon âme, mon cher cousin Yassin.

*À mes amis les plus proches, en particulier Abdelmounaïm Khadir
Imad Chickaoui, Mohamed Lammani et Mohamed Amine Abdoune.*

Fethi Benbelaid

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) sous la direction de monsieur M. Bendahou professeur au département de biologie, université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

Tout d'abord, je tiens à remercier monsieur B. Moussa-Boudjemâa, professeur à l'université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen et directeur du laboratoire LAMAABE, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse le professeur M. Bendahou pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je le remercie pour sa disponibilité, ses conseils précieux et surtout pour son comportement affectif comme si j'étais son fils.

Je tiens à remercier madame H. Hassaïne, professeur à l'université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen pour avoir accepté de présider le jury. Ses conseils précieux et sa compétence m'ont énormément marqué.

Je remercie madame D. Bouziane professeur à l'université d'Oran et monsieur Z. Mehdadi professeur à l'université de Sidi Bel Abbes pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

J'exprime mes fortes reconnaissances à notre maître monsieur D. E. Abdelouahid, professeur à l'université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen pour son aide, ses précieux conseils et d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci à monsieur M. Yousfi, professeur à l'université de Laghouat, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie tous les membres du laboratoire de chimie des substances naturelles, université de Corse, en particulier les professeurs J. Costa et A. Muselli pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire afin de réaliser des analyses par CPG/Ir et SM des huiles essentielles.

Je suis sincèrement reconnaissant envers madame Benyelles, docteur à l'université de Tlemcen (Département de chirurgie dentaire) qui m'a facilité l'accès dans son service, pour son aide et sa contribution.

Je remercie aussi le personnel du service de stomatologie CHU de Tlemcen, enseignants et étudiants, pour m'avoir accepté dans leur service et pour leurs aides.

Je tiens également à remercier chaleureusement monsieur B. Medjahedi, maître de conférences B à l'université de Tlemcen pour sa compétence et son aide dans l'identification des plantes.

Merci à toutes les personnes du laboratoire LAMAABE, enseignants et étudiants, qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse et pour les bons moments qu'on a passé ensemble. Je souhaite à tous une bonne réussite.

Pour n'oublier aucune personne, je formule mes sincères remerciements à tous les gens qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Travaux personnels

Publications internationales

1. Benbelaïd F., Khadir A., Abdoune M.A., Bendahou M., Muselli A. et Costa J. (2014). "Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state." *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4(6): 463-472.
2. Benbelaïd F., Khadir A., Abdoune M.A. et Bendahou M. (2013a). "Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. from Algeria." *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 3(6): 454-459.
3. Benbelaïd F., Abdoune M., Khadir A. et Bendahou M. (2013b). "Drying effect on yield and antimicrobial activity of essential oils." *Int. J. Med. Aromat. Plants* 3(1): 93-101.
4. Benbelaïd F., Bendahou M., Khadir A., Abdoune M., Bellahsene C., Zenati F., Bouali W. et Abdelouahid D. (2012). "Antimicrobial activity of essential oil of *Lavandula multifida* L." *J. Microbiol. Biotech. Res* 2(2): 244-247.

Communications internationales

1. Benbelaïd F. Study of the inflammatory response in patients with Cervico-facial cellulitis. 1st International congress of immunology and molecular immunopathology ; 17-20 October 2014, Tlemcen, Algeria.

2. Benbelaïd F. Antimicrobial activity of *Lavandula multifida* L. 4th International workshop on industrial biotechnology ; 10–11 April 2013, Tlemcen, Algeria.
3. Benbelaïd F. Cellulites cervico–faciales d’origine dentaire. 1^{ère} Congrès international de biotechnologie ; 19–20 Novembre 2012, Annaba, Algérie.

Communications nationales

1. Benbelaïd F. Evaluation de l’activité antimicrobienne d’une lavande Algérienne. 1^{ère} Journée scientifique des sciences de l’agriculture, environnement et santé ; 3 Juin 2014, Tlemcen, Algérie.
2. Benbelaïd F. Evaluation de l’activité antiseptique d’une plante médicinale Algérienne. 2^{ème} Forum sur le développement des sciences de la vie et de l’univers ; 14–15 Mai 2013, Tlemcen, Algérie.
3. Benbelaïd F. Prévention et traitement des infections buccales et d’origine dentaires par l’aromathérapie. 1^{ère} Forum sur le développement des sciences de la vie et de l’univers ; 14–15–16 Mai 2012, Tlemcen, Algérie.

Table des matières

Introduction	1
Partie 1. Synthèse bibliographique	4
1. Ecosystème buccal	4
1.1. Biofilms buccaux.....	4
1.1.1. Formation.....	6
1.1.2. Interactions bactériennes dans les plaques dentaires.....	7
2. <i>Enterococcus faecalis</i>	8
2.1. Nomenclature et caractères bactériologiques.....	9
2.2. Pathogénicité.....	10
2.2.1. Adhésines de surface.....	11
2.2.2. Pheromones.....	11
2.2.3. Acides lipotéichoïques.....	12
2.2.4. Production de superoxydes extracellulaires.....	12
2.2.5. Gélatinase.....	13
2.2.6. Hyaluronidase.....	13
2.2.7. Cytolysine.....	13
2.3. Aptitude de formation des biofilms.....	14
2.4. Résistance vis-à-vis des agents antimicrobiens.....	14
2.5. Rôles d' <i>Enterococcus faecalis</i> dans certaines infections buccodentaires.....	15
2.5.1. Caries dentaires.....	15
2.5.2. Pathologies parodontales.....	16
2.5.3. Parodontites apicales.....	17
3. Traitements endodontiques et échec lié à <i>Enterococcus faecalis</i>	18
3.1. Traitements endodontiques.....	18
3.2. Échec endodontique.....	20
3.3. Rôle clé du biofilm dans la résistance bactérienne	21
4. Les huiles essentielles (HEs): une solution alternative potentielle	23

4.1. Définition des huiles essentielles.....	25
4.2. Chimie des huiles essentielles.....	26
4.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	28
4.3.1. Mode d'action.....	30
4.3.2. Activité anti biofilms.....	32
4.4. Applications des huiles essentielles.....	33
4.4.1. En agroalimentaire.....	33
4.4.2. En cosmétique.....	34
4.4.3. En dentisterie.....	34
Partie 2. Matériel et méthodes.....	35
1. Matériel végétal.....	35
2. Extraction des huiles essentielles.....	37
3. Analyse chimique des huiles essentielles.....	38
4. Souches microbiennes.....	40
4.1. Souches de référence.....	40
4.2. Souches d'origine cliniques.....	40
5. Préparation de l'inoculum.....	41
6. Antibiogramme.....	41
7. Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	42
7.1. Diffusion sur gélose « Aromatogramme »	42
7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI ».....	43
8. Activité anti-biofilms des huiles essentielles.....	44
8.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du biofilm « CMIB».....	44
8.2. Détermination de la concentration minimale éradicatrice du biofilm « CMEB».....	45
9. Etude de la combinaison des huiles essentielles avec des antiseptiques.....	45
10. Evaluation des solutions d'irrigation préparées à base des huiles essentielles.....	48
10.1 Effets <i>in vitro</i> vis-à-vis des biofilms d' <i>E. faecalis</i>	48
10.1.1. Préparation des solutions d'irrigations	48
10.1.2 Vérification de formation des biofilms.....	48

10.1.3. Formation des biofilms.....	49
10.1.4. Irrigation.....	49
10.1.5. Sonication et dénombrement.....	50
10.2. Effets <i>in vivo</i> : traitement endodontique.....	50
Partie 3. Résultats et discussion.....	52
1. Rendements en huiles essentielles	52
2. Composition chimique des huiles essentielles.....	54
3. Effets des huiles essentielles envers <i>E. faecalis</i>	61
3.1. Souches d' <i>E. faecalis</i> cliniques.....	61
3.2. Effets des huiles essentielles vis-à-vis d' <i>E. faecalis</i> à l'état planctonique.....	62
3.3. Effets des HEs vis-à-vis d' <i>E. faecalis</i> à l'état biofilm.....	68
4. Combinaison des huiles essentielles avec la CHX et le NaOCl.....	71
5. Evaluation des solutions d'irrigation préparées à base des huiles essentielles.....	73
5.1. Évaluation <i>in vitro</i> vis-à-vis de biofilm d' <i>E. faecalis</i>	74
5.2. Évaluation <i>in vivo</i> dans un traitement endodontique.....	81
Conclusion.....	84
Références.....	87
Annexes.....	107
Publications.....	123

Liste des figures

Figure 1. Les étapes de formation des plaques dentaires matures.....	7
Figure 2. <i>E. faecalis</i> aux microscopes électroniques.....	10
Figure 3. Parodontite apicale.....	17
Figure 4. La viabilité d' <i>E. faecalis</i> après exposition par des solutions d'irrigation.....	19
Figure 5. Des tubules dentaires contaminés par des biofilms d' <i>E. faecalis</i>	23
Figure 6. Quelques molécules des HEs avec des exemples des fonctions chimiques.	27
Figure 7. Cellules d' <i>E. faecalis</i> après l'exposition par les HEs.....	29
Figure 8. Effets de Terpinène-4-ol sur <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Figure 9. Répartition géographique des lieux de récolte.....	37
Figure 10. Montage de type Clevenger modifié pour l'hydrodistillation des HEs	38
Figure 11. Combinaison sur microplaque de 96 puits.....	46
Figure 12. Interprétation des résultats de la combinaison.....	47
Figure 13. Réduction d'ufc d' <i>E. faecalis</i> par l'HE de <i>C. cassia</i>	75
Figure 14. Réduction d'ufc d' <i>E. faecalis</i> par l'HE de <i>T. lanceolatus</i>	76
Figure 15. Réduction d'ufc d' <i>E. faecalis</i> par l'HE de <i>C. munbyi</i>	77
Figure 16. Effets des solutions d'irrigation sur la flore aérobie totale dans des traitements endodontiques.....	82
Figure 17. Effets des solutions d'irrigation sur le nombre des entérocoques totaux dans des traitements endodontiques.....	82

Liste des tableaux

Tableau 1. Données sur les espèces végétales retenues et leurs utilisations.....	36
Tableau 2. Teneurs en HEs des plantes étudiées et leur durée d'obtention.....	52
Tableau 3. Rendements rapportés dans la littérature par rapport au poids frais.....	53
Tableau 4. Composition chimique des HEs étudiées.....	55
Tableau 5. Composition chimique des HEs rapportée dans la littérature.....	60
Tableau 6. Données sur les souches d' <i>E. faecalis</i> retenues	62
Tableau 7. Effet inhibiteur des HEs étudiées envers <i>E. faecalis</i> à l'état planctonique.	63
Tableau 8. Effet inhibiteur des HEs étudiées envers <i>E. faecalis</i> à l'état biofilm.....	69
Tableau 9. Résultats de la combinaison entre les HEs et la CHX	72
Tableau 10. Résultats de la combinaison entre les HEs et le NaOCl.....	72
Tableau 11. CMI des antimicrobiens étudiées.....	80

Liste des abréviations

CHX : Chlorhexidine di-gluconates

CMEB : Concentration minimale éradicatrice du biofilm

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMIB : Concentration minimale inhibitrice du biofilm

EPS : Substances polymères extracellulaires

HE : Huile essentielle

MF : Matériel frais

NaOCl : Hypochlorite de sodium

PAE : Pellicule acquise exogène

PBS : Tampon phosphate salin

Saline : Eau physiologique stérile.

ufc: Unité formant colonie

Introduction

Introduction

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.

Les parodontites apicales sont parmi les lésions bucco-dentaires les plus compliquées qui nécessitent une prise en charge adéquate. Ce sont des infections au niveau des racines dentaires causées par un ensemble des microorganismes d'origine endodontique. Le traitement des parodontites apicales consiste à nettoyer, désinfecter et obturer les racines des dents infectées. La désinfection des racines dentaires est une étape cruciale dans laquelle des antiseptiques chimiques, appelés solutions d'irrigation, sont couramment utilisées. L'échec du traitement endodontique induit la persistance et l'aggravation de l'infection des tissus péri-apicaux ce qui est connu sous le nom d'infection endodontique persistante.

Actuellement, les infections endodontiques persistantes sont devenues de plus en plus un problème incurable pour les chirurgiens-dentistes à travers le monde entier. Contrairement aux infections endodontiques primaires qui sont provoquées par une flore microbienne mixte, les infections persistantes dites secondaires sont causées

par seulement quelques espèces bactériennes et fongiques, telles que les entérocoques, les streptocoques et *Candida albicans* (Skucaite et al., 2010). L'espèce bactérienne *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) s'est imposé comme l'agent étiologique responsable à ces types d'infections (Portenier et al., 2003; Stuart et al., 2006). L'émergence d'*E. faecalis* dans les infections endodontiques persistantes est due à plusieurs facteurs, notamment sa résistance vis-à-vis des solutions d'irrigation utilisées (Estrela et al., 2008), une capacité non négligeable de tolérance contre les conditions écologiques extrêmes qui caractérisent le système canalaire dentaire (Portenier et al., 2003) et un grand pouvoir de formation des biofilms (Mohamed et Huang, 2007).

Face aux problèmes des infections endodontiques persistantes, il y a une nécessité croissante pour la recherche de nouveaux antiseptiques à fin de remplacer les solutions d'irrigation chimiques appliquées actuellement. La valorisation des produits naturels, en particulier les huiles essentielles, est parmi les solutions disponibles puisque ces substances sont douées d'un potentiel antiseptique intéressant et envers un grand nombre de microorganismes (Burt, 2004; Edris, 2007).

Dans le but de la mise en évidence des solutions d'irrigation alternatives, nous sommes intéressé à évaluer et à valoriser les huiles essentielles des plantes locales vis-à-vis des souches d'*E. faecalis* isolées de la clinique dentaire au CHU de Tlemcen.

Les objectifs assignés à ce travail sont (i) d'évaluer l'effet des plantes aromatiques retenues en l'occurrence les huiles essentielles sur des souches d'*E. faecalis* cliniques et de références, (ii) de voir s'il y a des interactions positives ou négatives avec les désinfectants les plus utilisés dans les soins endodontiques, à savoir la chlorhexidine di-gluconate (CHX) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl), (iii) d'affirmer ou d'infirmier l'effet *in vitro* et *in vivo* des solutions d'irrigation préparées à base des huiles essentielles.

Synthèse

bibliographique

Partie 1. Synthèse bibliographique

1. *Ecosystème buccal*

La cavité buccale est une niche écologique favorable qui permet la colonisation et la croissance d'une gamme diversifiée de microorganismes, principalement bactérienne, attribuée aux conditions favorables de température, d'humidité, du pH et des nutriments (**Marcotte et Lavoie, 1998; Gracieux et al., 2006**). Plus de 700 espèces bactériennes, y compris les non cultivables, vivent dans la cavité buccale humaine (**Aas et al., 2005**). Des études récentes réalisées par des techniques avancées de biologie moléculaire, en particulier le séquençage de l'ARN 16 s, ont montré qu'il y a des variations interindividuelles importantes du nombre et du type d'espèces bactériennes entre les sujets sains (**Bik et al., 2010**). Ces variations sont en forte relation avec plusieurs paramètres, notamment les facteurs liés à l'hôte, tels que l'âge, sa génétique, son origine ethnique et les facteurs liés à l'environnement (**Marsh et Devine, 2011**).

1.1. Biofilms buccaux

Environ 80% de la biomasse microbienne des différents écosystèmes naturels est regroupée en biofilm (**Richards et Melander, 2009**). Un mode de vie permet aux microorganismes non seulement la résistance et l'adaptation face aux conditions défavorables de l'environnement, mais aussi il favorise la collaboration métabolique entre les différents membres de cette communauté (**Hall-Stoodley et al., 2004; Tremblay et al., 2014**). Le biofilm est une structure tridimensionnelle constituée par

l'accumulation des cellules microbiennes et qui sont regroupées et adhérentes sur une surface grâce à un conglomérat de bio-polymères connu sous le nom d'EPS (substances polymères extracellulaires). Cette EPS, produite par les microorganismes eux-mêmes, constitue 90% de la masse sèche totale du biofilm (**Flemming et Wingender, 2010**).

Dans la cavité buccale, la majorité des microorganismes sont résidés sous forme des biofilms attachés sur les différents types de tissus et qui sont désignées par les plaques dentaires (**Marsh et Devine, 2011**). Il existe deux types de plaques dentaires, le premier est connu sous le nom des plaques supra-gingivales et qui se forme sur l'émail dentaire, par contre le deuxième type est désigné par les plaques sous-gingivales qui s'installent le plus souvent sous la gencive et dans les poches parodontales (**Subramani et al., 2008**). La formation de ces biofilms permet aux microorganismes de survivre essentiellement face aux mouvements de la langue et les lèvres, et surtout vis-à-vis des défenses immunitaires de l'hôte (**Gracieux et al., 2006**).

La biodiversité microbienne importante des plaques dentaires ainsi que leur implication dans des pathologies graves font que ces plaques sont parmi les biofilms les plus étudiées (**Axelsson et al., 2004; Marsh, 2005**). Cette diversité biologique des biofilms buccaux est attribuée à plusieurs facteurs, notamment aux conditions écologiques favorables et à la présence des supports solides dans la cavité buccale qui offrent le temps pour leur bon développement (l'émail dentaire et les implants dentaires). En revanche, la desquamation des tissus épithéliaux dans les différents

types de muqueuse humaine favorise l'élimination microbienne, ce qui gêne la maturation des biofilms sur ces sites (**Gracieux et al., 2006**).

1.1.1. Formation

Le développement des plaques dentaires dépend de la fixation de certaines espèces bactériennes sur les surfaces de l'émail. En effet, l'adhésion de ces bactéries, dites pionnières, est indispensable à la formation des biofilms dentaires (**Lamont et Jenkinson, 2010**). Seuls quelques d'espèces bactériennes, notamment les Streptocoques et les Actinomyces, possèdent sur leurs surfaces des adhésines qui reconnaissent spécifiquement la pellicule acquise exogène (PAE), un film organique d'origine salivaire. Leur fixation sur la PAE permet l'agrégation d'autres espèces bactériennes (la Co-adhérence), grâce à des interactions entre les récepteurs des cellules libres avec les protéines de la surface des bactéries pionnières (**Hojo et al., 2009**). En cas de manque d'hygiène, ou dans les sites protégés par exemple entre les dents, la Co-adhérence des nouvelles espèces favorise l'évolution des plaques dentaires des simples agrégats vers des biofilms très complexes, dits matures (**Figure 1**) (**Gracieux et al., 2006**).

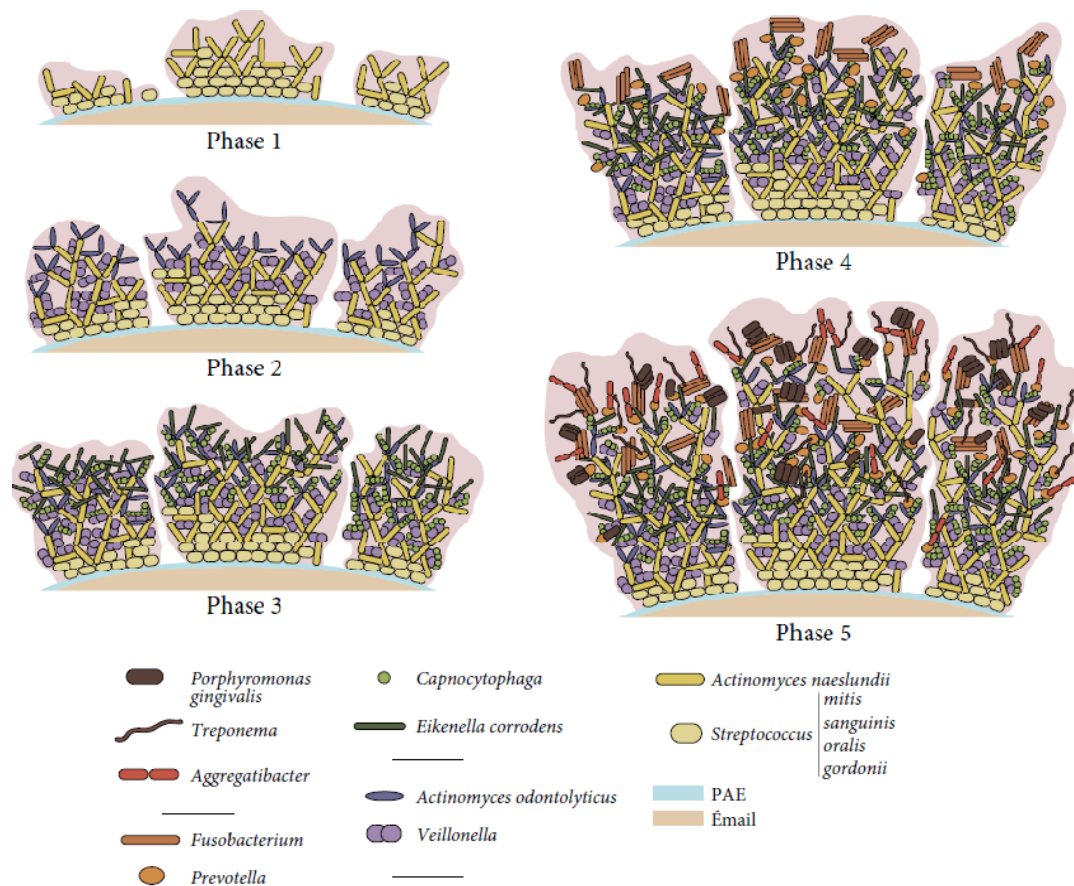


Figure 1. Les étapes de formation des plaques dentaires matures (Gracieux et al., 2006).

1.1.2. Interactions bactériennes dans les plaques dentaires

La biodiversité microbienne des plaques dentaires matures les rend un terrain favorable d'interactions complexes entre les espèces résidentes dans ces biofilms (Kolenbrander, 2000). Il est connu que le vieillissement, l'éruption des dents, les changements hormonaux, l'hygiène bucco-dentaire et d'autres facteurs ont une influence directe sur la formation des biofilms et l'accumulation des bactéries dans la cavité buccale (Gracieux et al., 2006). La communication métabolique, l'échange génétique, la production de facteurs inhibiteurs (par exemple, bactériocines, le

peroxyde d'hydrogène), et la détection du quorum sont des facteurs clés qui déterminent la composition bactérienne et/ou le type du métabolisme au sein des plaques dentaires (Hojo et al., 2009).

Dans les conditions saines, les différentes espèces microbiennes dans le biofilm maintiennent l'équilibre écologique. Cet équilibre peut être perturbé par des facteurs environnementaux ou des interactions interspécifiques. Ces perturbations peuvent favoriser la croissance et la domination de certaines espèces, ce qui conduit aux pathologies (Kreth et al., 2008). En conséquent, les changements dans les espèces déterminent si le biofilm favorise un état homéostatique bénigne ou au contraire le développement des maladies (Gracieux et al., 2006).

2. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) est un pathogène opportuniste des voies gastro-intestinales et uro-génitales. Il a reçu une attention considérable dans la bactériologie médicale en raison de son rôle croissant dans les infections liées aux soins, et essentiellement de sa résistance naturelle (intrinsèque) et acquise envers les antibiotiques fréquemment utilisés (Devriese et al., 2006). Considérée parmi les pathogènes nosocomiaux les plus communs, *E. faecalis* est actuellement responsable de plusieurs types d'infections, à savoir urinaires, intra-abdominales, pneumonies, septicémies, endocardites et méningites (Le-blanc, 2006).

Dans la cavité buccale, *E. faecalis* ne fait pas partie de la flore normale des plaques dentaires (Aas et al., 2005), sa présence est donc liée à l'état pathologique. D'après une étude réalisée par Salah et al. (2008), les auteurs ont constaté que sur 159 patients, *E. faecalis* a été identifiée seulement chez les sujets qu'ils avaient des pathologies dentaires, à savoir les caries dentaires, les gingivites et les parodontites apicales. Tandis qu'aucune souche d'*E. faecalis* n'a été détectée chez les sujets sains.

L'implication d'*E. faecalis* dans plusieurs types d'infections buccodentaires n'est pas expliquée seulement par son pouvoir pathogène, car il existe d'autres espèces bactériennes plus agressives, mais elles ne sont pas fréquemment identifiées en stomatologie, par exemple *Staphylococcus aureus* (Smith et al., 2003). Ceci peut être expliqué par le fait qu'*E. faecalis* est pourvue par d'autres caractères qui la rendent parmi les pathogènes les plus responsables des troubles dans l'écosystème buccal. On peut citer notamment, l'aptitude de formation des biofilms (Portenier et al., 2003) une capacité de tolérance des conditions extrêmes, particulièrement le stress oxydatif, la dessiccation, la salinité, la température et le pH (Gilmore et al., 2002). Ces caractéristiques permettent à *E. faecalis* la colonisation des sites particuliers dans la cavité buccale, par exemple, dans les racines dentaires (Portenier et al., 2003).

2.1. Nomenclature et caractères bactériologiques

E. faecalis, du latin *faex* qui veut dire fèces, est une cocci à Gram positif non sporulante de 0,5–0,9 µm appartient à la famille des Enterococcaceae (Figure 2). C'est un germe anaérobie facultatif, immobile, oxydase et catalase négatives, bien que le gène codant cette dernière enzyme de détoxification existe dans son génome.

E. faecalis a été identifiée pour la première fois par Schleifer et Kilpper-Bälz en 1884 sous le nom de *Streptococcus faecalis* (Ludwig et al., 2009).

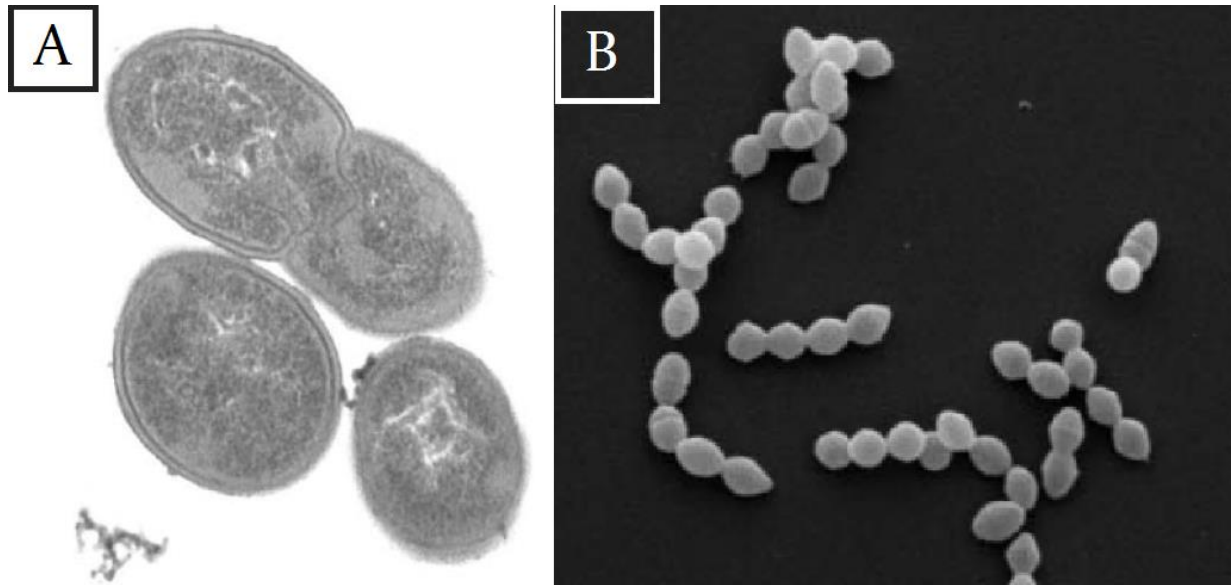


Figure 2. *E. faecalis* aux microscopes (A) électronique à transmission (x 33000), (B) électronique à balayage (x 4000) (Portenier et al., 2003).

2.2. Pathogénicité

Les infections liées à *E. faecalis* varient d'une simple infection vers des pathologies potentiellement mortelles, principalement attribuées à plusieurs facteurs de virulence. Un facteur de virulence est défini comme l'élément qui augmente la capacité d'un microorganisme à provoquer des maladies, néanmoins il n'est pas indispensable à la survie des bactéries elles-mêmes. Différents facteurs de virulence sont produits par *E. faecalis* qui ont pour rôle l'adhérence aux cellules hôtes, l'invasion des tissus, la modulation de la réponse immunitaire et l'induction des dommages par l'intermédiaire de toxines (Kayaoglu et Orstavik, 2004).

2.2.1. Adhésines de surface

Plusieurs gènes codants pour des protéines d'adhésions ont été identifiés chez *E. faecalis*. Ces protéines ont non seulement un rôle important dans l'adhésion et la formation des biofilms, mais également ils détiennent d'autres actions de virulence au moment des infections. Chez *E. faecalis*, le gène *esp* qui code pour une protéine de surface de poids moléculaire élevé (Esp) est la plus étudiée. Cette protéine Esp est incriminée dans la formation des biofilms d'*E. faecalis* sur la plupart des tissus endothéliaux et les surfaces inertes. Elle joue un rôle clé dans les infections dues à *E. faecalis*, notamment urinaires (**Shankar et al., 2001**) et endocardites (**Toledo-Arana et al., 2001**). D'autres gènes d'adhésion ont été aussi identifiés chez *E. faecalis*. On peut citer le gène *ace* qui code pour une protéine d'adhésion au collagène Ace. Cette protéine Ace est souvent exprimée en conditions de stress, spécifiquement dans les racines dentaires après un traitement endodontique (**Hubble et al., 2003**).

2.2.2. Pheromones

Les phéromones sont des petits peptides hydrophobes, de 7 à 8 acides aminés, codés par le chromosome bactérien. Ils jouent un rôle clé dans la signalisation et la conjugaison moléculaire chez *E. faecalis*. Ces phéromones, dites sexuelles, sont impliqués dans les transferts latéraux des gènes de virulence et de résistance envers les antibiotiques (**Dunny, 2013**).

2.2.3. Acides lipotéichoïques

Les acides lipotéichoïques (LTA) sont des molécules bipolaires constituées d'un squelette poly-glycerolphosphate. Ce sont parmi les facteurs de virulence les plus importants chez *E. faecalis*. Premièrement, elles permettent à *E. faecalis* l'attachement sur une variété de cellules eucaryotes, en particulier les plaquettes, les érythrocytes, les leucocytes, les lymphocytes et les cellules épithéliales. Deuxièmement, les LTA d'*E. faecalis* induisent l'apoptose de certaines lignées cellulaires, surtout chez les macrophages et les fibroblastes du ligament parodontal. Troisièmement, ces acides jouent un rôle important dans la résistance d'*E. faecalis* vis-à-vis des détergents, par diminution du taux d'autolyse et par activation du mode VNC (viable non cultivable). Ainsi, les LTA semblent associées à la résistance d'*E. faecalis* envers les solutions d'irrigations appliquées dans les traitements endodontiques (Kayaoglu et Orstavik, 2004).

2.2.4. Production de superoxydes extracellulaires

Il est connu que les superoxydes et les autres radicaux d'oxygène exercent un effet destructeur sur une grande variété de composés biologiques, tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques. *E. faecalis* est parmi les bactéries productrices des superoxydes extracellulaires qui agissent non seulement sur les cellules eucaryotes de l'hôte, par induction de leur nécrose et qui peuvent même induire des mutations cancérigènes, mais aussi ces peroxydes extracellulaires attaquent d'autres espèces bactériennes en cas d'antagonisme (Huycke et al., 2001; Huycke et al., 2002).

2.2.5. Gélatinase

La gélatinase d'*E. faecalis* est une métalloprotéinase zincifère qui est capable d'hydrolyser plusieurs types de macromolécules telles que la gélatine, le collagène, le fibrinogène, la caséine, l'hémoglobine et l'insuline. Cette enzyme est un facteur de virulence important chez *E. faecalis*. Elle est incriminée dans l'invasion des tissus endothéliaux au cours des infections urinaires et endocardites (Qin et al., 2000; Kayaoglu et Orstavik, 2004; Mohamed et Huang, 2007). D'autre part, cette gélatinase est impliquée dans la formation des biofilms chez *E. faecalis* (Mohamed et Huang, 2007).

2.2.6. Hyaluronidase

C'est une enzyme qui agit sur l'acide hyaluronique. Elle est associée à des lésions tissulaires comme conséquence de son activité, notamment la dentine. Cette enzyme est impliquée dans la virulence d'*E. faecalis* dans les caries dentaires, les infections des racines dentaires et les lésions périapicales (Kayaoglu et Orstavik, 2004).

2.2.7. Cytolysine

La cytolysine d'*E. faecalis* est un système lytique qui nécessite pour son action deux peptides non identiques, dont le petit est impliqué dans l'auto-induction de leur opéron. C'est une toxine qui augmente redoutablement la virulence des entérocoques, avec un pouvoir létal envers une large gamme de cellules eucaryotes et même

procaryotes. Ce complexe lytique est responsable à des décès humains d'après des études épidémiologiques (Coburn et Gilmore, 2003).

2.3. Aptitude de formation des biofilms

E. faecalis est une espèce bactérienne qui possède une grande compétence de formation des biofilms (Distel et al., 2002; Mohamed et Huang, 2007) qui attribuée aux molécules d'adhésion précédemment citées. Cette capacité mène *E. faecalis* à provoquer des infections graves liées aux biofilms, particulièrement les infections urinaires (Shankar et al., 2001; Singh et al., 2007) et les endocardites (Nallapareddy et al., 2006). Néanmoins, la formation des biofilms chez *E. faecalis* ne dépend pas seulement des facteurs intrinsèques comme les gènes de fixation (*esp*, *EfaA* et *ace*), mais elle dépend également des facteurs de l'environnement, tels que la présence du glucose (Mohamed et Huang, 2007).

2.4. Résistance vis-à-vis des agents antimicrobiens

Avant la découverte des antibiotiques, les épidémies causées par les bactéries ont tué des milliers voir des millions de personnes tout le long de l'histoire humaine. La mise en évidence de la pénicilline en 1928 a été parmi les plus grandes réalisations de l'humanité, puisque cette découverte a amené un grand développement en médecine et a réduit considérablement la mortalité due aux microorganismes. Malheureusement, l'usage abusif des antibiotiques dans la médecine humaine et l'agriculture a provoqué l'émergence de la résistance chez les bactéries, en particulier dans les pays développés (Levy et Marshall, 2004).

Les entérocoques sont parmi les espèces bactériennes qui ont développé des mécanismes de résistances envers plusieurs classes d'antibiotiques. Actuellement, l'espèce *E. faecalis* est apparue comme un important pathogène responsable d'infections liées aux soins, due à ses multi résistances naturelles et acquises vis-à-vis des antibiotiques (Taneja et al., 2006). En outre, *E. faecalis* possède une tendance importante d'accueillir et de transférer des éléments génétiques mobiles, dont les phéromones sexuelles jouent un rôle clé. Parmi les exemples les plus courants du transfert des phénotypes de résistance, on peut citer la transmission du gène de la résistance à la vancomycine d'*E. faecalis* vers *Staphylococcus aureus* (Paulsen et al., 2003; Nallapareddy et al., 2005).

D'autre part, la résistance d'*E. faecalis* envers les biocides inclut également d'autres types d'agents antimicrobiens, en particulier les antiseptiques et les désinfectants (Bischoff et al., 2012). Cette tolérance vis-à-vis des antiseptiques pose beaucoup de problèmes actuellement, notamment en endodontie (Kayaoglu et Orstavik, 2004).

2.5. Rôles d'*Enterococcus faecalis* dans certaines infections buccodentaires

2.5.1. Caries dentaires

Les caries dentaires sont parmi les maladies chroniques les plus répandues à travers le monde. Elles se surviennent au cours du temps à cause des interactions complexes entre les bactéries productrices d'acides à partir des glucides fermentescibles et de nombreux facteurs liés à l'hôte, en particulier les dents et la

salive (**Selwitz et al., 2007**). *E. faecalis* est une espèce non cariogène (**Anderson, 2001; Harris et al., 2004; Selwitz et al., 2007**). Bien que certains auteurs indiquent l'implication de cette espèce bactérienne dans le processus cariogène (**Kouidhi et al., 2011**) par l'intermédiaire de la Hyaluronidase et la gélatinase (**Kayaoglu et Orstavik, 2004**). Par ailleurs, *E. faecalis* est incriminée beaucoup plus dans l'évolution des caries dentaires d'une simple lésion vers des infections potentiellement graves, telles que les endocardites (**Nallapareddy et al., 2006**) et les parodontites apicales (**Johnson et al., 2006**).

2.5.2. Pathologies parodontales

Les pathologies parodontales sont des lésions chroniques d'origine infectieuse les plus communes chez l'homme, avec une prévalence rapportée entre 10 et 60% chez la population globale. Il y a deux types principaux de pathologies parodontales, à savoir les gingivites et les parodontites. Les gingivites sont des inflammations au niveau de la gencive, tandis que les parodontites sont des affections plus sévères qui se caractérisent par la destruction des tissus mous et de l'os (**Lamont et Jenkinson, 2010**). Ces maladies sont le plus souvent causées par des bactéries anaérobies à Gram négatif (**Xiong et al., 2006**). Par contre, selon une étude réalisée par **Souto et Colombo (2008)**, les auteurs ont constaté que sur 221 patients atteints de parodontites chroniques, *E. faecalis* était responsable jusqu'à 47%, ce qui montre son rôle non négligeable dans ces types d'infections.

2.5.3. Parodontites apicales

Les parodontites apicales (**Figure 3**) sont des inflammations au niveau des tissus péri-radiculaires causées par des agents étiologiques d'origine endodontique. Ce type d'infection provient principalement des caries dentaires, tandis que l'environnement canalaire fournit un habitat sélectif pour une certaine flore microbienne, principalement anaérobiques (**Nair, 2004; Nair, 2006**). Cette communauté résiduelle dans l'espace endodontique, y compris *E. faecalis* (**Svensäter et al., 2010**), agit d'une façon synergétique dans l'envahissement des tissus par l'action des toxines et des protéases. Par conséquent, ces pathogènes peuvent atteindre les tissus péri-radiculaires et même d'autre site où elles causent des abcès et des cellulites (**Lasfargue et al., 2001**).

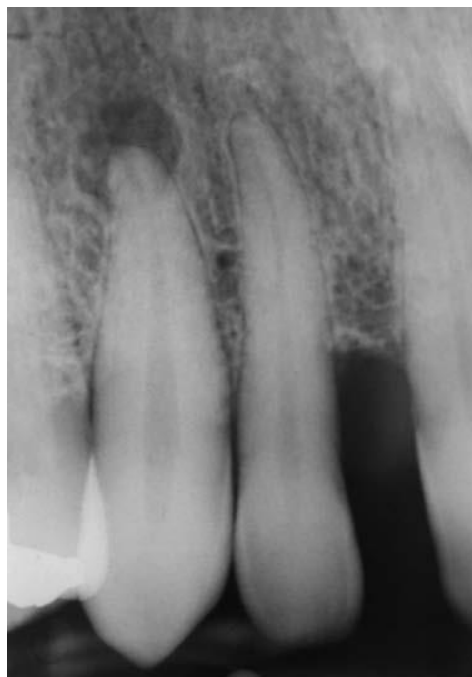


Figure 3. Parodontite apicale (**Haapasalo et al., 2003**).

En endodontie, deux types de parodontites apicales aiguës sont diagnostiquées, à savoir les primaires et les secondaires. Les parodontites apicales primaires sont souvent les conséquences des caries dentaires non traitées. Ce sont des infections d'origine pulpaire caractérisées par une inflammation des tissus pré-apicaux, et elles sont causées par une flore poly microbienne principalement anaérobie (**Lasfargue et al., 2001**). Par contre les parodontites apicales secondaires sont des affections racinaires sévères et persistantes dues aux échecs des traitements endodontiques. Elles correspondent à une évolution destructive des tissus pré-apicaux qui se traduit par la formation des abcès (**Lasfargue et al., 2001**). Concernant les microorganismes responsables, *E. faecalis* est actuellement considérée comme l'agent étiologique responsables de ces parodontites apicales secondaires (**Portenier et al., 2003; Stuart et al., 2006**).

3. Traitements endodontiques et échec lié à *Enterococcus faecalis*

3.1. Traitements endodontiques

La pathologie endodontique est la cause principale de consultation dentaire en urgence, dont son traitement consiste à préparer, décontaminer et obturer le système canalaire afin de prévenir ou de traiter une parodontite apicale. Ce sont les trois piliers de l'endodontie actuelle décrite par **Schilder (1974)**.

L'objectif principal d'un traitement endodontique est d'éliminer l'ensemble des microorganismes et leurs toxines présentes dans le système canalaire dentaire.

En outre, ces traitements servent à la prévention de toute recolonisation ultérieure (Trope et al., 1999). En effet, il est quasiment impossible d'éradiquer l'infection intraradiculaire seulement par des instruments mécaniques (Basrani et Haapasalo, 2012). Pour atteindre ce but, plusieurs désinfectants chimiques sont largement utilisés en endodontie et qu'ils sont connus sous le terme de solutions d'irrigations. Parmi les solutions d'irrigation les plus utilisées dans les traitements endodontiques on peut citer notamment, l'hypochlorite de sodium (NaOCl), la chlorhexidine (CHX) et l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique). Par ailleurs, de nombreuses nouvelles formulations sont commercialisées actuellement, par exemple le QMiX (Dentsply Tulsa Dental) (Figure 4) (Basrani et Haapasalo, 2012).

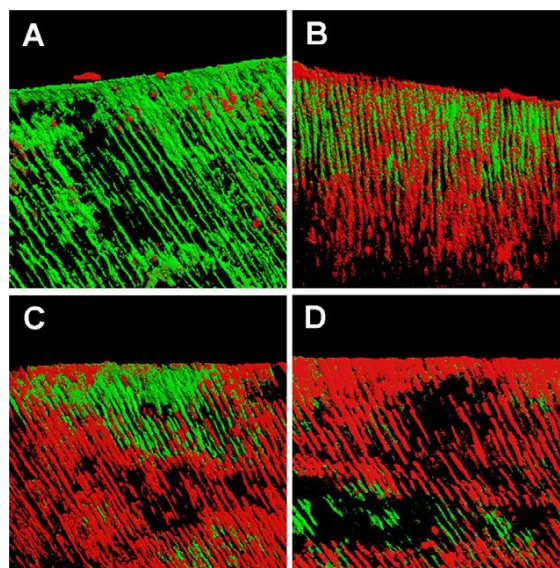


Figure 4. La viabilité d'*E. faecalis*, révélée par un microscopie confocale à balayage par laser, dans les tubules dentaires après 3 minutes de traitement par : (A) eau distillée (B) 2% NaOCl, (C) 6% NaOCl, (D) QMiX (Basrani et Haapasalo, 2012).

3.2. Échec endodontique

Après un traitement endodontique et plombage de la dent infectée, des échecs surviennent parfois et qui se caractérisent par une réinfection de la racine dentaire et la persistance de l'inflammation. Ces pathologies dues à l'échec endodontique sont connues sous le terme d'infection endodontique persistante (Nair, 2004). D'après des études épidémiologiques récentes dans plusieurs pays à travers le monde, il est constaté que le taux de pathologies liées à l'échec endodontique est en augmentation. La principale cause de l'échec endodontique est attribuée à la persistance de certaines pathogènes vis-à-vis des traitements mécaniques et à la résistance aux solutions d'irrigation (Haapasalo et Shen, 2010).

En effet, seulement quelques espèces microbiennes peuvent s'échapper aux traitements endodontiques, et par conséquent elles causent l'infection après obturation de la dent infectée. Ces dernières années, *E. faecalis* a émergé comme étant le principal agent étiologique causatif de ces infections persistantes (Portenier et al., 2003; Stuart et al., 2006). Elle est responsable jusqu'à 77% d'échecs endodontiques (Vidana et al., 2011). D'autres microorganismes sont également identifiés dans les parodontites persistantes, notamment *Candida albicans* et *Streptococcus spp.* Mais leur taux d'infection est relativement faible (Skucaite et al., 2010).

Plusieurs facteurs rendent *E. faecalis* l'agent étiologique causatif des infections endodontiques persistantes. On peut citer en premier lieu, sa résistance envers les solutions d'irrigations utilisées actuellement, en particulier le NaOCl et la CHX (Estrela et al., 2008). Deuxièmement, cette bactérie possède une aptitude

remarquable de tolérance face aux conditions écologiques défavorables, notamment le manque de nutriments et le pH basique (**Portenier et al., 2003**), ce qui la permet de persister jusqu'à 12 mois dans l'espace canalaire après un traitement endodontique (**Sedgley et al., 2005**). Troisièmement, *E. faecalis* est pourvue d'une capacité de formation des biofilms qui augmente ces résistances à la fois vis-à-vis des traitements endodontiques et les conditions écologiques dures (**Mohamed et Huang, 2007**). Quatrièmement, la possession de toute une gamme de facteurs de virulences qui permettent à *E. faecalis* l'envahissement des tissus prés-apicaux et de produire l'infection, à savoir la gélatinase, la hyaluronidase et la cytolysine (**Kayaoglu et Orstavik, 2004**). Cinquièmement, une antibiothérapie impliquées pour guérir les parodontites apicales primaires peuvent sélectionner juste les entérocoques dans les racines dentaires, grâce à leur multi résistance envers les antibiotiques. Ce qui les favorise de contribuer aux échecs endodontiques (**Dahlén et al., 2000**).

3.3. Rôle clé du biofilm dans la résistance bactérienne vis-à-vis des substances antimicrobiennes

En effet, la majorité des infections chez les êtres humains sont causés par des microorganismes en état de biofilm. Ce mode de vie permet aux pathogènes non seulement de s'échappées des systèmes immunitaires innés et adaptatifs de l'hôte, mais également la résistance contre les différents types d'agents antimicrobiens (**Costerton et al., 1999**). La résistance du biofilm microbien envers les antibiotiques se présente actuellement comme un vrai problème de santé publique. Plusieurs chercheurs ont constatées que les bactéries présentes au sein d'un biofilm sont plus résistantes à l'action des antibiotiques que celles à l'état planctonique (**Stewart et Costerton,**

2001). Cette résistance est généralement expliquée par plusieurs paramètres, notamment: l'activation de certains gènes par détection du Quorum, la croissance lente des bactéries (puisque la plupart des antibiotiques agissent au niveau de la phase exponentielle), le transfert des gènes de résistance entre les espèces bactériennes au sein d'un biofilm et finalement l'activation des gènes du stress (**Hoiby et al., 2010**).

En revanche, d'autres auteurs suggèrent que les cellules microbiennes au sein d'un biofilm ne sont pas plus résistantes que celles à l'état planctonique. Ils suggèrent que la matrice extra cellulaire (EPS) du biofilm joue un rôle clé dans la résistance des pathogènes vis-à-vis des biocides par empêchement et neutralisation de ces agents antimicrobiens (**Nadell et al., 2015**).

Dans les parodontites apicales persistantes, l'échec du traitement endodontique est attribué potentiellement aux biofilms, surtout ceux d'*E. faecalis* (**Figure 5**). La formation des biofilms augmente significativement la résistance des pathogènes endodontiques à la fois face aux solutions d'irrigations couramment utilisées et envers les conditions défavorables de l'espace endodontique. Ainsi, le succès d'un traitement endodontique dépend essentiellement de l'éradication effective de ces biofilms (**Haapasalo et Shen, 2010**).

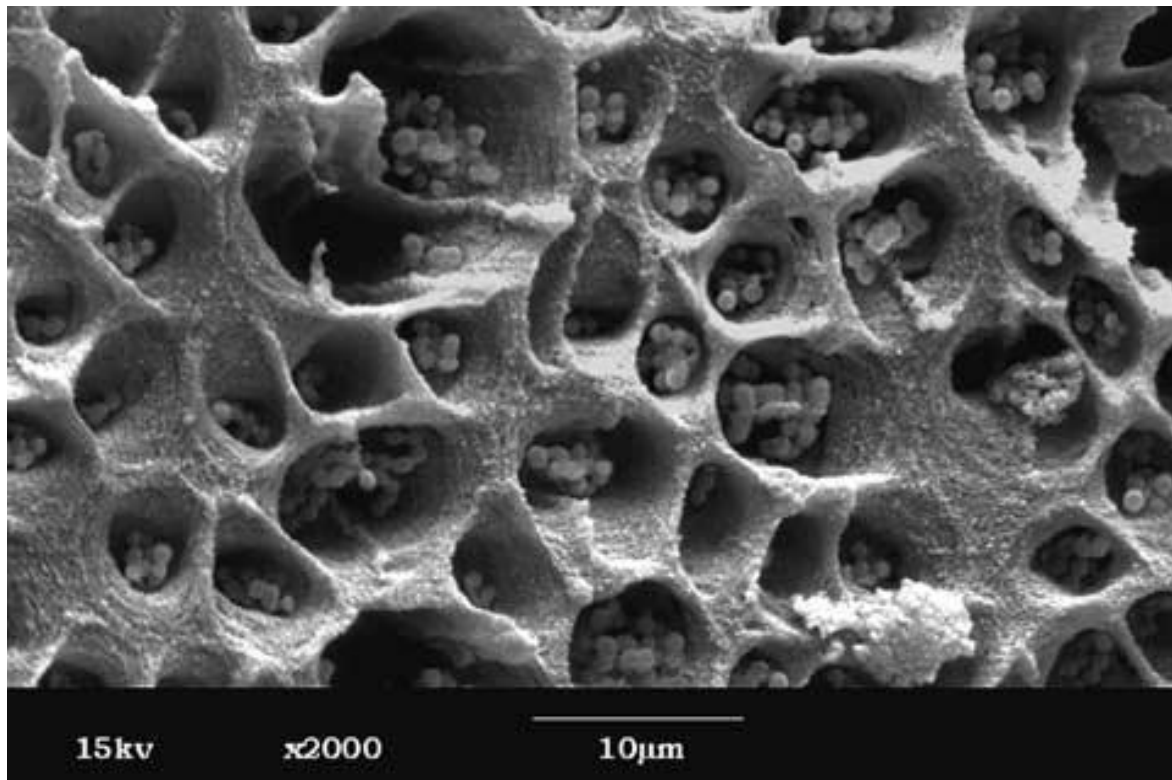


Figure 5. Des tubules dentaires contaminés par des biofilms d'*E. faecalis*
(Gomes et al., 2003).

4. Les huiles essentielles (HEs): une solution alternative potentielle

Face aux problèmes d'échecs dans les traitements endodontiques, il y a un besoin de la mise en évidence des nouveaux agents antimicrobiens pour la désinfection des racines dentaires avant le plombage des dents. L'alternative du choix doit répondre aux exigences suivantes: Premièrement, il faut qu'il soit un fort agent antimicrobien avec une action bactéricide pour assurer la totale élimination des pathogènes à partir des racines dentaires infectées (Haapasalo et al., 2005). Deuxièmement, l'antiseptique proposé doit cibler les microorganismes dans leur état

biofilm, puisque c'est l'état de leur existence dans les racines dentaires (**Haapasalo et Shen, 2010**). Troisièmement, l'antiseptique idéal pour les futures solutions d'irrigation doit être sécurisé pour l'usage humain (**Dumani et al., 2012**). Les antiseptiques utilisés actuellement présentent une certaine toxicité, notamment le NaOCl et la CHX (**Gernhardt et al., 2004; Faria et al., 2007**).

Depuis l'antiquité, les préparations traditionnelles à partir des plantes médicinales ont été largement utilisées dans les traitements d'une grande partie, sinon la majorité des pathologies à travers les cinq continents. Longtemps avant la découverte de l'existence des microbes, l'homme avait déjà l'idée que certaines plantes ont le pouvoir de guérir les maladies (**Mendonça-Filho, 2006**). Le potentiel antimicrobien des plantes a été investi par les populations anciennes dans les traitements des différents troubles causés par les microorganismes, tels que les intoxications alimentaires et les plaies purulentes. D'un autre côté, certaines plantes ont été utilisées également dans la conservation des denrées alimentaires (**Sofowora, 1982; Bakkali et al., 2008**).

Actuellement, une préoccupation mondiale s'est accentuée à la recherche de nouveaux agents doués d'activité biocide envers les bactéries responsables d'infections nosocomiales (**Schaberg et al., 1991**). Parmi les stratégies mises en disposition, les plantes aromatiques et médicinales constituent une bonne réserve de produits bioactifs (**Saleem et al., 2010**).

L'intérêt des plantes est incarné dans leurs richesses en métabolites secondaires. Des dizaines de familles chimiques sont produites par les plantes et qu'ils

ont des fonctions physiologiques différentes (**Daniel, 2006**). D'autre part, la diversité mondiale en espèces botaniques qui touche presque 360000 taxons dans le monde ! (**The-plant-list, 2015**) augmente le nombre de molécules métabolisées. Par conséquent, il est clair que les plantes se présentent vraiment comme une source importante de nouvelles biomolécules thérapeutiques qui peuvent être valorisées en médecine humaine. Sans oublier que pas mal de molécules sont déjà commercialisées (**Bruneton, 1999**) telles que la morphine et la Codéine.

Chez les organismes végétaux, une bonne partie des substances élaborées par leur métabolisme secondaire est impliquée dans leurs défenses contre les herbivores et les parasites (**Howe et Jander, 2008**). Parmi les classes chimiques douées d'activité biocide envers les microorganismes avec des concentrations inhibitrices intéressantes, on peut citer notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les polypeptides, les quinones et les terpénoïdes. Il y a une nécessité continue d'explorer les sources naturelles pour la mise en évidence de nouvelles molécules antimicrobiennes qui seront probablement utilisées comme des agents antimicrobiens à usage humain dans le future (**Cowan, 1999; Saleem et al., 2010**).

4.1. Définition des huiles essentielles

Les HEs sont des mélanges complexes de molécules volatiles issues des organismes vivants tels que le métabolisme secondaire des végétaux (**Franz et Novak, 2010**). Ce sont des substances caractérisées par un ensemble d'activités biologiques prouvées par la communauté scientifique, parmi lesquelles on peut citer brièvement l'activité antimicrobienne (**Burt, 2004**), antioxydante (**Amorati et al., 2013**), anti-

inflammatoire (Miguel et al., 2005), analgésique (Bakkali et al., 2008) et immunostimulante (Alexander, 2001).

L'obtention des HEs à partir du matériel végétal est généralement réalisée par distillation, une technique développée par les Arabes en moyens âges (Bakkali et al., 2008). En effet, l'hydrodistillation des HEs est utilisée à ce jour tant que la méthode recommandée par la pharmacopée européenne (European-Pharmacopoeia, 2005). D'autres techniques sont également appliquées pour l'extraction des HEs telles que l'enfleurage (Eltz et al., 2007), l'extraction par fluide supercritique (Moyler, 1993) et l'extraction aux microondes sans solvant (Lucchesi et al., 2004).

D'autre part, l'obtention des HEs par les différentes techniques est influencée par le séchage du matériel végétal. L'effet du séchage sur les HEs a été bien discuté dans plusieurs travaux publiés (Okoh et al., 2008; Figiel et al., 2010; Al-Jaber et al., 2012). Généralement, le séchage des plantes aromatiques affecte significativement le rendement ainsi que les activités biologiques de leurs HEs (Benbelaïd et al., 2013).

4.2. Chimie des huiles essentielles

Les HEs sont des substances constituées par un mélange complexe de composés volatils qui se caractérisent essentiellement par leurs poids moléculaires faibles, au-dessous de 300 Daltons, et par leur hydrophobicité (Sell, 2010). Ils existent deux classes principales des substances volatiles en fonction de leur voie de biosynthèse, à savoir les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes.

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires volatiles dérivent d'un précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphat. La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural et la plus abondante dans les HEs (Sell, 2010).

Les phénylpropanoïdes, ou les composés phénoliques, sont des métabolites volatiles bio-synthétisés à partir des acides aminés aromatiques, telles que la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (Petersen et al., 2010).

Dans les HEs, on trouve plusieurs fonctions chimiques issues des deux voies métaboliques notamment les carbures (ex. limonène), les alcools (ex. géranol), les aldéhydes (ex. cinnamaldéhyde), les cétones (ex. carvone), les acides (ex. l'acide cinnamiques) et les esters (ex. acétate de bornyle) (Figure 6) (Sell, 2010).

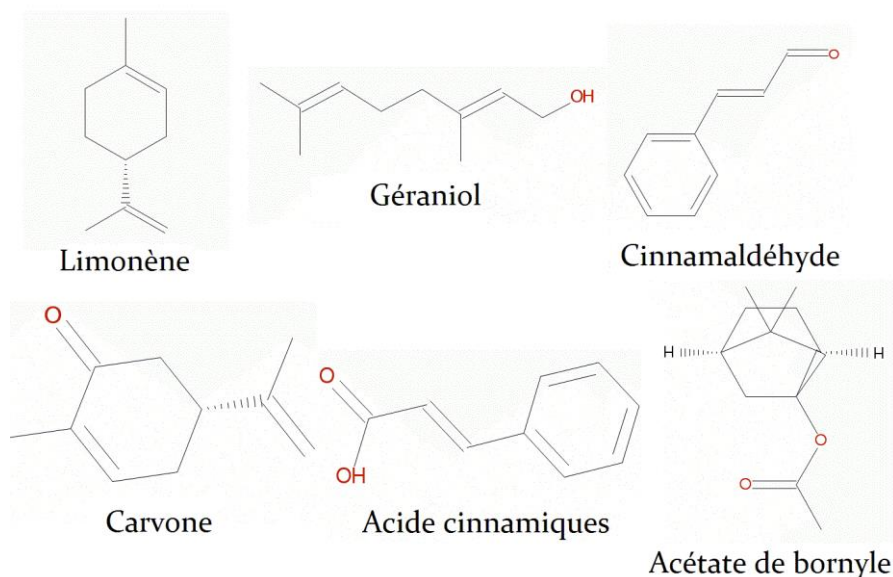


Figure 6. Quelques molécules des HEs avec des exemples des fonctions chimiques.

4.3.1 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

C'est en 1875 que Buchholtz avait mis en évidence pour le premier fois que les HEs sont douées d'une activité biocide envers les microorganismes (**Pauli et Schilcher, 2010**). Cette activité biologique est généralement attribuée à certaines molécules communes dans les HEs. Les molécules oxygénées des HEs sont parmi les plus actives envers les microorganismes, notamment les alcools, et en moindre degré, les aldéhydes et les cétones (**Kotan et al., 2007**).

Selon la bibliographie, les HEs sont parmi les métabolites secondaires les plus actifs vis-à-vis des microorganismes (**Figure 7**). Ces substances volatiles possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne contre non seulement les bactéries, y compris les espèces multi résistantes, mais aussi vis-à-vis des champignons et les virus (**Burt, 2004; Edris, 2007**). Toutefois, il existe une disparité dans l'activité antimicrobienne des HEs, car elle est plus dirigée envers les champignons que les bactéries et beaucoup plus actives contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif (**Burt, 2004**).

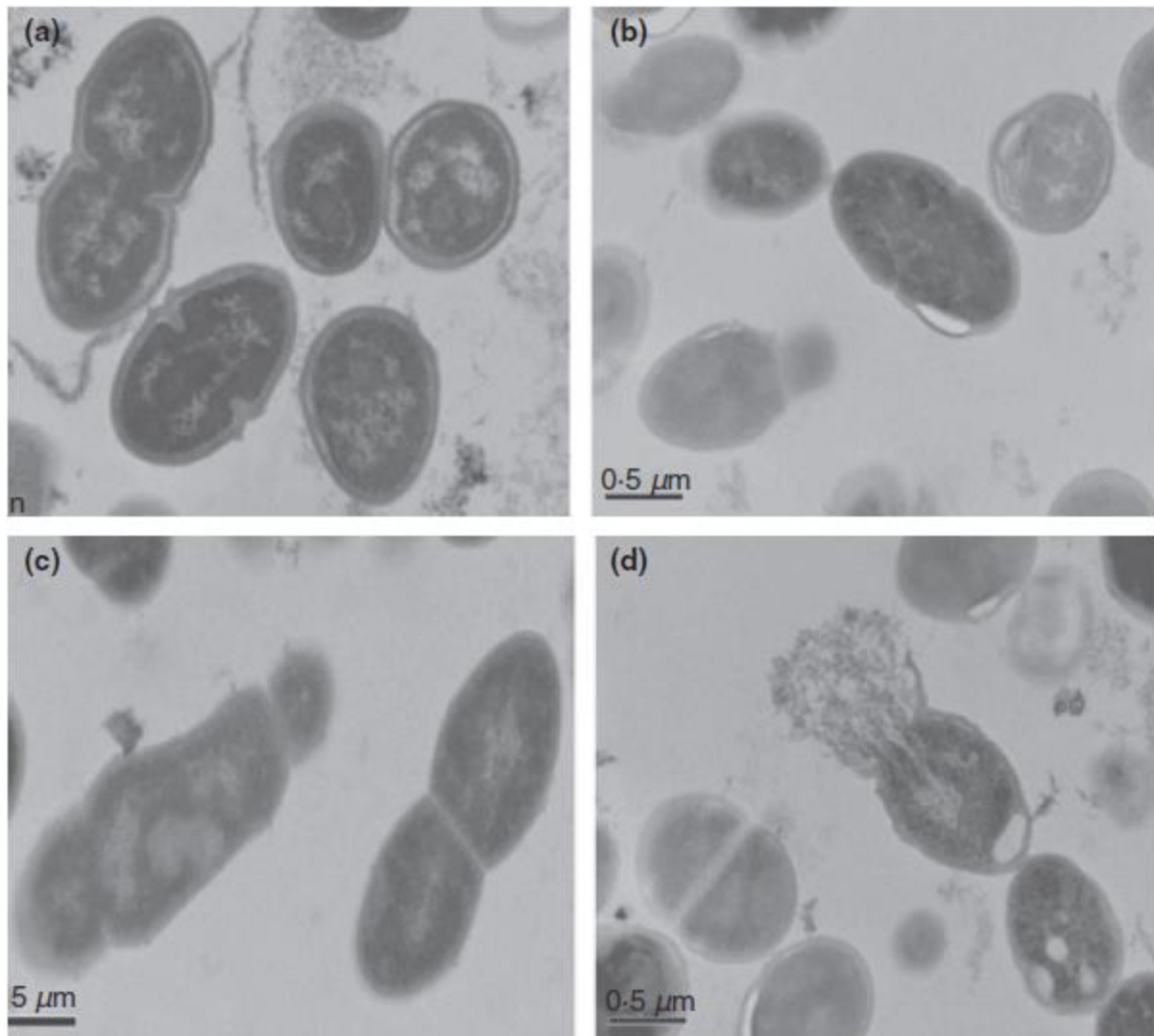


Figure 7. Cellules d'*E. faecalis* après l'exposition (a) pas d'HE, (b) HE d'orange à 2 %, (c) vapeur à 15 mg/l d'HE d'orange, (d) exemple de lyse cellulaire

(Fisher et Phillips, 2009).

Cette affinité du potentiel antimicrobien contre les champignons est expliquée par le fait que les plantes sont beaucoup plus attaquées par les champignons que par les bactéries (Agrios, 2005). D'autre part, les bactéries à Gram négatif sont moins sensibles aux HEs par rapport aux Gram positif grâce à la physiologie de leur paroi (Burt, 2004) qui est caractérisée par une double membrane (Pommerville, 2010).

4.3.1. Mode d'action

A ce jour, l'activité antimicrobienne des HEs n'est pas clairement élucidée. Cette ambiguïté est attribuée à plusieurs facteurs, notamment la variété des composés actifs existants au sein d'une HE donnée, avec la possibilité de synergie ou antagonisme entre ces molécules. En revanche, ce qui est sûr selon pas mal d'études, la cible d'action de la plupart des HEs est focalisée envers les membranes cytoplasmiques des microorganismes (**Kalemba et Kunicka, 2003; Burt, 2004**).

Par ailleurs, le mode d'action de certains composés volatils est bien étudié, due à leur activité antimicrobienne très effective et leur présence dans plusieurs HEs connues. Le Thymol et le Carvacrol agissent sur la perturbation de la fraction lipidique de la membrane plasmique des bactéries, ce qui entraîne des modifications létales dans leurs propriétés physiologiques, notamment la perméabilité membranaire (**Cristani et al., 2007**). En outre, d'après une étude portée sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne du Carvacrol envers *Bacillus cereus*, les auteurs ont constaté que ce phénol induit l'inhibition de la synthèse d'ATP à la conséquence d'une fuite de protons intracellulaire (**Ultee et Smid, 2001**).

Selon la littérature, le cinnamaldéhyde est parmi les molécules volatiles les plus actives envers les microorganismes connus actuellement. Son mode d'action envers les bactéries est similaire à celui des phénols, où il provoque l'inhibition de leur production d'ATP intracellulaire (**Gill et Holley, 2004**). En revanche, d'autres auteurs supposent que l'aldéhyde cinnamique agit d'une façon plus compliquée sur les bactéries. Des observations sous microscopie électronique à balayage ont montré que

le cinnamaldéhyde cause des modifications morphologiques graves au niveau des bactéries cibles. Chez *Bacillus cereus*, cet aldéhyde empêche la formation complète des *septa* de division et du coup, il entraîne des déformations cellulaires (**Kwon et al., 2003**). Tandis que chez *S. aureus* le cinnamaldéhyde provoque des pertes du contenu cellulaire en raison des dommages au niveau de la membrane cytoplasmique (**Carson et al., 2002**).

En raison de son activité antimicrobienne très effective envers les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, le mode d'action du terpinène-4-ol (composé majoritaire de l'HE de *Melaleuca alternifolia*) a été bien étudié. Aussi semblable aux phénols, le terpinène-4-ol cause la disfonctionnement de la membrane cytoplasmique des bactéries, ce qui conduit à la vidange des cellules de son contenu et la formation des structures qui ressemblent aux lysosomes (**Figure 8**) (**Carson et al., 2002**).

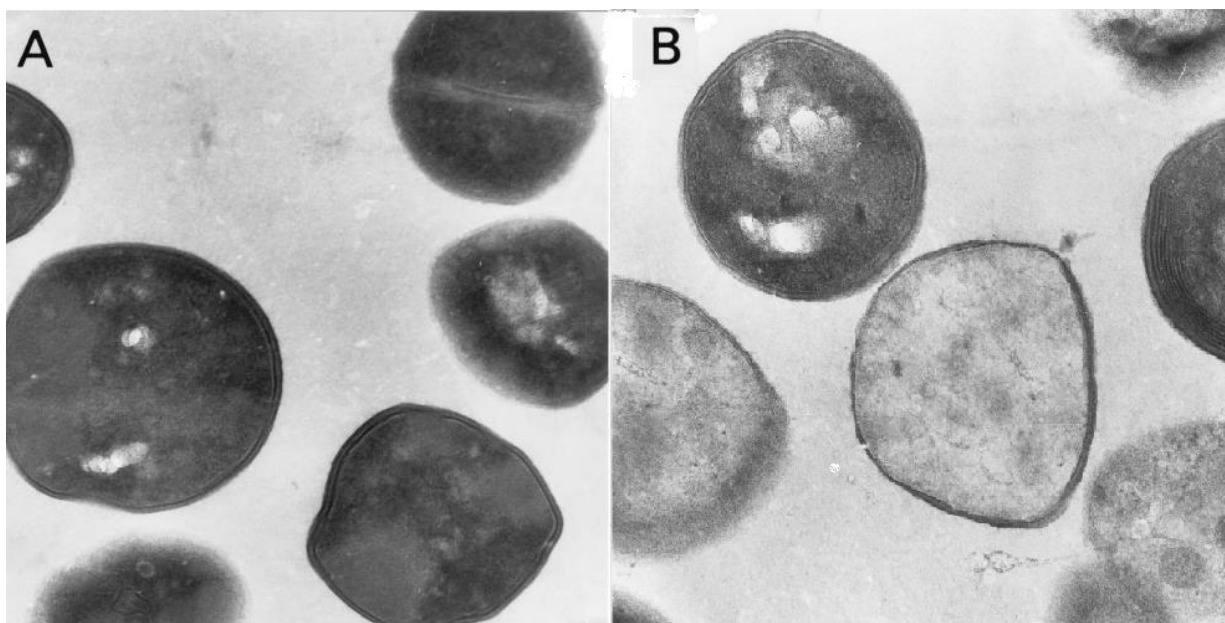


Figure 8: Micrographies en microscopie à transmission des cellules de *Staphylococcus aureus*. (A) : sans traitement $\times 11,500$ (B) : après traitement avec 0,3% du terpinène-4-ol $\times 14,200$ (Carson et al., 2002).

4.3.2. Activité anti biofilms

Il est connu que les biofilms microbiens sont difficiles à éradiquer par les agents antimicrobiens standards, tels que les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques (Kavanaugh et Ribbeck, 2012). Par contre, à travers des recherches effectuées récemment, les HEs sont avérées très efficaces vis-à-vis 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**).

4.4. Applications des huiles essentielles

4.4.1. En agroalimentaire

En industrie alimentaire, la conservation des aliments sans touché leurs qualités organoleptiques est un objectif clé. Les HEs sont actuellement valorisées en industrie agroalimentaire due à leur activité antimicrobienne vis-à-vis des microorganismes d'altération et les principaux pathogènes, notamment *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (**Burt, 2004**). D'un autre côté, les HEs sont également utilisées en agroalimentaire comme des exhausteurs de saveurs (**Brud, 2010**).

4.4.2. En cosmétique

Avant la mise en évidence de leurs propriétés médicinales, les HEs ont été largement exploitées en industrie cosmétique grâce à leurs caractères organoleptiques, principalement leur odeur agréable et persistante. Cette propriété aromatique est attribuée à l'ensemble de molécules volatiles issues des plantes aromatiques. En outre, le potentiel aromatisant des HEs est également appliqué dans des produits pharmaceutiques, notamment dans les solutions et lotions de l'hygiène buccodentaire telles que les dentifrices et les bains de bouche (**Brud, 2010**). L'utilisation des HEs dans des produits cosmétiques, telles que les crèmes et les gels, est non seulement dans le but de les parfumer, mais aussi pour la conservation de ces produits.

4.4.3. En dentisterie

Grâce à leurs propriétés aromatisants et antiseptiques, les HEs ont été largement utilisées dans les bains de bouche conçus pour l'hygiène buccodentaire. Les préparations à base du Thymol, d'Eucalyptol et du Menthol sont parmi 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 leur efficacité antimicrobienne et leur sûreté (**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 d'HE de Thymol et d'Eucalyptol utilisée pour le lavage de la cavité orale et les dents (**Kato et al., 1990**).

Matériel et méthodes

Partie 2. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Les plantes sélectionnées pour cette étude ont été choisies suite à une enquête ethnobotanique préliminaire réalisée en collaboration avec des herboristes et des spécialistes en médecine traditionnelle. Cette enquête, déroulée pendant six mois, nous a permis de sélectionner 12 espèces végétales dont trois taxons sont endémiques de l'Algérie (**Tableau 1**). Les plantes ont été choisies en fonction de leurs utilisations par les populations locales de la wilaya de Tlemcen dans la prévention et les traitements des différentes infections de la cavité buccale, telles que les pathologies parodontales, les candidoses et les caries dentaires. Les deux espèces endémiques *Thymus lanceolatus* et *Cistus munbyi* sont étudiées pour la première fois. Les monographies des plantes sélectionnées sont présentées dans l'**annexe 1**.

Le matériel végétal a été récolté en pleine inflorescence à l'état spontané, par contre certaines espèces ont été récoltées à partir des cultures. Les lieux de récolte des plantes sont présentés dans la **Figure 9**. L'identification botanique des espèces a été confirmée au laboratoire d'Ecologie et de la biodiversité végétale, Université de Tlemcen où des spécimens des plantes sont déposés.

Tableau 1. Données sur les espèces végétales retenues et leurs utilisations.

#	Espèces	Appellation locale	Utilisations	Distribution	Famille	Lieu de récolte	Altitude (m)	Date de récolte	Organes étudiés
A	<i>Ammi visnaga</i>	<i>Khella</i>	Maladies parodontales	Méditerranée	Apiacées	Bouhannak (Mansoura)	711	Juillet 2011	feuilles, tiges, fleurs, semences
B	<i>Ammoides verticillata</i>	<i>Nounkha</i>	Maladies parodontales, candidoses	Méditerranée	Apiacées	Atar (Mansoura)	980	Juillet 2011	feuilles, tiges, fleurs
C	<i>Artemisia arborescens</i>	<i>Chehiba</i>	Aromatisation de la bouche, Maladies parodontales	Méditerranée	Astéracées	Sidi Yahyia (Sidi Medjahed)	580	Juillet 2011	feuilles, tiges, fleurs
D	<i>Cistus munbyi</i>	<i>Chebouba lfedia</i>	Aromatisation de la bouche, Maladies parodontales, caries	Endémique	Cistacées	Honaïne	80	Avril 2011	feuilles, tiges, fleurs
E	<i>Dittrichia graveolens</i>	<i>Magramen</i>	Maladies parodontales	Méditerranée	Astéracées	Bouhannak (Mansoura)	725	Août 2011	feuilles, tiges, fleurs
F	<i>Lavandula dentata</i>	<i>Izir-Helhal</i>	Aromatisation de la bouche	Ouest Méditerranée	Lamiacées	Sidi Yahyia (Sidi Medjahed)	580	Juillet 2011	feuilles, tiges, fleurs
G	<i>Lavandula multifida</i>	<i>Kehila</i>	Maladies parodontales, caries	Ouest Méditerranée	Lamiacées	Bouhannak (Mansoura)	700	Octobre 2011	feuilles, tiges, fleurs
H	<i>Mentha x piperita</i>	<i>Naânaâ leftour</i>	Aromatisation de la bouche	Méditerranée	Lamiacées	Ouled charef (Maghnia)	400	May 2012	feuilles, tiges, fleurs
I	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i>	<i>zaâtar lehmir</i>	Maladies parodontales, caries, candidoses	Algérie/Tunisie	Lamiacées	Atar (Mansoura)	980	Juin 2011	feuilles, tiges, fleurs
J	<i>Rosmarinus eriocalyx</i>	<i>Berkla</i>	Aromatisation de la bouche, Maladies parodontales	Afrique du Nord	Lamiacées	Honaïne	100	Juin 2011	feuilles, tiges, fleurs
K	<i>Thymbra capitata</i>	<i>Ziitera</i>	Maladies parodontales, caries, candidoses	Méditerranée	Lamiacées	El-Koudia	690	Juillet 2011	feuilles, tiges, fleurs
L	<i>Thymus lanceolatus</i>	<i>Zaâtar Terni</i>	Maladies parodontales, caries, candidoses	Endémique	Lamiacées	Terni	1325	Juillet 2012	feuilles, tiges, fleurs

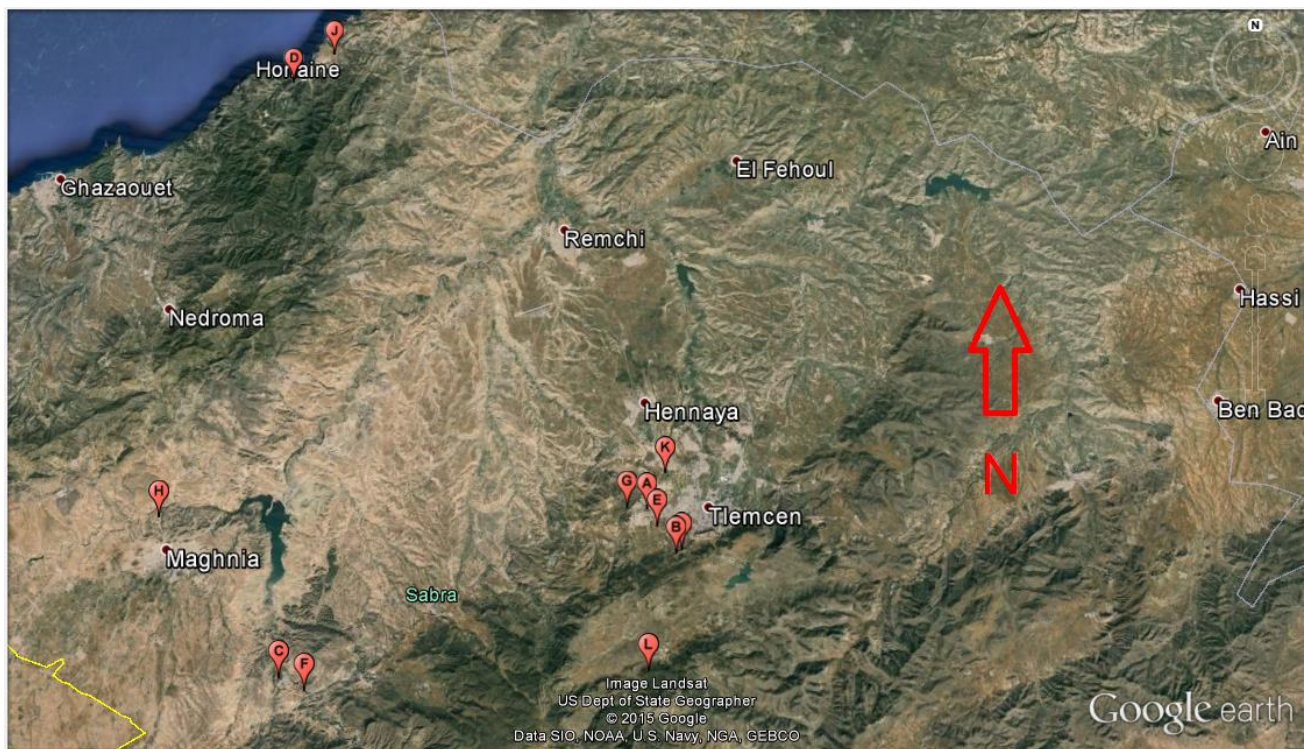


Figure 9. Répartition géographique des lieux de récolte.

2. Extraction des huiles essentielles

L'obtention des HEs à partir du matériel végétal frais a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un montage de type Clevenger (**Figure 10**), selon la technique recommandée par la pharmacopée européenne (**European-Pharmacopoeia, 2005**). Le procédé est basé sur la mise en contact direct du matériel végétal avec de l'eau dans un ballon placé au-dessus d'une source de chaleur. Le ballon est lié à une colonne qui communique avec un réfrigérant, permettant la condensation des vapeurs d'eau chargée de gouttelettes d'HE. L'huile est recueillie dans une burette graduée ou le volume est lu directement. L'extraction a été effectuée pendant trois jusqu'à cinq heures sur les parties aériennes des plantes aromatiques. Les huiles

obtenues ont été déshydratées sur le sulfate de magnésium (MgSO_4) et conservées à $4\text{ }^\circ\text{C}$ et à l'abri de la lumière.



Figure 10. Montage de type Clevenger modifié pour l'hydrodistillation des HEs.

3. Analyse chimique des huiles essentielles

Les analyses GC ont été effectuées en utilisant un appareil Perkin Elmer GC Autosystem équipé d'un injecteur unique et de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID). L'appareil est doté de deux colonnes de silice fondue capillaires (60 m x 0,22 mm de diamètre, épaisseur de film 0,25 μm) avec différentes phases stationnaires : Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Programme de température : $60\text{--}230\text{ }^\circ\text{C}$ à $2\text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ puis maintenus isotherme à $230\text{ }^\circ\text{C}$ (30 min). Gaz vecteur : hélium (1 ml/min). Températures d'injecteur et du détecteur ont eu lieu à $280\text{ }^\circ\text{C}$. Injection a été réalisée avec un rapport de division de 1:80. Volume injecté : $0,1\ \mu\text{l}$.

Les analyses CG/SM ont été effectuées à l'aide d'un détecteur Perkin Elmer TurboMass, directement couplé à un XL Perkin Elmer Autosystem équipé de colonnes de silice fondue capillaires (60 m×0,22 mm de diamètre, épaisseur du film 0,25 µm), Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Autres conditions CG étaient les mêmes que décrit ci-dessus.

CG/SM (IE) les conditions : température de la source d'ions : 150 °C ; énergie d'ionisation : 70 eV ; spectres électroniques de masse à ionisation ont été acquises sur la gamme de masse de 35 à 350 Da. Temps de numérisation : 1 s. L'injection a été réalisée avec un rapport de division de 1:80.

L'identification des composants est fondée : (i) la comparaison de leurs indices de rétention (RI GC) sur des colonnes apolaires et polaires, déterminée par rapport au temps de rétention d'une série de n-alcanes avec une interpolation linéaire, avec les composés authentiques ou des données de la littérature, et (ii) sur l'ordinateur correspondant à des bibliothèques spectrales de masses commerciales (**Adams, 2007**) et avec la comparaison des spectres avec ceux de notre bibliothèque personnelle. La quantité relative de chaque composant a été réalisée sur la base de leurs surfaces de pics sur les deux colonnes GC capillaires Rtx-1 et Rtx-Wax, sans correction du facteur de réponse du FID.

4. Souches microbiennes

4.1. Souches de référence

Deux souches de référence d'*E. faecalis* ont été utilisées dans les expérimentations, qui sont *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 conservées au laboratoire LAMAABE.

4.2. Souches d'origine cliniques

Des prélèvements cliniques ont été réalisés pendant une période de 8 mois chez des patients recrutés au niveau du service de stomatologie au CHU de Tlemcen, de Novembre 2011 jusqu'à Juillet 2012. Les différents prélèvements ont été effectués selon le type d'infection, soit par écouvillonnage des poches parodontales dans les cas des parodontites et des gingivites, soit à l'aide d'une seringue stérile à partir des cellulites, et par des tiges spéciales en cas des traitements endodontiques. Les échantillons ont été immédiatement transportés au laboratoire dans une glacière.

Au laboratoire, l'isolement des entérocoques a été réalisé par enrichissement des prélèvements dans un milieu sélectif, le bouillon Roth (Conda Pronadisa™, Espagne). Après incubation à 37 °C pendant 24 h, les cultures positives ont été ensemencées par méthode d'épuisement sur un milieu solide sélectif, la gélose bile esculine azide (Conda Pronadisa™, Espagne), afin de purifier les souches. Après ré-incubation dans les mêmes conditions, seulement les souches esculinase positives ont été purifiées par repiquage successif sur gélose bile esculine azide, puis conservées sur une gélose nutritive inclinée à 6 °C.

L'identification des souches comme étant *E. faecalis* a été effectuée dans un premier temps par des techniques de microbiologie classique, qui sont dans l'ordre successif, la mobilité à l'état frais, la coloration du Gram, le test de la catalase, la fermentation des sucres. Tandis que la confirmation de l'identification a été réalisée par système API Strep (Bio Mérieux®, Marcy, étoile de France), basée principalement sur le comportement enzymatique des souches. Les souches identifiées en tant que *E. faecalis* ont été conservées à -20 °C dans un mélange Bouillon cœur cervelle (Conda Pronadisa™, Espagne)/glycérol (Biochem®, Canada) 8/2 (v/v).

5. Préparation de l'inoculum

Pour préparer les suspensions bactériennes, les colonies purifiées précédemment sont prélevées et ensemencées dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon Coeur-Cervele (Conda Pronadisa™, Espagne) puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, les suspensions sont bien agitées à l'aide du vortex puis diluées pour standardisation, de telle sorte que l'inoculum sera ajusté à une turbidité standard de 0,5 McFarland, ce qui correspond à une densité optique de 0,08–0,13 à une longueur d'onde de 625 nm. La concentration finale de l'inoculum sera approximativement de l'ordre de 10⁸ ufc/ml (CLSI, 2006).

6. AntibioGramme

Afin de sélectionner des souches d'*E. faecalis* multi-résistantes, un antibiogramme a été effectué en utilisant les antibiotiques suivants, Amoxicilline (25 µg), Chloramphénicol (30 µg), Ciprofloxacine (5 µg), Erythromycine (15 µg), Gentamicine (15 µg), Tétracycline (30 µg), Vancomycine (30 µg) (Oxoid®, Angleterre).

L'antibiogramme a été réalisé selon les recommandations du (CLSI, 2006) sur des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre remplies par la gélose Muller–Hinton (Fluka®, Inde). Les boîtes sontensemencées par écouvillonnage à partir des suspensions de 10^8 ufc/mL. Puis les disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose et les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h. Après incubation, l'interprétation des résultats est effectuée par mesure des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

7. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

7.1. Diffusion sur gélose « Aromatogramme »

Le criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des HEs a été réalisé par la technique modifiée de Kirby–Bauer (Carson et Riley, 1995). Des boîtes de pétris (9 cm de diamètre) remplies par de gélose Muller–Hinton sontensemencées par écouvillonnage à partir des suspensions standardisées (10^8 ufc/mL). Ensuite, des disques en papier Whatman (No. 3) (6mm) imprégnés par 10 μ L d'HE sont déposés sur la surface de la gélose pré-ensemencée. Puis, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h. 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 lecture des résultats se fait par la mesure du \varnothing de la zone d'inhibition en mm selon la fourchette proposée par **Ponce et al. (2003)** comme suit :

$6 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 8 \text{ mm}$: non sensible	$9 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 14 \text{ mm}$: sensible
$15 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 19 \text{ mm}$: très sensible	$\varnothing \geq 20 \text{ mm}$: extrêmement sensible

7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI »

Les « CMI » des HEs ont été déterminées par une méthode modifiée de **Wiegand et al. (2008)**. Dix concentrations de l'HE sont préparées dans des tubes à hémolyse stériles. Elles sont réalisées par des dilutions $\frac{1}{2}$ successives dans un mélange bouillon Muller-Hinton et Tween 80. La fourche des concentrations obtenues est comprise entre 40% et 0,08% d'une façon que la concentration de Tween 80 est maintenue constante à 1%. Ensuite, une microplaque de 96 puits est préparée par déposition de 90 μL de suspension bactérienne à $5 \cdot 10^5$ ufc/mL (préparée par dilution $\frac{1}{200}$ de l'inoculum 10^8 ufc/mL) avec 10 μL de chaque concentration. Les concentrations de l'HE obtenues dans la microplaque sont entre 4% et 0,008%, et la concentration finale du Tween 80 est à 0,1% dans chaque puit. Deux témoins sont testés pour chaque manipulation. Un témoin consiste au remplissage des puits par 100 μL de milieu de culture stérile pour contrôler les contaminations. Tandis que l'effet du Tween 80 sur les souches testées a été contrôlé par son ajout à 0,1% dans des puits remplies seulement par des suspensions bactériennes. Après incubation des microplaques à 37 °C pendant 24h, la CMI de la croissance est déterminée en tant que la plus faible concentration de l'HE pour laquelle la croissance microbienne n'est pas observée à l'œil nu. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

8. Activité anti-biofilms des huiles essentielles

8.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du biofilm « CMIB»

Les CMIBs des HEs ont été déterminées selon la méthode modifiée de **Nostro et al. (2007)**. Dans un premier temps, une microplaque de 96 puits est remplie par 100 μL de suspension bactérienne à 10^8 ufc/mL puis incubée à 37 °C pendant 24h. 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). En même temps, dix concentrations de l'HE sont préparées de la même façon que dans la détermination des CMI, seulement que la concentration de Tween 80 est maintenue à 3,33% dans les tubes à hémolyses. Ensuite, les puits de la microplaque sont remplis par 70 μL de bouillon stérile (Muller-Hinton) 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 0,02% et 12%, et la concentration finale de Tween 80 est à 1% dans chaque puits. La microplaque est de nouveau ré-incubée dans les mêmes conditions. Après ré-incubation, la CIMB est définie étant que la plus faible concentration pour laquelle la croissance microbienne n'est pas observée à l'œil nu. En plus, ce résultat est confirmé par aucune augmentation de la densité optique par rapport à des lectures initiales. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

8.2. Détermination de la concentration minimale éradicatrice du biofilm « CMEB »

Les CMEBs des HEs ont été déterminées selon la méthode modifiée de **Nostro et al. (2007)**. L'expérience est poursuivie dans les mêmes microplaques utilisées pour la détermination des CMIBs. Dans le jour même après lecture des résultats des CMIBs, le milieu de culture est éliminé de la microplaque par aspiration à l'aide d'une seringue et les puits sont ensuite rincés trois fois par tampon phosphate salin (PBS) et une fois par une solution d'éthanol à 20% (afin d'éliminer les traces restantes de l'HE). Ensuite, tous les puits sont remplis par 100 µL du bouillon trypticase de soja stérile (Conda Pronadisa™, Espagne) et les microplaques sont re-incubées à 37 °C pendant 72 h. La CMEB est définie en tant que la plus faible concentration où il n'y a pas de croissance microbienne dans les puits, visuellement déterminée et vérifiée par aucune augmentation de la densité optique par rapport à des lectures initiales. Des contrôles sont réalisés pour vérifier que l'éthanol à 20% n'a pas d'effet sur les bactéries. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

9. Etude de la combinaison des huiles essentielles avec des antiseptiques

La recherche de la synergie entre les HEs et des antiseptiques envers *E. faecalis* a été réalisée selon la méthode modifiée de **Vitale et al. (2005)**. Sept concentrations de l'HE et l'agent antimicrobien, soit la CHX ou le NaOCl (Phcie, France), sont préparées dans des tubes à hémolyses stériles par des dilutions 1/2. Puis dans une microplaque de 96 puits remplie par une suspension d'*E. faecalis* ATCC 29212 à 10⁶ ufc/mL, les concentrations de l'HE sont introduites verticalement dans sept puits d'une façon

décroissante allons de CMI x 4 à CMI/16. Tandis que les concentrations de l'antiseptique sont introduites horizontalement dans sept puits d'une façon décroissante allons de CMI x 4 à CMI/16 (**Figure 11**).

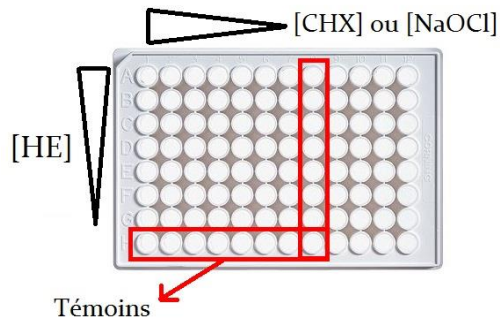


Figure 11. Combinaison sur microplaque de 96 puits.

Après incubation de la microplaque à 37 °C pendant 24 h, l'interprétation des résultats (**Figure 12**) se fait en calculant la CFI (la concentration fractionnelle inhibitrice). $CFI = CFI \text{ de l'agent 1} + CFI \text{ de l'agent 2}$. CFI des agents 1 ou 2 se calcule comme le suit :

$$CFI \text{ d'agent 1} = CMI \text{ de la combinaison} / CMI \text{ d'agent 1.}$$

$$CFI \text{ d'agent 2} = CMI \text{ de la combinaison} / CMI \text{ d'agent 2.}$$

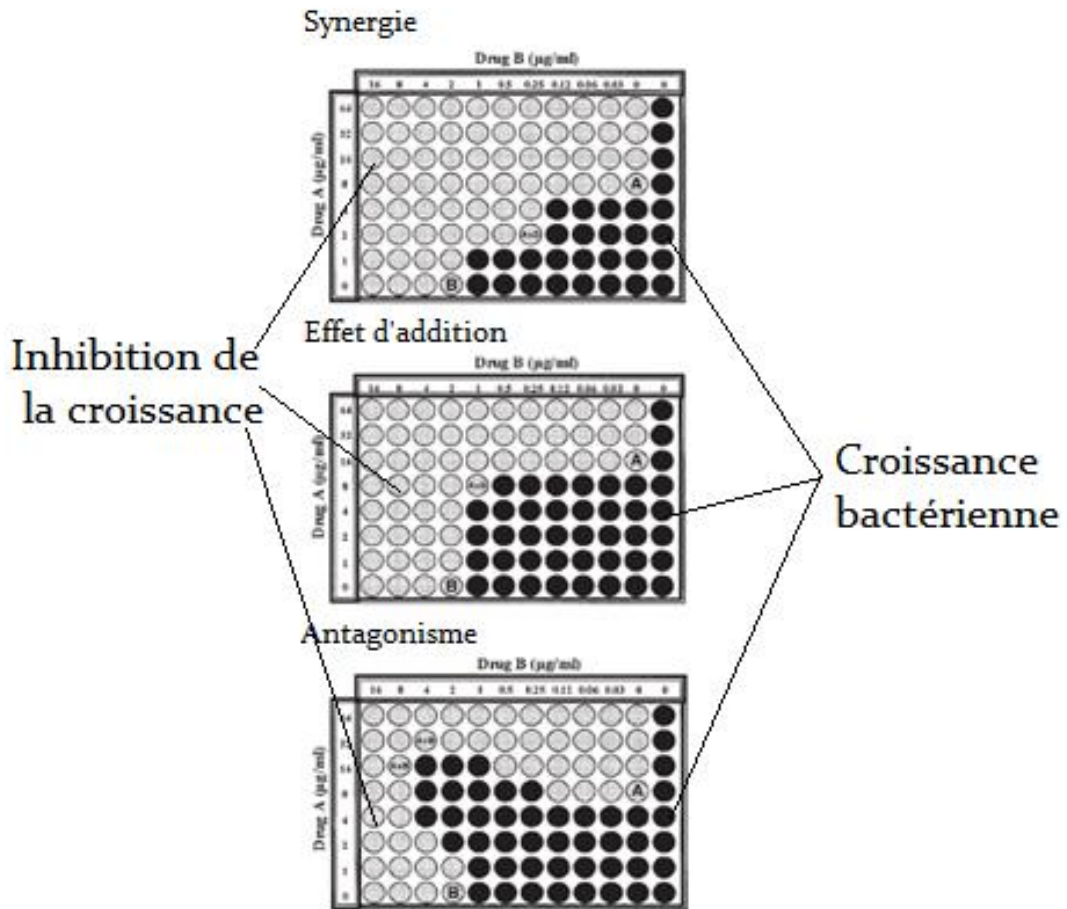


Figure 12. Interprétation des résultats de la combinaison (Vitale et al., 2005).

La signification des CFIs est déterminée comme suit: $CFI \leq 0,5$ cas de synergie, CFI entre 0,5 et 4 y a pas d'interaction entre les deux agents antimicrobiens, $CFI \geq 4$ cas d'antagonisme.

10. Evaluation des solutions d'irrigation préparées à base des huiles essentielles

10.1. Effets *in vitro* vis-à-vis des biofilms d'*E. faecalis*

Dans le but de l'évaluation des solutions d'irrigation préparées à base des HEs, une expérience *in vitro* semblable aux traitements endodontiques a été effectuée sur des tubes Eppendorf contaminés par des biofilms d'*E. faecalis* ATCC 29212. Le Protocole utilisé est extrait d'une étude réalisée par **Cheow et al. (2011)** et qui est constituée de trois étapes : 1) Formation des biofilm d'*E. faecalis* sur des tubes Eperndorf. 2) Traitement par les solutions d'irrigation. 3) Détermination de l'efficacité de l'irrigation selon la réduction décimale des cellules viables (réalisée par dénombrement après sonication).

10.1.1. Préparation des solutions d'irrigations

Les solutions d'irrigations à base des HEs sont préparées par la dilution de l'huile pure dans l'éthanol HPLC (Sigma-Aldrich®, France) d'une façon que la concentration de ce solvant est maintenue constante à 20%. Trois concentrations (1,25%, 0,63% et 0,32%.) ont été préparées pour chaque HE testée.

10.1.2 Vérification de formation des biofilms

La capacité de formation des biofilms chez la souche utilisée dans cette expérimentation (*E. faecalis* ATCC 29212) a été vérifiée par la méthode de (**Duggan et Sedgley, 2007**).

10.1.3. Formation des biofilms

Les biofilms d'*E. faecalis* sont formés dans des tubes Eppendorf de polypropylène de 1,5 mL. Dans un premier temps, les tubes Eppendorf sont remplis par 500 µL de suspensions bactérienne d'*E. faecalis* (ATCC 29212) à 10^8 ufc/mL, puis incubés à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, les tubes Eppendorf sont vidés et rincés trois fois par tampon phosphate salin (PBS), puis remplis par du bouillon stérile (Muller–Hilton) et ré-incubés pendant 24 h dans les mêmes conditions. L'opération est répétée deux fois pour obtenir à la fin des biofilms matures de 72 h dans les tubes Eppendorf.

10.1.4. Irrigation

Après l'obtention des biofilms matures dans les tubes Eppendorf, l'irrigation *in vitro* est réalisée par remplissage de ces tubes sans agitation (comme-ci des racines dentaires infectées) par 750 µL des solutions d'irrigation testées. Après des contacts pendant des durées déterminées, à savoir 30 secondes, une minute ou cinq minutes, les solutions d'irrigations sont aspirées et les tubes sont ensuite bien rincés trois fois à l'aide d'un tampon phosphate salin (PBS) et une fois par l'éthanol à 20% (afin d'éliminer les traces restantes de l'HE). Après rinçage, les tubes sont remplis par 1 mL d'eau physiologique stérile. Les contrôles testés dans cette expérience sont l'eau physiologique et l'éthanol à 20%. Alors que les témoins positifs sont la CHX à 2%, le NaOCl à 2,5%, et l'HE de l'espèce *Cinnamomum cassia* (la cannelle, achetée au marché de Tlemcen). Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

10.1.5. Sonication et dénombrement

Après irrigation, les tubes Eppendorf (remplis par 1 mL d'eau physiologique) sont introduits dans un appareil ultrason (Wiseclean[®]) dans le but de récupérer les cellules d'*E. faecalis* à partir des biofilms. La sonication est effectuée à 50 % pendant 5 minutes. Les cellules récupérées sont dénombrées pour déterminer leur réduction décimale Log ufc/mL.

10.2. Effets *in vivo* : traitement endodontique

Les solutions d'irrigation testées *in vitro* ont été également évaluées dans un traitement endodontique *in vivo*. Onze patients ont été recrutés pour cette expérimentation au sein du service de stomatologie de la faculté de médecine université Abou bekr Belkaïd de Tlemcen. Les informations personnelles des patients retenus sont présentées dans l'**annexe 2**. Les patients admis (après leur consentement) ont subi le test de l'effet antiseptique des solutions d'irrigation à base des HEs sous la direction assisté du Dr. Benyelles du département de chirurgie dentaire.

Cette expérience *in vivo* est basée sur le remplacement de l'antiseptique appliqué dans les traitements endodontiques (habituellement le NaOCl à 2,5%) par les solutions préparées à base des HEs à 1%. Après nettoyage mécanique de la dent traitée, l'irrigation se fait par le remplissage de la racine dentaire par la solution désinfectante pendant 10 secondes trois à cinq fois successive, puis la solution est aspirée et la racine dentaire est ainsi obturée. Trois solutions à base des HEs ont été testées, à savoir celles de *C. cassia*, *T. lanceolatus* et *C. munbyi*. Chaque solution a été testée sur trois patients, tandis que le dixième patient a été traité par le NaOCl à 2,5%, et il a été

considéré comme un témoin positif. Par contre le onzième patient est irrigué par du l'eau physiologique stérile (saline) est considéré comme un contrôle.

Deux prélèvements, avant et après l'irrigation, ont été réalisés à l'aide d'une tige spéciale à partir de la racine traitée. Les tiges ont été ainsi mises dans 1 mL d'eau physiologique stérile, puis transportés immédiatement au laboratoire dans une glacière. L'efficacité du traitement endodontique a été déterminée selon la réduction décimale Log ufc/mL des microorganismes mettait en évidence sur gélose Muller-Hinton pour la flore aérobie totale, et sur gélose bile esculine azide pour les entérocoques totaux.

11. Tests statistiques

Les tests de Student ont été réalisés à l'aide de Microsoft Excel®. Tandis que les analyses statistiques ANOVA à deux facteurs avec répétition ainsi que le test postérieure de Bonferroni ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad PRISM version

5.

Résultats et discussion

Partie 3. Résultats et discussion

1. Rendements en huiles essentielles

Les teneurs en HEs des plantes étudiées exprimées en pourcentage volume/poids par rapport au matériel frais sont consignées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4. Teneurs en HEs des plantes étudiées et leur durée d'obtention.

Espèces	Teneur % (v/p MF)	Durée (h)
<i>Ammi visnaga</i>	0,69	4
<i>Ammoides verticillata</i>	1,35	3
<i>Artemisia arborescens</i>	1,24	3
<i>Cistus munbyi</i>	1,72	5
<i>Dittrichia graveolens</i>	0,77	3
<i>Lavandula dentata</i>	1,68	4
<i>Lavandula multifida</i>	0,30	4
<i>Mentha piperita</i>	1,43	4
<i>Origanum glandulosum</i>	1,93	3
<i>Rosmarinus eriocalyx</i>	1,87	5
<i>Thymbra capitata</i>	1,62	4
<i>Thymus lanceolatus</i>	1,72	4

MF : Matériel frais

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que les rendements en HEs varient de 0,30% à 1,93%. Les espèces *O. glandulosum*, *R. eriocalyx*, *T. lanceolatus*, *L. dentata* et *T. capitata* ont donné de très bon rendements en HEs 1,93%, 1,87%, 1,72%, 1,68% et 1,62%, respectivement. Alors que d'autres espèces comme *L. multifida*, *A. visnaga* et *D. graveolens* ont titrée de faibles rendements en HEs, 0,30%, 0,69% et 0,77%, respectivement.

Aussi, on constate que la durée d'hydrodistillation pour l'obtention des HEs varie selon les espèces. Certaines plantes nécessitent cinq heures d'extraction tandis que d'autres espèces avaient besoin que de quatre voir trois heures. Plus le matériel végétal est épais et dur, plus il faut du temps pour libérer la fraction volatile.

Au vu de la littérature nous avons obtenu de très bons rendements en HEs (**Tableau 5**). C'est vrai qu'il y a des différences de rendements en HEs pour les mêmes espèces rapportés dans la bibliographie, mais c'est normal car le rendement en HEs dépend de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques comme la période de récolte, le type d'organes récoltés, le sol et la pluviométrie (**Schmidt, 2010**).

Tableau 5. Rendements rapportés dans la littérature par rapport au poids frais.

Espèces	Teneur*0%	Teneur**0%	Références
<i>Ammi visnaga</i>	0,69	1,3 ^b	(Khalfallah et al., 2011)
<i>Ammoides verticillata</i>	1,35	2 ^b	(El Ouariachi el et al., 2011)
<i>Artemisia arborescens</i>	1,24	0,33 ^a	(Militello et al., 2012)
<i>Dittrichia graveolens</i>	0,77	0,04–0,07 ^a	(Ghosn et al., 2006)
<i>Lavandula dentata</i>	1,68	0,58–0,89 ^b	(Bousmaha et al., 2006)
<i>Mentha piperita</i>	1,43	2,5 ^a	(Andoğan et al., 2002)
<i>Origanum glandulosum</i>	1,93	2,3–5 ^a	(Ruberto et al., 2002)
<i>Thymbra capitata</i>	1,62	0,6 ^a	(Miguel et al., 2005)

*: résultats de cette étude. **: résultats rapportés dans des travaux antérieurs. a: rendement en pourcentage volume/poids (% v/p MF), b: rendement en pourcentage poids/poids (% p/p MF).

2. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des HEs étudiées (analysées par CG/Ir et CG/SM) est présentée dans le **Tableau 6**. D'après les résultats obtenus, on observe qu'il y a une variabilité chimique importante entre les huiles étudiées. Toutes les HEs sont avérées riches en monoterpènes (>50%), dont les monoterpènes oxygénés caractérisent les HEs des espèces appartenant aux Lamiacées, Apiacées et Astéracées. A titre d'exemple *M. piperita* (91,09%), *T. lanceolatus* (80,37%), *O. glandulosum* (72,49%), *L. dentata* (72,16%) et *T. capitata* (66,29%), *A. visnaga* (43,84%), *A. verticillata* (59,37%), *A. arborescens* (60,19%) et *D. graveolens* (76,93%). Tandis que l'espèce endémique *C. munbyi* (Cistacées) a donné une HE équilibrée en monoterpènes oxygénés et hydrocarbures monoterpéniques (49,40%/43,59%). D'autre part, l'HE de cette espèce est la plus riche en composés (47 constituants) parmi toutes les HEs étudiées.

De point de vu composition chimique, on remarque que certaines HEs sont riches en phénols (Thymol et/ou Carvacrol) comme les HE d'*O. glandulosum*, *T. lanceolatus*, *A. verticillata*, *T. capitata* et *L. multifida* (41,62%, 73,98% et 50,13%) du Thymol et (58,68% et 57,11%) du Carvacrol, respectivement. D'autres alcools monoterpéniques caractérisent certaines HEs comme le Linalol dans l'huile de *M. piperita* (51,59%) et *A. visnaga* (35,57%), le 1,8-Cinéole dans l'huile de *L. dentata* (36,72%) et le Terpinène-4-ol dans l'HE de *C. munbyi* (23,75%). Alors que les HEs de *R. eriocalyx*, *A. arborescens* et *D. graveolens* sont riches par d'autres types de terpènes tels que le Camphre (35,50%), le bêta-Thujone (47,58%) et l'acétate de Bornyle (56,16%), respectivement.

Tableau 6. Composition chimique des HEs étudiées.

#	Composé	Ira	IRp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ID
1	Santolinatriène	901	1018					0,70								RI, SM
2	isobutyrate d'isobutyle	902	1090	2,27												IR, SM
3	Tricylène	921	1020										0,68			IR, SM
4	<i>alpha</i> -Thujène	922	1023	1,55	0,33		5,22				0,33	1,02		2,07	0,64	IR, SM
5	<i>alpha</i> -Pinène	931	1022	1,90	1,04	0,90	1,86	0,88	4,86	0,64		0,74	11,68	1,07	1,03	IR, SM
6	2,4(10)-Thujadiène	942	1205				0,10									IR, SM
7	Camphène	943	1066				2,60	6,03	0,91			0,11	11,64	0,48		IR, SM
8	1-Octène-3-ol	959	1446							0,21		0,17		0,99		IR, SM
9	Octane-3-one	963	1253									0,13				IR, SM
10	Sabinène	964	1120	2,25		1,87	12,83		1,51		0,38					IR, SM
11	<i>bé</i> ta-Pinène	970	1110		0,11		0,81	1,19	13,89	0,24	0,51	0,19	2,77	0,54	1,37	IR, SM
12	Myrcène	979	1159		0,57	2,28				0,68	0,57	1,98	0,71	2,39		IR, SM
13	Déhydro-1,8-cinéole	979	1197				0,34	1,29								IR, SM
14	Isovalerate d'isobutyle	993	1175	3,23												IR, SM
15	<i>alpha</i> -Phellandrène	997	1164				0,10					0,26	0,26	0,54		IR, SM
16	2-Méthyle butyl isobutyrate	1004	1176	10,27												IR, SM
17	<i>delta</i> -3-Carène	1005	1147									0,10	0,48			IR, SM
18	<i>alpha</i> -Terpinène	1008	1178		0,13	0,64	0,25					2,76		1,54	0,84	IR, SM
19	<i>meta</i> -Cymène	1010	1269				17,30									IR, SM
20	<i>para</i> -Cymène	1011	1268	1,71	15,58		0,25			2,23		17,07	1,83	8,58	8,06	IR, SM
21	Limonène	1020	1199	1,80	15,02		0,26	0,58				0,58			0,51	IR, SM
22	1,8-Cinéole	1020	1209			0,51	0,23		36,72	0,91	5,57		15,31			IR, SM
23	<i>cis</i> - <i>bé</i> ta-Ocimène	1024	1230	1,59								0,11				IR, SM
24	<i>trans</i> - <i>bé</i> ta-Ocimène	1034	1247	1,78								0,13				IR, SM
25	<i>gamma</i> -Terpinène	1047	1243		6,63	1,14	1,54					27,03	0,35	5,67	5,16	IR, SM
26	<i>trans</i> -hydrate de Sabinène	1051	1451			1,75	5,62					0,17	0,11	1,80		IR, SM
27	Linalool oxyde	1057	1435				0,10		1,34		0,53					IR, SM
28	<i>alpha</i> -Thujone	1067	1395			1,44										IR, SM
29	Fenchone	1071	1401	3,78					0,83				0,32			IR, SM
30	Terpinolène	1078	1280		0,13	1,10	0,47			0,12		0,10	0,30			IR, SM
31	Linalool	1081	1544	35,57	0,11	0,80	0,15		3,11		51,59	0,66	0,30	0,57	1,08	IR, SM
32	Carène	1082	1541													IR, SM
33	<i>cis</i> -hydrate de Sabinène	1083	1345				4,00									IR, SM

34	<i>alpha</i> -Thujone	1089	1396				0,14													IR, SM			
35	2-Méthyle butyl isovalérate	1098	1274	14,14																IR, SM			
36	<i>béta</i> -Thujone	1103	1422				47,58	0,24												IR, SM			
37	Camphre	1123	1517				0,91	1,65											35,50	IR, SM			
38	<i>trans</i> -Pinocarvéol	1125	1651																5,76	IR, SM			
39	<i>cis</i> -Verbénol	1127	1655					1,51												IR, SM			
40	<i>trans</i> -Verbénol	1129	1676					0,55											2,02	IR, SM			
41	Pinocarvone	1136	1558																2,35	IR, SM			
42	<i>delta</i> -Terpinéol	1143	1658																1,53	IR, SM			
43	Bornéol	1148	1698				1,05	0,86	19,48										2,04	IR, SM			
44	Cryptone	1157	1667																2,30	IR, SM			
45	Terpinène-4-ol	1161	1600			0,18	3,26	23,75											0,96	IR, SM			
46	Myrtenal	1172	1628																4,12	IR, SM			
47	Estragole	1176	1670	4,49																IR, SM			
48	Myrténol	1177	1789					0,38											3,00	IR, SM			
49	<i>alpha</i> -Terpinéol	1179	1700			0,14	0,83	1,02											1,82	IR, SM			
50	Verbénone	1182	1707					0,25												IR, SM			
51	<i>Gamma</i> -Terpinéol	1183	1702					0,74												IR, SM			
52	<i>trans</i> -Carvéol	1196	1832					0,57											1,09	IR, SM			
53	Nérol	1208	1793																	IR, SM			
54	Thymyl-méthyl-oxyde	1215	1586																	0,24	IR, SM		
55	Cuminaldéhyde	1217	1782					0,72											1,14	0,40	IR, SM		
56	Carvone	1222	1739																1,17		IR, SM		
57	L'éther de méthyle du Carvacrol	1231	1603																	0,32	IR, SM		
58	Géraniol	1232	1844																		IR, SM		
59	Acétate de Linalyl	1240	1557					0,56												3,15	IR, SM		
60	Acétate de Liratyl	1256	1630					0,41												21,12	IR, SM		
61	<i>p</i> -Cymen-7-ol	1266	1690					1,47													IR, SM		
62	Thymol	1266	2189				50,13														IR, SM		
63	Acétate de Bornyle	1269	1515					0,40	56,16												IR, SM		
64	Bornyle Iso Acétate	1272	1581					0,41												0,33	IR, SM		
65	L'alcool périllylique	1276	2005																0,86		IR, SM		
66	Carvacrol	1278	2219			8,81	0,92	0,40												57,11	IR, SM		
67	Acétate de Terpinén-4-ol	1282	2250					0,30												2,15	58,68	4,19	IR, SM
68	Eugénol	1330	2171																		0,41		IR, SM
69	<i>alpha</i> - Acétate de Terpényle	1334	1695					2,63												0,14			IR, SM
70	Acétate de Néryle	1342	1725																		2,26		IR, SM

71	Méthyle eugénol	1367	2009				0,22					IR, SM
72	<i>alpha</i> -Ylangene	1375	1476						0,16			IR, SM
73	<i>gamma</i> -Caryophyllène	1407	1571			1,91				1,70		IR, SM
74	<i>alpha</i> -Ionone	1407	1848		0,13							IR, SM
75	Néryyl acétone	1410	1825						0,51			IR, SM
76	3-Buten-1-ol, 3-méthyle-, benzoate	1422	1979			0,88						IR, SM
77	<i>bé</i> ta-Caryophyllène	1424	1591				0,58	2,09	0,96		0,34	IR, SM
78	<i>bé</i> ta- Farnésène	1448	1661					0,13				IR, SM
79	<i>alpha</i> -Humulène	1456	1665						0,12			IR, SM
80	Germacrène D	1478	1710	13,85						0,10		IR, SM
81	<i>gamma</i> - Himachalène	1479	1693		0,10							IR, SM
82	<i>bé</i> ta-Bisabolène	1500	1720					25,17	0,14			IR, SM
83	<i>cis</i> -Calaménène	1512	1816		1,01							IR, SM
84	Cadinène D	1516	1725							0,30		IR, SM
85	<i>bé</i> ta-Sesquiphellandréne	1516	1765						0,57			IR, SM
86	<i>alpha</i> -Calocarene	1531	1895		0,11							IR, SM
87	Spathuléol	1560	2119					3,36				IR, SM
88	Oxyde de Caryophyllène	1576	1980		2,35	2,56		3,67	0,18	0,46	0,23	IR, SM
89	Viridiflorol	1591	2089		0,11							IR, SM
90	Caryophyllèn-4(14),8(15)-dièn-5 α -ol	1624	2155			1,06						IR, SM
91	T-Cadinol	1632	2169			0,93				0,20		IR, SM
92	<i>bé</i> ta-Eudesmol	1640	2230				0,81					IR, SM
93	<i>alpha</i> -Cadinol	1645	2231							0,94		IR, SM
94	Intermedéol	1647	2215				0,63					IR, SM
95	Cadaléne	1654	2203		0,12							IR, SM
96	<i>alpha</i> - Bisabolol	1672	2217							0,50		IR, SM
97	Chamazulene	1713	2410	13,39								IR, SM
98	Geranyl linalool	2026	2444	6,06								IR, SM

Totale identifié	15	14	18	47	14	24	17	11	28	28	16	15
Totale identifié (%)	92,39	98,91	94,22	96,80	94,28	94,72	98,57	92,88	99,44	90,76	92,58	98,55
Hydrocarbures monoterpéniques	12,58	39,54	6,79	43,59	9,38	21,17	3,91	1,79	24,81	30,70	22,88	17,61
Monoterpènes oxygénés	43,84	59,37	60,19	49,40	76,93	72,16	59,41	91,09	72,49	56,16	66,29	80,37
Phénylpropanoïdes	-	-	-	0,66	-	-	0,22	-	-	0,41	-	-
Hydrocarbures sesquiterpéniques	-	-	27,24	1,35	1,91	0,58	27,39	-	1,79	0,56	1,70	0,34
Sesquiterpènes oxygénés	-	-	-	2,46	5,18	0,81	7,03	-	0,18	2,94	-	0,23
Autres	29,91	-	-	-	0,88	-	0,21	-	0,17	-	0,99	-

Les résultats sont présentés en pourcentage (%) des composés de l'HE de (1) *A. visnaga*, (2) *A. verticillata*, (3) *A. arborescens*, (4) *C. munbyi*, (5) *D. graveolens*, (6) *L. dentata*, (7) *L. multifida*, (8) *M. piperita*, (9) *O. glandulosum*, (10) *R. eriocalyx*, (11) *T. capitata*, (12) *T. lanceolatus*. Les pourcentages et l'ordre d'élution des composés individuels sont donnés par rapport à la colonne apolaire. Les indices de rétention IR_p et IR_a sont donnés respectivement par rapport aux colonnes polaire (R_{tx}-Wax) et apolaire (R_{tx}-1). ID : l'identification des composés est faite par comparaison des indices de rétentions (IR) et les spectres de masse (SM).

Lorsqu'on compare la composition chimique des HEs des espèces étudiées avec celles rapportée dans la littérature (**Tableau 7**), on constate que la composition chimique est presque identique, c'est-à-dire on retrouve les mêmes composés majoritaires. Excepté, les HEs de *M. piperita* et *A. visnaga* qui ont d'autres composés majoritaires à savoir le Menthol et le Nérol au lieu du Linalol, respectivement.

Nous signalons, que la composition chimique des deux espèces endémiques *T. lanceolatus* et *C. munbyi* est rapporté pour la première fois dans cette étude.

Tableau 7. Composition chimique des HEs rapportée dans la littérature.

Espèces	Composé majoritaire*	%*	Composé majoritaire**	%**	Références
<i>Ammi visnaga</i>	Linalol	56,13	Nérol	29,98	(Gunaydin et Beyazit, 2004)
<i>Ammoides verticillata</i>	Thymol	56,13	Thymol	44,5	(Laouer et al., 2003)
<i>Artemisia arborescens</i>	béta-Thujone	47,58	béta-Thujone	20,5-55,9	(Militello et al., 2012)
<i>Dittrichia graveolens</i>	Acétate de Bornyle	56,16	Acétate de Bornyle	56,8	(Blanc et al., 2004)
<i>Lavandula dentata</i>	1,8-Cinéole	36,72	1,8-Cinéole	50,6	(Gamez et al., 1990)
<i>Lavandula multifida</i>	Carvacrol	57,11	Carvacrol	31,81	(Chograni et al., 2010)
<i>Mentha piperita</i>	Linalol	51,59	Menthol	27,5-42,3	(Iscan et al., 2002)
<i>Origanum glandulosum</i>	Thymol	41,62	Thymol	41,6	(Bendahou et al., 2008)
<i>Rosmarinus eriocalyx</i>	Camphre	35,5	Camphre	32,3-37,0	(Arnold et al., 1997)
<i>Thymbra capitata</i>	Carvacrol	58,68	Carvacrol	79	(Faleiro et al., 2005)

*: résultats de cette étude. **: résultats rapportés dans des travaux antérieurs. %: pourcentage du composé.

3. Effets des huiles essentielles envers *E. faecalis*

3.1. Souches d'*E. faecalis* cliniques

Soixante-cinq souches ont été identifiées par système API Strep BioMérieux® comme étant *E. faecalis*. Les résultats de l'antibiogramme des souches d'*E. faecalis* sont reportés dans l'**annexe 3**. D'après les phénotypes de résistances des souches, on remarque que toutes les souches d'*E. faecalis* isolées sont sensibles vis-à-vis de l'amoxicilline qui est parmi les antibiotiques le plus utilisés dans les traitements des différentes infections de la cavité buccale (**Pye et al., 2009**). Des résistances sont observées envers d'autres antibiotiques testés avec des taux relativement faibles, à savoir la vancomycine (7,69%), le chloramphénicol (9,23%), la tétracycline (13,84%), la ciprofloxacine (16,92%), la gentamicine (23,07%) et l'érythromycine (67,69%).

Ces résultats obtenus sont confirmés par les travaux de **Pinheiro et al. (2004)** qui ont étudiés la résistance des souches d'*E. faecalis* isolées des infections des racines dentaires. Ces auteurs ont trouvé un même taux de sensibilité de 100% vis-à-vis de l'amoxicilline et un taux de 28,5%, 95,2%, 85,7% et 80,9% vis-à-vis de l'érythromycine, le chloramphénicol, la tétracycline et la ciprofloxacine, respectivement ; par contre, aucune résistance envers la vancomycine n'a été signalée. Dans une autre étude réalisée par **Sedgley et al. (2004)** sur la résistance des souches d'entérocoques buccaux, notamment l'espèce *E. faecalis*, les auteurs ont constaté que leurs souches étaient sensibles vis-à-vis de l'ampicilline, la gentamicine et la vancomycine. Ils ont noté également de très faibles taux de résistance envers la tétracycline, le chloramphénicol et l'érythromycine.

Au vu de la sensibilité aux antibiotiques, *E. faecalis* et les entérocoques d'une façon générale ne présentent aucun problème d'échecs d'antibiothérapie dans les infections buccales. Cependant, *E. faecalis* est impliquée beaucoup plus dans les échecs de traitements effectués par les antiseptiques, notamment dans les traitements endodontiques (**Portenier et al., 2003**). C'est pour quoi ce présent travail s'oriente beaucoup plus sur les échecs endodontiques due à la résistance d'*E. faecalis* contre les antiseptiques utilisés en endodontie.

Pour les tests d'activité antimicrobienne, seulement cinq souches d'*E. faecalis* cliniques ont été utilisées à cause de leurs multi résistances (**Tableau 8**) et deux souches de référence (*E. faecalis* ATCC 29212 et *E. faecalis* ATCC 49452).

Tableau 8. Données sur les souches d'*E. faecalis* retenues.

Souches	Antibiotiques							Origine
	CN	C	VA	E	CIP	AX	TE	
1 (Ef7)	R	R	R	R	R	S	R	Parodontite apicale
2 (Ef18)	R	R	R	R	R	S	R	Parodontite apicale
3 (Ef27)	R	S	R	R	S	S	R	Cellulite cervicofacial
4 (Ef29)	R	R	R	R	S	S	R	Parodontite agressive
5 (Ef52)	R	R	R	S	S	S	R	Parodontite chronique
ATCC29212	S	S	S	S	S	S	S	
ATCC49452	S	S	S	S	S	S	S	

CN: gentamicine, C: chloramphénicol, VA: vancomycine, E: érythromycine, CIP: ciprofloxacine, AX: amoxicilline, TE: tétracycline. R: résistant. S: sensible.

3.2. Effets des huiles essentielles vis-à-vis d'*E. faecalis* à l'état planctonique

Les résultats de l'activité antimicrobienne des HEs envers *E. faecalis* à l'état planctonique (exprimée par zones d'inhibitions et par détermination des CMI) sont présentés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9. Effet inhibiteur des HEs étudiées vis-à-vis des souches d'*E. faecalis* à l'état planctonique. Exprimé par la méthode des zones d'inhibition (\emptyset en mm) et les concentrations minimales inhibitrices (CMI en % v/v).

Espèces		R ₁	R ₂	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5
<i>A. visnaga</i>	\emptyset	10 ± 1	11 ± 0	11 ± 1	11 ± 0	10 ± 1	11 ± 0	10 ± 1
	CMI	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000
<i>A. verticillata</i>	\emptyset	35 ± 1	34 ± 1	36 ± 1	35 ± 1	35 ± 2	35 ± 1	34 ± 1
	CMI	0,250 ± 0,000	0,208 ± 0,072	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,208 ± 0,072	0,250 ± 0,000
<i>A. arborescens</i>	\emptyset	10 ± 1	11 ± 0	11 ± 1	11 ± 1	10 ± 0	11 ± 1	11 ± 0
	CMI	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	3,333 ± 1,154	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000
<i>C. munbyi</i>	\emptyset	12 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	11 ± 1	13 ± 2	12 ± 1	12 ± 1
	CMI	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000
<i>D. graveolens</i>	\emptyset	12 ± 1	13 ± 1	13 ± 0	13 ± 1	13 ± 0	13 ± 1	12 ± 1
	CMI	4,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	4,000 ± 0,000	3,333 ± 0,154	4,000 ± 0,000
<i>L. dentata</i>	\emptyset	15 ± 0	16 ± 1	15 ± 1	16 ± 1	15 ± 1	16 ± 1	15 ± 1
	CMI	1,000 ± 0,000	0,833 ± 0,288	0,666 ± 0,288	0,500 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000
<i>L. multifida</i>	\emptyset	26 ± 1	26 ± 1	27 ± 1	27 ± 1	26 ± 1	26 ± 1	26 ± 1
	CMI	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,208 ± 0,072	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000	0,250 ± 0,000
<i>M. piperita</i>	\emptyset	9 ± 1	9 ± 0	10 ± 0	11 ± 1	10 ± 0	10 ± 1	9 ± 0
	CMI	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	1,666 ± 0,057	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000
<i>O. glandulosum</i>	\emptyset	28 ± 1	29 ± 1	29 ± 1	29 ± 1	28 ± 1	29 ± 1	28 ± 1
	CMI	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000	0,026 ± 0,009	0,026 ± 0,009	0,063 ± 0,000	0,032 ± 0,000	0,063 ± 0,000
<i>R. eriocalyx</i>	\emptyset	13 ± 1	13 ± 0	13 ± 1	13 ± 2	13 ± 0	13 ± 0	12 ± 1
	CMI	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	0,833 ± 0,288	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,333 ± 0,057
<i>T. capitata</i>	\emptyset	30 ± 1	31 ± 1	32 ± 1	32 ± 1	31 ± 1	31 ± 1	30 ± 1
	CMI	0,052 ± 0,018	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000	0,052 ± 0,018	0,063 ± 0,036	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000
<i>T. lanceolatus</i>	\emptyset	18 ± 1	19 ± 1	20 ± 2	19 ± 1	19 ± 1	20 ± 1	19 ± 1
	CMI	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000	0,063 ± 0,000

Tous les résultats présentés dans ce tableau sont ± écart-type de trois répétitions. R₁: *E. faecalis* ATCC 29212. R₂: *E. faecalis* ATCC 49452. Souches (1,2,3,4,5) sont des souches cliniques (voir Tableau 8).

Selon la méthode de diffusion sur gélose, certaines HEs ont présenté une très forte activité antimicrobienne contre *E. faecalis*, aussi bien vis-à-vis des souches cliniques (multi-résistantes) ou de référence (sensibles). L'espèce *A. verticillata* a montré les plus larges zones d'inhibition qui dépassent les 34 mm. D'autres HEs ont également formé des zones d'inhibitions significatives, notamment celles de *T. capitata* (30–32 mm), *O. glandulosum* (28–29 mm) et *L. multifida* (26–27 mm). Alors que le reste des HEs sont avérées moyennement actives avec des diamètres d'inhibition rapportés ente 10–20 mm.

L'activité antimicrobienne de nombreuse HEs étudiées vis-à-vis d'*E. faecalis* est très peu documenté. L'HE de *L. multifida* a révélé des zones d'inhibition variables entre 19,5–32 mm contre *E. faecalis* ATCC 29212 (**Benbelaïd et al., 2012**). Pour *M. piperita*, 5 µL de l'HE a donné des zones d'inhibition de 24 mm envers *E. faecalis* CIP 103907 (**Bassolé et al., 2010**).

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 vis-à-vis des 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 souches d'*E. faecalis* à l'état planctonique sont celles de *T. capitata*, *T. lanceolatus* et *O. glandulosum*, avec de très faibles CMI de l'ordre de 0,026 à 0,063%. D'autres HEs sont également actives

envers *E. faecalis*, notamment celles de *C. munbyi* (CMI 0,250%), *L. multifida* (CMIs entre 0,208–0,250%) et *A. verticillata* (CMIs entre 0,208–0,250%). Les HEs de *L. dentata* et *R. eriocalyx* ont montré des activités plus ou moins intéressantes avec des CMIs comprises entre 0,5–1% et entre 0,833–1,333%, respectivement. Alors que le reste des HEs sont avérées moins efficaces.

La littérature n'apporte aucune information sur les CMIs de plusieurs HEs vis-à-vis d'*E. faecalis*, notamment les huiles actives, c'est le cas des HEs de *T. capitata*, *O. glandulosum* et *A. verticillata*. Alors que pour l'HE de *L. multifida*, **Benbelaïd et al. (2012)** ont trouvé une CMI de 0,25% envers *E. faecalis* ATCC 29212. Cependant, la CMI de l'HE de *M. piperita* était de l'ordre de 0,83% vis-à-vis d'*E. faecalis* CIP 103907 (**Bassolé et al., 2010**).

L'analyse statistique, à l'aide d'un *t*-test de Student ($p < 0,05$) entre la sensibilité des souches cliniques (multi-résistantes) et la sensibilité des souches de référence (sensibles aux antibiotiques) envers les HEs étudiées, nous a permis de constater qu'il n'y a pas de différence significative entre la sensibilité des deux groupes. On peut dire, qu'à l'état planctonique, les HEs agissent de la même façon vis-à-vis de toutes les souches d'*E. faecalis*.

Concernant la relation entre l'activité antimicrobienne et la composition chimique des HEs, on constate que les HEs riches en phénols (Thymol et Carvacrol) sont les plus actives vis-à-vis des souches d'*E. faecalis*, à savoir les huiles d'*O. glandulosum*, *T. lanceolatus*, *A. verticillata*, *T. capitata* et *L. multifida*. En moins degré, les HEs riches par d'autres alcools monoterpéniques sont également très actives contre *E. faecalis*, notamment celles de *C. munbyi* qui est riche en Terpinène-4-ol et *L. dentata* constituée principalement par le 1,8-Cinéole.

D'après la littérature, on confirme que les HEs riches en phénols sont dotées d'une forte activité antimicrobienne. D'ailleurs, les HEs constituées principalement par le Thymol, le Carvacrol et l'Eugénol sont parmi les huiles les plus actives vis-à-vis des microorganismes (Botelho et al., 2007; Ahmad et al., 2011; Guarda et al., 2011). Les HEs riches par d'autres types de mono-terpènes oxygénés sont aussi pourvues d'une activité antimicrobienne intéressante contre les microorganismes. Par exemple le Terpinén-4-ol dans l'HE de *Melaleuca alternifolia* (Carson et Riley, 1995) et le 1,8-Cinéole dans l'huile d'*Eucalyptus globulus* (Cermelli et al., 2008).

Par conséquent, on peut dire que les résultats obtenus sont en concordance avec ceux des travaux antérieurs. On déduit également que l'activité antimicrobienne des HEs est potentiellement attribuée aux composés oxygénés. Le mode d'action antimicrobien de ces molécules est semblable les uns aux autres, où elles agissent de la même façon sur les membranes cytoplasmiques des microorganismes (Carson et al., 2002; Cristani et al., 2007). Néanmoins, la synergie, l'effet d'addition ou l'antagonisme entre les composés d'une HE donnée sont possibles. Lorsqu'on compare entre les HEs ayant le même pourcentage d'un composé actif avec une disparité antimicrobienne considérable entre eux, cela prouve que l'une des deux est pourvue d'une synergie entre ses composés, par contre la deuxième présente un effet d'addition ou un effet d'antagonisme. Par exemple, les HEs de *T. capitata* et *L. multifida* sont constituées presque par le même pourcentage du Carvacrol, 57,11% et 58,68%, respectivement. Alors qu'au niveau de l'activité antimicrobienne envers *E. faecalis*, l'HE de *T. capitata* est beaucoup plus active par rapport à celle de *L. multifida*. La même observation est remarquée entre les HEs d'*O. glandulosum* et *A. verticillata*. Donc, il est

clairement constaté que certaines HEs peuvent avoir de la synergie entre ses molécules, ce qui augmente significativement leur activité antimicrobienne.

L'effet synergique entre les principaux composés des HEs a été démontré dans certaines études. **Veras et al. (2012)** ont trouvé que l'HE de *Lippia sidoides* était plus active vis-à-vis des microorganismes que son composé majoritaire, le Thymol. Dans une autre étude, **Mulyaningsih et al. (2010)** ont constaté un bon effet de synergie entre les composés de l'HE d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis des bactéries multi-résistantes, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. Aussi, **Gallucci et al. (2009)** ont observé que les multiples combinaisons entre les terpènes étaient efficaces contre les microorganismes.

D'autre part, il est nécessaire de signaler d'après les résultats obtenus et les informations tirées de la bibliographie, 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**, le potentiel antimicrobien des HEs n'est pas spécifique, puisqu'elles agissent 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 vis-à-vis 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).

3.3. Effets des HEs vis-à-vis d'*E. faecalis* à l'état biofilm

Les résultats de l'activité antimicrobienne des CMIBs et CMEBs des HEs envers les souches d'*E. faecalis* à l'état biofilm sont présentés dans le **Tableau 10**.

D'après les résultats ci-dessous, on remarque bien que les CMIBs (concentration minimale inhibitrice du biofilm) sont plus ou moins grandes par rapport à celles des CMI. Comme à l'état planctonique, les huiles de *T. capitata*, *T. lanceolatus* et *O. glandulosum* sont les plus actives vis-à-vis des souches d'*E. faecalis* en biofilm. Ces HEs peuvent inhiber la croissance de ce microorganisme sous forme de biofilms avec des concentrations intéressantes, qui varient entre 0,38 et 0,75%. D'autres HEs sont également actives sur l'inhibition des biofilms d'*E. faecalis*, notamment les HEs d'*A. verticillata*, *C. munbyi* et *L. multifida*.

Tableau 10. Effet d'inhibiteur des HEs étudiées vis-à-vis des souches d'*E. faecalis* en état de biofilm. Exprimée par la concentration minimale inhibitrice du biofilm (CMIB en % v/v) et les concentrations minimales éradicatrice du biofilm (CMEB en % v/v).

Espèces		R ₁	R ₂	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5
<i>A. visnaga</i>	CMIB	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	12,0 ± 0,00	12,0 ± 0,00	6,00 ± 0,00	12,0 ± 0,00	6,00 ± 0,00
	CMEB	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	/	/	12,0 ± 0,00	/	12,0 ± 0,00
<i>A. verticillata</i>	CMIB	0,38 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00
	CMEB	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	2,00 ± 0,86	3,00 ± 0,00	1,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00	1,50 ± 0,00
<i>A. arborescens</i>	CMIB	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	/	/	12 ± 0,00	/	12,0 ± 0,00
	CMEB	12,0 ± 0,00	12,0 ± 0,00	/	/	/	/	/
<i>C. munbyi</i>	CMIB	0,38 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00
	CMEB	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	2,00 ± 0,86	3,00 ± 0,00	1,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
<i>D. graveolens</i>	CMIB	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
	CMEB	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	8,00 ± 3,46	12,0 ± 0,00	6,00 ± 0,00	12,0 ± 0,00	6,00 ± 0,00
<i>L. dentata</i>	CMIB	1,50 ± 0,00	1,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00	4,00 ± 1,73	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
	CMEB	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
<i>L. multifida</i>	CMIB	0,38 ± 0,00	0,50 ± 0,21	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00
	CMEB	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	2,00 ± 0,86	3,00 ± 0,00	2,50 ± 0,86	3,00 ± 0,00	1,50 ± 0,00
<i>M. piperita</i>	CMIB	1,50 ± 0,00	1,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
	CMEB	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
<i>O. glandulosum</i>	CMIB	0,38 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00
	CMEB	0,75 ± 0,00	0,63 ± 0,22	1,50 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,00 ± 0,43	1,50 ± 0,00	0,75 ± 0,00
<i>R. eriocalyx</i>	CMIB	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
	CMEB	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	/	/	12,0 ± 0,00	/	12,0 ± 0,00
<i>T. capitata</i>	CMIB	0,38 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00
	CMEB	0,625 ± 0,21	0,75 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,25 ± 0,43	1,50 ± 0,00	1,00 ± 0,43
<i>T. lanceolatus</i>	CMIB	0,38 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00
	CMEB	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,50 ± 0,00	0,75 ± 0,00	1,50 ± 0,00	0,75 ± 0,00

Tous les résultats présentés dans ce tableau sont ± écart-type de trois répétitions. R₁: *E. faecalis* ATCC 29212. R₂: *E. faecalis* ATCC 49452. Souches (1,2,3,4,5) sont des souches cliniques (voir Tableau 8)./ : non déterminée.

Quant aux CMEBs (concentration minimale éradicatrice du biofilm) des HEs étudiées, on remarque que les huiles d'*O. glandulosum*, *T. lanceolatus* et *T. capitata* sont toujours les plus actives. Ces HEs peuvent éradiquer les biofilm d'*E. faecalis* avec des concentrations très faibles et du coup intéressantes, qui ne dépassent pas 1,5%. D'autres HEs sont plus ou moins actives envers *E. faecalis* en biofilm, avec des CMEBs moyennes entre 0,75 et 3%, à savoir d'*A. verticillata*, *C. munbyi* et *L. multifida*.

On peut signaler de plus, que contrairement aux résultats précédents, les souches cliniques (multi résistantes) d'*E. faecalis* sous forme de biofilms sont plus ou moins résistantes vis-à-vis des HEs que les souches de référence (sensible aux antibiotiques). Ceci est confirmé par un *t*-test de Student ($p < 0,05$), par lequel on a constaté une différence significative entre les deux groupes. Cette légère résistance des souches cliniques est expliquée par le fait que le phénotype de formation des biofilms est beaucoup plus répandu chez les souches multi-résistantes que chez les souches sensibles (Sanchez et al., 2013). D'autre part, il est connu que la matrice extracellulaire du biofilm entrave l'efficacité de nombreux agents antimicrobiens (Davies, 2003). Par conséquent, on peut dire que les souches cliniques d'*E. faecalis* en biofilm ont été légèrement résistantes vis-à-vis les HEs probablement en raison de leur grande capacité de formation des biofilms.

Cependant, même si on a noté une légère résistance des souches cliniques d'*E. faecalis* en biofilm envers les HEs étudiées, ces agents antimicrobiens restent très actifs et intéressants, surtout celles d'*O. glandulosum*, *T. capitata*, *T. lanceolatus*, *C. munbyi*, *A. verticillata* et *L. multifida*.

4. Combinaison des huiles essentielles avec la CHX et le NaOCl

Vu que les HEs sont des substances irritantes à certaines concentrations (Tisserand, 2012), il est intéressant de chercher des techniques pour minimiser leur concentration lors d'un usage thérapeutique. La recherche des effets de synergie avec d'autre type d'agents antimicrobiens est parmi les solutions disponibles. Cet effet de synergie s'il existe va nous permettre de diminuer les concentrations effectives (CMI, CMIB et CMEB) des HEs par deux jusqu'à quatre fois.

Dans cette expérience, on a combiné les HEs les plus actives envers *E. faecalis* avec les antiseptiques les plus utilisés en traitement endodontiques. Six HEs ont été testées, à savoir celle d'*O. glandulosum*, *T. capitata*, *T. lanceolatus*, *C. munbyi*, *A. verticillata* et *L. multifida*. Les antiseptiques usuels utilisés dans cette étude de combinaison étaient la CHX et le NaOCl. Les résultats obtenus (Tableaux 11 et 12) sont traduits soit par des interactions positives (synergie) ou négatives (antagonisme), soit pas d'interaction entre l'HE et l'antiseptique ce qu'on appelle un effet d'addition.

Tableau 11. Résultats de la combinaison entre les HEs et la CHX vis-à-vis d'*E. faecalis* ATCC 29212.

Espèces	CMI combinée / CMI de HE seul	CFI de l'huile	CMI combinée / CMI de CHX seul	CFI de CHX	CFI	Interprétation
<i>Ammoides verticillata</i>	0,125/0,250	0,5	0,002/0,004	0,5	1	Effet d'addition
<i>Cistus munbyi</i>	0,125/0,250	0,5	0,002/0,004	0,5	1	Effet d'addition
<i>Lavandula multifida</i>	0,125/0,250	0,5	0,002/0,004	0,5	1	Effet d'addition
<i>Origanum glandulosum</i>	0,032/0,063	0,5	0,002/0,004	0,5	1	Effet d'addition
<i>Thymbra capitata</i>	0,032/0,063	0,5	0,002/0,004	0,5	1	Effet d'addition
<i>Thymus lanceolatus</i>	0,032/0,063	0,5	0,002/0,004	0,5	1	Effet d'addition

Tableau 12. Résultats de la combinaison entre les HEs et le NaOCl vis-à-vis d'*E. faecalis* ATCC 29212.

Espèces	CMI combinée / CMI de HE seul	CFI de l'huile	CMI combinée / CMI de NaOCl seul	CFI de NaOCl	CFI	Interprétation
<i>Ammoides verticillata</i>	0,125/0,250	0,5	0,016/0,032	0,5	1	Effet d'addition
<i>Cistus munbyi</i>	0,125/0,250	0,5	0,016/0,032	0,5	1	Effet d'addition
<i>Lavandula multifida</i>	0,125/0,250	0,5	0,016/0,032	0,5	1	Effet d'addition
<i>Origanum glandulosum</i>	0,032/0,063	0,5	0,016/0,032	0,5	1	Effet d'addition
<i>Thymbra capitata</i>	0,032/0,063	0,5	0,016/0,032	0,5	1	Effet d'addition
<i>Thymus lanceolatus</i>	0,032/0,063	0,5	0,016/0,032	0,5	1	Effet d'addition

D'après les résultats obtenus, toutes les HEs testées présentent juste l'effet d'addition entre les deux antiseptiques étudiés (CHX et NaOCl), avec des CFI égales à 1. Tandis qu'aucun effet de synergie ou d'antagonisme envers *E. faecalis* n'a été observé.

En fait, Il y a peu de travaux publiés sur l'effet de la combinaison entre des HEs et des antiseptiques utilisés dans l'hygiène et les traitements buccodentaires. Parmi les travaux recensés, on peut citer celui de **Karpanen et al. (2008)** qui ont combiné l'HE de *Melaleuca alternifolia*, de *Eucalyptus globulis* et le Thymol seul avec la CHX vis-à-vis de *Staphylococcus epidermidis*. Ils ont trouvé juste l'effet d'addition entre les agents antimicrobiens évalués. Tandis qu'aucune étude n'a été réalisée apparemment sur la combinaison entre les HEs et le NaOCl.

5. Evaluation des solutions d'irrigation préparées à base des huiles essentielles

Des solutions d'irrigation alternatives préparées à base des HEs ont été évaluées dans des expériences *in vitro* et *in vivo*. Les HEs sélectionnées pour la formulation de ces solutions étaient celles de *T. lanceolatus* et de *C. munbyi*. Le choix de ces deux HEs était en fonction de (i) leur originalité (endémiques et aucun travail publié sur ces deux espèces), (ii) leur teneur appréciables en HEs et (iii) de leur activité antimicrobienne très intéressante envers *E. faecalis*. En plus, on a utilisé une solution d'irrigation préparée à base l'HE de la Cannelle (*Cinnamomum cassia*) comme un témoin. Le choix de cette espèce est attribué à son potentiel antimicrobien fort (**Kavanaugh et Ribbeck, 2012**).

5.1. Évaluation *in vitro* vis-à-vis des biofilms d'*E. faecalis*

Cette expérience «*in vitro*» est une simulation de l'irrigation réalisée dans les traitements endodontiques. Le protocole consiste à la désinfection totale des tubes Eppendorf contaminés par des biofilms matures d'*E. faecalis* ATCC 29212, qui ressemblent à des racines dentaires infectées. Le traitement, proprement dit l'irrigation, est réalisé par remplissage de ces tubes Eppendorf par les solutions d'irrigation testées pendant des durées de temps déterminées. Les solutions évaluées dans cette expérimentation étaient les HEs, celles de *T. lanceolatus*, de *C. munbyi*, et l'huile de Cassia (témoin), préparées dans l'éthanol à 20% à trois concentrations (1,25, 0,63 et 0,31%), la CHX à 2% et le NaOCl à 2,5% comme des témoins positifs, tandis que l'eau physiologique stérile (saline) et l'éthanol à 20% sont testés comme des contrôles. Après irrigation, l'efficacité du traitement a été déterminée selon la réduction décimale des cellules viables (ufc) d'*E. faecalis* récupérées à partir des biofilms par sonication. On a utilisé la CHX et le NaOCl pour contrôler les essais car ils sont les antiseptiques les plus utilisés en traitements endodontiques.

Les résultats de cette expérience *in vitro* sont présentés dans **les Figures (13, 14 et 15)** ci-dessous. Les données sont analysées statiquement par un test d'ANOVA à deux facteurs avec répétition suivi par un test postérieur de Bonferroni.

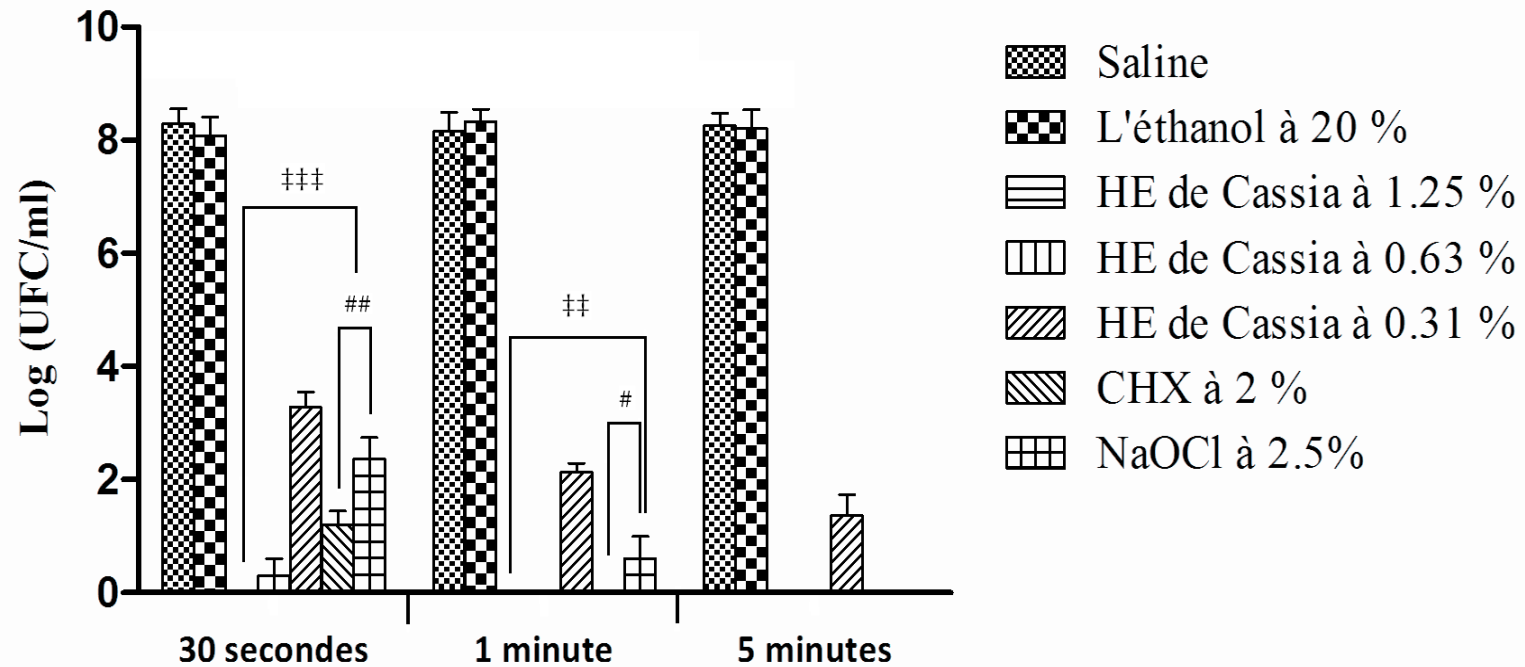


Figure 13. Réduction d'ufc d'*E. faecalis* par la solution d'irrigation à bas de l'HE de *C. cassia*. Les barres indiquent le nombre d'ufc d'*E. faecalis* récupérée à partir des biofilms mature après traitement par les solutions d'irrigation. Les résultats sont présentés étant que barre \pm écart-type de trois répétitions. D'après l'analyse statistique d'ANOVA suivi par un test postérieur de Bonferroni, il y a une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre toutes les solutions d'irrigation, l'huile, la CHX et le NaOCl, et l'eau physiologique (saline) dans la réduction d'ufc d'*E. faecalis*, seulement pour l'éthanol à 20% il y a pas de différence ($p > 0,05$) dans tous les temps du traitement. ### ($p < 0,001$) l'HE de Cassia à 1,25% est hautement significative plus performante vis-à-vis d'*E. faecalis* que la CHX et le NaOCl, notamment pendant 30 secondes d'irrigation. ## ($p < 0,01$) l'HE de Cassia à 1,25% est significativement plus performante envers *E. faecalis* que NaOCl pendant une minute de traitement. # ($p < 0,05$) la CHX à 2% est significativement plus puissante dans l'éradication d'*E. faecalis* que le NaOCl à 2,5%.

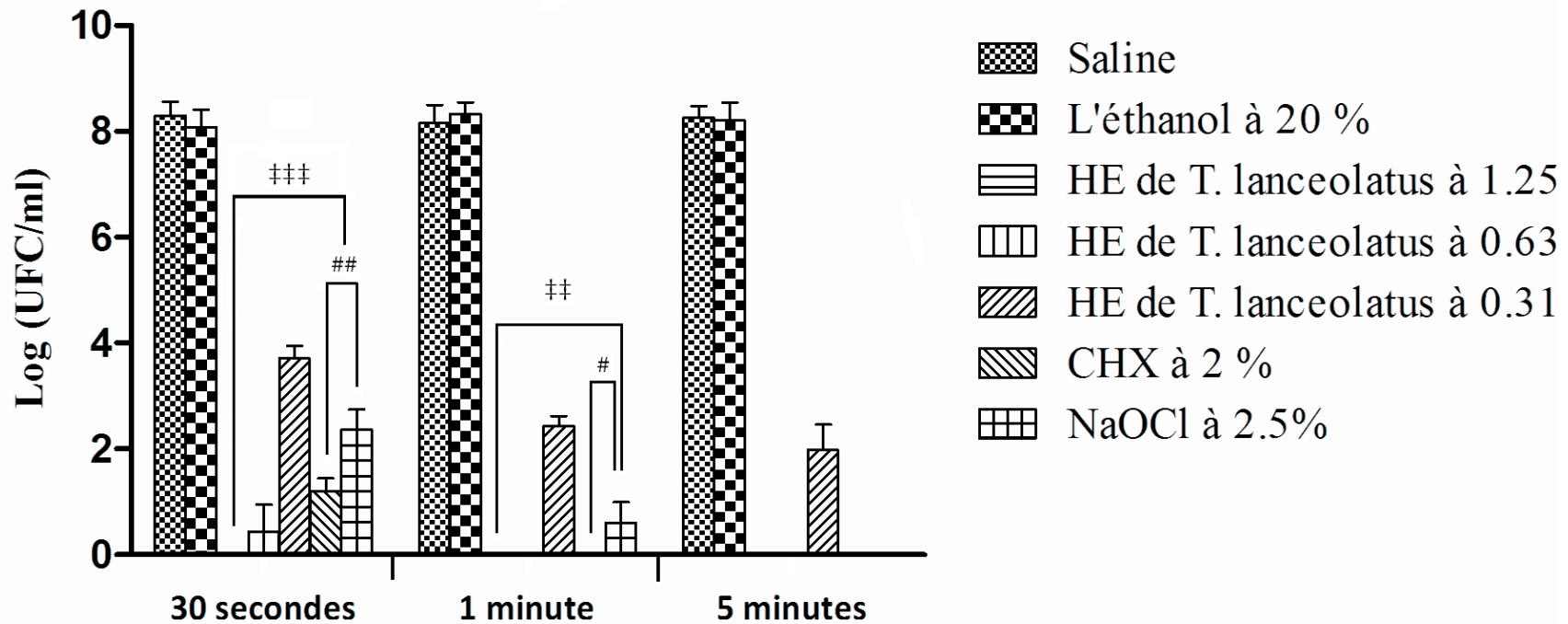


Figure 14. Réduction d'ufc d'*E. faecalis* par la solution d'irrigation à bas de l'HE de *T. lanceolatus*. Les barres indiquent le nombre d'ufc d'*E. faecalis* récupérées à partir des biofilms mature après traitement par les solutions d'irrigation. Les résultats sont présentés étant que barre \pm écart-type de trois répétitions. D'après l'analyse statistique d'ANOVA suivi par un test postérieur de Bonferroni, il y a une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre toute les solutions d'irrigation, l'huile, la CHX et le NaOCl, et l'eau physiologique (saline) dans la réduction d'ufc d'*E. faecalis*, seulement pour l'éthanol à 20% il y a pas différence ($p > 0,05$) dans tous les temps du traitement. ### ($p < 0,001$) l'HE de *T. lanceolatus* à 1,25% est hautement significative plus performante envers *E. faecalis* que la CHX et le NaOCl, notamment pendant 30 secondes d'irrigation. ## ($p < 0,01$) l'HE de *T. lanceolatus* à 1,25% est significativement plus performante vis-à-vis *E. faecalis* que NaOCl pendant une minute de traitement.

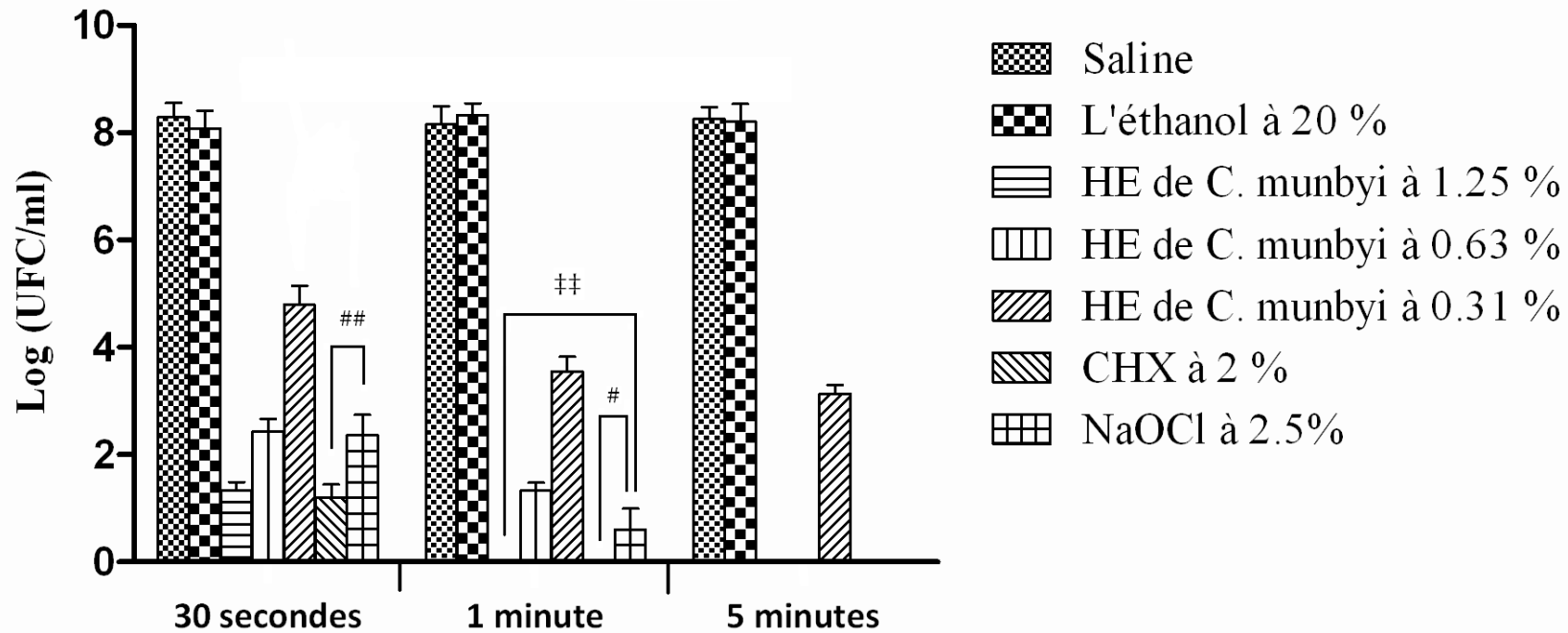


Figure 15. Réduction d'ufc d'*E. faecalis* par la solution d'irrigation à bas de l'HE de *C. munbyi*. Les barres indiquent le nombre d'ufc d'*E. faecalis* récupérées à partir des biofilms mature après traitement par les solutions d'irrigation. Les résultats sont présentés étant que barre \pm écart-type de trois répétitions. D'après l'analyse statistique d'ANOVA suivi par un test postérieur de Bonferroni, il y a une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre toutes les solutions d'irrigation, l'huile, la CHX et le NaOCl, et l'eau physiologique (saline) dans la réduction d'ufc d'*E. faecalis*, seulement pour l'éthanol à 20% il n'y a pas de différence ($p > 0,05$) dans tous les temps du traitement. Il y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre l'huile de *C. munbyi* à 1,25% et les antiseptiques CHX et NaOCl. ## ($p < 0,01$) l'HE de *C. munbyi* à 1,25% est significativement plus performante vis-à-vis *E. faecalis* que NaOCl pendant une minute de traitement.

D'après les résultats obtenus, on constate que toutes les solutions d'irrigation à base d'HEs ont réduit le nombre d'ufc d'*E. faecalis* dans les trois temps d'exposition par rapport à l'eau physiologique. Selon l'analyse statistique, les solutions préparées à base des HEs de *C. cassia* et de *T. lanceolatus* à 1,25% sont significativement ($p < 0,05$) plus efficace que la CHX à 2% et le NaOCl à 2,5%, notamment pendant 30 secondes du traitement, puisque elles ont totalement éradiqué toutes les cellules viables d'*E. faecalis* protégées dans des biofilms matures. Par contre, la solution à base de l'HE de *C. munbyi* était moins efficace ; son effet vis-à-vis d'*E. faecalis* en biofilms est semblable à celle de la CHX et du NaOCl, puisqu'il y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre la solution de *Cistus* à 1,25% et 0,63% d'une part, et la CHX à 2% et le NaOCl à 2,5% d'autre part.

Il convient de signaler que la CHX à 2% était significativement ($p < 0,05$) plus efficace que le NaOCl à 2,5% dans la réduction d'ufc d'*E. faecalis*. On a constaté également que l'éthanol à 20% n'a aucun effet antimicrobien contre les cellules *E. faecalis*, puisqu'il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) par rapport à l'eau physiologique pendant les trois temps de traitement.

Il y a peu de travaux qui ont abordé l'évaluation des métabolites secondaires issus de plantes comme des alternatifs dans les traitements endodontiques. Parmi ces études, on cite le travail de **Samadi et al. (2011)**, qui ont évalué l'effet de l'HE de *Satureja khuzistanica* diluée dans le DMSO envers *E. faecalis* par rapport à la CHX à 2% et le NaOCl à 2,5%. Ces auteurs ont trouvé que l'HE et les antiseptiques étaient efficaces sans différence significative. Mais il est à signaler que ces auteurs n'ont pas testé leur HE contre *E. faecalis* à l'état biofilm, le vrai état de son existence dans les

racines dentaires (Portenier et al., 2003). Dans une autre étude, Gupta et al. (2013) ont testé des extraits éthanoliques de *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* et *Cinnamomum zeylanicum* vis-à-vis d'*E. faecalis*, en comparaison avec le NaOCl à 3%. Ces auteurs ont trouvé que leurs extraits étaient moins actives comparativement au NaOCl. Ces chercheurs ont bien évalué leurs extraits par des techniques intéressantes vis-à-vis des biofilms d'*E. faecalis*. Par contre, ils ont trouvé des résultats modestes due à l'utilisation des extraits bruts.

Cependant dans cette étude, on a non seulement utilisé un métabolisme secondaire bien particulier et facile à valoriser, les HEs, mais également on a testé un protocole *in vitro* semblable à l'irrigation réalisée dans traitements endodontiques. La particularité du protocole c'est qu'on a testé les solutions désinfectantes envers les biofilms d'*E. faecalis*, pour mieux évalué les métabolites secondaires comme des futures solutions irrigations. Et comme était prévu, ces solutions alternatives ont montré une efficacité intéressante envers les biofilms d'*E. faecalis*, remarquablement supérieur à celle de la CHX et le NaOCl.

A l'état planctonique, les antiseptiques chimiques sont plus actifs envers *E. faecalis* par rapport aux HEs, notamment la CHX (Tableau 13). Par contre, à l'état biofilm on a constaté que les HEs sont avérées plus efficaces vis-à-vis d'*E. faecalis* que les antiseptiques chimiques.

Tableau 13. CMI des antimicrobiens étudiées.

Antiseptiques	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
<i>T. lanceolatus</i>	0,063±0,000
<i>C. munbyi</i>	0,250±0,000
<i>C. cassia</i>	0,031±0,000
NaOCl	0,031±0,000
CHX	0,004±0,000

Tous les résultats présentés dans ce tableau sont ± écart-type de trois répétitions.

La supériorité de l'activité antimicrobienne des HEs envers des bactéries en biofilms nécessite des explications particulières. En effet, ces agents antimicrobiens sont pourvus de certaines propriétés physicochimiques qui leur confèrent une efficacité contre les microorganismes en agrégats. Il est connu que les HEs sont des substances constituées par un mélange de molécules qui sont caractérisées essentiellement par leur poids moléculaire faible, leur volatilité et hydrophobicité (Sell, 2010). Ces propriétés peuvent être la cause qui donne aux HEs une certaine facilité dans la diffusion à travers la matrice extracellulaire du biofilm (EPS). Par conséquent, ces substances peuvent atteindre les cellules microbiennes protégées à l'intérieure. Contrairement, la résistance des microorganismes en biofilm vis-à-vis des antiseptiques chimiques est attribuée, soit à l'inhibition de leur accès, soit à la neutralisation de ces agents antimicrobiens par la matrice extracellulaire EPS (Brown et Gilbert, 1993). Notamment le poids moléculaire élevé de la CHX inhibe, même si d'une façon partielle, sa solubilité à travers l'EPS. Et que cette matrice extracellulaire EPS, peut également neutraliser les agents oxydants comme le cas du NaOCl, ce qui

influence sur son activité et il élargit le temps de son action (**Basrani et Haapasalo, 2012**).

5.2. Évaluation *in vivo* dans un traitement endodontique

Après qu'on a remarqué que les solutions d'irrigation préparées à base des HEs étaient remarquablement efficaces *in vitro*, on a décidé de les tester et confirmer ces résultats constatés dans un traitement endodontique réel. Cette expérience « *in vivo* » a été réalisée via le remplacement de l'antiseptique utilisé dans l'irrigation (le NaOCl à 2,5%) par les solutions préparées à base des HEs. L'irrigation par les solutions désinfectantes a été effectuée après nettoyage mécaniques des dents traitées. L'efficacité du traitement a été déterminée selon la réduction décimale des cellules viables de la flore aérobie totale et les entérocoques totaux. Les données tirées des résultats obtenus (**Figure 16 et 17**) sont analysées statistiquement par un test d'ANOVA à deux facteurs avec répétition suivi par un test postérieur de Bonferroni.

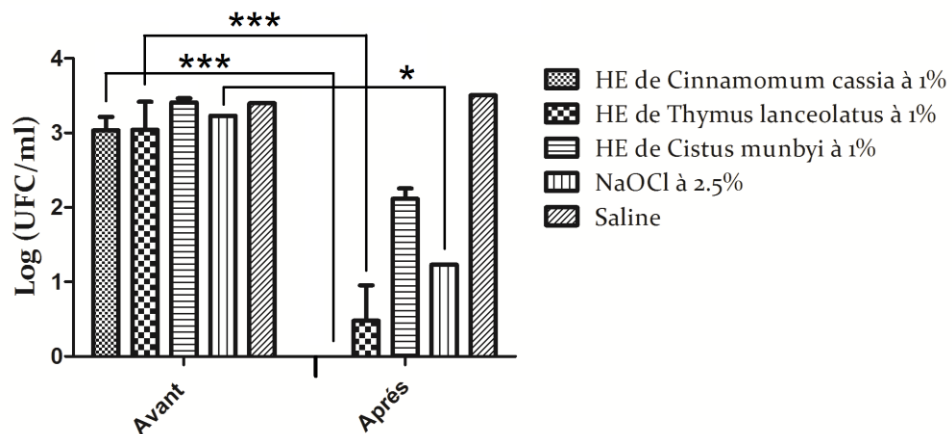


Figure 16. Effets des solutions d'irrigation sur la flore aérobie totale dans des traitements endodontiques. Les barres indiquent le nombre d'ufc par mL des bactéries aérobie récupérée à partir des racines dentaires infectées avant et après irrigation. Les résultats sont présentés étant que barre \pm écart-type de trois répétitions. D'après l'analyse statistique d'ANOVA suivie par un test postérieur de Bonferroni, il y a une différence hautement significative *** ($p < 0,001$) entre le nombre d'ufc récupérés après traitement par les HEs de *C. cassia* et *T. lanceolatus*, ce qui signifie l'efficacité de la désinfection de ces deux huiles, notamment cassia. Le NaOCl était aussi efficace, mais d'une façon nettement moins significative * ($p < 0,1$). Tandis que l'HE de *C. munbyi* et la solution saline étaient statistiquement inactives dans la réduction du nombre des germes de la flore totale.

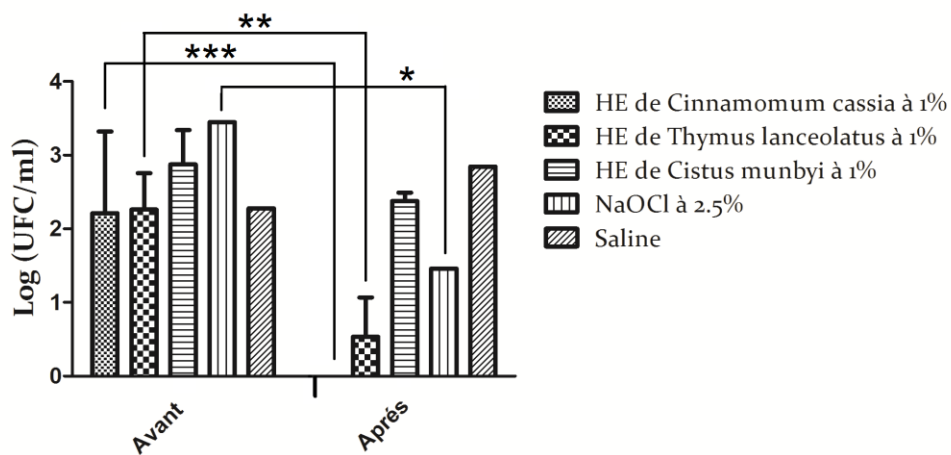


Figure 17. Effets des solutions d'irrigation sur le nombre des entérocoques totaux dans des traitements endodontiques. Les barres indiquent le nombre d'ufc par mL des entérocoques totaux récupérés à partir des racines dentaires infectées avant et après irrigation. Les résultats sont présentés étant que barre \pm écart-type de trois répétitions. D'après l'analyse statistique d'ANOVA suivi par un test postérieur de Bonferroni, il y a une différence hautement significative *** ($p < 0,001$) et ** ($p < 0,01$) entre le nombre d'ufc récupérés après traitement par les HEs de *C. cassia* et de *T. lanceolatus*, respectivement, ce qui signifie l'efficacité de la désinfection de ces deux huiles. Le NaOCl était plus ou moins actif * ($p < 0,1$) dans la réduction des entérocoques totaux. Alors que l'HE de *C. munbyi* n'était pas significativement active dans le traitement ($p > 0,5$).

Les résultats étaient très satisfaisants comme ceux obtenus dans l'expérience *in vitro*. L'HE de la cannelle à 1% était la plus active avec une éradication complète de la flore microbienne aérobie totale ainsi que les entérocoques totaux. Elle a dépassé les autres solutions, y compris le NaOCl à 2,5%. L'HE de *T. lanceolatus* à 1% était aussi significativement ($p < 0,01$) active dans la réduction du nombre des germes des racines dentaires infectées. Tandis que l'HE de *C. munbyi* à 1% n'a montrée aucune réduction d'ufc significative ($p > 0,5$). En outre, Il est constaté que le NaOCl présente une certaine activité envers les germes microbiens, plus ou moins significative ($p < 0,1$).

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ce travail était l'évaluation des HEs extraites des plantes locales vis-à-vis d'*E. faecalis*, l'agent étiologique responsable des infections endodontiques persistantes.

Douze plantes aromatiques, dont deux endémiques de l'Algérie, ont été retenues pour cette étude selon une enquête ethnobotanique préliminaire. Les espèces sélectionnées étaient *A. visnaga*, *A. verticillata*, *A. arborescens*, *D. graveolens*, *L. dentata*, *L. multifida*, *M. piperita*, *O. glandulosum* et *T. capitata*. Concernant les espèces endémiques sont *Cistus munbyi* et *Thymus lanceolatus*.

La majorité de plantes retenues ont donné de bons rendements en HEs variant de 0,3 à 1,93% (v/p MF). L'analyse chimique de leurs HEs par CG/Ir et CG/SM a révélé que ces huiles sont non seulement chimiquement variées, mais aussi de bonne qualité, c'est-à-dire riches en mono terpènes oxygénés comme les espèces *M. piperita* (91,09%), *T. lanceolatus* (80,37%), *D. graveolens* (76,93%), *O. glandulosum* (72,49%), *L. dentata* (72,16%) et *T. capitata* (66,29%), *A. arborescens* (60,19%), *A. verticillata* (59,37%), *A. visnaga* (43,84%). Les composés Linalol (51,59%), Thymol (73,98%), Thymol (41,62%), le 1,8-Cineole (36,72%), le Carvacrol (58,68%), le Thymol (50,13%), le *bêta*-Thujone (47,58%) et l'acétate de Bornyle (56,16%) sont les produits caractéristiques des HEs de ces espèces respectivement.

Soixante-cinq souches ont été identifiées par système API Strep BioMérieux® comme étant *E. faecalis* dont cinq souches multi résistantes. Quant aux résultats de l'antibiogramme, la majorité de ces souches sont avérées sensibles aux antibiotiques

avec de très faibles taux de résistances vis-à-vis de la vancomycine (7,69%), le chloramphénicol (9,23%), la tétracycline (13,84%), la ciprofloxacine (16,92%), la gentamicine (23,07%) et l'érythromycine (67,69%).

Selon la méthode de contact direct (méthode des disques), l'HE de l'espèce *A. verticillata* a exercé une bonne activité vis-à-vis d'*E. faecalis* avec des zones d'inhibition qui dépassent les 34mm. Le même résultat est obtenu pour les huiles de *T. capitata* (30–32 mm), *O. glandulosum* (28–29 mm) et *L. multifida* (26–27 mm).

L'évaluation des HEs étudiées envers *E. faecalis* dans son état planctonique et biofilm par la méthode de micro-dilution a montré que ce pathogène endodontique présente une sensibilité remarquable vis-à-vis des HEs testées. Les HEs les plus actives étaient celles d'*O. glandulosum*, *T. capitata*, *T. lanceolatus*, *C. munbyi*, *A. verticillata* et *L. multifida* avec des CMI, CMIB et CMEB intéressantes qui ne dépassent pas les 0,250%, 0,75%, 3%, respectivement. A l'état planctonique, les HEs agissent de la même façon vis-à-vis de toutes les souches d'*E. faecalis*. La sensibilité des souches aux huiles actives semble liée à la composition chimique des huiles notamment à la présence des phénols (Thymol et carvacrol) et alcools terpéniques (Terpinène-4-ol et 1,8-Cinéol).

La combinaison de six HEs avec les antiseptiques les plus utilisés en endodontie (la CHX et le NaOCl) envers *E. faecalis* ATCC 29121 a montré qu'il y a juste un effet d'addition avec des CFI égale à 1.

Des solutions d'irrigation, formulées à base des HEs de *T. lanceolatus* et de *C. munbyi*, ont été évaluées dans une expérience *in vitro* (simulant les traitements endodontiques) et *in vivo*. Concernant l'étude *In vitro*, la solution d'irrigation à base de

l'HE de *T. lanceolatus* à 1,25% s'est montré très efficace vis-à-vis des biofilms d'*E. faecalis* pendant 30 secondes de contact. Alors que la solution préparée à base de l'huile de *C. munbyi* a été moins efficace. Les mêmes résultats ont été confirmés *in vivo* en traitement endodontique chez onze patients au niveau de CHU de Tlemcen mais avec la dose à 1%.

En résumé, l'originalité de ce travail était la proposition des nouvelles solutions d'irrigation face aux problèmes des infections endodontiques persistantes. L'utilisation des formulations à base des HEs diluées dans l'éthanol présente une bonne alternative des antiseptiques chimiques utilisés actuellement, tels que la CHX et le NaOCl.

Vu les résultats obtenus, il serait très intéressant d'élargir l'examen *in vivo* sur un échantillon de patients plus représentatif afin de confirmer l'effet des HEs, de valoriser et de commercialiser des solutions à base d'HEs, telles que des bains de bouche et des solutions d'irrigation. Il serait aussi intéressant d'évaluer d'autres métabolites, synthétisés par les plantes, dans les traitements endodontique envers les anaérobies.

Références

Références

- Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I. et Dewhirst F.E. (2005). "Defining the normal bacterial flora of the oral cavity." *J. Clin. Microbiol.* 43(11): 5721-5732.
- Adams P.R. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Illinois, Allured Publishing Corporation.
- Agrios G.N. (2005). Plant Pathology. San Diego, Academic Press.
- Ahmad A., Khan A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L. et Manzoor N. (2011). "Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*." *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30(1): 41-50.
- Al-Jaber H.I., Al-Qudah M.A., Barhoumi L.M., Abaza I.F. et Afifi F.U. (2012). "Essential oil composition of the aerial parts of fresh and air-dried *Salvia palaestina* Benth. (Lamiaceae) growing wild in Jordan." *Nat. Prod. Res.* 26(13): 1179-1187.
- Alexander M. (2001). "Aromatherapy & immunity: How the use of essential oils aid immune potentiality Part 2 mood-immune correlations, stress and susceptibility to illness and how essential oil odorants raise this threshold." *Int. J. Arom.* 11(3): 152-156.
- Amorati R., Foti M.C. et Valgimigli L. (2013). "Antioxidant Activity of Essential Oils." *J. Agric. Food Chem.* 61(46): 10835-10847.
- Anderson M. (2001). "Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature." *Pediatr Dent* 24(5): 377-385.
- Andoğan B.C., Baydar H., Kaya S., Demirci M., Özbaşar D. et Mumcu E. (2002). "Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils." *Archives of Pharmacal Research* 25(6): 860-864.

- Arnold N., Valentini G., Bellomaria B. et Hocine L. (1997). "Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinalis* L. from other countries." J. Ess. Oil. Res. 9(2): 167-175.
- Axelsson P., Nyström B. et Lindhe J. (2004). "The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults." J. Clin. Periodontol. 31(9): 749-757.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008). "Biological effects of essential oils: a review." Food Chem. Toxicol. 46(2): 446-475.
- Basrani B. et Haapasalo M. (2012). "Update on endodontic irrigating solutions." Endod. Topics 27(1): 74-102.
- Bassolé I.H.N., Lamien-Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., Novak J., Nebié R.C. et Dicko M.H. (2010). "Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination." Molecules 15(11): 7825-7839.
- Benbelaïd F., Abdoune M., Khadir A. et Bendahou M. (2013). "Drying effect on yield and antimicrobial activity of essential oils." Int. J. Med. Aromat. Plants 3(1): 93-101.
- Benbelaïd F., Bendahou M., Khadir A., Abdoune M., Bellahsene C., Zenati F., Bouali W. et Abdelouahid D. (2012). "Antimicrobial activity of essential oil of *Lavandula multifida* L." J. Microbiol. Biotech. Res 2(2): 244-247.
- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.-M., Bernardini A.-F. et Costa J. (2008). "Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation." Food Chem. 106(1): 132-139.

- Bik E.M., Long C.D., Armitage G.C., Loomer P., Emerson J., Mongodin E.F., Nelson K.E., Gill S.R., Fraser-Liggett C.M. et Relman D.A. (2010). "Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals." *ISME. J.* 4(8): 962–974.
- Bischoff M., Bauer J., Preikschat P., Schwaiger K., Mölle G. et Hölzel C. (2012). "First Detection of the Antiseptic Resistance Gene *qac A/B* in *Enterococcus faecalis*." *Microbial. Drug Resistance* 18(1): 7–12.
- Blanc M.-C., Muselli A., Bradesi P. et Casanova J. (2004). "Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica." *Flavour Fragr. J.* 19(4): 314–314.
- Botelho M., Nogueira N., Bastos G., Fonseca S., Lemos T., Matos F., Montenegro D., Heukelbach J., Rao V. et Brito G. (2007). "Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40(3): 349–356.
- Bousmaha L., Boti J.B., Bekkara F.A., Castola V. et Casanova J. (2006). "Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria." *Flavour and fragrance journal* 21(2): 368–372.
- Brown M. et Gilbert P. (1993). "Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents." 74(22): 87–97.
- Brud W.S. (2010). *Industrial uses of essential oils. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.* Can Başer K. H. et Buchbauer G. Florida: USA, CRC Press: 843–853.
- Bruneton J. (1999). *Pharmacognosy.* Paris: France, Lavoisier.
- Burt S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review." *Int. J. Food Microbiol.* 94(3): 223–253.

- Carson C.F., Mee B.J. et 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." *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46(6): 1914-1920.
- Carson C.F. et Riley T.V. (1995). "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*." *J. Appl. Bacteriol.* 78(3): 264-269.
- Cermelli C., Fabio A., Fabio G. et Quaglio P. (2008). "Effect of Eucalyptus Essential Oil on Respiratory Bacteria and Viruses." *Curr. Microbiol.* 56(1): 89-92.
- Cheow W.S., Chang M.W. et Hadinoto K. (2011). "The roles of lipid in anti-biofilm efficacy of lipid-polymer hybrid nanoparticles encapsulating antibiotics." *Colloids Surf. A Physicochem Eng. Asp.* 389(1-3): 158-165.
- Chograni H., Zaouali Y., Rajeb C. et Boussaid M. (2010). "Essential Oil Variation among Natural Populations of *Lavandula multifida* L. (Lamiaceae)." *Chem. Biodivers.* 7(4): 933-942.
- Clsi (2006). "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically." *Clinical and Laboratory Standards Institute* 26(2).
- Coburn P.S. et Gilmore M.S. (2003). "The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells." *Cell. Microbiol.* 5(10): 661-669.
- Costerton J.W., Stewart P.S. et Greenberg E.P. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* 284(5418): 1318-1322.
- Cowan M.M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564-582.
- Cristani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A. et Trombetta D. (2007). "Interaction of four monoterpenes

- contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity." *J. Agric. Food Chem.* 55(15): 6300–6308.
- Dahlén G., Samuelsson W., Molander A. et Reit C. (2000). "Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal." *Oral Microbiology and Immunology* 15(5): 309–312.
- Daniel M. (2006). *Medicinal plants*. USA, Science publishers.
- Davies D. (2003). "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents." *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2(2): 114–122.
- Devriese L., Baele M. et Butaye P. (2006). *The Genus Enterococcus: Taxonomy. The Prokaryotes*. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.–H. et Stackebrandt E. New York: USA, Springer: 163–174.
- Distel J.W., Hatton J.F. et Gillespie M.J. (2002). "Biofilm formation in medicated root canals." *J. Endod.* 28(10): 689–693.
- Duggan J.M. et Sedgley C.M. (2007). "Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*." *J. Endod.* 33(7): 815–818.
- Dumani A., Yoldas O., Yilmaz S., Akcimen B., Seydaoglu G., Kipalev A. et Koksall F. (2012). "In vitro susceptibility of *e.faecalis* and *C.albicans* isolates from apical periodontitis to common antimicrobial agents, antibiotics and antifungal medicaments." *J. Clin. Exp. Dent.* 4(1): 1–7.
- Dunny G.M. (2013). "Enterococcal sex pheromones: signaling, social behavior, and evolution." *Annu. Rev. Genet.* 47: 457–482.
- Edris A.E. (2007). "Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review." *Phytother. Res.* 21(4): 308–323.

- El Ouariachi El M., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J.M., Costa J. et Paolini J. (2011). "Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco." *Food Chem Toxicol* 49(2): 533-536.
- Eltz T., Zimmermann Y., Haftmann J., Twele R., Francke W., Quezada-Euan J.J.G. et Lunau K. (2007). "Enfleurage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees." *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 274(1627): 2843-2848.
- Estrela C., Silva J.A., De Alencar A.H., Leles C.R. et Decurcio D.A. (2008). "Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: a systematic review." *J. Appl. Oral. Sci.* 16(6): 364-368.
- European-Pharmacopoeia (2005). Sainte Ruffine, Maissonneuve.
- Faleiro L., Miguel G., Gomes S., Costa L., Venâncio F., Teixeira A., Figueiredo A.C., Barroso J.G. et Pedro L.G. (2005). "Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L.(Cav.) and *Origanum vulgare* L." *J. Agric. Food Chem.* 53(21): 8162-8168.
- Faria G., Celes M.R., De Rossi A., Silva L.A., Silva J.S. et Rossi M.A. (2007). "Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured 1929 fibroblasts." *J. Endod.* 33(6): 715-722.
- Figiel A., Szumny A., Gutiérrez-Ortíz A. et Carbonell-Barrachina Á.A. (2010). "Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.) as affected by drying method." *J. Food. Eng.* 98(2): 240-247.
- Fisher K. et Phillips C. (2009). "The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*." *J. Appl. Microbiol.* 106(4): 1343-1349.

- Flemming H.-C. et Wingender J. (2010). "The biofilm matrix." *Nat. Rev. Microbiol.* 8(9): 623-633.
- Franz C. et Novak J. (2010). *Sources of Essential Oils. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.* Can Başer K. H. et Buchbauer G. Florida, CRC Press: 39-81.
- Gallucci M.N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygadlo J. et Demo M. (2009). "Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*." *Flavour Fragr. J.* 24(6): 348-354.
- Gamez M., Jimenez J., Navarro C. et Zarzuelo A. (1990). "Study of the essential oil of *Lavandula dentata* L." *Pharmazie* 45(1): 69-70.
- Gernhardt C.R., Eppendorf K., Kozłowski A. et Brandt M. (2004). "Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant." *Int. Endod. J.* 37(4): 272-280.
- Ghosn M.W., Chemali C.B., Zaknoun F.I. et Saliba N.A. (2006). "Chemical Profile of the *Dittrichia graveolens* (Desf.) Greuter Essential Oil of Lebanese Origin." *Journal of Essential Oil Research* 18(4): 443-444.
- Gill A.O. et Holley R.A. (2004). "Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*." *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10): 5750-5755.
- Gilmore S.M., Clewell B.D., Courvalin P., Dunny M.G., Murray E.B. et Rice B.L. (2002). *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance and Infection Control.* Washington: USA, ASM Press.

- Gomes B.P., Souza S.F., Ferraz C.C., Teixeira F.B., Zaia A.A., Valdrighi L. et Souza-Filho F.J. (2003). "Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro." *Int. Endod. J.* 36(4): 267-275.
- 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.
- Guarda A., Rubilar J.F., Miltz J. et Galotto M.J. (2011). "The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol." *Int. J. Food Microbiol.* 146(2): 144-150.
- Gunaydin K. et Beyazit N. (2004). "The chemical investigations on the ripe fruits of *Ammi visnaga* (Lam.) Lamarck growing in Turkey." *Nat. Prod. Res.* 18(2): 169-175.
- Gupta A., Duhan J., Tewari S., Sangwan P., Yadav A., Singh G., Juneja R. et Saini H. (2013). "Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: a preliminary study." *Int. Endod. J.*
- Haapasalo M., Endal U., Zandi H. et Coil J.M. (2005). "Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions." *10(1): 77-102.*
- Haapasalo M. et Shen Y. (2010). "Current therapeutic options for endodontic biofilms." *Endodontic Topics* 22(1): 79-98.
- Haapasalo M., Udnæs T. et Endal U. (2003). "Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment." *Endodontic Topics* 6(1): 29-56.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W. et Stoodley P. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2): 95-108.

- Harris R., Nicoll A.D., Adair P.M. et Pine C.M. (2004). "Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature." *Community dent. health* 21(1): 71-85.
- Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S. et Ciofu O. (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35(4): 322-332.
- Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T. et Maeda N. (2009). "Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development." *J. Dent. Res.* 88(11): 982-990.
- Howe G.A. et Jander G. (2008). "Plant immunity to insect herbivores." *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 41-66.
- Hubble T.S., Hatton J.F., Nallapareddy S.R., Murray B.E. et Gillespie M.J. (2003). "Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin." *Oral Microbiol. Immunol.* 18(2): 121-126.
- Huycke M.M., Abrams V. et Moore D.R. (2002). "*Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA." *Carcinog.* 23(3): 529-536.
- Huycke M.M., Moore D., Joyce W., Wise P., Shepard L., Kotake Y. et Gilmore M.S. (2001). "Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases." *Mol. Microbiol.* 42(3): 729-740.
- Iscan G., Kirimer N., Kurkcuoglu M., Baser K.H. et Demirci F. (2002). "Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils." *J. Agric. Food. Chem.* 50(14): 3943-3946.

- Johnson E.M., Flannagan S.E. et Sedgley C.M. (2006). "Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis." *J. Endod.* 32(10): 946–950.
- Kalemba D. et Kunicka A. (2003). "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." *Curr. Med. Chem.* 10(10): 813–829.
- Karpanen T.J., Worthington T., Hendry E.R., Conway B.R. et Lambert P.A. (2008). "Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*." *J. Antimicrob. Chemother.* 62(5): 1031–1036.
- Kato T., Iijima H., Ishihara K., Kaneko T., Hirai K., Naito Y. et Okuda K. (1990). "Antibacterial effects of Listerine on oral bacteria." *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 31(4): 301–307.
- Kavanaugh N.L. et Ribbeck K. (2012). "Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus aureus* biofilms." *Appl. Environ. Microbiol.* 78(11): 4057–4061.
- Kayaoglu G. et Orstavik D. (2004). "Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease." *Crit Rev Oral Biol Med* 15(5): 308–320.
- Khalfallah A., Labed A., Semra Z., Alkaki B., Kabouche A., Touzani R. et Kabouche Z. (2011). "Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Ammi visnaga* L.(Apiaceae) from Constantine, Algeria." *Int. J. Med. Arom. Plants* 1(3): 302–305.
- Kolenbrander P.E. (2000). "Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems 1." *Annual Rev. Microb.* 54(1): 413–437.

- Kotan R., Kordali S. et Cakir A. (2007). "Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes." *Z. Naturforsch. C.* 62(7-8): 507-513.
- Kouidhi B., Zmantar T., Mahdouani K., Hentati H. et Bakhrouf A. (2011). "Antibiotic resistance and adhesion properties of oral Enterococci associated to dental caries." *BMC Microbiol.* 11(1): 155-162.
- Kreth J., Zhang Y. et Herzberg M.C. (2008). "Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*." *J. Bacteriol.* 190(13): 4632-4640.
- Kwon J.A., Yu C.B. et Park H.D. (2003). "Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*." *Lett. Appl. Microbiol.* 37(1): 61-65.
- Lamont R.J. et Jenkinson H.F. (2010). *Oral Microbiology at a Glance*, Wiley-Blackwell.
- Laouer H., Zerroug M.M., Sahli F., Chaker A.N., Valentini G., Ferretti G., Grande M. et Anaya J. (2003). "Composition and antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. essential oil." *J. Ess. Oil. Res.* 15(2): 135-138.
- Lasfargue J.J., Mallet J.P. et Rousell T. (2001). *Parodontites apicales. La dent normale et pathologique.* Piette E. et Goldberg M. Paris: France, De Boeck: 137-152.
- Le-Blanc J.D. (2006). *The Genus Enterococcus: Medical Importance.* The prokaryotes. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. et Stackebrandt E. new York: USA, Springer: 175-204.
- Levy S.B. et Marshall B. (2004). "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses." *Nat. Med.* 10(12): 122-129.

- Lucchesi M.E., Chemat F. et Smadja J. (2004). "Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation." *J. Chromatogr A* 1043(2): 323-327.
- Ludwig W., Schleifer K.-H. et William W.B. (2009). Enterococcaceae. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. William W. B. Georgia: USA, Springer: 594-623.
- Marcotte H. et Lavoie M.C. (1998). "Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(1): 71-109.
- Marsh P.D. (2005). "Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style." *J. Clin. Periodontol.* 32: 7-15.
- Marsh P.D. et Devine D.A. (2011). "How is the development of dental biofilms influenced by the host?" *J. Clin. Periodontol.* 38(11): 28-35.
- Mendonça-Filho R.R. (2006). *Bioactive Phytocompounds: New Approaches in the Phytosciences. Modern Phytomedicine*. Ahmad I., Aqil F. et Owais M. Germany, WILEY-VCH Verlag.
- Miguel M.G., Falcato-Simões M., Figueiredo A.C., Barroso J.M.G., Pedro L.G. et Carvalho L.M. (2005). "Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils." *Journal. Food Lipids* 12(3): 181-197.
- Militello M., Carrubba A. et Blázquez M.A. (2012). "Artemisia arborescens L.: essential oil composition and effects of plant growth stage in some genotypes from Sicily." *Journal of Essential Oil Research* 24(3): 229-235.
- Mohamed J.A. et Huang D.B. (2007). "Biofilm formation by enterococci." *J. Med. Microbiol.* 56(12): 1581-1588.

- Moyler D.A. (1993). "Extraction of essential oils with carbon dioxide." *Flavour Fragr. J.* 8(5): 235-247.
- Mulyaningsih S., Sporer F., Zimmermann S., Reichling J. et Wink M. (2010). "Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens." *Phytomedicine* 17(13): 1061-1066.
- Nadell C.D., Drescher K., Wingreen N.S. et Bassler B.L. (2015). "Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms." *ISME J.*: 1-10.
- Nair P. (2006). "On the causes of persistent apical periodontitis: a review." *Int. Endod. J.* 39(4): 249-281.
- Nair P.N.R. (2004). "Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures." *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 15(6): 348-381.
- Nallapareddy S.R., Singh K.V., Sillanpää J., Garsin D.A., Höök M., Erlandsen S.L. et Murray B.E. (2006). "Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*." *J. Clin. Investig.* 116(10): 2799-2807.
- Nallapareddy S.R., Wenxiang H., Weinstock G.M. et Murray B.E. (2005). "Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island." *J. Bacteriol.* 187(16): 5709-5718.
- Niu C. et Gilbert E. (2004). "Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure." *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12): 6951-6956.
- 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." J. Med. Microbiol. 56(4): 519–523.
- Okoh O.O., Sadimenko A.P., Asekun O.T. et J. A.A. (2008). "The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L." Afr. J. Biotech. 7(10): 1500–1502.
- Ouhayoun J.P. (2003). "Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash." J. Clin. Periodontol. 5: 10–12.
- Pauli A. et Schilcher H. (2010). *In Vitro* Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Hüsnü C. B. K. et Gerhard B. New York: USA, Taylor & Francis.
- Paulsen I.T., Banerjee L., Myers G.S., Nelson K.E., Seshadri R., Read T.D., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill S.R., Heidelberg J.F., Tettelin H., Dodson R.J., Umayam L., Brinkac L., Beanan M., Daugherty S., Deboy R.T., Durkin S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., Vamathevan J., Tran B., Upton J., Hansen T., Shetty J., Khouri H., Utterback T., Radune D., Ketchum K.A., Dougherty B.A. et Fraser C.M. (2003). "Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*." Science 299(5615): 2071–2074.
- Petersen M., Hans J. et Matern U. (2010). Biosynthesis of Phenylpropanoids and Related Compounds. Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Wiley–Blackwell: 182–257.
- Pinheiro E., Gomes B., Drucker D., Zaia A., Ferraz C. et Souza-Filho F. (2004). "Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root

- filled teeth with periapical lesions." *International Endodontic Journal* 37(11): 756–763.
- Pommerville J. (2010). *Alcamo's Fundamentals of Microbiology*. Quebec: Canada Jones and Bartlett Publishers
- Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C. et Roura S.I. (2003). "Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard." *LWT –Food Sci. Technol.* 36(7): 679–684.
- Portenier I., Waltimo T.M.T. et Haapasalo M. (2003). "*Enterococcus faecalis*: the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease." *Endodontic Topics* 6(1): 135–159.
- Pye A., Lockhart D., Dawson M., Murray C. et Smith A. (2009). "A review of dental implants and infection." *Journal of Hospital Infection* 72(2): 104–110.
- Qin X., Singh K.V., Weinstock G.M. et Murray B.E. (2000). "Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence." *Infect. Immun.* 68(5): 2579–2586.
- Richards J.J. et Melander C. (2009). "Controlling bacterial biofilms." *Chem. biochem.* 10(14): 2287–2294.
- Ruberto G., Baratta M.T., Sari M. et Kaâbeche M. (2002). "Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf." *Flavour and Fragrance Journal* 17(4): 251–254.
- Salah R., Dar-Odeh N., Abu Hammad O. et Shehabi A.A. (2008). "Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental Diseases." *BMC Oral Health* 8(17): 1472–1479.

- Saleem M., Nazir M., Ali M.S., Hussain H., Lee Y.S., Riaz N. et Jabbar A. (2010). "Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates." *Nat. Prod. Rep.* 27(2): 238–254.
- Samadi N., Zaree R., Bakhtiar H., Salehnia A. et Azimi S. (2011). "Comparative antibacterial efficacy of endemic *Satureja Khuzistanica* Jamzad essential oil, Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate solutions as root canal irrigations." *Dent. Res. J.* 8(1): 28.
- Sanchez C.J., Mende K., Beckius M.L., Akers K.S., Romano D.R., Wenke J.C. et Murray C.K. (2013). "Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections." *BMC infectious diseases* 13(1): 47.
- Schaberg D.R., Culver D.H. et Gaynes R.P. (1991). "Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection." *Am. J. Med.* 91(3): 72–75.
- Schilder H. (1974). "Cleaning and shaping the root canal." *Dent. Clin. North. Am.* 18: 269–296.
- Schmidt E. (2010). Production of essential oils. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Can Başer K. H. et Buchbauer G. Florida, CRC Press: 83–119.
- Sedgley C., Lennan S. et Appelbe O. (2005). "Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo." *International endodontic journal* 38(10): 735–742.
- Sedgley C., Lennan S. et Clewell D. (2004). "Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci." *Oral microbiology and immunology* 19(2): 95–101.
- Sell C. (2010). Chemistry of Essential Oils. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Hüsnü C. B. K. et Gerhard B. New york: USA, Taylor & Francis: 121–150.

- Selwitz R.H., Ismail A.I. et Pitts N.B. (2007). "Dental caries." *The Lancet* 369(9555): 51-59.
- Shankar N., Lockett C.V., Baghdayan A.S., Drachenberg C., Gilmore M.S. et Johnson D.E. (2001). "Role of *Enterococcus faecalis* surface protein ESP in the pathogenesis of ascending urinary tract infection." *Infect. Immun.* 69(7): 4366-4372.
- Singh K.V., Nallapareddy S.R. et Murray B.E. (2007). "Importance of the ebp (endocarditis and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection." *J. Infect. Dis.* 195(11): 1671-1677.
- Skucaite N., Peciuliene V., Vitkauskiene A. et Machiulskiene V. (2010). "Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis." *J. Endod.* 36(10): 1611-1616.
- Smith A.J., Robertson D., Tang M.K., Jackson M.S., Mackenzie D. et Bagg J. (2003). "*Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data." *Br. Dent. J.* 195(12): 701-703.
- Sofowora A. (1982). *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*, John Wiley and sons LTD.
- Souto R. et Colombo A.P. (2008). "Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection." *Arch. Oral. Biol.* 53(2): 155-160.
- Stewart P.S. et Costerton J.W. (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." *Lancet* 358(9276): 135-138.
- 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." *J. Periodontol.* 78(7): 1218-1228.

- Stuart C.H., Schwartz S.A., Beeson T.J. et Owatz C.B. (2006). "*Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment." J. Endod. 32(2): 93-98.
- Subramani K., Jung R.E., Molenberg A. et Hammerle C. (2008). "Biofilm on dental implants: a review of the literature." Int. J. Oral Maxillofac. Implants 24(4): 616-626.
- Svensäter G., Chávez De Paz L. et Theilade E. (2010). The microbiology of the necrotic pulp Textbook of Endodontology. Bergenholtz G., Hørsted-Bindslev P. et Reit C. Singapore, Blackwell Publishing Ltd: 95-110.
- Taneja N., Khuddaier B., Biswal M. et Kobayashi N. (2006). "Drug resistance in enterococci." Drug resistance of enterococci: epidemiology and molecular mechanisms: 61-78.
- The-Plant-List. (2015).
- Thormar H. (2011). Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. New Delhi: India, John Wiley & Sons, Ltd.
- Tisserand R. (2012). Essential oil safety: a guide for health care professionals. London: Angleterre, Elsevier
- Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M.a.J., Cucarella C., Lamata M., Amorena B., Leiva J., Penadés J.R. et Lasa I. (2001). "The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation." Appl. Environ. Microbiol. 67(10): 4538-4545.
- Tremblay Y.D.N., Hathroubi S. et Jacques M. (2014). "Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique." Can. J. Vet. Res. 78(2): 110-116.
- Trope M., Delano E.O. et Ørstavik D. (1999). "Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment." J. Endod. 25(5): 345-350.

- Ultee A. et Smid E.J. (2001). "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*." Int. J. Food. Microbiol. 64(3): 373-378.
- Veras H.N., Rodrigues F.F., Colares A.V., Menezes I.R., Coutinho H.D., Botelho M.A. et Costa J.G. (2012). "Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol." Fitoterapia 83(3): 508-512.
- Vidana R., Sullivan Å., Billström H., Ahlquist M. et Lund B. (2011). "Enterococcus faecalis infection in root canals—host-derived or exogenous source?" Letters in applied microbiology 52(2): 109-115.
- Vitale R., Afeltra J. et Dannaoui E. (2005). Antifungal Combinations. Antifungal Agents. Ernst E. et Rogers P. D., Humana Press. 118: 143-152.
- Walsh C. (2003). Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. Washington: USA, American Society for Microbiology (ASM).
- Wiegand I., Hilpert K. et Hancock R.E.W. (2008). "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances." Nat. Protoc. 3(2): 163-175.
- Xiong X., Buekens P., Fraser W.D., Beck J. et Offenbacher S. (2006). "Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review." B. J. O. G. 113(2): 135-143.

Annexes

Annexe 1. Plantes étudiées

1. *Ammi visnaga*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Apiales

Famille: Apiaceae



Genre Espèce: *Ammi visnaga* (L.) Lam.

Ammi visnaga

Noms vernaculaires : *El-Khella, Swak al nebi.*

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et en polyphénols dont le Khellin, le Visnagin et le Visamiol.

Utilisations en médecine traditionnelle : Pathologies buccodentaires, contre les calculs urinaires et vésicaux, les tiges séchées sont utilisées comme un cure-dents, un traitement de vitiligo.

2. *Ammoides verticillata*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Apiales

Famille: Apiaceae

Genre Espèce: *Ammoides verticillata* Briq.



Ammoides verticillata

Noms vernaculaires : *El-Nounkha, El-Noukha.*

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et en polyphénols.

Utilisations en médecine traditionnelle : Pathologies buccodentaires, conte les toxi-infections alimentaires, diarrhées.

3. *Artemisia arborescens*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Asterales

Famille: Asteraceae

Genre Espèce: *Artemisia arborescens* (Vaill.) L.



Artemisia arborescens

Composition chimique : Riche en huiles essentielles.

Utilisations en médecine traditionnelle : Aromatisation de la bouche, Pathologies buccodentaires, infections urinaires, maux de tête.

4. *Cistus munbyi*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Violales

Famille: Cistaceae

Genre Espèce: *Cistus munbyi* Pomel



Noms vernaculaires : *Chebouba lfedia*.

Cistus munbyi

Composition chimique : Riche en huiles essentielles.

Utilisations en médecine traditionnelle : Aromatisation de la bouche, Pathologies buccodentaires, toxi-infections alimentaires.

5. *Dittrichia graveolens*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Asterales

Famille: Asteraceae

Genre Espèce: *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter



Noms vernaculaires : *Magramen*

Dittrichia graveolens

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et polyphénols.

Utilisations en médecine traditionnelle : Pathologies buccodentaires, plaies purulents, diurétique.

6. *Lavandula dentata*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Genre Espèce: *Lavandula dentata* L.



Noms vernaculaires : *Helhal, Izir, El-khozama*

Lavandula dentata

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et polyphénols.

Utilisations en médecine traditionnelle : Aromatisation de la bouche, calmant des nerfs, maux de tête.

7. *Lavandula multifida*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Genre Espèce: *Lavandula multifida* L.



Noms vernaculaires : *El- Kehila, Kamoun El-djmel.*

Lavandula multifida

Composition chimique : Riche en polyphénols.

Utilisations en médecine traditionnelle : Pathologies buccodentaires, troubles digestifs, diarrhées.

8. *Mentha × piperita*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Genre Espèce: *Mentha × piperita* L.



Noms vernaculaires : *Naânaâ leftour*.

Mentha piperita

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et polyphénols.

Utilisations en médecine traditionnelle : Aromatisation de la bouche, diurétique, troubles digestifs.

9. *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Genre Espèce: *Origanum vulgare* subsp.

glandulosum (Desf.) Ietsw



Origanum glandulosum

Noms vernaculaires : *Zaâtar lehmir, Zaâtar Lbarhouche.*

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et polyphénols.

Utilisations en médecine traditionnelle : Aromatisation de la bouche, contre la grippe, perdre de l'appétit.

10. *Rosmarinus eriocalyx*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae



Genre Espèce: *Rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr.

Rosmarinus eriocalyx

Noms vernaculaires : *Berkla, Iklil El-djbel, yazir El-djbel.*

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et en polyphénols.

Utilisations en médecine traditionnelle : Pathologies buccodentaires, diurétique, calmant des nerfs.

11. *Thymbra capitata*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae



Genre Espèce: *Thymbra capitata* (L.) Cav.

Thymbra capitata

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et en polyphénols.

Utilisations en médecine traditionnelle : Pathologies buccodentaires et digestives, diarrhées, plaies purulentes.

12. *Thymus lanceolatus*

Position systématique :

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicots

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Genre Espèce: *Thymus lanceolatus* Desf.



Thymus lanceolatus

Noms vernaculaires : *Zaâtar Terni.*

Composition chimique : Riche en huiles essentielles.

Utilisations en médecine traditionnelle : Pathologies buccodentaires, troubles digestives, diarrhées, plaies purulentes.

Annexe 2. Donnés sur les patients impliqués dans les expériences *in vivo*.

Patients no.	Sexe	Age	Traitement
1	Homme	60	Solution de cassia à 1%
2	Femme	21	Solution de cassia à 1%
3	Homme	48	Solution de cassia à 1%
4	Homme	26	Solution de Thym à 1%
5	Femme	24	Solution de Thym à 1%
6	Homme	25	Solution de Thym à 1%
7	Homme	21	Solution de Cistus à 1%
8	Homme	20	Solution de Cistus à 1%
9	Femme	37	Solution de Cistus à 1%
10	Homme	43	NaOCl à 2,5%
11	Femme	28	Témoin

Les solutions d'irrigation à base des HEs ont été préparées par la dilution de l'huile pure dans l'éthanol à une concentration finale de 20%.

Annexe 3. Phénotypes de résistance et origines des souches cliniques.

Souches	Antibiotiques							Origine
	CN	C	VA	E	CIP	AX	TE	
EF1	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
EF2	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite apicale
EF3	R	S	S	R	S	S	R	Parodontite apicale
EF4	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
EF5	S	S	S	R	S	S	S	Cellulite cervicofacial
EF6	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
<u>EF7*</u>	R	R	R	R	R	S	R	Parodontite apicale
EF8	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
EF9	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF10	R	S	S	R	R	S	S	Parodontite apicale
EF11	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite agressive
EF12	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
EF13	R	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF14	S	S	S	R	R	S	S	Parodontite apicale
EF15	R	R	S	R	R	S	S	Cellulite cervicofacial
EF16	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
EF17	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
<u>EF18*</u>	R	R	R	R	R	S	R	Parodontite apicale
EF19	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF20	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF21	S	S	S	S	R	S	S	Parodontite chronique
EF22	R	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF23	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique

EF24	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF25	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
EF26	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
<u>EF27*</u>	R	S	R	R	S	S	R	Cellulite cervicofacial
EF28	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
<u>EF29*</u>	R	R	R	R	S	S	R	Parodontite agressive
EF30	S	S	S	R	R	S	S	Parodontite chronique
EF31	S	S	S	R	R	S	S	Parodontite chronique
EF32	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF33	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF34	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF35	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite apicale
EF36	R	S	S	S	S	S	R	Parodontite chronique
EF37	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF38	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF39	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF40	S	S	S	S	S	S	R	Parodontite apicale
EF41	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF42	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF43	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF44	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
EF45	R	R	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF46	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite agressive
EF47	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique
EF48	S	S	S	R	S	S	R	Parodontite apicale
EF49	S	S	S	R	S	S	S	Cellulite cervicofacial
EF50	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale

EF51	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite apicale
EF52*	R	R	R	S	S	S	R	Parodontite chronique
EF53	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF54	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF55	R	S	S	R	R	S	S	Parodontite apicale
EF56	S	S	S	R	S	S	S	Cellulite cervicofacial
EF57	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite agressive
EF58	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite apicale
EF59	S	S	S	S	R	S	R	Parodontite apicale
EF60	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF61	R	S	S	R	S	S	S	Parodontite chronique
EF62	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF63	S	S	S	R	S	S	S	Parodontite apicale
EF64	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite apicale
EF65	S	S	S	S	S	S	S	Parodontite chronique



* : Souches retenues. CN: gentamicine, C: chloramphénicol, VA: vancomycine, E: érythromycine, CIP : ciprofloxacine, AX: amoxicilline, TE: tétracycline. R: résistant. S: sensible.

Publications



Document heading

Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state

Fethi Benbelaïd^a, Abdelmounaïm Khadir^a, Mohamed Amine Abdoune^a, Mourad Bendahou^a,  , Alain Muselli^b, Jean Costa^b

Open Access funded by Hainan Medical University

Under a Creative Commons license

 [Show more](#)

doi:10.12980/APJTB.4.2014C1203

[Get rights and content](#)

[Open Access](#)

ABSTRACT

Objective

To evaluate some essential oils in treatment of intractable oral infections, principally caused by biofilm of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), such as persistent endodontic infections in which their treatment exhibits a real challenge for dentists.

Methods

Ten chemically analyzed essential oils by gas chromatography-mass spectrometry were evaluated for antimicrobial activity against sensitive and resistant clinical strains of *E. faecalis* in both planktonic and biofilm state using two methods, disk diffusion and broth micro-dilution.

Results

Studied essential oils showed a good antimicrobial activity and high ability in *E. faecalis* biofilm eradication, whether for sensitive or multidrug-resistant strains, especially those of *Origanum glandulosum* and *Thymbra capitata* with interesting minimum inhibitory concentration, biofilm inhibitory concentration, and biofilm eradication concentration values which doesn't exceed 0.063%, 0.75%, and 1.5%, respectively.

Conclusions

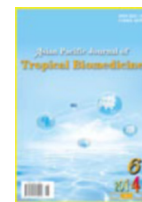
Findings of this study indicate that essential oils extracted from aromatic plants can be used in treatment of intractable oral infections, especially caused by biofilm of multidrug-resistant *E. faecalis*.

KEYWORDS

Bacterial infections; Biofilm; *Enterococcus faecalis*; Essential oils; Multidrug-resistance

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.apjtb.com



Document heading doi:10.12980/APJTB.4.2014C1203 © 2014 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. All rights reserved.

Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm stateFethi Benbelaïd¹, Abdelmounaïm Khadir¹, Mohamed Amine Abdoune¹, Mourad Bendahou^{1*}, Alain Muselli², Jean Costa²¹Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE), Aboubekr Belkaïd University, PO Box 119, 13000 Tlemcen, Algeria²Laboratory of Natural Products Chemistry, University of Corsica, UMR CNRS 6134, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France

PEER REVIEW

Peer reviewer

Malinee Pongsavee, Ph.D., Associate Professor, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus Patumthani 12121, Thailand.

Tel: 662–9869213 ext.7252

Fax: 662–5165379

E-mail: malineep@tu.ac.th

Comments

This study evaluated some EOs in treatment of intractable oral infections, principally caused by biofilm of multidrug-resistant *E. faecalis*. The results of this study is useful for *E. faecalis* infection treatment. The high yield and strong antimicrobial activity of three Algerian medicinal plants EOs used in eradication of MDR pathogens from oral ecosystem may contribute to the medical treatment for oral intractable infections caused by *E. faecalis*.

Details on Page 471

ABSTRACT

Objective: To evaluate some essential oils in treatment of intractable oral infections, principally caused by biofilm of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), such as persistent endodontic infections in which their treatment exhibits a real challenge for dentists.

Methods: Ten chemically analyzed essential oils by gas chromatography–mass spectrometry were evaluated for antimicrobial activity against sensitive and resistant clinical strains of *E. faecalis* in both planktonic and biofilm state using two methods, disk diffusion and broth micro-dilution.

Results: Studied essential oils showed a good antimicrobial activity and high ability in *E. faecalis* biofilm eradication, whether for sensitive or multidrug-resistant strains, especially those of *Origanum glandulosum* and *Thymbra capitata* with interesting minimum inhibitory concentration, biofilm inhibitory concentration, and biofilm eradication concentration values which doesn't exceed 0.063%, 0.75%, and 1.5%, respectively.

Conclusions: Findings of this study indicate that essential oils extracted from aromatic plants can be used in treatment of intractable oral infections, especially caused by biofilm of multidrug-resistant *E. faecalis*.

KEYWORDS

Bacterial infections, Biofilm, *Enterococcus faecalis*, Essential oils, Multidrug-resistance

1. Introduction

Enterococci are commensal Gram-positive bacteria that inhabit in oral cavity, gastrointestinal tract, and vagina of humans and animals[1]. These bacteria can cause a wide

variety of diseases in humans, especially, nosocomial infections and they now rank among the leading causative pathogens in the world[2]. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) is responsible for up to 90% of human enterococcal infections[3], its pathogenicity ranges from life threatening

*Corresponding author: Dr. Mourad Bendahou, Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature, Life, Earth and Universe, Aboubekr Belkaïd University, P.O. Box 119, 13000 Tlemcen, Algeria.

Tel: +21343211572

Fax: +21343286308

E-mail: bendahou63@yahoo.fr

Foundation Project: Supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of People's Democratic Republic of Algeria (Grant No. B05/N125).

Article history:

Received 13 Feb 2014

Received in revised form 20 Feb, 2nd revised form 25 Feb, 3rd revised form 3 Mar 2014

Accepted 12 Apr 2014

Available online 28 Jun 2014

diseases in compromised individuals to less severe conditions particularly due to many virulence factors[4]. Enterococci are multidrug-resistant (MDR) bacteria to most antimicrobial drugs used to treat human infections which exhibit a considerable therapeutic challenges[5].

In oral cavity, *E. faecalis* is not considered to be part of the normal oral microbiota[6]. *E. faecalis* is mainly responsible for several oral pathologies, particularly, dental caries[7], dental abscess[8], periodontal infections[9], apical periodontitis[10], and persistent endodontic infections, also known as post-treatment endodontic diseases, in which *E. faecalis* is the etiological causative agent and responsible for serious complications[11,12]. This can be explained by the fact that this bacterium possesses not only many virulence factors, but also an endogenous resistance to extreme ecological conditions and antimicrobials[8], allowing *E. faecalis* to tolerate harsh environmental conditions in some sites within oral cavity, especially in root canal[11].

The resistance of microorganisms to harsh conditions is due to biofilm formation[13], a complex of lifestyle that allowing bacteria displaying specific properties, including an increase in resistance to antibiotics and antiseptic chemicals[14]. In fact, formation of these sessile communities and their inherent resistance to biocides are the origin of many persistent and chronic bacterial infections[15]. In dental root canal, eradication of *E. faecalis* with chemo-mechanical preparations and using antiseptics is difficult[11]. Even the most used antiseptics in endodontic treatments, sodium hypochlorite and chlorhexidine showed low ability to eliminate *E. faecalis*[16].

The lack of strategies for *E. faecalis* biofilm elimination requires trying other substances except antiseptics and antibiotics, such as secondary metabolites of plants, especially, essential oils (EOs) one of the most important

bioactive substances in medicinal plants[17]. Possessing a good antimicrobial activity[18], EOs can replace treatments with antibiotics and disinfection using antiseptics. Furthermore, EOs have many interesting medicinal properties which can contribute to the treatment of intractable oral infections such as anti-inflammatory[19,20], anti-oxidant and stimulating the immune system response activities[21,22].

Treatment of oral infections by plant preparations, such as decoctions and infusions, is very popular among Arab peoples. Major reason of using those herbs extracts is their effectiveness and availability. In Algeria, many herbs especially from Lamiaceae family are widely used in treatment of oral diseases such as candidiasis, dental caries and periodontal diseases. Present principally in wild, species of thyme, lavender, oregano and rosemary are even applied by local population as antiseptics and for oral cavity aromatization because of their refreshing scent.

In the lack of studies that evaluate EOs as treatments of intractable oral infections, such as persistent endodontic infections, the aim of this study was to evaluate some Algerian EOs as natural antiseptics and antimicrobials against MDR *E. faecalis*, one of the principal oral pathogens, in both planktonic and biofilm state.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

We have selected ten medicinal plants for this study which are presented in Table 1. The choice of plant species is based on their use by the local population against oral infections, such as periodontal infections and dental caries. All species have been harvested from the region of

Table 1

Data on the studied plant material.

Scientific name	Family	Studied organs	Harvest station			Harvest date
			Name (Municipality)	Location	Altitude (m)	
<i>Ammi visnaga</i> (L.) Lam.	Apiaceae	Leaves, Stems, Flowers & Seeds	Bouhannak (Mansoura)	+34°88'19" -1°37'07"	711	Jul-11
<i>Ammoides verticillata</i> (Desf.) Briq.	Apiaceae	Leaves, Stems, Flowers & Seeds	Atar (Mansoura)	+34°88'51" -1°37'75"	980	Jul-11
<i>Artemisia arborescens</i> (Vaill.) L.	Asteraceae	Leaves, Stems & Flowers	Sidi Yahyia (Sidi Medjahed)	+34°46'45" -1°38'12"	380	Jul-11
<i>Dittrichia graveolens</i> (L.) Greuter	Asteraceae	Leaves, Stems & Flowers	Bouhannak (Mansoura)	+34°88'14" -1°36'38"	725	Aug-11
<i>Lavandula dentata</i> L.	Lamiaceae	Leaves, Stems & Flowers	Sidi Yahyia (Sidi Medjahed)	+34°88'14" -1°36'38"	580	Jul-11
<i>Lavandula multifida</i> L.	Lamiaceae	Leaves, Stems & Flowers	Bouhannak (Mansoura)	+34°88'51" -1°37'75"	700	Oct-11
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	Leaves, Stems & Flowers	Ouled charef (Maghnia)	+34°49'57" -1°42'4"	400	May-12
<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i> (Desf.) letsw.	Lamiaceae	Leaves, Stems & Flowers	Atar (Mansoura)	+34°88'51" -1°37'75"	980	Jun-11
<i>Rosmarinus eriocalyx</i> Jord. & Fourr.	Lamiaceae	Leaves, Stems & Flowers	Honaine	+34°88'14" -1°36'38"	100	Jun-11
<i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav.	Lamiaceae	Leaves, Stems & Flowers	El Koudia	+34°53'59" -1°21'55"	690	Jul-11

Tlemcen located in the northwestern Algeria, from Jun 2011 to May 2012, in the wild and others cultivated. Specimens of all species in this study were identified by Laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems, University of Tlemcen. All voucher specimens were deposited in our laboratory.

2.2. Obtaining EOs

For this purpose, we have used hydrodistillation with Clevenger-type apparatus of the fresh plant material, as recommended by Benbelaid *et al*[23]. Recovered EOs were dried using magnesium sulfate and stored in smoked vials at 4 °C until analysis.

2.3. EOs analysis with GC and GC/MS

Gas chromatography (GC) analysis was performed using a Perkin Elmer Autosystem GC-type chromatograph, equipped with two flame ionization detectors, for the detection of volatile compounds, one injector/splitter, and two polar (Rtx-Wax, polyethylene glycol) and nonpolar (Rtx-1, polydimethylsiloxane) columns (60 m×0.22 mm inner diameter, film thickness 0.25 µm). The carrier gas was helium (1 mL/min) with a column head pressure of 25 psi. The injector temperature was 250 °C and that of the detector was 280 °C. The temperature was programmed to increase from 60 to 230 °C at the rate of 2 °C/min, and then maintained constant for 45 min at a level of 230 °C. The injection was done by split mode with a split ratio of 1/50. The amount of EO injected was 0.2 µL. Quantification was made by direct electronic integration of peak areas.

For the gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS), analysis was performed using a Perkin Elmer Autosystem XL chromatograph, with an automatic injector and two polar (Rtx-Wax) and nonpolar (Rtx-1) columns (60 m×0.22 mm inner diameter, film thickness 0.25 µm), coupled with a Perkin Elmer TurboMass mass detector. The carrier gas was helium (1 mL/min) with a column head pressure of 25 psi. The injector temperature was 250 °C. The temperature was programmed to rise from 60 to 230 °C at the rate of 2 °C/min, and then kept constant for 35 min at a level of 230 °C. The injection was done by split mode with a split ratio of 1/80. The amount of EO injected was 0.2 µL. Detection was carried out by a quadrupole analyzer which consisted of an assembly of four parallel electrodes with cylindrical section. The source temperature was 150 °C. The device functioned in electron impact and fragmentation was performed at an electric field of 70 eV. The resulting mass spectra were acquired over the mass range of 35–350 Da.

To identify the constituents of the studied EOs, identification made by Kovats index was used, where the polar and nonpolar retention indices were calculated from

the retention times of a series of *n*-alkanes, and from databases of mass spectra, where the obtained mass spectra were compared with those of computerized libraries[24].

2.4. Microbial strains

Seven strains of *E. faecalis* have been selected for this study; two of them are American Type Culture Collection strains with codes ATCC 29212 and ATCC 49452 (sensitive to antibiotics), while the rest are multidrug-resistant strains, selected from a collection of clinical *E. faecalis* strains obtained from patients with various oral infections, including, apical periodontitis, chronic periodontitis, aggressive periodontitis, and cervicofacial cellulitis which are summarized in Table 2. Strain samples were taken in the service of stomatology at University Health Center of Tlemcen from December 2011 to June 2012. At the first time, samples were enriched in Roth broth (Conda Pronadisa™, Spain) at 37 °C for 18 h. Thus, positive culture was inoculated in bile esculin agar (Fluka®, Switzerland) and incubated at 37 °C for 24 h, in order to isolate pure colonies. After purification, all isolated strains of *E. faecalis* were firstly identified by conventional microbiological methods, while the final identification confirmation was carried out by API Strep® gallery (BioMérieux®, France). Finally, all *E. faecalis* strains were conserved in brain heart infusion broth (Conda Pronadisa™, Spain) with glycerol (Fluka®, France) (8:2,v/v) at –20 °C.

Table 2

Data on studied *E. faecalis* strains.

Strains	Origin	Antibiotics						
		GN	C	VA	E	CIP	AX	TE
1	Apical periodontitis	R	R	R	R	R	S	R
2	Apical periodontitis	R	R	R	R	R	S	R
3	Cervicofacial cellulitis	R	S	R	R	S	S	R
4	Aggressive periodontitis	R	R	R	R	S	S	R
5	Chronic periodontitis	R	R	R	S	S	S	R

GN: Gentamicin; C: Chloramphenicol; VA: Vancomycin; E: Erythromycin; CIP: Ciprofloxacin; AX: Amoxicillin; TE: Tetracycline. R: Resistant; S: Sensitive.

2.5. Antibigram

For selection of *E. faecalis* multidrug-resistant strains from clinical collection, we have performed an antibiogram according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations[25]. Antibiogram was determined with the following antimicrobial agent-containing disks: amoxicillin (25 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (15 µg), tetracycline (30 µg) and vancomycin (30 µg) (Oxoid®, England).

2.6. Antimicrobial assay

2.6.1. Inocula preparation

Previously identified and conserved strains were taken and

inoculated in Mueller–Hinton broth (Fluka®, India). After incubation at 37 °C for 24 h, suspensions were taken and shaken well using the vortex then diluted for standardizing. Inocula were set to 0.5 McFarland or an optical density from 0.08 to 0.13 at 625 nm wavelength, which corresponds to 10^8 CFU/mL[25].

2.6.2. Antimicrobial activity of EOs against planktonic *E. faecalis* strains

2.6.2.1. Disk diffusion method

We have used Kirby–Bauer's agar disk diffusion modified method[26], where antimicrobial activity of EOs against *E. faecalis* strains was evaluated in plates with Mueller–Hinton agar (Fluka®, India) pre-inoculated by swabbing of standardized microbial suspension at 10^8 CFU/mL. Whatman No. 3 paper disks impregnated with 10 µL of EO, were placed on the surface of agar, each disk has a 6 mm diameter. After incubation at 37 °C for 24 h, the results were read by measuring the diameter of inhibition zones in millimeters (mm) by vernier scale. All tests were performed in triplicate.

2.6.2.2. MIC determination

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of EOs were determined by modified broth micro-dilution method from Wiegand *et al.*[27]. Briefly, concentrations of each EO were prepared by 1/2 dilution series in Mueller–Hinton broth with 1% of Tween 80, starting from 40.00% to 0.08%. After that, 96-well microplate was filled by distributing 90 µL of 5×10^5 CFU/mL inoculum (prepared by 1/200 dilution of 10^8 CFU/mL inoculum) with 10 µL of each concentration. The final concentration of EOs in wells was ranging from 4% to 0.008%, and the final concentration of Tween 80 was 0.1% in each well. After 24 h incubation at 37 °C, the MIC was defined as the lowest concentration of EO inhibiting visible growth. In addition, two wells of every range of microplate were filled with inoculum and inoculum with 0.1% of Tween 80, and served as positive controls for each strain. All tests were performed in triplicate.

2.6.3. Antimicrobial activity of EOs against *E. faecalis* strains in biofilm

2.6.3.1. Biofilm inhibitory concentration

The biofilm inhibitory concentrations (BICs) of studied EOs against *E. faecalis* strains in biofilm case were determined as described by Nostro *et al.*[28] with modification. Firstly, 96-well microplate was filled by distributing 100 µL of inoculum at 10^8 CFU/mL in each well. After 24 h of incubation at 37 °C, medium was gently removed and all wells were washed three times with sterile phosphate buffered saline. In the same moment, ten concentrations of each EO were prepared by 1/2 dilution series in Mueller–Hinton broth with 3.33% of Tween 80, starting from 40.00% to 0.08%. After

removing of planktonic cells from microplate, all wells were filled with 70 µL of sterile Mueller–Hinton broth with 30 µL of each concentration, the final concentrations of EO in wells were ranging from 12% to 0.02%, and the final concentration of Tween 80 was about 1% in each well. Biofilm inhibitory concentration was determined after 24 h incubation at 37 °C, as the lowest concentration with no culture in well, visually determined and confirmed by no increase in optical density compared with the initial reading. Two ranges of wells for each microplate were filled with sterile Mueller–Hinton broth and serve as positive controls. All tests were performed in triplicate.

2.6.3.2. Biofilm eradication concentration

Biofilm eradication concentration (BEC) is the lowest concentration of EO that kills all viable cells of *E. faecalis* present and protected in biofilm. BEC was defined also as described by Nostro *et al.*[28] with modification. Protocol was continued in the same 96-well microplate used in determination of BIC, in the same day where the result of BIC was read. Supernatant fluid was gently removed and the wells were well washed three times with sterile phosphate buffered saline and one time with 20% sterile ethanol solution (Scharlau®, Spain) (in order to eliminate remaining traces of EOs). Then, microplate wells were filled with sterile tryptic soy agar (Conda Pronadia™, Spain) and incubated for 72 h at 37 °C. BEC was determined as the lowest concentration with no culture visually determined and confirmed by no increase in optical density compared with the initial reading. Positive control was performed to verify that 20% of ethanol has no effect on strains. All tests were performed in triplicate.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses used in this study have been carried out using Microsoft® Excel. Where, comparison between antimicrobial activity against reference and clinical strains was performed by Student *t*-test at 95% level ($P < 0.05$) in both planktonic and biofilm state.

3. Results

3.1. Chemical composition of studied EOs

Quantitative and qualitative analytical results of the studied EOs by GC and GC/MS are shown in Table 3. In which we notice variability in composition of EOs between studied plants. EOs of species which belong to Lamiaceae and Apiaceae family are mainly rich in oxygenated monoterpenes, especially alcohols, such as thymol, carvacrol, and linalool with a high percentage. *Thymbra*

Table 3

Chemical composition of studied EOs.

#	Component	nRI	pRI	Chemical composition (%)										ID				
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
1	Santolina triene	901	1018				0.70											RI, MS
2	Isobutyl isobutyrate	902	1090	2.27														RI, MS
3	Tricylene	921	1020									0.68						RI, MS
4	alpha-Thujene	922	1023	1.55	0.33					0.33	1.02		2.07					RI, MS
5	alpha-Pinene	931	1022	1.90	1.04	0.90	0.88	4.86	1.12		0.74	11.68	1.07					RI, MS
6	Camphene	943	1066				6.03	0.91			0.11	11.64	0.48					RI, MS
7	1-Octen-3-ol	959	1446						0.56		0.17		0.99					RI, MS
8	Octan-3-one	963	1253								0.13							RI, MS
9	Sabinene	964	1120	2.25		1.87		1.51		0.38								RI, MS
10	beta-Pinene	970	1110		0.11		1.19	13.89	0.42	0.51	0.19	2.77	0.54					RI, MS
11	Myrcene	979	1159		0.57	2.28				0.93	0.57	1.98	0.71	2.39				RI, MS
12	Dehydro-1,8-cineole	979	1197				1.29											RI, MS
13	Isobutyl isovalerate	993	1175	3.23														RI, MS
14	alpha-Phellandrene	997	1164								0.26	0.26	0.54					RI, MS
15	2-Methyl butyl isobutyrate	1004	1176	10.27														RI, MS
16	delta-3-Carene	1005	1147								0.1	0.48						RI, MS
17	alpha-Terpinene	1008	1178		0.13	0.64					2.76		1.54					RI, MS
18	para-Cymene	1011	1268	1.71	15.58				2.77		17.07	1.83	8.58					RI, MS
19	Limonene	1020	1199	1.80	15.02		0.58				0.58							RI, MS
20	1,8-Cineole	1020	1209			0.51		36.72	1.26	5.57		15.31						RI, MS
21	cis-beta-Ocimene	1024	1230	1.59							0.11							RI, MS
22	trans-beta-Ocimene	1034	1247	1.78							0.13							RI, MS
23	gamma-Terpinene	1047	1243		6.63	1.14					27.03	0.35	5.67					RI, MS
24	trans-Sabinene hydrate	1051	1451			1.75					0.17	0.11	1.80					RI, MS
25	Linalool oxide	1057	1435					1.34		0.53								RI, MS
26	alpha-Thujone	1067	1395			1.44												RI, MS
27	Fenchone	1071	1401	3.78				0.83				0.32						RI, MS
28	Terpinolene	1078	1280		0.13	1.10			0.56		0.10	0.30						RI, MS
29	Linalool	1081	1544	35.57	0.11	0.80		3.11		51.59	0.66	0.30	0.57					RI, MS
30	2-Methyl butyl isovalerate	1098	1274	14.14														RI, MS
31	beta-Thujone	1103	1422			47.58												RI, MS
32	Camphor	1123	1517			0.91						35.50						RI, MS
33	trans-Pinocarveol	1125	1651					5.76										RI, MS
34	trans-Verbenol	1129	1676					2.02										RI, MS
35	Pinocarvone	1136	1558					2.35										RI, MS
36	delta-Terpineol	1143	1658					1.53										RI, MS
37	Borneol	1148	1698			1.05	19.48	2.04			0.12	2.03	1.07					RI, MS
38	Cryptone	1157	1667					2.30										RI, MS
39	Terpinen-4-ol	1161	1600		0.18	3.26		0.96			0.11	2.11	5.16					RI, MS
40	Myrtenal	1172	1628					4.12										RI, MS
41	Estragole	1176	1670	4.49														RI, MS
42	Myrtenol	1177	1789					3										RI, MS
43	alpha-Terpineol	1179	1700		0.14	0.83		1.82	1.51	6.87	0.16	0.47						RI, MS
44	trans-Carveol	1196	1832					1.09										RI, MS
45	Cuminaldehyde	1217	1782					1.14										RI, MS
46	Carvone	1222	1739					1.17										RI, MS
47	Carvacrol methyl ether	1231	1603						0.84									RI, MS
48	Geraniol	1232	1844							3.15								RI, MS
49	Linalyl acetate	1240	1557							21.12								RI, MS
50	Thymol	1266	2189		50.13						41.62							RI, MS
51	Bornyl acetate	1269	1515				56.16					0.33						RI, MS
52	Perillyl alcohol	1276	2005					0.86										RI, MS
53	Carvacrol	1278	2219		8.81	0.92				57.75	2.15		58.68					RI, MS
54	Eugenol	1330	2171									0.41						RI, MS
55	alpha-Terpinyol acetate	1334	1695						0.15									RI, MS
56	Neryl acetate	1342	1725							2.26								RI, MS
57	Methyl eugenol	1367	2009							0.16								RI, MS

Results are in percentage (%) of components for EOs of (1) *A. visnaga*, (2) *A. verticillata*, (3) *A. arborescens*, (4) *D. graveolens*, (5) *L. dentata*, (6) *L. multifida*, (7) *M. piperita*, (8) *O. vulgare* subsp. *glandulosum*, (9) *R. eriocalyx*, and (10) *T. capitata*. Percentages and elution order of individual components are given on nonpolar column. Retention indices nRI and pRI are given respectively on nonpolar (Rtx-1) and polar (Rtx-Wax) columns. ID: identification method by comparison of RI and MS. RI: Retention indices; MS: Mass spectra.

Table 3, continued

Chemical composition of studied EOs.

#	Component	nRI	pRI	Chemical composition (%)										ID		
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
58	alpha-Ylangene	1375	1476											0.16		RI, MS
59	gamma-Caryophyllene	1407	1571				1.91								1.70	RI, MS
60	Neryl acetone	1410	1825											0.51		RI, MS
61	3-Buten-1-ol, 3-methyl-, benzoate	1422	1979				0.88									RI, MS
62	beta-Caryophyllene	1424	1591					0.58	1.86		0.96					RI, MS
63	beta-Farnesene	1448	1661						0.09							RI, MS
64	alpha-Humulene	1456	1665								0.12					RI, MS
65	Germacrene D	1478	1710			13.85							0.10			RI, MS
66	beta-Bisabolene	1500	1720						22.91		0.14					RI, MS
67	Cadinene D	1516	1725										0.30			RI, MS
68	beta-Sesquiphellandrene	1516	1765									0.57				RI, MS
69	Spathulenol	1560	2119						1.58							RI, MS
70	Caryophyllene oxide	1576	1980				2.56		1.24		0.18	0.46				RI, MS
71	Caryophyllen-4(14),8(15)-dien-5α-ol	1624	2155				1.06									RI, MS
72	T-Cadinol	1632	2169				0.93					0.20				RI, MS
73	beta-Eudesmol	1640	2230					0.81								RI, MS
74	alpha-Cadinol	1645	2231									0.94				RI, MS
75	Intermedeol	1647	2215				0.63									RI, MS
76	alpha-Bisabolol	1672	2217									0.50				RI, MS
77	Chamazulene	1713	2410			13.39										RI, MS
78	Geranyl linalool	2026	2444	6.06												RI, MS
	Yield (% v/w)			0.7	1.7	1.3	0.8	1.8	0.4	1.5	2.3	1.9	1.9			
	Total identified (%)			92.39	98.91	94.22	94.28	94.72	95.71	92.88	99.44	90.76	92.85			
	Monoterpene hydrocarbons			12.58	39.54	7.93	9.38	21.17	5.8	1.79	52.18	33.70	22.88			
	Oxygenated monoterpenes			39.35	59.37	59.05	76.93	72.16	62.07	91.09	44.99	56.76	67.28			
	Sesquiterpene hydrocarbons					27.24	5.53	0.58	24.86		1.79	0.56	1.70			
	Oxygenated sesquiterpenes						1.56	0.81	2.86		0.18	2.61				
	Others			40.46			0.88		0.16		0.30	0.41	0.99			

Results are in percentage (%) of components for EOs of (1) *A. visnaga*, (2) *A. verticillata*, (3) *A. arborescens*, (4) *D. graveolens*, (5) *L. dentata*, (6) *L. multifida*, (7) *M. piperita*, (8) *O. vulgare* subsp. *glandulosum*, (9) *R. eriocalyx*, and (10) *T. capitata*. Percentages and elution order of individual components are given on nonpolar column. Retention indices nRI and pRI are given respectively on nonpolar (Rtx-1) and polar (Rtx-Wax) columns. ID: identification method by comparison of RI and MS. RI: Retention indices; MS: Mass spectra.

Table 4

Inhibition effect of studied EOs against planktonic *E. faecalis* strains. Expressed by the diameter inhibition zones (IZ in mm) and minimum inhibitory concentration (MIC in % v/v) methods.

Species		R1	R2	Strain 1	Strain 2	Strain 3	Strain 4	Strain 5
<i>A. visnaga</i>	IZ	10±1	11±0	11±1	11±0	10±1	11±0	10±1
	MIC	4.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000	2.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000
<i>A. verticillata</i>	IZ	35±1	34±1	36±1	35±1	35±2	35±1	34±1
	MIC	0.250±0.000	0.208±0.072	0.250±0.000	0.250±0.000	0.250±0.000	0.208±0.072	0.250±0.000
<i>A. arborescens</i>	IZ	10±1	11±0	11±1	11±1	10±0	11±1	11±0
	MIC	4.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000	3.333±1.154	4.000±0.000	4.000±0.000	4.000±0.000
<i>D. graveolens</i>	IZ	12±1	13±1	13±0	13±1	13±0	13±1	12±1
	MIC	4.000±0.000	4.000±0.000	2.000±0.000	2.000±0.000	4.000±0.000	3.333±0.154	4.000±0.000
<i>L. dentata</i>	IZ	15±0	16±1	15±1	16±1	15±1	16±1	15±1
	MIC	1.000±0.000	0.833±0.288	0.666±0.288	0.500±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
<i>L. multifida</i>	IZ	26±1	26±1	27±1	27±1	26±1	26±1	26±1
	MIC	0.250±0.000	0.250±0.000	0.250±0.000	0.208±0.072	0.250±0.000	0.250±0.000	0.250±0.000
<i>M. piperita</i>	IZ	9±1	9±0	10±0	11±1	10±0	10±1	9±0
	MIC	2.000±0.000	2.000±0.000	2.000±0.000	1.666±0.057	2.000±0.000	2.000±0.000	2.000±0.000
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i>	IZ	28±1	29±1	29±1	29±1	28±1	29±1	28±1
	MIC	0.063±0.000	0.063±0.000	0.026±0.009	0.026±0.009	0.063±0.000	0.032±0.000	0.063±0.000
<i>R. eriocalyx</i>	IZ	13±1	13±0	13±1	13±2	13±0	13±0	12±1
	MIC	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	0.833±0.288	1.000±0.000	1.000±0.000	1.333±0.057
<i>T. capitata</i>	IZ	30±1	31±1	32±1	32±1	31±1	31±1	30±1
	MIC	0.052±0.018	0.063±0.000	0.063±0.000	0.052±0.018	0.063±0.036	0.063±0.000	0.063±0.000

All results are mean±SD of three repeats. R1: *E. faecalis* ATCC 29212; R2: *E. faecalis* ATCC 49452. -: not determined.

capitata (*T. capitata*) and *Lavandula multifida* (*L. multifida*) are constituted principally by carvacrol (58.68% and 57.75%, respectively), beta-bisabolene (22.91%) is the second major component in *L. multifida* EOs. Thymol followed by gamma-terpinene and para-cymene are the main constituents in EO of *Origanum glandulosum* (*O. glandulosum*) (41.62%, 27.03%, and 17.07%, respectively), and thymol followed by para-cymene and limonene in EO of *Ammoides verticillata* (*A. verticillata*) (50.13%, 15.58%, and 15.02%, respectively). Linalool and linalyl acetate (51.59% and 21.12%, respectively) are the major constituents of *Mentha piperita* (*M. piperita*). While the rest of studied EOs are constituted principally by non-alcoholic terpenes, such as beta-thujone (47.58%) in *Artemisia arborescens* (*A. arborescens*), bornyl acetate (56.16%) in *Dittrichia graveolens* (*D. graveolens*), 1,8-cineole (36.72%) in *Lavandula dentata* (*L. dentata*), and camphor (35.50%) in *Rosmarinus eriocalyx* (*R. eriocalyx*).

3.2. Antimicrobial activity of EOs against MDR *E. faecalis*

During sampling at the Service of Dentistry at University Health Center of Tlemcen, we have remarked that *E. faecalis* was responsible for several oral complications, especially,

apical periodontitis. Antibiogram results of *E. faecalis* strains have shown that almost all of these bacteria are multidrug-resistant to majority of antibiotics, especially vancomycin and gentamicin, only amoxicillin was effective on all these *E. faecalis* strains.

Antimicrobial activity evaluation of studied EOs against *E. faecalis* strains was very interesting, whether in planktonic or biofilm state. In planktonic, both methods, agar disk diffusion and MIC determination (Table 4), have shown that EOs of *T. capitata* and *O. glandulosum* were the most active, with inhibition zone larger than 27 mm and MIC less than 0.07% whether for susceptible or resistant strains. At less degree, *A. verticillata*, *L. multifida*, *L. dentata*, and *M. piperita* have a good antimicrobial activity on all strains, while the rest of EOs have shown a moderate activity.

In biofilm state (Table 5), both EOs of *T. capitata* and *O. glandulosum* were also the effective oils, which can inhibit biofilm growth of all *E. faecalis* strains at 0.75%, and can eradicate all viable microbial cells protected in biofilm at 1.50% only. Other EOs have shown an interesting antimicrobial activity against *E. faecalis* strains in biofilm, notably *A. verticillata* and *L. multifida* with their BECs range between 1.50% and 3.00%.

Table 5

Inhibition effect of studied EOs against strains of *E. faecalis* in biofilm. Expressed by biofilm inhibitory concentration (BIC in %v/v) and biofilm eradication concentration (BEC in %v/v) methods.

Species		R1	R2	Strain 1	Strain 2	Strain 3	Strain 4	Strain 5
<i>A. visnaga</i>	BIC	6.00±0.00	6.00±0.00	12.00±0.00	12.00±0.00	6.00±0.00	12.00±0.00	6.00±0.00
	BEC	6.00±0.00	6.00±0.00	–	–	12.00±0.00	–	12.00±0.00
<i>A. verticillata</i>	BIC	0.38±0.00	0.38±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00
	BEC	0.75±0.00	0.75±0.00	2.00±0.86	3.00±0.00	1.50±0.00	3.00±0.00	1.50±0.00
<i>A. arborescens</i>	BIC	6.00±0.00	6.00±0.00	–	–	12.00±0.00	–	12.00±0.00
	BEC	12.00±0.00	12.00±0.00	–	–	–	–	–
<i>D. graveolens</i>	BIC	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
	BEC	6.00±0.00	6.00±0.00	8.00±3.46	12.00±0.00	6.00±0.00	12.00±0.00	6.00±0.00
<i>L. dentata</i>	BIC	1.50±0.00	1.50±0.00	3.00±0.00	4.00±1.73	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00
	BEC	3.00±0.00	3.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
<i>L. multifida</i>	BIC	0.38±0.00	0.50±0.21	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00
	BEC	0.75±0.00	0.75±0.00	2.00±0.86	3.00±0.00	2.50±0.86	3.00±0.00	1.50±0.00
<i>M. piperita</i>	BIC	1.50±0.00	1.50±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00
	BEC	3.00±0.00	3.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	3.00±0.00
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i>	BIC	0.38±0.00	0.38±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00
	BEC	0.75±0.00	0.63±0.22	1.50±0.00	1.50±0.00	1.00±0.43	1.50±0.00	0.75±0.00
<i>R. eriocalyx</i>	BIC	3.00±0.00	3.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	3.00±0.00	6.00±0.00	3.00±0.00
	BEC	6.00±0.00	6.00±0.00	–	–	12.00±0.00	–	12.00±0.00
<i>T. capitata</i>	BIC	0.38±0.00	0.38±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00
	BEC	0.63±0.21	0.75±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.25±0.43	1.50±0.00	1.00±0.43

All results are mean±SD of three repeats. R1: *E. faecalis* ATCC 29212; R2: *E. faecalis* ATCC 49452. –: not determined.

4. Discussion

In the present study, we have evaluated some Algerian EOs against oral MDR *E. faecalis*. The choice of this species is based on many factors. Firstly, because of its multiple virulence factors[29], the presence of this Gram-positive bacterium in the oral cavity has, in fact, a relation with

several dental diseases, especially apical periodontitis[10]. In a research released by Salah *et al.*[30] all *E. faecalis* isolates in their study were recovered only from patients with dental diseases, especially necrotic pulps, while no *E. faecalis* strains were found in healthy patients. Secondly, *E. faecalis* is a nosocomial bacterium which can resist against many antibiotics[31], chemo-mechanical preparations, and

antiseptics, which represent a real challenge for dentists in some intractable infections, as seen in post-treatment endodontic diseases^[11]. Thirdly, *E. faecalis* has an ability to form biofilm which seems to be a key factor in many bacterial infections and resistance of microorganisms to disinfections^[13,32,33]. So, all these factors make *E. faecalis* as one of the major pathogens in the oral cavity, with a high risk of treatment failure because of its resistance to both antibiotics and antiseptics. Therefore, elimination of this harmful bacterium from oral ecosystem needs other solutions.

As alternative to antibiotics and antiseptics, we have tested some EOs against oral multidrug-resistant *E. faecalis*, especially in biofilm state, which is the real existence state of this harmful bacterium in the oral cavity, and the reason for its ability to survive under severe conditions causing pathogenesis during chronic infections. Antimicrobial activity evaluation of studied EOs against *E. faecalis* strains was very interesting, whether in planktonic or biofilm state. When we compare the ability to total *E. faecalis* eradication of studied EOs with well-used endodontic antiseptics, we find these EOs are competitive, especially in biofilm state. In study realized by Sena *et al.*^[34], it was found that chlorhexidine at 2% and NaOCl at 5.25% can eradicate *E. faecalis*, on condition when supplemented with mechanical agitation. While, some authors indicate that chlorhexidine and NaOCl show a low ability to eliminate *E. faecalis*^[16]. For example, Arias-Moliz *et al.*^[35] found that chlorhexidine at 4% did not eradicate *E. faecalis* biofilm. So, we conclude that studied EOs are good alternative antiseptic which can be used instead of chlorhexidine or NaOCl, especially against *E. faecalis* biofilm.

Comparison of the antimicrobial effect of studied EOs, using Student *t*-test at 95% confidence level ($P < 0.05$), between sensitive and resistant strains have shown no difference in activity at planktonic state. While in biofilm state, Student *t*-test at 95% confidence level ($P < 0.05$) show a significant difference between strains, where studied EOs were more effective against sensitive strains of *E. faecalis* than clinical ones. This could explain that biofilm formation was prevalent among isolates with MDR phenotype^[36], as well as the slow metabolic rate of microorganisms in biofilms^[37], and the extracellular matrix of the biofilm impede the effectiveness of many antimicrobials, which deters these agents to gain the protected cell inside^[38]. We concluded that MDR strains of *E. faecalis* were less sensitive to EOs mainly due to their high ability to biofilm formation. But even if there is a mild resistance of biofilm to EOs, these antimicrobial agents remained effective, especially those of *T. capitata* and *O. glandulosum*.

A huge number of studies that evaluate the antimicrobial activity of many EOs were published in recent years, from

which some authors concluded that antimicrobial activity of EOs was strongly correlated with the content of terpenoid phenols such as carvacrol, eugenol and thymol and some other oxygenated monoterpenes such as nerol, linalool, α -terpineol, fenchol and terpinen-4-ol^[18,39,40]. In this study, we have found the same remark, where chemical analyses of studied EOs showed that among the most active EOs against MDR *E. faecalis* strains, *O. glandulosum*, *T. capitata*, *L. multifida*, and *A. verticillata* EOs are constituted principally by terpenoid phenols, 41.62% thymol, 58.68% carvacrol, 57.75% carvacrol, and 50.13% thymol, respectively. While *M. piperita* was constituted principally by oxygenated monoterpenes, 51.59% linalool. In the other hand, synergetic effect between all major compounds of EOs was reported in some studies, where EO was more antimicrobially active than its major compound that was responsible for activity. For example, in study realized by Veras *et al.*^[41] they found that EO of *Lippia sidoides* was more effective against *Staphylococcus aureus* than thymol alone, its major compound. In addition, Mulyaningsih *et al.*^[42] found a good synergetic effect between compounds of *Eucalyptus globulus* EO against multidrug-resistant bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. As well as, multiple combinations between terpenes were effective against microorganisms^[43], the use of the entire EO as antiseptic in mouthwash seems to be better than use of those terpenes alone, in both antimicrobial activity and natural treatment.

In summary, the findings of this study indicate that EOs extracted from aromatic plants can be used in treatment of oral intractable infections caused by *E. faecalis*, especially persistent endodontic infections. Because of their high yield and strong antimicrobial activity in biofilm state, the activity of three Algerian medicinal plants *O. glandulosum*, *T. capitata* and *A. verticillata* as solution used in eradication of MDR pathogens from oral ecosystem seems to be very important in both medical and economical point of view.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

The Authors profusely thank Dr. Boumediene Medjahdi, Department of Agronomy and Forestry, Aboubekr Belkaïd University of Tlemcen, for botanical assistance. This work was financially supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of People's Democratic Republic of Algeria (Grant No. B05/N125).

Comments

Background

Enterococci are the commensal Gram-positive bacteria that inhabit in oral cavity, gastrointestinal tract and vagina of humans and animals. Enterococci are multidrug-resistant bacteria to most antimicrobial drugs used to treat human infections and they exhibit a considerable therapeutic challenges. *E. faecalis* is responsible for several oral pathologies, particularly, dental caries, dental abscess, periodontal infections etc. The secondary metabolites of plants, especially, EOs are one of the most important bioactive substances in medicinal plants. Possessing a good antimicrobial activity, EOs can replace treatments with antibiotics and disinfection using antiseptics.

Research frontiers

Ten medicinal plants were studied in this research. The choice of plant species was based on their use by the local population against oral infections, such as periodontal infections and dental caries. Seven strains of *E. faecalis* have been selected for this study; two of them were American Type Culture Collection strains with codes ATCC 29212 and ATCC 49452 (sensitive to antibiotics). While the rest were multidrug-resistant strains, selected from a collection of clinical *E. faecalis* strains obtained from patients with various oral infections, including apical periodontitis, chronic periodontitis, aggressive periodontitis, and cervicofacial cellulitis. Antimicrobial activity of EOs against planktonic *E. faecalis* strains assay and antimicrobial activity of EOs against *E. faecalis* strains in biofilm assay were done.

Related reports

E. faecalis is the etiological causative agent where it's responsible for serious complications. It is the fact that this bacterium possesses not only many virulence factors, but also an endogenous resistance to extreme ecological conditions and antimicrobials, allowing *E. faecalis* to tolerate harsh environmental conditions in some sites within oral cavity, especially in root canal. EOs have many interesting medicinal properties which can contribute to the treatment of intractable oral infections such as anti-inflammatory, anti-oxidant and stimulating the immune system response activities.

Innovations and breakthroughs

EOs extracted from aromatic plants in this study can be used in treatment of oral intractable infections caused by *E. faecalis*, especially persistent endodontic infections.

Applications

EOs are good alternative antiseptics which can be used

instead of chlorhexidine or NaOCl, especially against MDR *E. faecalis* biofilm. It might be applied to use in other virulence bacterial strains.

Peer review

This study evaluated some EOs in treatment of intractable oral infections, principally caused by biofilm of multidrug-resistant *E. faecalis*. The results of this study is useful for *E. faecalis* infection treatment. The high yield and strong antimicrobial activity of three Algerian medicinal plants EOs used in eradication of MDR pathogens from oral ecosystem may contribute to the medical treatment for oral intractable infections caused by *E. faecalis*.

References

- [1] Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci* 2012; **4**(1): 19–23.
- [2] Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical–surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; **21**(8): 510–515.
- [3] Teixeira LM, Merquior VLC. Enterococcus. In: De Filippis I, Mekeke ML, editors. *Molecular typing in bacterial infections*. New York: Humana Press; 2013, p. 17–26.
- [4] Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; **15**(5): 308–320.
- [5] Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multi-drug resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**(6): 555–562.
- [6] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(11): 5721–5732.
- [7] Kouidhi B, Zmantar T, Mahdouani K, Hentati H, Bakhrouf A. Antibiotic resistance and adhesion properties of oral *Enterococci* associated to dental caries. *BMC Microbiol* 2011; **11**(1): 155.
- [8] Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; **30**(5): 315–320.
- [9] Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol* 2008; **53**(2): 155–160.
- [10] Takahashi Y, Yoshida A, Nagayoshi M, Kitamura C, Nishihara T, Awano S, et al. Enumeration of viable *Enterococcus faecalis*, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 2011; **55**(12): 889–892.
- [11] Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*—the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *Endod Topics* 2003; **6**(1): 135–159.
- [12] Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GSP, Shen Y. Prevalence,

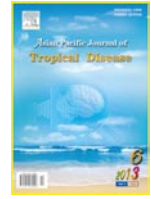
- phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod* 2010; **36**(12): 1950–1955.
- [13] George S, Kishen A, Song P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005; **31**(12): 867–872.
- [14] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**(4): 322–332.
- [15] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**(5418): 1318–1322.
- [16] Estrela C, Silva JA, De Alencar AH, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. *J Appl Oral Sci* 2008; **16**(6): 364–368.
- [17] Kalembe D, Matla M, Smętek A. Antimicrobial activities of essential oils. In: Patra AK, editor. *Dietary phytochemicals and microbes*. Germany: Springer; 2012, p. 157–183.
- [18] Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res* 2007; **21**(4): 308–323.
- [19] Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules* 2010; **15**(12): 9252–9287.
- [20] Mendes SS, Bomfim RR, Jesus HC, Alves PB, Blank AF, Estevam CS, et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J Ethnopharmacol* 2010; **129**(3): 391–397.
- [21] İnan Ö, Özcan MM, Al Juhaimi FY. Antioxidant effect of mint, laurel and myrtle leaves essential oils on pomegranate kernel, poppy, grape and linseed oils. *J Clean Prod* 2012; **27**: 151–154.
- [22] Alexander M. Aromatherapy & immunity: how the use of essential oils aid immune potentiality Part 2 mood-immune correlations, stress and susceptibility to illness and how essential oil odors raise this threshold. *Int J Aromather* 2001; **11**(3): 152–156.
- [23] Benbelaïd F, Abdoune MA, Khadir A, Bendahou M. Drying effect on yield and antimicrobial activity of essential oils. *Int J Med Aromat Plants* 2013; **3**(1): 93–101.
- [24] Adams PR. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation; 2007, p. 802.
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—ninth edition*. Pennsylvania, USA: CLSI; 2006.
- [26] Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods* 2010; **81**(2): 121–126.
- [27] Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008; **3**(2): 163–175.
- [28] Nostro A, Sudano Roccaro A, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 519–523.
- [29] Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF Jr, dos Santos KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 2011; **162**(2): 151–158.
- [30] Salah R, Dar-Odeh N, Abu Hammad O, Shehabi AA. Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental diseases. *BMC Oral Health* 2008; doi: 10.1186/1472-6831-8-17.
- [31] Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest* 2006; **116**(10): 2799–2807.
- [32] Crémet L, Corvec S, Bataud E, Auger M, Lopez I, Pagniez F, et al. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **75**(3): 252–255.
- [33] Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PØ, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011; **3**(2): 55–65.
- [34] Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006; **39**(11): 878–885.
- [35] Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrime and chlorhexidine. *J Endod* 2010; **36**(1): 87–90.
- [36] Sanchez CJ Jr, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* 2013; doi: 10.1186/1471-2334-13-47.
- [37] Chávez De Paz LE, Hamilton IR, Svensäter G. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. *Microbiology* 2008; **154**(7): 1927–1938.
- [38] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; **2**(2): 114–122.
- [39] Guarda A, Rubilar JF, Miltz J, Galotto MJ. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int J Food Microbiol* 2011; **146**(2): 144–150.
- [40] Kotan R, Kordali S, Cakir A. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z Naturforsch C* 2007; **62**(7–8): 507–513.
- [41] Veras HN, Rodrigues FF, Colares AV, Menezes IR, Coutinho HD, Botelho MA, et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia* 2012; **83**(3): 508–512.
- [42] Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine* 2010; **17**(13): 1061–1066.
- [43] Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J, et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J* 2009; **24**(6): 348–354.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtd



Document heading

doi: 10.1016/S2222-1808(13)60100-0

© 2013 by the Asian Pacific Journal of Tropical Disease. All rights reserved.

Phytochemical screening and *in vitro* antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. from Algeria

Fethi Benbelaid*, Abdelmounaïm Khadir, Mohamed Amine Abdoune, Mourad Bendahou

Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment, Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature, Life, Earth and Universe, Aboubekr Belkaïd University of Tlemcen, Algeria

PEER REVIEW

Peer reviewer

Dr. Ahmed Elhaitoum, Associate Professor, Department of Agronomy and Forestry, Aboubekr Belkaïd University of Tlemcen.
Tel: +21 3664 866501
E-mail: HAITOUM55DZ2001@yahoo.fr

Comments

This is a good and an original study in which authors have valorised *T. lanceolatus*, an endemic medicinal plant from Algeria, for antimicrobial activity against pathogens responsible for many human diseases. The findings of this study are interesting, where authors report that *T. lanceolatus* contains some phytochemicals which provided a strong antimicrobial activity.

Details on Page 458

ABSTRACT

Objective: To investigate the antimicrobial activity of an endemic *Thyme*, *Thymus lanceolatus* (*T. lanceolatus*), against a large number of pathogens.

Methods: Four solvent extracts were evaluated for antimicrobial activity using disc diffusion method and MIC determination on twenty-one strains.

Results: *T. lanceolatus* extracts showed a broad-spectrum antimicrobial activity, especially ethanol extract with inhibition zone diameters ranging from 14 to 32 mm, and MIC values from 0.052 to 0.500 mg/mL. Chloroform extract was more active against Gram-positive bacteria, since it has an inhibitory potency on *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* at only 31 µg/mL. While, hexane and water extracts were less effective since they were inactive against several strains.

Conclusions: The findings of this study indicate that *T. lanceolatus* has a strong antimicrobial potential, which justifies its use in folk medicine for treatment of infectious diseases. Since this species is poorly investigated, further refined studies on its pure secondary metabolites are needed and very important, in the perspective to identify new antimicrobial molecules from this endemic plant.

KEYWORDS

Antimicrobial activity, Endemic, *Thymus lanceolatus*, Solvent extracts

1. Introduction

Plant derivatives, such as infusions and decoctions, have since long been used in traditional medicine for prevention and treatment of several pathologies[1,2]. Including common infectious diseases, leading causes of morbidity and mortality[3], which are directly responsible for 26% of annual deaths worldwide[4], were also treated by those plants preparations since ancient times[5]. In modern medicine, the discovery of bioactive molecules from microbial origin and synthetic antimicrobial agents decreased the use of traditional plant preparations, especially in developed

countries. But in last decade, and besides their toxicities and side-effects[6], it has become clear that current antimicrobial drugs are losing their effectiveness[7], due to the emergence of resistance in pathogens to those antibiotics, which causes therapeutic failures and death of individuals[8]. Therefore, there is a continuing need to search for new antibiotics[3,7]. Since plant-derived antibacterials are always a source of novel therapeutics[9], many researchers in field of ethnopharmacology have concentrated in studies of those compounds in the past few decades[5] on a promising and wealthy source for safe and effective new antimicrobial agents.

*Corresponding author: Fethi Benbelaid, Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature, Life, Earth and Universe, Aboubekr Belkaïd University of Tlemcen, PO Box 119, 13000 Tlemcen, Algeria.

Tel: +213799490817

E-mail: benbelaidfethi@gmail.com

Foundation Project: Supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of People's Democratic Republic of Algeria (Grant No. B05/N125).

Article history:

Received 3 Sep 2013

Received in revised form 10 Sep, 2nd revised form 15 Sep, 3rd revised form 19 Sep 2013

Accepted 20 Oct 2013

Available online 28 Dec 2013

The genus *Thymus* L. which belongs to Lamiaceae family, rich in medicinal and aromatic species, is one of the well-known genera by their pharmaceutical properties. Used from antiquity as antimicrobial drugs, antiseptic, food preservative, as flavour in food, and cosmetic, *Thyme* species have thus a huge economic importance^[10]. *Thymus* genus has been extensively studied. Some native species in this genus remain poorly or not studied such as *Thymus lanceolatus* Desf. (*T. lanceolatus*) and *Thymus guyonii* de Noé which are endemic in Algeria^[11]. *T. lanceolatus*, an aromatic *Thyme* with long leaves, is a rare species which grows wild in Northwestern Algeria, precisely in mountains of Tlemcen and Tiaret. Apparently, no work has been published on the antimicrobial activity of different extracts from this plant. This plant is known locally, with the species *Thymus pallescens* de Noé, as “Zaater” and is traditionally used for the preparation of herbal teas and for flavoring and meat hygiene especially poultry.

In the same line of research of new bioactive alternative products, this work aims to evaluate the antimicrobial activity of some aqueous and organic extracts from aerial parts and roots of the species *T. lanceolatus* harvested in Tlemcen region. The use of leaves of this plant for the preservation of food and in treatment of infectious diseases, such as festering wounds and foodborne disorders give an idea of their antimicrobial potential. In addition, traditionally known beneficial effects of its decoction on health require a qualitative study to determine the phytochemical families responsible for these effects.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The plant material of *T. lanceolatus* was collected in July 2012 during full inflorescence, from an elevated area called Terni (1300 m) located in the south of Tlemcen (west of Algeria) between 1°22'20"–1°22'30" West and 34°47'12"–34°47'35" North. The botanical identification of species was carried out by Laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems, University of Tlemcen. A voucher specimen was deposited in our laboratory under code TL06121. All harvested plant materials consisting of roots, leaves, stems, flowers, and seeds were washed and dried by spreading in open air and away from sun light for 20 d.

2.2. Extracts preparation

All dried plant materials (100 g) were pulverized and extracted using Soxhlet apparatus separately by four solvents with different polarity, namely, hexane, chloroform, ethanol, and distilled water. After 6 h of extraction, until the used solvent turned pure and colorless^[12], extracts were filtered with Whatman No. 1 filter paper and then solvents were

removed by rotary evaporation. Then, residues obtained from each extract were recovered in dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 100 mg/mL. At last, resulting extracts were sterilized by filtration through syringe filter (0.2 µm) and conserved in dark at 4 °C.

2.3. Phytochemical tests

Screening of principal *T. lanceolatus* chemical families which have a pharmacological interest was performed according to standard methods^[13,14]. These tests involved detecting the different chemical families that existed in the plant by precipitation reactions or staining using specific reagents to each family of compounds.

2.4. Microbial strains

A large number of microbial species were selected for this study. A total of 21 reference strains including 19 bacterial and two fungal strains represented the principal sources of microbial infections for humans, for better evaluation of the antimicrobial potency of this medicinal plant. The fungal strains were yeasts which were *Candida albicans* ATCC 10231 (*C. albicans*) and *C. albicans* IPP 444. Among bacterial strains, 11 strains were Gram-negative which were *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (*A. baumannii*), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (*C. freundii*), *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*), *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (*E. cloacae*), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 (*K. pneumoniae*), *Proteus mirabilis* ATCC 35659 (*P. mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*), *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (*P. fluorescens*), *Salmonella enteritidis* ATCC 2453 (*S. enteritidis*), *Salmonella montevideo* ATCC 3581 (*S. montevideo*), and *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 (*S. typhimurium*); and eight Gram-positive which were *Bacillus cereus* ATCC 11778 (*B. cereus*), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (*E. faecalis*), *E. faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (*L. monocytogenes*), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus*), *S. aureus* ATCC 29213, and *S. aureus* ATCC 33862.

2.5. Antimicrobial assay

2.5.1. Inoculum preparation

Previously conserved and revived strains were taken and inoculated in Mueller–Hinton broth (Conda Pronadisa™, Spain) for bacteria and Sabouraud broth (Fluka®, India) for fungi at 37 °C. After 24 h of incubation, suspensions were taken and shaken well using the vortex then diluted for standardizing. Inocula were set to 0.5 McFarland or an optical density from 0.08 to 0.13 at 625 nm wavelength, which corresponds to 10⁸ CFU/mL^[15].

2.5.2. Disc diffusion method

We have used Kirby–Bauer's agar disc diffusion modified

method^[16], as preliminary antimicrobial potency evaluation of extracts. In short, plates of Mueller–Hinton agar for bacteria and Sabouraud agar for fungi were firstly inoculated by swabbing of standardized microbial suspension (10^8 CFU/mL), accordingly to Clinical And Laboratory Standards Institute 2006 recommendations^[15]. Then, Whatman No. 3 filter paper discs (6 mm of diameter), impregnated with 10 μ L of extracts at 100 mg/mL (1 mg per disc), were placed on the surface of agar. Four discs were placed peripherally in each plate. In addition, discs of gentamicin (10 μ g) and amphotericin B (100 μ g) were placed on the center of plate and served as positive controls for bacterial and fungal strains respectively. After incubation at 37 °C for 24 h, antimicrobial activity of *T. lanceolatus* extracts was determined by measuring the diameter of inhibition zones in millimeters (mm) by Vernier scale. All tests were performed in triplicate.

2.5.3. Determination of minimum inhibitory concentration

The MICs were determined by broth microdilution using 96–well microtiter plates method modified by Wiegand *et al.*^[17]. Briefly, 10 concentrations of each solvent extract ranged from 10.00 to 0.08 mg/mL were made by 1/2 dilutions in sterile glass tubes. Dilution was performed using a blank solution constituted by Mueller–Hinton broth or Sabouraud broth (for bacteria or fungi respectively) with 10% DMSO to keep the concentration of that emulsifier constant. Then, microtiter plates were prepared by filling 180 μ L of 5.10^5 CFU/mL inocula (prepared by 1/200 dilution of 10^8 CFU/mL inocula) with 20 μ L of each concentration. The final concentration in wells was ranging from 4.000 to 0.007 (mg/mL), and the final concentration of DMSO was 1% in each

well. After incubation at 37 °C for 24 h, MICs were determined as the lowest concentration of extract for which no microbial growth was observed by visual inspection of the media. At the same moment, susceptibility test according to Clinical And Laboratory Standards Institute 2006^[18] was performed with gentamicin for bacterial strains and amphotericin B for fungal strains and served as positive control. All tests were performed in triplicate.

3. Results

Screening of *T. lanceolatus* principal chemical families is presented in Table 1.

Table 1

Phytochemical screening of principal chemical families of *T. lanceolatus*.

Compositions	Solvents			
	Hexane	Chloroform	Ethanol	Water
Alkaloids	–	–	–	–
Anthocyanins	–	–	–	–
Anthraquinones	–	–	–	–
Coumarins	–	–	–	–
Emodins	–	–	–	–
Essential oils	+	++	++	–
Flavonoids	–	–	++	+
Iridoids	–	+	+	–
Saponins	–	–	–	++
Steroids	++	++	+	–
Tannins	–	–	+	++
Terpenoids	+	++	+	–
Xanthones	–	–	–	–

(++): Presence at high content; (+): Presence; (–): Absence.

Table 2

Antimicrobial activity of *T. lanceolatus* extracts using disc diffusion method.

Organisms	Extracts (1 mg per disc)				Antibiotics	
	Hexane	Chloroform	Ethanol	Water	GEN1	AMB2
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	9±1	14±1	20±1	8±0	18±1	NA
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	8±0	13±1	14±1	–	18±1	NA
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	–	19±1	16±1	–	20±1	NA
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	–	20±1	18±1	–	20±1	NA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10±1	10±1	16±1	8±0	21±1	NA
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	–	9±1	20±1	9±1	20±1	NA
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	11±0	18±1	15±1	9±0	19±1	NA
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	12±1	17±1	14±1	11±1	20±1	NA
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 70603	–	7±0	16±1	–	20±1	NA
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	8±0	14±1	15±1	9±1	21±1	NA
<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	–	9±0	25±1	12±1	22±1	NA
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	–	8±0	17±1	–	17±1	NA
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	–	8±0	22±1	8±0	18±1	NA
<i>S. enteritidis</i> ATCC 2453	8±0	7±0	18±1	7±0	19±1	NA
<i>S. montevideo</i> ATCC 3581	9±1	9±1	19±1	9±0	18±1	NA
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	10±1	9±1	20±1	9±0	19±1	NA
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	–	33±2	32±1	15±1	21±1	NA
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	–	30±1	30±1	14±1	20±1	NA
<i>S. aureus</i> ATCC 33862	–	31±1	30±1	15±1	20±1	NA
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	–	11±0	15±1	–	NA	19±1
<i>C. albicans</i> IPP 444	–	12±1	16±1	–	NA	20±1

Data are expressed as mean±SD. (–): no activity. NA: not applicable. GEN1: Gentamicin (10 μ g per disc), AMB2: Amphotericin B (100 μ g per disc).

These phytochemical analyses showed that Algerian *Thyme* was richly contains essential oils, saponins, and polyphenols, namely flavonoids and tannins. While, these tests have shown absence of many secondary metabolites, such as alkaloids, anthraquinones, xanthones, and coumarins. Yields of *T. lanceolatus* extracts were 6.3% by hexane, 16% by chloroform, 14% by ethanol, and 9.8% by water.

The antimicrobial activity of *T. lanceolatus* extracts evaluated by disc diffusion method is summarized in Table 2.

From these preliminary results, we could notice clearly that Algerian *Thyme* had an interesting antimicrobial activity. Among active *T. lanceolatus* extracts, ethanol and chloroform extracts have shown a broad-spectrum antimicrobial activity on both bacterial and fungal strains. Ethanol extract was the most active, with inhibition zones large than 14 mm, up to 32 mm against *S. aureus* strains. Chloroform was more active against Gram-positive bacteria. Concerning the rest of solvents, hexane and water extracts were inactive against some strains, such as *Bacillus* spp., *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*.

Quantitative evaluation of *T. lanceolatus* extracts antimicrobial potency through MIC determination is summarized in Table 3. As disc diffusion method results, ethanol and chloroform revealed a strong antimicrobial

activity. From which, ethanol extract has shown a broad-spectrum activity against all studied strains, with low MIC values ranging from 0.052 to 0.500 mg/mL whether for Gram-positive, Gram-negative bacteria or fungi. *S. aureus* and *E. faecalis* strains were the most sensitive to *T. lanceolatus* extracts, which were inhibited at 0.031 mg/mL by chloroform extract. While, hexane extract was the less active since 4 mg/mL had no effect on several strains.

4. Discussion

Since microbial resistance to antibiotics reduces the possibility of treating infectious diseases and increases mortality^[19], the discovery of new antimicrobial agents is very important to improve mankind's future health^[3]. In this report, we have evaluated the antimicrobial potency of *T. lanceolatus* extracts as potential source for new antimicrobial agents, since this species is not studied. As expected, antimicrobial activity evaluation against large number of microbial strains, by two recommended methods showed that *T. lanceolatus* extracts had a strong effect against microorganisms, especially ethanol and chloroform extracts with board-spectrum activity. Comparison of *T. lanceolatus* antimicrobial activity with other medicinal plants well known by their strong antimicrobial activity, such as *Allium*

Table 3

Minimum inhibitory concentrations for *T. lanceolatus* extracts.

Organisms	Extracts (mg/mL)				Antibiotics (µg/mL)	
	Hexane	Chloroform	Ethanol	Water	GEN1	AMB2
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	4.000±0.000	0.125±0.000	0.125±0.000	4.000±0.000	2.000±0.000	NA
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	2.000±0.000	1.000±0.000	0.500±0.000	–	2.666±1.154	NA
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	–	0.083±0.036	0.125±0.000	–	4.000±0.000	NA
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	–	0.125±0.000	0.250±0.000	–	4.000±0.000	NA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4.000±0.000	1.000±0.000	0.500±0.000	–	2.000±0.000	NA
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	–	1.000±0.000	0.250±0.000	4.000±0.000	2.000±0.000	NA
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2.000±0.000	0.031±0.000	0.104±0.036	4.000±0.000	8.000±0.000	NA
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	4.000±0.000	0.041±0.018	0.063±0.000	–	8.000±0.000	NA
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 70603	–	1.000±0.000	0.500±0.000	–	1.333±0.577	NA
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	–	0.031±0.000	0.250±0.000	4.000±0.000	2.000±0.000	NA
<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	–	1.000±0.000	0.208±0.072	2.000±0.000	>8.000	NA
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	–	2.000±0.000	0.250±0.000	–	1.000±0.000	NA
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	–	1.000±0.000	0.250±0.000	–	1.000±0.000	NA
<i>S. enteritidis</i> ATCC 2453	–	1.333±0.577	0.500±0.000	4.000±0.000	2.000±0.000	NA
<i>S. montevideo</i> ATCC 3581	–	1.000±0.000	0.250±0.000	4.000±0.000	2.000±0.000	NA
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	4.000±0.000	0.500±0.000	0.250±0.000	4.000±0.000	2.000±0.000	NA
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	–	0.041±0.018	0.063±0.000	1.000±0.000	0.416±0.144	NA
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	–	0.031±0.000	0.052±0.018	1.000±0.000	0.333±0.144	NA
<i>S. aureus</i> ATCC 33862	–	0.031±0.000	0.063±0.000	0.833±0.288	0.250±0.000	NA
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	–	0.125±0.000	0.104±0.036	–	NA	1.000±0.000
<i>C. albicans</i> IPP 444	–	0.125±0.000	0.063±0.000	–	NA	1.000±0.000

Values are expressed as mean±SD. All tests were performed in triplicate (mg/mL). (–): not determined. NA: not applicable. GEN 1: Gentamicin; AMB 2: Amphotericin B.

sativum (*A. sativum*) and *Camellia sinensis*, it shows that Algerian *Thyme* has an effectiveness close to these herbs. For example, the MIC of *A. sativum* methanol extract was 0.1 mg/mL on *B. subtilis*, while MIC of *T. lanceolatus* ethanol extract was 0.25 mg/mL on this Gram-positive bacillus. In the other hand, *T. lanceolatus* ethanol extract was active on all strains tested contrary to *A. sativum* methanol extract where 2 mg/mL of this extract was ineffective against *S. aureus* and *C. albicans*[20]. Furthermore, inhibition zone diameters of *C. sinensis* ethanol extract were up to 16 mm, 17 mm, 17 mm against *B. subtilis*, *E. coli*, and *S. aureus* respectively, as the strongest antimicrobial activity[21]. When compared with *T. lanceolatus* ethanol extract, we note clearly that Algerian *Thyme* is more active since inhibition zone diameters of ethanol extract on *S. aureus* were large than 30 mm.

Since implied in protection from insects and microbial infections, some secondary metabolites are the natural defense system of plants[22,23], which explains the antimicrobial potency of those substances. The principally chemical families responsible for antimicrobial activity in medicinal plants are polyphenols, terpenoids, alkaloids, iridoids, saponins, coumarins, and xanthoness[7]. The genus *Thymus*, which belongs to Lamiaceae family, is well known by its high content of terpenoids[10] and polyphenols[24]. Phytochemical screening of *T. lanceolatus* has confirmed that this species has the same phytochemical profile, a high content of polyphenols and essential oils, while alkaloids and coumarins are absent. Therefore, the antimicrobial activity seen in *T. lanceolatus* extracts is principally due to those secondary metabolites, or possibly synergistic effect between them, specifically noted in ethanol extract, which contains iridoids, flavonoids, tannins, and essential oils, and was the most active among all extracts. *T. lanceolatus* chloroform extract was more active against Gram-positive bacteria mainly due to its richness in essential oils, since those volatile secondary metabolites are effective against Gram-positive bacteria than Gram-negative ones[25].

As findings of this study, evaluation of *T. lanceolatus* antimicrobial potency on large number of microorganisms has shown that Algerian *Thyme* has a strong antimicrobial activity against all strains selected for this study, which justifies its wide use by local population. Since it is rich in terpenoids and flavonoids, which can be used as new pharmacologically acceptable antibiotics in the future[7,26], *T. lanceolatus* can be a source of new antibiotics. In the other hand, because of the absence of data for the chemical composition, further refined studies on extracts obtained from this plant are interesting.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors would thank Dr. Boumediene Medjahdi, Forestry Department, Aboubekr Belkaïd University of Tlemcen, for botanical assistance. This work was financially supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of People's Democratic Republic of Algeria (Grant No. B05/N125).

Comments

Background

Assessment and evaluation of unstudied plants, which are often endemic and rare, is scientifically very important. This line of research has an importance in pharmaceutical industry for valorization of those plants, especially species with biological activities, in the perspective to discover new molecules with pharmacological interest.

Research frontiers

The study was carried out to investigate the antimicrobial activity of *T. lanceolatus*, which is, up to date, an unstudied species since there are no studies published online on its chemical and biological properties. The evaluation of the antimicrobial activity of this plant against a large number of microbial species is among the strongest points of this work.

Related reports

Apparently, no study was performed on the antimicrobial activity of *T. lanceolatus*. While other antimicrobial studies performed in some species of the genus *Thymus* showed that their extracts have commonly a strong antimicrobial activity, for example methanol extract of *Thymus vulgaris*, as reported by Al-Bayati *et al.*, 2008.

Innovations & breakthroughs

This study is the first academic research that highlights *T. lanceolatus* as medicinal plant in providing a very interesting antimicrobial activity, which opens the field of in-depth research on this endemic species.

Applications

Actually, multidrug resistance present a real public

health problem, especially in developed countries, where discovery of new antimicrobial drugs is an urgent necessity. In this study, authors have demonstrated that endemic species *T. lanceolatus* has some phytochemicals with an interesting antimicrobial activity, which can be a source of new antimicrobial molecules. Further studies are needed for investment of these findings.

Peer review

This is a good and an original study in which authors have valorised *T. lanceolatus*, an endemic medicinal plant from Algeria, for antimicrobial activity against pathogens responsible for many human diseases. The findings of this study are interesting, where authors report that *T. lanceolatus* contains some phytochemicals which provided a strong antimicrobial activity.

References

- [1] Gonçalves S, Gomes D, Costa P, Romano A. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Ind Crops Prod* 2013; **43**(1): 465–471.
- [2] Luo H, Li Q, Flower A, Lewith G, Liu J. Comparison of effectiveness and safety between granules and decoction of Chinese herbal medicine: A systematic review of randomized clinical trials. *J Ethnopharmacol* 2012; **140**(3): 555–567.
- [3] Radulovic NS, Blagojevic PD, Stojanovic–Radic ZZ, Stojanovic NM. Antimicrobial plant metabolites: Structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem* 2013; **20**(7): 932–952.
- [4] Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. Emerging infections: a perpetual challenge. *Lancet Infect Dis* 2008; **8**(11): 710–719.
- [5] Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; **100**(1–2): 80–84.
- [6] Grill MF, Maganti RK. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *Br J Clin Pharmacol* 2011; **72**(3): 381–393.
- [7] Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep* 2010; **27**(2): 238–254.
- [8] Hooper DC, DeMaria A, Limbago BM, O'Brien TF, McCaughey B. Antibiotic resistance: how serious is the problem, and what can be done? *Clin Chem* 2012; **58**(8): 1182–1186.
- [9] Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008; **15**(8): 639–652.
- [10] Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Salgueiro L, Miguel MG, Faleiro ML. Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Curr Pharm Des* 2008; **14**(29): 3120–3140.
- [11] Morales R. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl–Biskup E, Sáez F, editors. *Thyme: the genus Thymus*. London: Taylor & Francis; 2002, p. 1–43.
- [12] Al–Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol* 2008; **116**(3): 403–406.
- [13] Harborne AJ. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd ed. London: Chapman & Hall; 1998, p. 320.
- [14] Raaman N. *Phytochemical techniques*. New Delhi: New India Publishing Agency; 2006, p. 306.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- [16] Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods* 2010; **81**(2): 121–126.
- [17] Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008; **3**(2): 163–175.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- [19] Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**(4): 260–271.
- [20] Meriga B, Mopuri R, MuraliKrishna T. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pac J Trop Med* 2012; **5**(5): 391–395.
- [21] Chauhan DS, Bhattacharya S, Mueen Ahmed KK. Comparative *in vitro* antibacterial evaluation of different extracts of *Camellia sinensis* leaves from different geographical locations in India. *Phcog J* 2013; **5**(2): 87–90.
- [22] Howe GA, Jander G. Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 41–66.
- [23] Reichling J. Plant–microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. In: Wink M, editor. *Annual plant reviews: Functions and biotechnology of plant secondary metabolites*. Oxford: Wiley–Blackwell; 2010, p. 214–347.
- [24] Pereira RO, Cardoso MS. Overview on *Mentha* and *Thymus* polyphenols. *Curr Anal Chem* 2013; **9**(3): 382–396.
- [25] Barry–Ryan C, Bourke P. Essential oils for the treatment of fruit and vegetables. In: Gómez–López VM, editor. *Decontamination of fresh and minimally processed produce*. Oxford: Wiley–Blackwell; 2012, p. 225–246.
- [26] Pistelli L, Giorgi I. Antimicrobial properties of flavonoids. In: Patra AK, editor. *Dietary phytochemicals and microbes*. Berlin: Springer; 2012, p. 33–91.



Drying effect on yield and antimicrobial activity of essential oils

Fethi BENBELAID*, Mohamed Amine ABDOUNE, Abdelmounaïm KHADIR, Mourad BENDAHOU

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen, 13000, Alegria.

*Corresponding Author, Tel.: +213-799490817.

Article History: Received 29th November 2012, Revised 9th February 2013, Accepted 10th February 2013.

Abstract: The present paper highlights the drying effect on yield and activity of some medicinal and aromatic plants. For this purpose we have chosen nine plants, four trees and five herbs. Each plant species represents one of the great aromatic families in Mediterranean. Drying was carried out at the dark at room temperature. Essential oils were obtained by hydrodistillation, where, we have noticed a significant decrease in yield of essential oil after drying in all plants. This loss was in strong relation with moisture decrease by drying. Drying effect on antimicrobial activity of essential oils has been evaluated by agar disk diffusion method. We have found a significant decrease in antimicrobial activity among all active essential oils after drying. Finally, we have concluded that drying significantly affects the essential oil quantity and quality.

Keywords: Antimicrobial activity; drying; essential oils; yield.

Introduction

Many herbalists are interested in the need to dry the plant material for several reasons including the exclusion of moisture (Müller and Heindl 2006) and the facilitation of the extraction process (Marur and Sodek 1995) for various phytochemicals to obtain their highest yield (Birdi et al. 2006). The storage of plants for use in a later time (Singh 2009) or for trade purpose requires drying (Douglas et al. 2005; Jakhar et al. 2009). According to some authors, the fresh plant material should be delivered as quickly as possible to the processing facility to prevent microbial fermentation or thermal degradation by mentioning that the methods and temperatures used for drying may have a considerable impact on the quality of the resulting medicinal plant materials (Birdi et al. 2006), while others use the fresh plant material without justifying the reason for this type of use (Lucchesi et al. 2004; Okoh et al. 2010; Stashenko et al. 2004). In contrast, some authors confirm that drying reduces the yield of volatile oil while the extraction from fresh plants is

economic which avoids the drying process (Schmidt 2010).

Essential oils extracted from many medicinal plants have several interesting biological activities (Reichling et al. 2009). The antimicrobial activity is strongly correlated with the content of terpenoid phenols such as carvacrol, eugenol and thymol (Edris 2007; Guarda et al. 2011) and some other oxygenated monoterpenes such as nerol, linalool, -terpineol, fenchol and terpinen-4-ol (Kotan et al. 2007). From the phenolic compounds, eugenol and thymol reveal a broadband spectrum of activity in various *in vitro* test systems due to their considerable water solubility and volatility (Pauli and Schilcher 2010). However, those molecules are characterized by low molecular weight (Bakkali et al. 2008).

The sensitivity of volatile constituents from various aromatic plants is observed in the changes of their concentrations during drying which depends on several factors such as drying method and parameters that are characteristic of the product subjected to drying (Venskutonis 1997). Even the freeze-drying, one of the best

*Corresponding author: (E-mail) benbelaidfethi <@> gmail.com

© 2013 Copyright by the Authors, licensee Open Access Science Research Publisher.

<http://www.openaccessscience.com>
ijmap@openaccessscience.com

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported (CC BY-NC-ND 3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0>)

pharmaceutical techniques for drying medicinal plants, causes a change in the relative concentrations of molecules in the essential oil (Abascal et al. 2005) which may influence the pharmacological properties of these medicinal plants. This drying method causes the loss of certain monoterpenes such as 1,8-cineole, linalool and geraniol (Díaz-Maroto et al. 2002). Same case is observed in natural drying and in hot air drying at 45 °C (Omidbaigi et al. 2004; Szumny et al. 2010). In general, convective drying (using hot air) leads to significant volatile losses (Díaz-Maroto et al. 2004), with losses increasing with higher air temperatures and longer drying times. However, the loss of volatiles was maximum in the first step of the drying process and insignificant thereafter (Szumny et al. 2010). Therefore, shade drying is the preferred method for drying plant material since it can maintain or minimize loss of color of leaves and flowers (Birdi et al. 2006).

The antimicrobial activity is one of the most important therapeutic effects that the plant may possess (Cowan 1999; Pauli and Schilcher 2010). The change in the composition of extracts has a significant impact towards these microorganisms whether in the emergence of their sensitivity or resistance (Bitu et al. 2012; Mondal et al. 2007; Sasidharan and Menon 2010). Hence, it may appear evident the importance for the plant to keep most of its components, especially quickly volatile ones, which is somewhat guaranteed in the fresh case (Al-Jaber et al. 2012; Baritoux et al. 1992; Englund and Nussbaum Ralph 2000; Jerkovi et al. 2001).

In the absence of a large comparative antimicrobial analysis between extraction in the case of dry and fresh plant material, which is seen in most of what is published. So, we decided to perform a simple work to compare between the amount and effect of essential oils for a group of plants known by their medical properties in both dry and fresh cases.

Materials and methods

Plant material

We have selected a group consisting of nine species; each one represents a certain family for several reasons. First, there are differences in type secretory containers and biosyntheses of essential oil taxonomical families (Franz and Novak 2010). While, this distinctive feature between botanical families may affect the way these plants wither, and more specifically, changes that may affect the chemical composition of the essential oil during drying. Secondly, selected species are the most conserved plants in our regions for subsequent uses either medical or food.

Apium graveolens L. (Apiaceae), *Citrus × sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae), *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae), *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter subsp. *viscosa* (Asteraceae), *Eucalyptus globulus* Labill. subsp. *globules* (Myrtaceae), *Laurus nobilis* L. (Lauraceae), *Lavandula multifida* L. (Lamiaceae), *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae) and *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) plant material have been harvested from the region of Tlemcen located in the northwestern Algeria from November 2011 to January 2012, from which we find those in the wild and others cultivated. We have used organs of their aerial part for extraction which are summarized in (Table 1). Plant material was divided into two parts by weighing each of them separately, a part for extraction in the fresh case which is launched the day its harvest, and the other part which is left to dry for a period ranging from 20 to 30 days by spreading it in open air and away from sunlight. Specimens of all spices in this study were identified by Laboratory of Ecological Management of Natural Ecosystems; University of Tlemcen. All voucher specimens were deposited at LAMAABE laboratory, University of Tlemcen.

Obtaining the essential oils

For this purpose, we have used hydrodistillation, where obtaining the essential oil was performed in a Clevenger-type apparatus, by putting plant material in direct contact with water inside a flask over a heat source. The flask was connected to a column then a condenser allowing the accumulation of

water vapor loaded with essential oil droplets. Essential oil was collected in a graduated burette (precise volume of 0.05 ml) where the

volume is read directly. The essential oil was dried using magnesium sulfate and stored in smoked vials at +4 °C.

Table 1: Data on the studied plant material.

Scientific Name	Family	Studied Organs	Harvest Station			Total Annual QPF*	Harvest Date
			Name (Municipality)	Location	Altitude (m)		
<i>Apium graveolens</i> L.	<i>Apiaceae</i>	Leaves & Stems	Ain El-Houtz (Chetouane)	+34°56'14" - 1°19'29"	476 m	450 mm	Jan-12
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>Rutaceae</i>	Fruit Cortex	DjenaneLihoudi (Hennaya)	+34°57'48" - 1°22'07"	379 m	450 mm	Nov-11
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	<i>Cupressaceae</i>	Leaves & Fruits	Bouhannak (Mansourah)	+34° 52' 37" -1° 21' 40"	749 m	450 mm	Dec-11
<i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter subsp. <i>viscosa</i>	<i>Asteraceae</i>	Leaves & Stems	Imama (Mansourah)	+34° 53' 43" -1° 21' 11"	716 m	450 mm	Dec-11
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill. subsp. <i>globulus</i>	<i>Myrtaceae</i>	Leaves	Bouhannak (Mansourah)	+34° 52' 37" -1° 21' 40"	749 m	450 mm	Nov-11
<i>Laurus nobilis</i> L.	<i>Lauraceae</i>	Leaves	Bouhannak (Mansourah)	+34° 53' 3" -1° 22' 29"	701 m	450 mm	Nov-11
<i>Lavandula multifida</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Leaves, Stems & Flowers	OuledCharef (Maghnia)	+34°53'2" -1° 22' 32"	697 m	450 mm	Jan-12
<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér.	<i>Geraniaceae</i>	Leaves & Stems	Imama (Mansourah)	+34° 53' 35" -1° 21' 18"	715 m	450 mm	Jan-12
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	<i>Anacardiaceae</i>	Leaves & Fruits	Bouhannak (Mansourah)	+34° 53' 1" -1° 22' 34"	690 m	450 mm	Jan-12

* 2011 total annual quantitative precipitation forecast according to Office National de Meteorologie d'Algerie in March 2012 (<http://www.meteo.dz/>).

Strains and media

Seven strains have been selected, one of them is a fungus and the rest are bacteria representing various infection sources. The fungal strain was yeast which is *Candida albicans* ATCC 10231. While we find among the bacterial strains, three Gram-negative ones which are *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, and three Gram-positive ones which are *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

The purity of strains was verified by subculturing them in their selective growth media and taking distinct colonies in each time, where *Candida albicans* was cultivated in Sabouraud agar (Fluka®, India) with chloramphenicol (Calbiochem®, Germany) at 37 °C for 48 h, all of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were cultivated in MacConkey agar (Fluka®,

India) at 37 °C for 24 h, *Enterococcus faecalis* in Bile Esculin agar (Fluka®, Switzerland) at 37 °C for 24 h, *Staphylococcus aureus* in Mannitol Salt agar (Fluka®, Switzerland) at 37 °C for 24 h, and *Bacillus subtilis* in Mossel agar (Fluka®, Switzerland) at 30 °C for 24 h. As media for testing antimicrobial effect, we have chosen Mueller-Hinton agar (Fluka®, India) for bacteria and Sabouraud agar (Fluka®, India) for yeasts.

Microbial suspensions were prepared in test tubes containing 5 ml of Mueller-Hinton broth (Fluka®, India) for bacteria and Sabouraud broth (Fluka®, India) for yeast, as blank.

Previously purified colonies were taken and inoculated into tubes with 5 ml of Mueller-Hinton broth (Fluka®, India) for bacteria and Sabouraud broth (Fluka®, India) for yeast, at 37 °C for 24 h. After incubation, suspensions were shaken well using the vortex then diluted for standardizing, so that the inoculum was set to 0.5 McFarland which corresponds to an optical density from 0.08 to 0.1 at 625 nm wavelength.

The inoculum final concentration will be approximately 10^8 cfu/ml.

Evaluation of antimicrobial effect

We have used Kirby-Bauer's agar disk diffusion method (Bauer et al. 1966), where filter paper disks impregnated with 2 μ l of essential oil are placed on the surface of agar pre-inoculated by swabbing of standardized microbial suspension, each disk has a 6 mm diameter. After incubation, the results are read by measuring the diameter of inhibition zones in millimeters (mm) by Vernier scale. Gentamicin (10 μ g per disc) and Amphotericin B (100 μ g per disc) (Oxoid, England) were used and served as positive controls for bacterial and fungal strains respectively. All tests were performed in triplicate.

Statistical analysis

Table 2: Essential oils yield difference between fresh and dry cases.

Plant	Fresh weight (g)	Weight after drying (g)	Weight decrease (%)	Fresh yield (%)*	Yield after drying (%)*	Yield decrease (%)
<i>Apium graveolens</i>	1000	217	78	0.06	0.03	50
<i>Citrus sinensis</i>	1000	167	83	0.45	0.14	68
<i>Cupressus sempervirens</i>	1000	495	51	0.16	0.13	21
<i>Dittrichia viscosa</i> subsp. <i>viscosa</i>	1000	241	76	0.10	0.01	98
<i>Eucalyptus globulus</i> subsp. <i>globulus</i>	1000	423	58	0.70	0.58	18
<i>Laurus nobilis</i>	1000	500	49	0.62	0.59	05
<i>Lavandula multifida</i>	1000	423	58	0.10	0.08	20
<i>Pelargonium graveolens</i>	1000	318	68	0.13	0.08	41
<i>Pistacia lentiscus</i>	1000	494	51	0.12	0.11	08

*Yield percentage was determined by volume/weight ratio.

On the other hand, we have observed that loss of essential oil yield in plants after drying was related to the decrease of their weight. Where, species that lose a lot of weight by drying, their yield decreases sharply and vice versa. Furthermore, we have clearly observed highly significant correlation ($R=0.86$) between plant material weight decrease and essential oil yield decrease after drying (Figure 1).

The antimicrobial activity of studied plants was summarized in (Table 3). Where, we can see that *Lavandula multifida* has the most clear inhibitory effect on most strains especially on

The effect of plant weight decrease on essential oil yield was verified by a correlation test ($P < 0.05$). The difference in antimicrobial activity of essential oils extracted in the both fresh and dry cases was verified by two-way ANOVA test ($P < 0.05$) for each strain. All tests have been carried out using Microsoft® Excel.

Results

The results of the extraction yields are presented in (Table 2). Where, we noticed a significant decrease in yield of essential oils after drying in all plants in this study. These losses of yield are remarkably large in some species such as *Citrus sinensis* and *Apium graveolens*, while this change is less significant in other one such as *Laurus nobilis*. Moreover, there was an almost total loss of essential oil after drying observed in a species of the Asteraceae family, *Dittrichia viscosa*.

Gram-positive bacteria. Then, *Pelargonium graveolens* and *Eucalyptus globulus* have a good inhibitory effect on each of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. It has also been shown that *Dittrichia viscosa*, *Pistacia lentiscus* and *Apium graveolens* have an acceptable inhibitory effect on each of *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, respectively. While, *Cupressus sempervirens*, *Citrus sinensis* and *Laurus nobilis* haven't shown any inhibitory effect that can be mentioned.

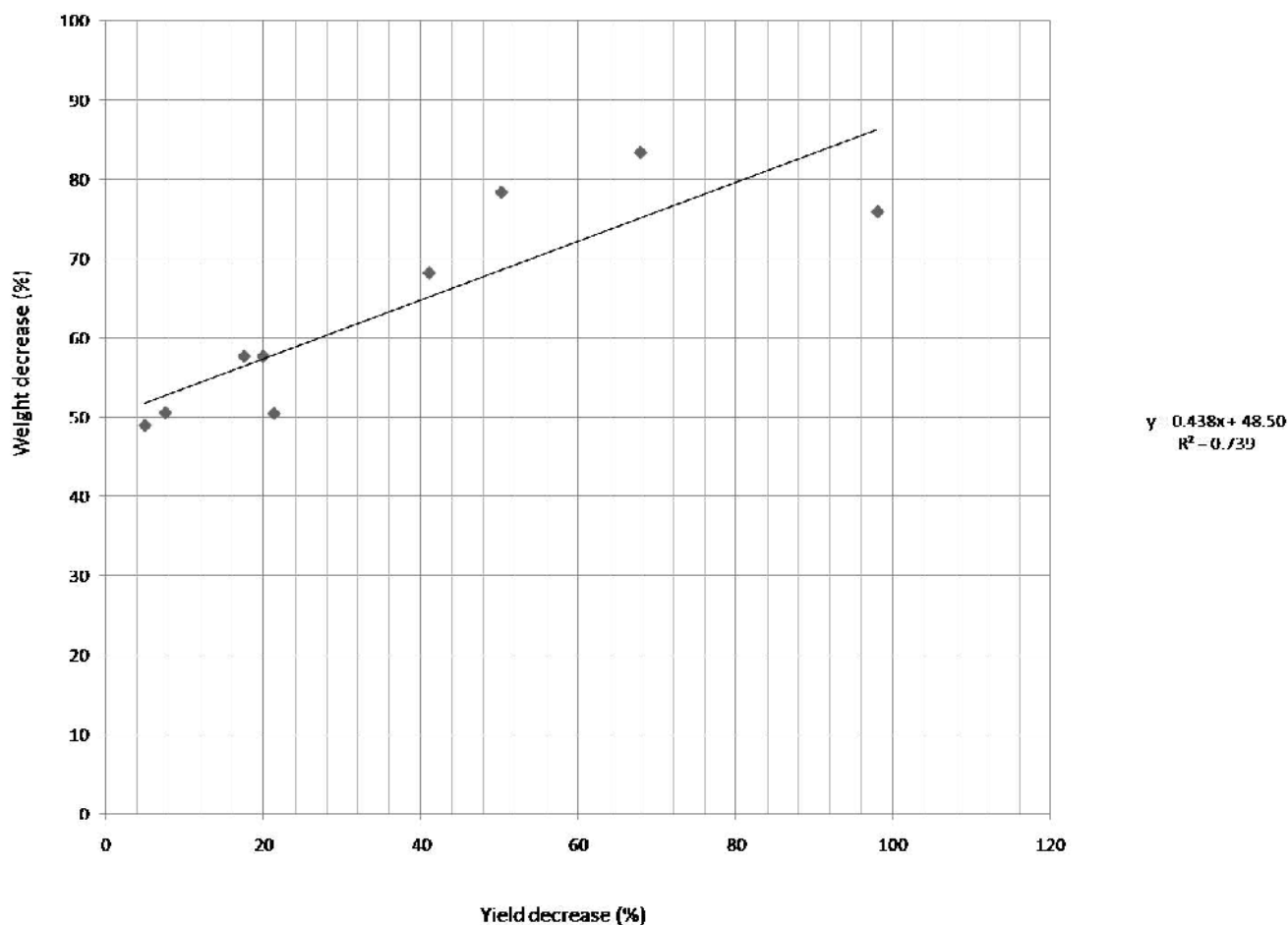


Figure 1: Correlation between plant material weight decrease and essential oil yield decrease.

Table 3: Inhibition zones diameters.

Strains		Essential oils (2 µl)									Antibiotics	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	GEN ¹	AMB ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	F	27 ± 1	22 ± 1	12 ± 1	14 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	21 ± 1	nd
	D	14 ± 0	18 ± 1	09 ± 1	10 ± 1	09 ± 0	nd	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0		
<i>Bacillus subtilis</i>	F	20 ± 1	12 ± 1	11 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	10 ± 1	08 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	19 ± 1	nd
	D	15 ± 1	10 ± 0	09 ± 0	07 ± 1	08 ± 1	nd	07 ± 0	06 ± 0	06 ± 0		
<i>Escherichia coli</i>	F	16 ± 1	07 ± 0	07 ± 0	09 ± 1	10 ± 1	06 ± 0	07 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	20 ± 0	nd
	D	12 ± 1	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	07 ± 1	nd	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F	09 ± 1	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	08 ± 1	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	19 ± 1	nd
	D	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	nd	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0		
<i>Enterococcus faecalis</i>	F	14 ± 1	07 ± 1	07 ± 1	10 ± 1	07 ± 0	08 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	20 ± 1	nd
	D	08 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	nd	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	08 ± 1	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	18 ± 0	nd
	D	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0	nd	06 ± 0	06 ± 0	06 ± 0		
<i>Candida albicans</i>	F	26 ± 0	14 ± 1	14 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	08 ± 1	08 ± 1	06 ± 0	nd	18 ± 1
	D	14 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	08 ± 0	08 ± 1	nd	07 ± 0	06 ± 0	06 ± 0		

Abbreviation: Mean ± Standard Deviation (SD) of three repeats, 6.0 = no inhibition zone.

1: *Lavandula multifida*, 2: *Eucalyptus globulus*, 3: *Pelargonium graveolens*, 4: *Apium graveolens*, 5: *Pistacia lentiscus*, 6: *Dittrichia viscosa*, 7: *Laurus nobilis*, 8: *Cupressus sempervirens*, 9: *Citrus sinensis*. F: essential oil extracted from fresh plant, D: essential oil extracted from dry plant, nd: not determined, 1: Gentamicin 10 µg, 2: Amphotericin B 100 µg.

We can even see clearly the retraction of the inhibitory effect of all active essential oils after drying, especially for *Lavandula multifida*, and with less degree, *Pelargonium graveolens*, *Eucalyptus globulus*, *Dittrichia viscosa*, *Pistacia lentiscus* and *Apium graveolens*. It should be denoted the lack of sensitivity for both *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* to all essential oils except the low inhibitory effect observed with those of *Lavandula multifida* and *Pistacia lentiscus* on *Klebsiella pneumoniae* and that of *Apium graveolens* on *Pseudomonas aeruginosa* only in the fresh case.

Discussion

Essential oils yields

Extraction results show a clear difference in yield which was turned down after drying in all studied plants. This confirms many results in studies carried out in this area by mentioning the evident effect of drying (Jerkovi et al. 2001; Okoh et al. 2008) whether on yield decrease or on the change of essential oil chemical composition by concentration decrease of some constituents (Al-Jaber et al. 2012; Baritoux et al. 1992; Díaz-Maroto et al. 2004; Englund and Nussbaum Ralph 2000; Figiel et al. 2010; Jerkovi et al. 2001; Okoh et al. 2008). While, other authors have stated increase in yield of essential oil after drying with reference to dry weight. In fact, there was a decrease towards fresh weight (Combrinck et al. 2006).

On the other hand, the decrease in weight observed after drying is expressed by the decrease in moisture to preserve the product for extended shelf life (Müller and Heindl 2006). Thus, the correlation observed between material weight decrease and essential oil yield decrease after drying is in fact a relationship between yield loss and moisture decrease during drying. While, plants drying contributes significantly to the loss of moisture which is expressed by the content of water and all of what is volatile among other fluids (Isengard 1995). So, essential oil constitutes one of the most important moisture components in plant especially its highly volatile constituents. From here, we can say that drying has a clear effect on

essential oil yield decrease, so it seems very important to perform extraction in the fresh case for several reasons particularly to maintain maximum amount of these essential oils.

Drying may have a role in total or partial loss of essential oil which can be seen in *Dittrichia viscosa* by the fact that it's essential oil is characterized by high viscosity and quickly volatile constituents may occur in small amounts with regard to the other ones having a high molecular weight which gives the viscous property for the essential oil (Stewart 2005). The possibility to obtain a viscous essential oil rich in high molecular weight constituents in a short time may explain their extraction easiness and finally their loss possibility after drying, so that what have been seen in fact in this study.

Essential oils effect on studied strains

The results of the antimicrobial activity of essential oils have shown a clear influence of drying on the antimicrobial activity of these oils, which was turned down after drying in most active plants. Anyway, a few studies have reported the comparison of essential oil antimicrobial activity between fresh and dry cases. The decrease of antibacterial activity was clearly observed after drying for *Ocimum sanctum* (Mondal et al. 2007), *Zingiber officinale* (Sasidharan and Menon 2010) and *Lippia gracilis* (Bitu et al. 2012). While, there was an increase in antifungal activity after drying for *Ocimum sanctum* essential oil (Mondal et al. 2007).

The significant increase in activity observed with essential oils extracted from fresh plants have been reported by some authors due to quantitative and qualitative variations in the essential oil chemical composition (Mondal et al. 2007; Sasidharan and Menon 2010). Thus, drying effect on chemical composition has been well discussed in many studies. For example, there was a decrease in monoterpene concentration after drying while sesquiterpenes were in considerable amounts in comparison with the fresh case (Al-Jaber et al. 2012; Bartley and Jacobs 2000; Diaz-Maroto et al. 2002; Sasidharan and Menon 2010; Szumny et al. 2010). Furthermore, the decrease in

monoterpenes is due to their low weight and high volatility compared to other compounds in essential oil (Bartley and Jacobs 2000; Stewart 2005). Essential oil antimicrobial activity is highly correlated with the composition in monoterpenes compared with other chemical families and in oxygenated molecules against hydrocarbons (Sinha and Gulati 1990; Srivastava et al. 2000). Then, monoterpene-sesquiterpene ratio specifies the essential oil quality (Reverchon 1997). So, we can say that the retraction of the antimicrobial activity seen in our results is probably reported to the decrease in concentration of monoterpenes lost by drying, especially oxygenated ones.

Conclusion

Drying of aromatic plants affects significantly the quantity and the quality of essential oils. Therefore, the extraction from fresh plants not only economically increases the yield for industries, but also the pharmaceutical quality of essential oils.

References

- Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E. 2005. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research*, 19(8): 655–660.
- Al-Jaber, H.I., Al-Qudah, M.A., Barhoumi, L.M., Abaza, I.F., Afifi, F.U. 2012. Essential oil composition of the aerial parts of fresh and air-dried *Salvia palaestina* Benth. (Lamiaceae) growing wild in Jordan. *Natural Product Research*, 26(13): 1179–1187.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446–475.
- Baritoux, O., Richard, H., Touche, J., Derbesy, M. 1992. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part I. Basil, *ocimum basilicum* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 7(5): 267–271.
- Bartley, J.P., Jacobs, A.L. 2000. Effects of drying on flavour compounds in Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(2): 209–215.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4): 493–496.
- Birdi, T.J., Brijesh, S., Daswani, P.G. 2006. Approaches towards the preclinical testing and standardization of medicinal plants. The Foundation for Medical Research, Mumbai.
- Bitu, V., Botelho, M.A., Costa, J.G.M.d., Rodrigues, F.F.G., Veras, H.N.H., Martins, K.T., Lyra, A., Coluchi, G.G., Ruela, R.S., Queiroz, D.B., Siqueira, J.d.S., Quintans-Junior, L.J. 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracillis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(NS): 69–75.
- Combrinck, S., Bosman, A.A., Botha, B.M., Du Plooy, W., McCrindle, R.I., Retief, E. 2006. Effects of post-harvest drying on the essential oil and glandular trichomes of *Lippia scaberrima* Sond. *Journal of Essential Oil Research*, 18(NS): 80–84.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564–582.
- Diaz-Maroto, M.C., Perez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D. 2002. Effect of drying method on the volatiles in bay leaf (*Laurus nobilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16): 4520–4524.
- Díaz-Maroto, M.C., Sánchez Palomo, E., Castro, L., González Viñas, M.A., Pérez-Coello, M.S. 2004. Changes produced in the aroma compounds and structural integrity of basil (*Ocimum basilicum* L.) during drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(15): 2070–2076.
- Douglas, M., Heyes, J., Smallfield, B. 2005. Herbs, Spices and Essential Oils: Post-Harvest Operations in Developing Countries. UNIDO & FAO, Vienna.

- Edris, A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4): 308–323.
- Englund, F., Nussbaum Ralph, M. 2000. Monoterpenes in Scots Pine and Norway Spruce and their Emission during Kiln Drying. *Holzforschung*, 54(5): 449–456.
- Figiel, A., Szumny, A., Gutiérrez-Ortíz, A., Carbonell-Barrachina, Á.A. 2010. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 98(2): 240–247.
- Franz, C., Novak, J. 2010. Sources of Essential Oils, In: Can Ba er, K.H., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press, Florida, pp. 39–81.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., Galotto, M.J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2): 144–150.
- Isengard, H.D. 1995. Rapid water determination in foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology* 6(5): 155–162.
- Jakhar, M.L., Kakralya, B.L., Singh, S.J., Singh, K. 2009. Enhancing the export potential of medicinal plants through biodiversity conservation and development under multi-adversity environment, In: Trivedi, P.C. (Eds.), *Medicinal Plants: Utilisation and Conservation*, second ed. Aavishkar Publishers, Rajasthan, pp. 36–78.
- Jerkovi, I., Masteli, J., Miloš, M. 2001. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(6): 649–654.
- Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A. 2007. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 62(7-8): 507–513.
- Lucchesi, M.E., Chemat, F., Smadja, J. 2004. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2): 323–327.
- Marur, C.J., Sodek, L. 1995. Microwave drying of plant material for biochemical analysis. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 7(1): 111–114.
- Mondal, S., Mahapatra, S.C., Mirdha, B.R., Naik, S.N. 2007. Antimicrobial activities of essential oils obtained from fresh and dried leaves of *Ocimum sanctum* L. against enteric bacteria and yeast. *Acta Horticulturae*, 756(NS): 267–270.
- Müller, J., Heindl, A. 2006. Drying of medicinal plants, In: Bogers, R.J., Craker, L.E., Lange, D. (Eds.), *Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Wageningen, pp. 237–252.
- Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J. 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 120(1): 308–312.
- Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., Asekun, O.T., J., A.A. 2008. The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. *African Journal of Biotechnology*, 7(10): 1500–1502.
- Omidbaigi, R., Sefidkon, F., Kazemi, F. 2004. Influence of drying methods on the essential oil content and composition of Roman chamomile. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(3): 196–198.
- Pauli, A., Schilcher, H. 2010. In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition, In: Can Ba er, K.H., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press, Florida, pp. 353–548.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. 2009. Essential oils of aromatic plants

- with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties: an overview. *Forsch Komplementmed*, 16(2): 79–90.
- Reverchon, E. 1997. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*, 10(1): 1–37.
- Sasidharan, I., Menon, N. 2010. Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2(4): 40–43.
- Schmidt, E. 2010. Production of essential oils, In: Can Ba er, K.H., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press, Florida, pp. 83–119.
- Singh, B.P. 2009. Germplasm introduction, exchange, collection and conservation of medicinal and aromatic plants — Their export potential, In: Trivedi, P.C. (Eds.), *Medicinal Plants: Utilisation and Conservation*, second ed. Aavishkar Publishers, Rajasthan, pp. 1–26.
- Sinha, G.K., Gulati, B.C. 1990. Antibacterial and antifungal study of some essential oils and some of their constituents. *Indian Perfumer*, 34(2): 126–129.
- Srivastava, A., Shukla, Y.N., Kumar, S. 2000. Recent development in plant derived antimicrobial constituents : A review. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 22(2/3): 349–405.
- Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., Martinez, J.R. 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1): 93–103.
- Stewart, D. 2005. *The Chemistry of Essential Oils Made Simple: God's Love Manifest Molecules*. Care Publications, Missouri.
- Szumny, A., Figiel, A., Gutiérrez-Ortíz, A., Carbonell-Barrachina, Á.A. 2010. Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 97(2): 253–260.
- Venskutonis, P.R. 1997. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Chemistry*, 59(2): 219–227.

ملخص

التهابات اللبية المستعصية تمثل حالياً مشكل عالمي لأطباء الأسنان. عدد محدود من أنواع الجراثيم يكون مسؤول عادة عن فشل علاج اللبي، على وجه الخصوص المعوية البرازية. في صدد إقتراح محلول لعلاج اللبي جديد، تم تجربة 12 زيت عطري ضد سلالات المعوية البرازية السريرية والمرجعية. وقد أبانت ستة زيوت عطرية *T. capitata*, *O. glandulosum*, *T. lanceolatus*, *A. verticillata*, *C. munbyi*, *L. multifida* من أصل 12 زيت مقترحة عن فعالية معتبرة على المعوية البرازية في كلتا حالاتها الهائمة والبيوفيلمية مع قيم ت.م.أ (تركيز المثبط أدنى)، ت.م.أ.ب (تركيز المثبط أدنى لبيوفيلم) و ت.أ.ب (تركيز أدنى لإزالة البيوفيلم) ممتازة لا تتعدى 0,25%, 0,75% و 3% على التوالي. في المختبر، أظهر المحلول لعلاج اللبي على أساس زيت الطيار *T. lanceolatus* عن فعالية كبيرة على أشرطة الحويمة لمعوية البرازية بتركيز 1,25% لمدة 30 ثانية من الاتصال مقارنة بمحلول *C. munbyi*. وتأكدت هذه النتائج في المعالجة اللبية في الجسم الحي، حيث كان محلول العلاج اللبي مصاغ على أساس 1% من الزيت الطيار *T. lanceolatus* الأكثر نشاطاً.

الكلمات الدالة: زيوت الطيارة، التهابات اللبية المستعصية، المعوية البرازية، محلول لعلاج اللبي.

Titre : Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur *Enterococcus faecalis* responsable d'infections d'origine dentaire.

Résumé

Les infections des racines dentaires persistantes se présentent actuellement comme un problème mondial pour les chirurgiens-dentistes. Seul un nombre limité d'espèces microbiennes sont souvent responsables des échecs endodontiques, dont *E. faecalis* est l'agent étiologique. Dans le but de la proposition des solutions d'irrigation alternatives à base d'huiles essentielles face aux infections endodontiques persistantes, 12 huiles essentielles ont été évaluées vis-à-vis des souches d'*E. faecalis* cliniques et de référence. Six HEs parmi les 12 étudiées ont montré une forte activité antimicrobienne envers *E. faecalis* sous forme planctonique et biofilm, notamment celles de *T. capitata*, *O. glandulosum*, *T. lanceolatus*, *A. verticillata*, *C. munbyi* et *L. multifida* avec des CMIs, CMIBs et CMEBs intéressantes qui ne dépassent pas 0,25%, 0,75% et 3%, respectivement. L'effet *in vitro* de la solution d'irrigation formulée à base d'HE de *Thymus lanceolatus* a montré une bonne éradication du biofilm d'*E. faecalis* par rapport à celle de *C. munbyi* avec seulement 1,25% pendant 30 secondes de contact. Alors *in vivo*, une totale désinfection des racines dentaire a été obtenue en appliquant seulement la solution d'irrigation à base de l'huile essentielle de *T. lanceolatus* à 1%.

Mots-clés: huiles essentielles; infections des racines dentaires persistantes; *Enterococcus faecalis*; solution d'irrigation.

Title: Effects of some plants essential oils on *Enterococcus faecalis* responsible for infections from dental origin.

Abstract

Persistent endodontic infections are among global problems in dentistry. Only some pathogens are responsible for endodontic treatment failure, in which *E. faecalis* is the etiological agent. In order to propose alternative irrigation solutions against persistent endodontic infections, 12 essential oils were evaluated towards clinical and reference stains of *E. faecalis*. Among studied essential oils, six oils have showed high antimicrobial activity against *E. faecalis* at planktonic and biofilm state, especially those of *T. capitata*, *O. glandulosum*, *T. lanceolatus*, *A. verticillata*, *C. munbyi*, and *L. multifida* with interesting MICs, MBICs and MBECs values, which doesn't exceed 0,25%, 0,75% and 3%, respectively. The *Thymus lanceolatus* irrigation solution has showed a good eradication *in vitro* against *E. faecalis* biofilm with only 1.25% for 30 seconds of contact, compared to solution of *C. munbyi* essential oil. However *in vivo*, a total disinfection of dental roots was obtained by irrigation solution based on *T. lanceolatus* at 1%.

Keywords: essential oils; persistent endodontic infections; *Enterococcus faecalis*; irrigation solution.