

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le 08 juillet 2014
Par Mademoiselle Vanessa CHEMAM**

**Un nouveau produit d'origine naturelle à activité antibactérienne à
spectre large**

Membres du jury :

Président : Neut Christel, Maître de Conférences Universitaire, Lille II

Assesseur(s) : Rivière Céline, Maître de Conférences Universitaire, Lille II

Membre(s) extérieur(s) : Tesse Nicolas, Docteur en Pharmacie



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Patrick PELAYO Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Monique CAPRON Professeur Salem KACET Madame Stéphanie DAMAREY Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Edouard DANJOU
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Damien CUNY
Assesseurs :	Mme Nadine ROGER Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs :	Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIÈRE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie

Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique

M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)
----	--------	-------	------------------------------

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique

M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)
----	---------	---------	--------------------------

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2

Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
------	-----	--------	-------------

Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Christel NEUT : merci d'avoir accepté de me suivre tout au long de ce travail. Merci pour votre disponibilité enviabile par tout autre étudiant, vos encouragements, votre implication et votre chaleur humaine. Merci d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie également Céline RIVIERE et Nicolas TESSE de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie des membres du jury.

Merci à Séverine MAHIEUX pour avoir consacré du temps pour moi : aussi bien les démonstrations à la paillasse que la transmission des résultats du laboratoire.

Merci à Gwenaëlle ROGER pour sa sympathie au secrétariat et à tous les autres qui m'ont aidée de près ou de loin.

Merci à mes deux amies Louise CARTON et Charlotte CORDIER (je précise à Charlotte que c'est dans l'ordre alphabétique !) pour leur préoccupation -quasi continue- quant à ma motivation à avancer dans la thèse.

Merci à ma maman, Anne-Marie ROBAK, qui a su trouver les mots pour que je termine ce travail.

Un grand merci tout particulièrement à Guillaume LETIZIA : merci pour m'avoir supportée durant toutes ces années sans thèse (je sais que c'était difficile !). Merci pour les réveils très matinaux pour la relecture et le souci du travail bien fait.

SOMMAIRE :

REMERCIEMENTS	7
LISTE DES ABREVIATIONS	10
PREAMBULE	11
INTRODUCTION.....	12
GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES.....	14
DÉFINITION D'UNE HUILE ESSENTIELLE:	14
DEFINITION D'UN CHEMOTYPE :	16
IDENTIFICATION DE L'HUILE ESSENTIELLE	16
MODE D'OBTENTION DE L'HUILE ESSENTIELLE	17
<i>L'expression à froid</i>	17
<i>La distillation à la vapeur d'eau</i>	17
<i>La distillation sèche</i>	18
SPECTRE D'ACTION DES HUILES ESSENTIELLES TESTEES	19
DÉFINITION CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI)	19
PROTOCOLE DU TEST SUR LES HUILES ESSENTIELLES TESTÉES AU SEIN DU LABORATOIRE DE LA FACULTÉ.....	19
L'ACTION ANTIBACTÉRIENNE DES HUILES ESSENTIELLES	22
L'HUILE ESSENTIELLE DANS LES CANNELIERS	24
ETUDE SUR LES MUTANTS RESISTANTS AUX HUILES ESSENTIELLES DE CANNELLES	26
ÉTUDE DE BACTERICIDIE D'HUILES ESSENTIELLES	28
DÉFINITION DE LA BACTÉRICIDIE	28
DÉFINITION DE LA CONCENTRATION MINIMALE BACTÉRICIDE.....	28
PROTOCOLE D'ÉTUDE DE BACTÉRICIDIE SUR LES HUILES ESSENTIELLES DE CANNELLES	28
RESULTATS :	30
DISCUSSION À PROPOS DU POUVOIR ANTISEPTIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE CANNELLES.....	31
<i>Définition d'un antiseptique</i>	31
<i>Discussion à propos du pouvoir antiseptique du mélange d'huiles essentielles de cannelle</i>	31
DETERMINATION DE LA COMPOSITION DE « NOSO1CCC »	32
CINNAMALDEHYDE	34
TRANS-2-METHOXYCINNAMALDEHYDE	35
CINNAMYL ACETATE.....	35
LINALOL	36
B-CARYOPHYLLENE.....	37
CINEOLE.....	38
BENZOATE DE BENZYLE	39
BACTERICIDIE DU COMPOSE « NOSO1CC »	40
PROTOCOLE	40
RESULTATS :	41
TESTS DE CROISSANCE BACTERIENNE SUITE A L'EXPOSITION A NOSO1CC.....	46
LES EFFETS PERSISTANTS	46
<i>L'effet à concentration subinhibitrice</i>	46
<i>L'effet post-antibiotique direct</i>	46
<i>L'effet de sensibilisation aux leucocytes (observable in vivo uniquement)</i>	47
PROTOCOLE D'ÉVALUATION DE L'EFFET DE NOSO1CC A CONCENTRATION SUBINHIBITRICE SUR LES BACTERIES	47
RÉSULTATS DE L'EFFET DE NOSO1CC À CONCENTRATION SUBINHIBITRICE SUR LES BACTÉRIES	48
PROTOCOLE DE DÉTERMINATION DE L'EFFET POST-ANTIBIOTIQUE DE NOSO1CC SUR LES BACTÉRIES.....	51
RÉSULTATS DE L'EFFET POST-ANTIBIOTIQUE DE NOSO1CC SUR LES BACTÉRIES.....	53
<i>Gram (+)</i>	53
<i>Gram (-)</i>	54
ETUDE SUR L'ASSOCIATION DE NOSO1CC AVEC DES ANTIBIOTIQUES	55
OBJECTIFS DE CETTE ETUDE	55

<i>Synergie</i>	55
<i>Antagonisme</i>	55
<i>Addition</i>	55
<i>Indifférence</i>	55
FRACTIONAL INHIBITORY CONCENTRATION	56
PROTOCOLE	56
RESULTATS	58
TEST DE CROISSANCE BACTERIENNE APRES CONTACT AVEC NOSO1CC A 37°C ET A 4°C... 61	
PROTOCOLE	61
RESULTATS	62
HYPOTHESES SUR LE MECANISME D’ACTION DU CINNAMALDEHYDE 64	
RAPPEL SUR LA MULTIPLICATION BACTERIENNE :	64
RAPPEL SUR LES ATPASES MEMBRANAIRES	67
RAPPEL SUR LES DECARBOXYLASES.....	70
RAPPEL SUR LE QUORUM SENSING.....	70
TESTS EFFECTUES A INSTITUT POLYTECHNIQUE DE LYON :	78
CONNAISSANCES ACTUELLES A PROPOS DE LA TOXICITE DU CINNAMALDEHYDE..... 80	
ETUDES SUR L’ANIMAL	80
<i>Administration par voie orale</i>	80
• Administration du cinnamaldéhyde par voie orale chez le rat.....	80
• Administration du cinnamaldéhyde par voie orale chez le cobaye.....	85
<i>Administration du cinnamaldéhyde par voie cutanée chez le lapin</i>	85
<i>Etudes de sensibilisation allergique immunologique</i>	85
<i>Etudes de phototoxicité</i>	85
<i>Administration du cinnamaldéhyde par voie intrapéritonéale</i>	87
<i>Administration du cinnamaldéhyde par inhalation</i>	87
<i>Administration du cinnamaldéhyde par voie intraveineuse</i>	87
<i>Administration du cinnamaldéhyde par voie oculaire</i>	87
<i>Effets tératogènes et fœtotoxiques</i>	88
<i>Génotoxicité et mutagénèse</i>	89
• Mutations géniques	89
• Mutations chromosomiques	90
• Cancérogénèse	93
ADMINISTRATION DU CINNAMALDEHYDE CHEZ L’HOMME	94
<i>Voie cutanée</i>	94
• Réactions d’irritations.....	94
• Allergies.....	95
PHARMACOCINETIQUE DU CINNAMALDEHYDE..... 98	
METABOLISME.....	98
<i>La voie de la conjugaison au glutathion</i>	99
<i>La voie de la β-oxydation</i>	100
INHIBITION ET INDUCTION ENZYMATIQUE.....	104
LA MISE SUR LE MARCHE D’UN MEDICAMENT 105	
DISCUSSION 108	
CONCLUSION 114	
ANNEXES 116	
TABLE DES ILLUSTRATIONS : FIGURES..... 164	
TABLE DES ILLUSTRATIONS : TABLEAUX 167	
BIBLIOGRAPHIE..... 168	

Liste des abréviations

A : Adénine
ADN : Adénosine DiPhosphate
AHL : Acyl Homosérine Lactone
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ATP : Adénosine TriPhosphate
C : Cytosine
CMB : Concentration Minimale Bactéricide
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
COMBACTE: Combatting Bacterial Resistance in Europe
Da : Dalton
DL50 : Dose Létale 50
EMA: European Medicines Agency
FIC: Fractional Inhibitory Concentration
G: Guanine
GTP: Guanine TriPhosphate
HE : Huile Essentielle
IM : Intra Musculaire
IV : Intra Veineux
J : Jour
NAOEL : No Observable Adverse Effect Level
PO : *Per Os*
SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline
T : Tyrosine
UFC : Unité Formant Colonie
UVA : Ultra Violet A

Préambule

Les travaux qui ont été réalisés au laboratoire de la faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille II ont été initiés à la demande de Nicolas Tesse, président de la société SEPTÉOS.

L'ensemble des résultats des travaux présentés ici - sauf indication bibliographique - appartiennent à la société SEPTÉOS.

SEPTÉOS est une société perfectionnée dans la recherche et le développement en biotechnologie.

Un brevet a d'ailleurs été déposé par cette société :
« Composition comprenant au moins du trans- cinnamaldéhyde et son utilisation dans le traitement des infections bactériennes plus particulièrement dans le traitement des maladies nosocomiales »

La présente invention concerne une composition, notamment anti-bactérienne, comprenant du trans-cinnamaldéhyde, une composition pharmaceutique comprenant du trans-cinnamaldéhyde pour le traitement ou la prophylaxie, notamment d'une maladie nosocomiale, en particulier provoquée par une bactérie résistante aux antibactériens, l'utilisation de trans-cinnamaldéhyde en tant qu'agent anti-bactérien et un procédé de préparation d'une surface comprenant l'application d'une composition selon l'invention.

Les droits de propriété industrielle de « Noso1CC » appartiennent à SEPTÉOS.

Contact :

12 AVENUE DE LA GRANDE ARMÉE

BATIMENT B

75017 Paris 17ème Arrondissement

Introduction

L'arrivée des antibiotiques, dans les années 1940, a été un bouleversement : c'était un traitement curatif dont l'effet fut facilement observable par tous : il augmentait la survie. Par exemple, le taux de mortalité de la tuberculose, véritable fléau, a été divisé par cinq entre 1941 et 1955.(1)

« Pourquoi le médecin ne m'a-t-il pas mis d'antibiotiques !? » Voici une question qui m'est régulièrement posée au comptoir. Les antibiotiques apparaissent chez beaucoup de patients comme le traitement *vraiment* efficace.



(2)

Cet article de presse adressé au grand public s'inquiète ici de l'avenir des antibiotiques. Ils ont été et sont encore très largement prescrits. La résistance bactérienne augmente et préoccupe, d'autant plus que le nombre d'alternatives diminue de plus en plus.

Entre les années 2000 et 2012, « *le nombre de substances antibiotiques (à usage systémique, seules ou en association) disponibles en France a diminué de 18 %, passant de 103 à 84. Ce solde négatif résulte de l'arrêt de commercialisation de 28 substances, alors que seules neuf nouvelles substances (ou associations de substances) ont été commercialisées.*»(3)

« *À l'heure actuelle, très peu de nouveaux antibiotiques sont en cours de développement. Sans la mise au point de nouveaux traitements efficaces, mais avec une aggravation du phénomène de résistance, la société pourrait retrouver les conditions qui prévalaient avant les antibiotiques, quand une infection pulmonaire simple pouvait tuer un enfant, ou quand les médecins étaient impuissants devant les cas de méningite.* »(4)

Il est clair que l'absence de nouvelles molécules antibiotiques est devenue un problème et risque de conduire les médecins dans une impasse thérapeutique pour certaines bactéries. Devant ce constat, les pouvoirs publics sont passés à l'action :

- L'ANSM a prévu de promouvoir la recherche socio-médico-économique en s'associant « *aux travaux conduits pour mieux identifier les déterminants de la prescription et de la consommation d'antibiotiques* ». (5)

- IMI (Innovative Medicines Initiative) est un programme européen de partenariat public-privé. Il a lancé un projet (COMBACTE) qui a pour objectif de faciliter l'enregistrement des nouveaux agents antibactériens.

Dans ce contexte, mon travail a consisté à exposer les recherches effectuées au laboratoire de bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Lille 2, dans le cadre d'une prestation pour la société SEPT EOS, à propos d'un nouveau produit d'origine naturelle aux propriétés antibiotiques.

J'ai ainsi relaté, par ordre chronologique, la découverte de ce produit et les différents tests ayant été réalisés dessus.

Généralités sur les huiles essentielles

Définition d'une huile essentielle:

« *Huile essentielle, ou volatile, obtenue par distillation de substances aromatiques contenues dans diverses plantes* »(6)

Trois mots sont importants ici :

- volatile : explique le caractère odorant de l'huile essentielle. C'est un critère de distinction avec les huiles végétales.

- Distillation : le procédé le plus utilisé en vue de l'obtention d'une huile essentielle est la distillation à la vapeur d'eau.

La définition du « Petit Robert » est incomplète. Les huiles essentielles provenant du genre « *Citrus* » sont obtenues par expression à froid. Elles ne subissent pas le procédé de distillation.

- Diverses : seules 10% des plantes peuvent synthétiser de l'huile essentielle.

La pharmacopée européenne nous offre une définition plus complète(7):

Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. Les huiles essentielles peuvent subir un traitement ultérieur approprié. Elles peuvent être commercialement dénommées comme étant déterpénée, désesquiterpénée, rectifiée ou privée de « x ».

– L'*huile essentielle déterpénée* est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures monoterpéniques.

– L'*huile essentielle déterpénée et désesquiterpénée* est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques.

- L'*huile essentielle rectifiée* est une huile essentielle qui a subi une distillation fractionnée dans le but de supprimer certains constituants ou d'en modifier la teneur.
- L'*huile essentielle privée de « x »* est une huile essentielle qui a subi une élimination partielle ou complète d'un ou de plusieurs constituants.

Le but du traitement de l'huile essentielle est l'élimination d'un composé toxique.

Pour être conforme à la pharmacopée, une huile essentielle doit subir quatre essais généraux :

- Densité ;
- Indice de réfraction ;
- Angle de rotation optique ;
- Huile grasses et huiles essentielles résinifiées.

Si nécessaire, elle subit également des tests qui mettent en évidence :

- Point de solidification ;
- Indice d'acide ;
- Indice de peroxyde ;
- Esters étrangers ;
- Résidu d'évaporation ;
- Eau dans les huiles essentielles ;
- Solubilité dans l'alcool ;
- Falsification (chromatographie sur couche mince, ou en phase gazeuse).

La pharmacopée donne des règles strictes d'étiquetage. L'étiquette indique obligatoirement le nom scientifique de la matière première végétale utilisée.

Dans les cas appropriés, elle indique le type d'huile essentielle et/ou le chémotype ; certaines plantes possèdent au minimum deux huiles de composition biochimique différente selon l'organe utilisé lors de l'extraction.

C'est le cas de la cannelle (*Cinnamomum verum*). [Tableau 1]

Partie de la plante	Concentration de l'eugéno1	Concentration du cinnamaldéhyde
Feuille	70-85%	Au maximum 3%
Ecorce	Au maximum 7,5 %	55-75%

Tableau 1 : Concentration en eugéno1 et en cinnamaldéhyde dans l'huile essentielle de *Cinnamomum verum* selon une extraction de la feuille ou de l'écorce.

L'huile essentielle est un métabolite tertiaire produit dans des structures spécialisées de la plante.(8)

La conservation des huiles essentielles se fait dans un récipient étanche, bien rempli, à l'abri de la lumière.

Définition d'un chémotype :

Type d'extrait avec une composition comportant une molécule dont la variation de concentration révèle les propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle considérée.

Selon le chémotype de la plante, on trouvera une grande variation dans la composition de l'huile essentielle.

Pour une même espèce (par exemple *Cinnamomum osmophloeum*) et pour une même partie distillée (par exemple les feuilles), on peut observer une absence totale de cinnamaldéhyde ou une concentration de 73 % selon la **provenance** de l'huile essentielle de cannelle.

Certains autres composés varient de façon identique : le linalool (0,07 % à 96 %), le bêta-caryophyllène (absence à 4%), l'acétate de cinnamyle (0,59 % à 41 %).(9)

Identification de l'huile essentielle

Selon la pharmacopée, les huiles essentielles sont identifiées par leur profil chromatographique en phase gazeuse ou, à défaut, par tout autre essai éventuellement requis. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation des composants de l'huile essentielle.

La CPG permet de :

- vérifier l'identité de la plante qui fournit l'huile essentielle.

- Vérifier la **qualité** de l'huile essentielle obtenue. La durée de distillation influe sur la qualité de l'huile essentielle obtenue : les molécules lourdes mettent jusqu'à 24 heures pour être distillées.

Certains distillateurs préfèrent stopper la distillation au bout d'une heure pour augmenter la rentabilité.

- Vérifier le **chénotype** obtenu. Le chénotype précise la molécule biochimiquement active.
- Vérifier l'**absence de falsification** (plantes en mélange).

Des labels ont été créés pour garantir la qualité de l'huile essentielle :

- AB: L'huile essentielle provient de l'Agriculture Biologique
- HEBBD: Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie
- HECT: Huile essentielle chénotypée.

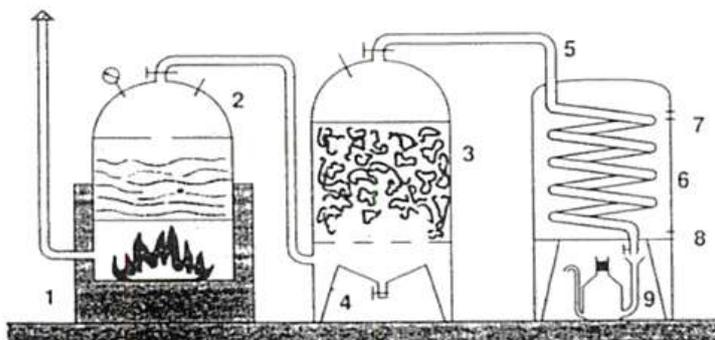
Mode d'obtention de l'huile essentielle

Les huiles essentielles peuvent être obtenues par divers moyens (7) (10) :

L'expression à froid

Cette méthode consiste à faire éclater les poches à essence par un procédé mécanique sans chauffage. L'huile essentielle est récoltée à l'aide d'une éponge qu'on comprime.

La distillation à la vapeur d'eau



1. Foyer - 2. Chaudière - 3. Vase à fleurs - 4. Vidange de condensation - 5. Col de cygne - 6. Réfrigérant avec serpentins 7. Sortie eau chaude - 8. Arrivée eau froide - 9. Essencier servant à la décantation de l'HE et de l'hydrolat.

Figure 1 : Appareil de distillation des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau (11)

Spectre d'action des huiles essentielles testées

Une étude réalisée au laboratoire de microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Lille 2 a permis de trouver la composition optimale d'un mélange antibactérien synthétique le plus proche possible d'un mélange d'huiles essentielles.

Pour procéder au « premier » screening, une étude bibliographique a été réalisée par la société SEPTEOS. Elle a mis en évidence 53 huiles essentielles ayant un potentiel pouvoir antibactérien. [Annexe 1 page 116]

Pour procéder au « second » screening, le laboratoire a mis au point une méthode de solubilisation en phase aqueuse pour permettre une bonne accessibilité aux bactéries.

La solubilisation est de type micellaire, le surfactant (Tween® 80) et l'adjuvant (propylène glycol) utilisés ont été testés pour vérifier qu'ils ne possédaient pas d'activité inhibitrice sur la croissance des souches aux concentrations utilisées.

Le laboratoire a ensuite évalué les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles seules.

Définition Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration pour laquelle on observe *in vitro* l'absence de toute culture visible.

Protocole du test sur les huiles essentielles testées au sein du laboratoire de la Faculté

Les souches des bactéries utilisées lors de ces tests étaient variées et quelques unes étaient multirésistantes aux antibiotiques. [Annexe 2 page 117]

La détermination de la CMI était mesurée de la manière suivante (technique de dilution en gélose) :

- Préparation des inocula pour obtenir une suspension de bactéries à 10^6 UFC/ml.

- Préparation des boîtes de Pétri : milieu de culture des souches bactériennes testées, ces boîtes étaient composées d'une gélose Mueller Hinton renfermant une concentration variable en huile essentielle (0,03 à 1%). [Figure 4]
- Inoculation à l'aide d'un Steers [Figure 3]: les boîtes de Pétri contiennent un milieu homogène strictement identique pour chaque souche testée.



Figure 3 : Photo d'un appareil de Steers (par Séverine Mahieux)

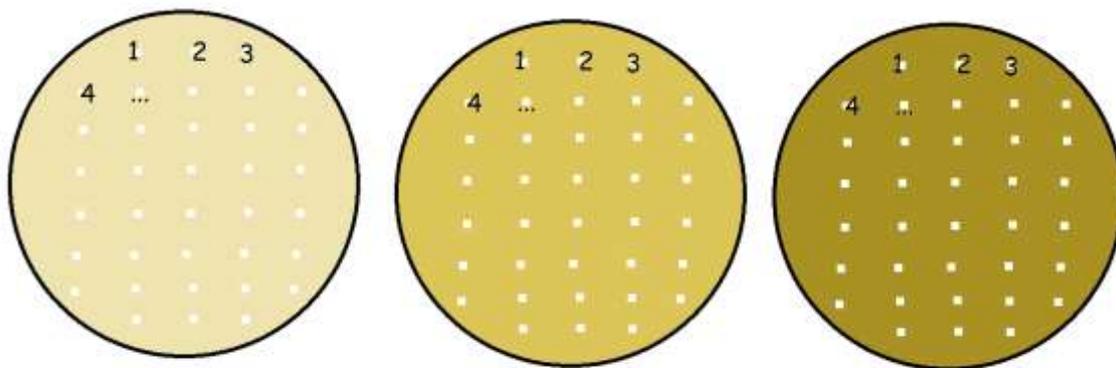


Figure 4 : Exemple de boîtes de Petri partant en incubation : dans chaque boîte on retrouve une concentration donnée en huile essentielle qui varie selon les boîtes pour des souches à tester inoculées de manière identique dans toutes les boîtes.

- Incubation à 37°C pendant 24 heures.
- Détermination de la CMI (0,03%, 0,06%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% ou >1%) pour chaque huile essentielle testée.

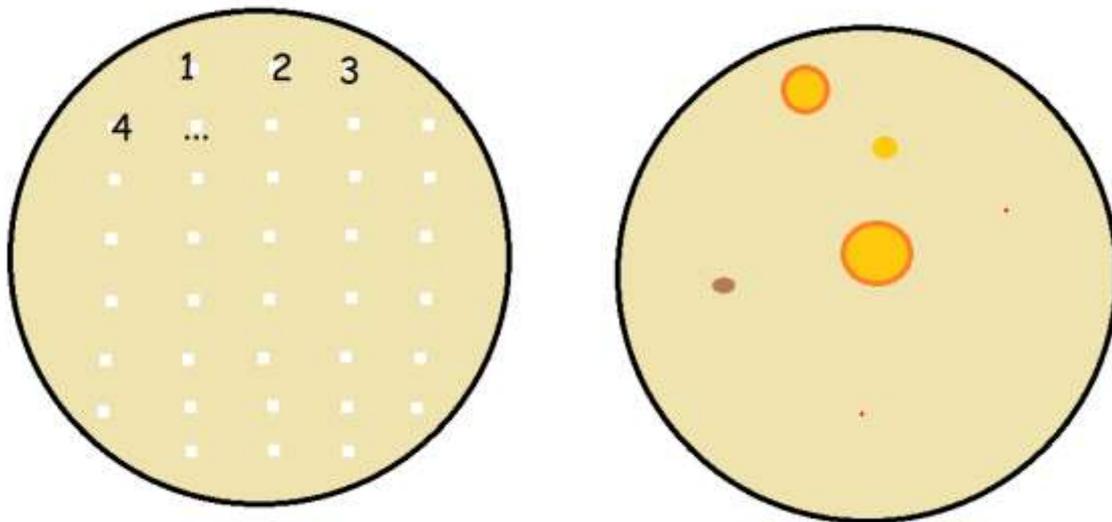


Figure 5 : Représentation d'une boîte de Petri avant puis après 24 heures d'incubation

On a observé les souches qui se sont développées dans le milieu.

Les résultats [Annexe 3 page 120] montraient que la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) ainsi que l'huile d'écorce de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) étaient parmi les plus inhibitrices. Toutes deux inhibaient la totalité des souches testées [Tableau 2] à une concentration d'huile essentielle égale à 0,25%.

	Huile essentielle Cannelle de Chine	Huile essentielle Écorce de Cannelle
CMI = 0,03 %	11 souches	2 souches
CMI = 0,06 %	12 souches	21 souches
CMI = 0,125 %	8 souches	7 souches
CMI = 0,25 %	2 souches	3 souches
	TOTAL = 33 souches testées	

Tableau 2 : Répartition du nombre de souches inhibées selon la CMI et selon l'huile essentielle testée

L'action antibactérienne des huiles essentielles

Une étude a confirmé les résultats du laboratoire de la faculté. Elle présentait l'action bactéricide et bactériostatique de treize huiles essentielles parmi (12) :

- écorce de *Cinnamomum verum* (cannelle) *
 - feuilles de *Cinnamomum verum* (cannelle) *
 - *Cymbopogon citratus* (citronnelle) *
 - *Cymbopogon martinii* (palmarosa) *
 - *Eugenia caryophyllus* (ail) *
 - *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) *
 - *Lavendula angustifolia* (lavande) *
 - *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé) *
 - *Melaleuca cajuputi* (cajeput)
 - *Origanum compactum* (origan) *
 - *Thymus satureoides* (thym)
 - *Citrus sinensis* (orange)
 - *Tachyspermum ammi* (ajowan)
- * Huiles testées au laboratoire de notre Faculté.

Celle-ci a démontré que l'huile essentielle d'écorce de cannelle avait le potentiel antibactérien le plus élevé.

Les CMI de l'huile essentielle issue de l'écorce sont plus basses que celles issues de la feuille sur les souches testées. [Tableau 3]

	<i>Cinnamomum verum</i> , écorce	<i>Cinnamomum verum</i> , feuille
Souche testée	CMI +/- écart type	CMI +/- écart type
<i>Escherichia coli</i>	0,07 +/- 0,03	0,5 +/- 0,15
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,1 +/- 0,04	0,47 +/- 0,16
<i>Salmonella</i>	0,08 +/- 0	0,47 +/- 0,16
<i>Citrobacter</i>	0,01 +/- 0,04	0,47 +/- 0,16
<i>Hafnia alvei</i>	0,08 +/- 0	0,47 +/- 0,16
<i>Vibrio cholerae</i>	0,06 +/- 0,02	0,47 +/- 0,16
<i>Klebsiella</i>	0,1 +/- 0,04	0,47 +/- 0,16
<i>Pasteurella multocida</i>	0,04 +/- 0,01	0,31 +/- 0
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0,08 +/- 0	0,47 +/- 0,16
<i>Actinetobacter baumanni</i>	0,08 +/- 0	0,58 +/- 0,1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,07 +/- 0,02	0,47 +/- 0,16
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,03 +/- 0,01	0,35 +/- 0,17
<i>Branhamella catarrhalis</i>	0,03 +/- 0,01	1,25 +/- 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,24 +/- 0,08	>10 +/- 0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1 +/- 0,03	0,48 +/- 0,15
<i>Staphylococci (coagulase -)</i>	0,08 +/- 0,03	0,7 +/- 0,25
<i>Streptococci</i>	0,06 +/- 0,04	0,58 +/- 0,24
<i>Enterococci</i>	0,16 +/- 0	1,15 +/- 0,23
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,08 +/- 0	1,25 +/- 0
<i>Corynebacterium</i>	0,09 +/- 0,04	0,78 +/- 0,27

Tableau 3 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) en % (v/v) des huiles essentielles de *Cinnamomum verum* selon la provenance : écorce ou feuille (12)

Cette étude présentait les principaux composants des huiles essentielles. Le composant majoritaire de l'huile essentielle d'écorce de cannelle est le **cinnamaldéhyde**. Il est présent à 68,8% alors qu'il est absent dans l'huile essentielle de feuille de cannelle.

Le composant majoritaire de l'huile essentielle de feuille de cannelle est l'eugéno1. Il est présent à 65,3% contre 6,96% dans l'huile essentielle d'écorce de cannelle.

L'huile essentielle dans les canneliers

Les cannelles sont des plantes médicinales utilisées traditionnellement en allopathie et en homéopathie. La pharmacopée française décrit deux canneliers(13) :

- Cannelier de Ceylan

Cinnamomum zeylanicum Nees

La partie utilisée est l'écorce de tige raclée qu'on appelle la cannelle de Ceylan.

- Cannelier de Chine

Cinnamomum aromaticum Nees, *C. cassia* Nees ex Blume.

La partie utilisée est l'écorce de tige qu'on appelle la cannelle de Chine.

La pharmacopée européenne introduit dans la définition de la cannelle de Ceylan une notion de **teneur minimale** en huile essentielle.

L'efficacité de la cannelle est donc dépendante de la présence d'huile essentielle.

La pharmacopée européenne décrit **trois** monographies différentes d'huile essentielle de cannelle :

- Huile essentielle de cannelle dite de Ceylan, *Cinnamomi zeylanicii corticis aetheroleum* (provenant de l'écorce des jeunes tiges de la plante).

- Huile essentielle de cannelle dite de Ceylan, *Cinnamomi zeylanici folii aetheroleum* (provenant des feuilles de la plante).

- Huile essentielle de cannelier, *Cinnamomum cassia* Blume (*C. aromaticum* Nees), provenant des feuilles et jeunes rameaux de la plante.

Selon les différentes variétés décrites, la concentration des molécules composant l'huile essentielle varie. [Tableau 4]

Molécules et concentrations des huiles essentielles de cannelle de la pharmacopée européenne			
	Huile essentielle de cannelle de Ceylan - écorce -	Huile essentielle de cannelle de Ceylan - feuille -	Huile essentielle de cannelle de Chine
cinéole	maximum 3 %	maximum 1 %	
linalol	1,0 à 6,0 %	1,5 à 3,5 %	
β-caryophyllène	1,0 à 4,0 %	1,5 à 7,0 %	
safrole	maximum 0,5 %	maximum 3,0 %	
aldéhyde trans-cinnamique	55 à 75 %	maximum 3,0 %	70 à 90 %
eugéno1	maximum 7,5 %	70 à 85 %	maximum 0,5 %
coumarine	maximum 0,5 %	maximum 1 %	1,5 à 4,0 %
trans-2-méthoxycinnamaldéhyde	0,1 à 1,0 %		3,0 à 15 %
benzoate de benzyle	maximum 1,0 %		
acétate de cinnamyle		maximum 2,0 %	1,0 à 6,0 %

Tableau 4 : Concentration de quelques molécules dans l'huile essentielle de cannelle selon la variété du cannelier (7)

Le laboratoire a ensuite évalué l'activité antibactérienne (CMI) des huiles essentielles en association. L'association a été faite à parts égales dans un premier temps : 50% de l'huile essentielle A associée à 50% de l'huile essentielle B. L'effet recherché était la synergie. L'association la plus efficace était ici l'HE de cannelle de Chine + l'écorce de cannelle (*Cinnamomum cassia* et *Cinnamomum zeylanicum*). La CMI pour la totalité des souches variait de 0,03 % (29 souches) à 0,06% (4 souches).

Des tests de CMI ont été effectués avec cette fois une proportion variable d'huile essentielle de cannelle de Chine et d'huile essentielle d'écorce de cannelle afin de déterminer les concentrations optimales pour obtenir une synergie. L'association cannelle de Chine à 50 % et d'écorce de cannelle à 50% a conduit aux CMI les plus basses. [Annexe 4 et Annexe 5 pages 121 et 122]

Etude sur les mutants résistants aux huiles essentielles de cannelles

Une étude sur un nouvel antibiotique implique de connaître son potentiel à sélectionner des mutants résistants.

"L'apparition de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques et leur diffusion dans les populations humaines constituent un problème majeur en infectiologie.

La perspective de découvrir de nouvelles classes d'antibiotiques étant réduite, ce phénomène préoccupe les pouvoirs publics qui ont donné pour objectif à la loi de santé publique de maîtriser la progression de ces résistances. La mise en place d'un plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques en 2001, suivi d'une seconde phase pour 2007-2010, a permis de prendre en compte, en ville et à l'hôpital, les questions posées par la lutte contre les résistances bactériennes et d'engager une réflexion sur les modalités de calcul des consommations d'antibiotiques. Parmi les objectifs du plan 2005-2008 de lutte contre les infections nosocomiales, figure également la maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé."
(14)

La CMI définit la sensibilité des souches majoritaires sauvages. L'expérience suivante a cherché à sélectionner des mutants résistants.

La détermination de la CMI s'est faite avec une suspension de bactéries concentrées à 10^6 UFC/ml.

Cet inoculum réduisait la probabilité de retrouver dans l'échantillon des mutants spontanés.

Un inoculum de 10^{10} UFC/ml contient ainsi plus de bactéries porteuses d'un mécanisme de résistance à l'huile essentielle testée.

Lors de l'exposition à des concentrations équivalentes à quatre fois la CMI, les bactéries les plus sensibles sont incapables de croître. L'inoculum à 10^{10} UFC/ml contient

potentiellement des mutants résistants qui pousseront malgré la CMI élevée.(15)

L'expérience consistait à mettre en culture 100 µL d'un inoculum à 10^{10} UFC/ml sur une gélose concentrée à quatre fois la CMI en HE.

Les résultats étaient lisibles au bout de 48h d'incubation à 37°C. Le nombre de colonies ayant crû dans ces conditions était dénombré.

A la lecture des résultats, **aucun mutant** n'a été mis en évidence pour les huiles essentielles de cannelle de Chine ainsi que pour le mélange des deux cannelles.

A titre de comparaison, la rifampicine possède un taux de mutation d'un staphylocoque doré ou d'un méningocoque **sur 10^7** . Ce taux élevé nécessite l'association avec d'autres antibiotiques.¹

¹ (16) (Page 233)

Étude de bactéricidie d'huiles essentielles

La bactéricidie des huiles essentielles les plus intéressantes a été évaluée.

Définition de la bactéricidie

Destruction des bactéries.

Pour apprécier la bactéricidie, on mesure le nombre de bactéries en contact avec un antibiotique au temps 0, puis après un temps d'incubation donné. Ce nombre doit être inférieur à celui déterminé au temps 0 : la bactéricidie est *au moins* un arrêt de la croissance.

Les bactéries sont cultivées, puis comptées selon le pourcentage de survivantes.(17) La mortalité est quantifiable en terme de CMB (Concentration Minimale Bactéricide) en mg/L.

Définition de la Concentration Minimale Bactéricide

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle l'effet bactéricide souhaité est de 99,99 % (soit 0,01% de survivants), les conditions de culture étant standardisées. Sa détermination consiste à mesurer les bactéries survivantes (%) dans les tubes sans croissance visible et à comparer semi-quantitativement à la gamme témoin obtenue au temps 0 par dilution de base 10.

Protocole d'étude de bactéricidie sur les huiles essentielles de cannelles

L'étude en cinétique de la bactéricidie s'est faite de manière suivante :

Dénombrement des bactéries survivantes après 0, 15, 30, 45 et 60 minutes de contact entre l'huile essentielle et la souche bactérienne :

- Préparation de la solution mère : suspension d'huile essentielle à 10 % (dans Tween® 80 et propylène glycol), dix fois supérieure à la concentration finale souhaitée, du fait

d'une dilution au dixième dans le milieu réactionnel. Ceci correspondait à une concentration sérique souhaitée de 100 mg/L. A titre d'exemple, voici les concentrations sériques maximales de certains antibiotiques² [Tableau 5]:

Antibiotique	Concentration sérique maximale (mg/L)	Dose et voie d'administration
Amoxicilline trihydrate	7 à 10	500 mg PO
Ceftriaxone	80	1 g IM
	> 168	1 g IV
Cefotaxime	24	1 g IM
	> 100	1 g IV

Tableau 5 : Concentration sériques maximales observées après administration d'une dose d'antibiotique (16)

- Préparation de l'inoculum pour obtenir une suspension bactérienne de 10^7 UFC/ml (bactéries dans Ringer Cystéiné).
 - Mélange des deux préparations ; la concentration finale de l'huile était de 1%.
 - Une fois le temps de contact écoulé, un neutralisant (« Neutralizing broth for neutralizing and testing disinfectants and antiseptics » de Dey et Engley, commercialisé chez Criterion) était ajouté ce qui bloquait l'action antibactérienne de l'huile.
- Une dilution au dixième, centième, millième et dix-millième était effectuée pour un dénombrement correct des UFC vivantes restantes.
- L'absence de pouvoir bactéricide de l'huile essentielle en association avec le neutralisant était vérifiée.
- Dénombrement des bactéries après dilution en Ringer cystéiné et incubation à 37°C pendant 24 heures sur une gélose Mueller Hinton sur des boîtes contenant entre 15 et 150 colonies.

² (16) (Page 58 et 102)

Résultats :

Sous forme de graphique représentant :

- le temps sur l'axe des abscisses (en minutes) ;
- les logarithmes des numérations de bactéries survivantes (en UFC/ml) sur l'axe des ordonnées.

Exemple de résultats obtenus sur une souche *Pseudomonas* :

<i>Pseudomonas</i> 08134	Témoïn	Cannelle de chine	Mélange deux cannelles
T0	$4,1 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^6$
T15	$4,9 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^3$
T30	$2,7 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^3$
T45	$3,7 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^3$
T60	$4,5 \cdot 10^7$	$8,5 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^3$

Tableau 6 : Dénombrement des bactéries selon le temps et selon la présence d'huile essentielle de cannelle

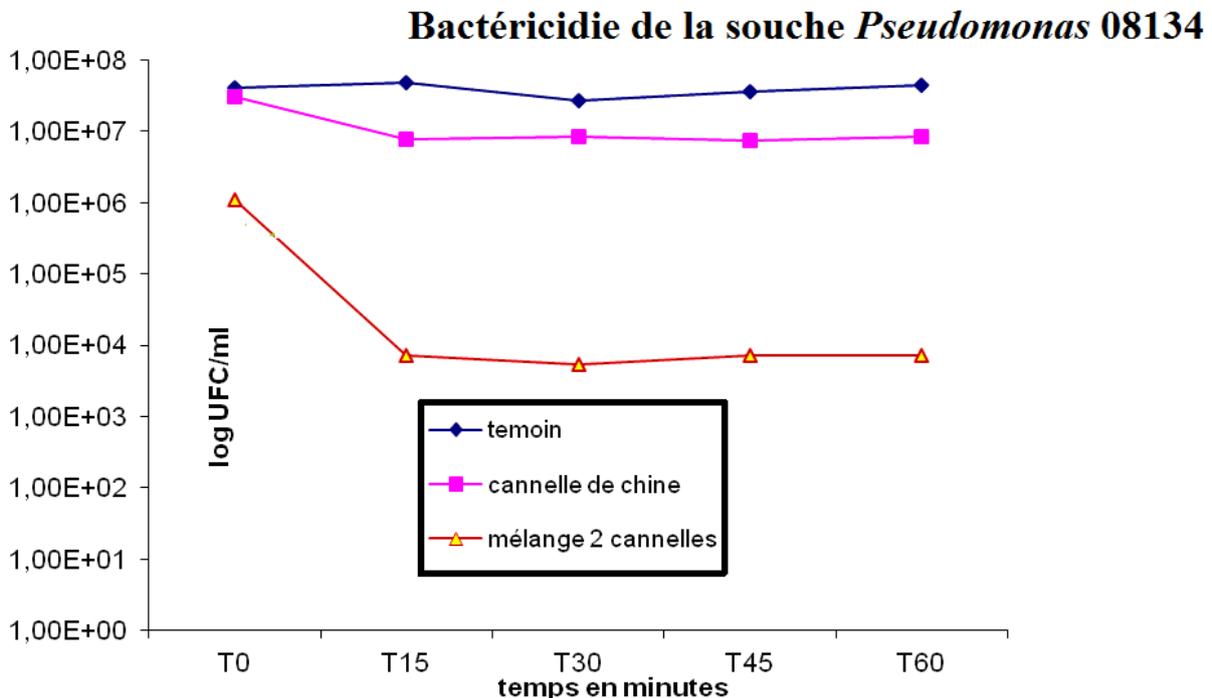


Figure 6 : Dénombrement des bactéries selon le temps et selon la présence d'huile essentielle de cannelle dans le milieu

L'huile essentielle de cannelle de Chine en synergie avec l'huile essentielle d'écorce de cannelle présentait la meilleure activité bactéricide. [Annexe 6 page 123]

Discussion à propos du pouvoir antiseptique des huiles essentielles de cannelles

Définition d'un antiseptique (18)

Produit ou procédé utilisé pour l'antiseptie dans des conditions définies. Si le produit ou le procédé est sélectif (action limitée aux agents fongiques, par exemple), ceci doit être précisé.

Les antiseptiques sont des préparations ayant la propriété d'éliminer, de tuer les microorganismes ou d'inactiver les virus sur des **tissus vivants** (peau saine, muqueuses, plaies) dans la limite de leur tolérance.

En fonction de l'indication, l'inactivation par d'éventuelles "substances interférentes" ainsi que les incompatibilités sont indiquées.

La norme applicable aux antiseptiques bactéricides miscibles à l'eau est NF T-72-152 (EN 1040). *Détail des normes AFNOR disponible à la vente.*

Les souches obligatoires testées sont :

- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*

(N.B. : les souches exactes sont dans la version payante de la norme).

Les conditions d'essais obligatoires sont **cinq minutes à 20°C**. Le résultat obtenu doit être une **diminution de cinq log** de l'inoculum bactérien.(19)

Discussion à propos du pouvoir antiseptique du mélange d'huiles essentielles de cannelle

On ne peut définir ce mélange comme étant un antiseptique :

- Les tests de bactéricidie ont été effectués à T0 puis T15 minutes, l'antiseptie devant être mesurée et atteinte en cinq minutes. On ne pouvait donc pas conclure quant à un effet antiseptique.
- Les tests de bactéricidie ont été effectués pour la plupart sur des souches internes au laboratoire. Pour répondre à la norme AFNOR d'antiseptie, des souches ATCC déterminées dans le texte auraient du être utilisées.

Ici, la bactéricidie était obtenue pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* mais ne l'était pas pour les souches de *Staphylococcus aureus*.

Détermination de la composition de « Nosolccc »

L'activité la plus intéressante a été observée avec le mélange d'huiles essentielles des deux cannelles : écorce de *Cinnamomum zeylanicum* et *Cinnamomum cassia*.

Tout extrait de la nature a une composition qui n'est jamais strictement identique d'un lot à un autre, et l'existence de chémotype est inacceptable pour la reproductibilité des proportions de principes actifs dans le « candidat médicament ». L'huile essentielle de cannelle ne peut bénéficier d'un statut de médicament si sa composition n'est pas reproductible.

À ce stade des études sur les propriétés des huiles essentielles, une formulation de produits de synthèse qui se rapprochait de la composition de notre mélange d'huiles essentielles était obligatoire.

Un mélange synthétique présentait d'autres avantages :

- Présence de composés potentiellement toxiques dans l'huile essentielle (non présents dans le composé synthétique) ;
- Coût réduit : un assemblage de composés synthétiques facilement procurables dans le commerce étant moins cher à produire que de l'huile essentielle.

Le mélange nommé Nosolccc se rapprochait au mieux du mélange testé. [Tableau 7]

	<i>Cinnamomun cassia</i> Cannelle de Chine	<i>Cinnamomum verum</i> Cannelle de Ceylan ECORCE	Noso1cc
Aldéhyde trans-cinnamique	70 à 90 %	55 à 75 %	86,7 %
Trans-2-methoxycinnamaldéhyde	3,0 à 15 %	0,1 à 1,0 %	5,4 %
Acetate de cinnamyle	1,0 à 6,0 %	-	3,0 %
Linalol	-	1,0 à 6,0 %	2,4 %
Bêta-caryophyllène	-	1,0 à 4,0 %	1,7 %
Cinéole	-	Maxi 3 %	1,0 %
Benzoate de benzyle	-	Maxi 1 %	0,3 %

Tableau 7 : Concentration des différents composés de Noso1cc en comparaison avec la concentration contenue dans les huiles essentielles de deux différentes cannelles

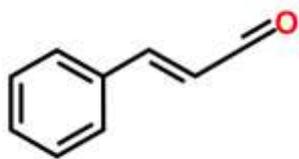
Les CMI ont été déterminées pour chaque composé synthétique du mélange. [Annexe 8 page 162]

L'efficacité du mélange synthétique a été comparée avec les huiles essentielles de cannelles ainsi qu'avec des essences d'écorce de cannelle reconstituée et de cannelle de Chine reconstituée.

Il est apparu que les mélanges synthétiques étaient supérieurs aux mélanges naturels.

Voici en détail les composants du mélange reconstitué :

Cinnamaldéhyde



(20)

Figure 7 : Cinnamaldéhyde

Formule brute : C_9H_8O

Masse atomique : environ 132 Da

Apparence : liquide jaune ayant une odeur de cannelle

Dose létale 50 (administration orale) chez le rat : 2200 mg.kg^{-1}

Synonymes (21) : Cinnamal; Cinnamic aldehyde; Phenylacrolein; 3-Phenylpropenal; 3-Phenyl-2-propen-1-al; 2-Propenal-3-phenyl.

Le cinnamaldéhyde entre dans la composition du TRUE TEST DISP TRANSDERMIQUE®(22), dispositif numéro six.

Classe pharmacothérapeutique : TESTS IMMUNOLOGIQUES, ALLERGENES ET ANTIGENES.

Une réponse positive au dispositif transdermique est une réaction classique d'hypersensibilité retardée (type IV), qui peut apparaître entre 6 et 96 heures après l'exposition. Les signes cliniques d'une réaction d'eczéma de contact sont l'érythème, l'œdème, les papules et les vésicules et un infiltrat inflammatoire dermique palpable au niveau de la zone d'application.

Pour chaque allergène, la concentration a été fixée de manière à être suffisante pour déclencher une réaction, même chez des patients faiblement sensibilisés, mais suffisamment faible pour minimiser les risques de réaction irritante. Le cinnamaldéhyde est présent à **0,034 mg** dans le patch.

Trans-2-methoxycinnamaldehyde (23)

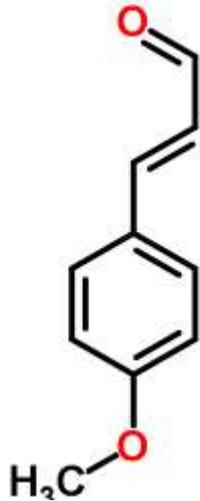


Figure 8 : Trans-2-methoxycinnamaldehyde

Formule brute : C₁₀H₁₀O₂

Masse atomique : environ 162 Da

Apparence : Cristaux blancs jaunâtres avec une odeur épicée fleurie

Cinnamyl acetate (24)

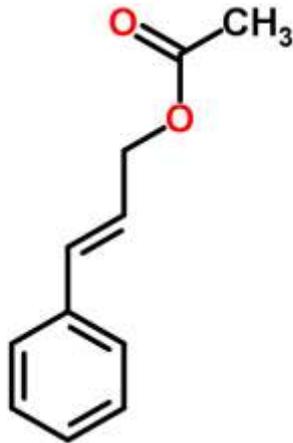


Figure 9 Cinnamyl acetate

Formule brute : C₁₁H₁₂O₂

Masse atomique : environ 176 Da

Apparence : liquide incolore à légèrement jaune. Odeur douce, balsamique, florale

Linalol (25)

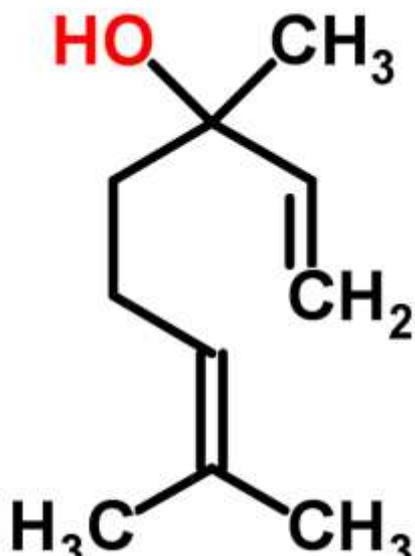


Figure 10 : Linalol

Formule brute : C₁₀H₁₈O

Masse atomique : environ 154 Da

Apparence : Liquide incolore avec une agréable odeur fleurie

Dose létale 50 (administration orale) chez le rat : 2790 mg.kg⁻¹

Dose létale 50 (administration cutanée) chez le rat : 5610 mg.kg⁻¹

Le linalol est une substance active commercialisée dans un médicament (26):

BIOGAZE COMPRESSE 9x12CM ©

Ce médicament est composé d'une compresse en coton de 9 cm x 12 cm imprégnée par 1,45 g de masse d'imprégnation. La compresse contient une substance active composée d'huile essentielle de niaouli et d'huile essentielle reconstituée de thym blanc.

Composition de l'huile essentielle de thym reconstituée :

- . Terpènes extraits de thym : 1,014 g
- . Thymol : 1,950 g
- . Terpinéol : 0,858 g
- . Linalol : 0,078 g

Le linalol est ainsi décrit(27) :

Classe(s) chimique(s) :

- TERPENE CYCLIQUE

Classes pharmacothérapeutiques :

- ANTIBACTERIEN VOIE LOCALE
- ANTISEPTIQUE VOIE LOCALE

β -caryophyllène (28)

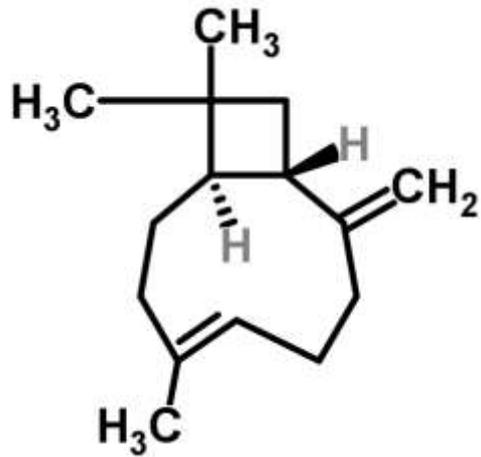


Figure 11 : bêta-caryophyllène

Formule brute: C₁₅H₂₄

Masse atomique: environ 204 Da

Cinéole (29)

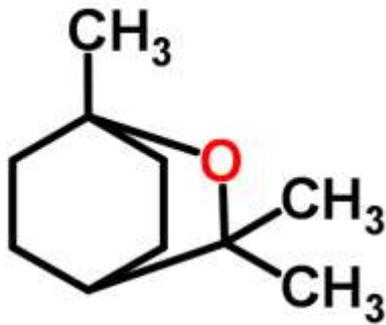


Figure 12 : Cinéole

Formule brute: $C_{10}H_{18}O$

Masse atomique: environ 154 Da

Apparence : Liquide incolore
ayant une odeur de camphre

Dose létale 50 (administration
orale) chez le rat : 2480 mg.kg⁻¹

Synonymes : Le cinéole, cajeputo1 ou encore eucalypto1.

Il est utilisé dans plusieurs médicaments(30):

- BI-QUI-NOL AD SUPPO@
- BI-QUI-NOL ENF SUPPO@
- BRONCHODERMINE AD SUPPO@, BRONCHODERMINE ENF SUPPO@
- BRONCHODERMINE POMMADE TB 60G@
- CALYPTOL INHALANT EMULSION INHAL@
- ESSENCE ALGERIENNE SOL INHAL@
- EUCALYPTINE AD SUPPO@, EUCALYPTINE ENF SUPPO@
- EUCALYPTINE LE BRUN SIROP FL 200ML@
- GLYCO THYMOLINE 55 SOL BUCCALE 250ML@
- PHOLCONES BISMUTH AD SUPPO@
- PHOLCONES BISMUTH ENF SUPPO@
- PULMOFLUIDE SIMPLE SOL BUV FL 180ML@

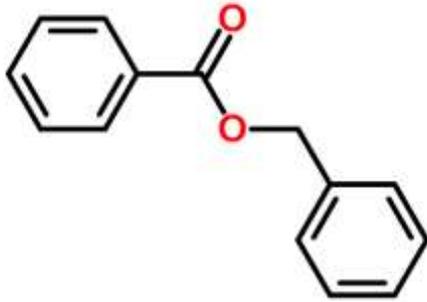
Classes chimiques(31) :

- TERPENE CYCLIQUE

Classes pharmacothérapeutiques :

- ANTIBACTERIEN SYSTEMIQUE
- ANTIBACTERIEN VOIE LOCALE
- ANTISEPTIQUE VOIE GENERALE
- ANTISEPTIQUE VOIE LOCALE

Benzoate de benzyle (32)



Formule brute: $C_{14}H_{12}O_2$

Masse atomique: environ 212 Da

Apparence : Liquide incolore, gras, avec une douce odeur aromatique.

Dose létale 50 (administration orale) chez le rat : 1700 mg.kg^{-1}

Figure 13 : Benzoate de benzyle

Le benzoate de benzyle est commercialisé en tant que médicament sous le nom d'Ascabiol®(33).

Classes pharmacothérapeutiques :

- ANTIPARASITAIRE INSECTICIDE PEDICULICIDE
- ANTIPARASITAIRE ANTIACARIEN SCABICIDE

Il est actif sur les acariens, sarcoptes de la gale, les aoûtats et les poux.

Les parasites habituellement sensibles au benzoate de benzyle sont :

PEDICULUS CORPORIS
PEDICULUS CAPITIS
SARCOPTES SCABIEI
TROMBICULA AUTOMNALIS.

Bactéricidie du composé « Noso1cc »

Des tests de bactéricidie ont à nouveau été réalisés sur le mélange synthétique.

L'étude en cinétique de la bactéricidie s'est faite de manière suivante : dénombrement des bactéries survivantes après 0, 15, 30, 45 et 60 minutes de contact entre Noso1cc et la souche bactérienne. Certaines souches ont été en contact avec Noso1cc pendant 240 minutes.

Protocole

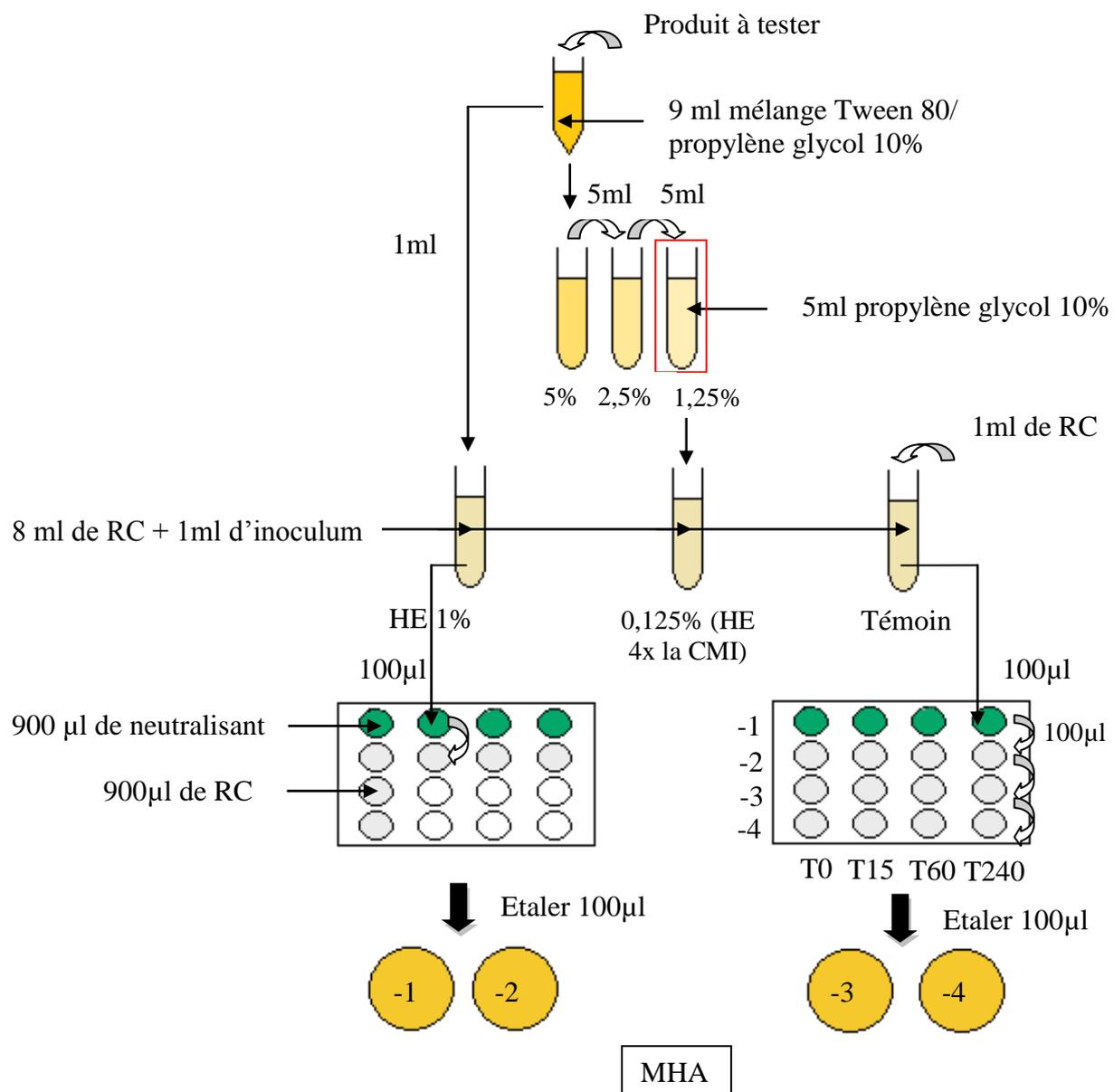


Figure 14: Illustration du protocole en vue de l'observation de l'effet bactéricide en fonction du temps

- Préparation de la solution mère : suspension de Noso1cc à 10% (dans Tween® 80 et propylène glycol), dix fois supérieure à la concentration finale souhaitée, du fait d'une dilution au dixième dans le milieu réactionnel.
- Préparation des autres concentrations à tester par dilutions au demi de la solution mère.
- Préparation des inocula pour obtenir une suspension bactérienne de 10^7 UFC/ml (bactéries dans Ringer Cystéiné).
- Mélange des deux préparations : 1 ml de Noso1cc à 10% (ou de concentration inférieure), 1 ml de l'inoculum à 10^7 UFC/ml et 8 ml de Ringer Cystéiné.

La concentration finale de Noso1cc était au maximum de 1%.

- Une fois le temps de contact écoulé, 900 μ L de neutralisant (« Neutralizing broth for neutralizing and testing disinfectants and antiseptics » de Dey et Engley, commercialisé chez Criterion) étaient ajoutés pour 100 μ L de solution testée, bloquant l'action antibactérienne de Noso1cc.
- Dilution au dixième, centième, millième et dix-millième pour un dénombrement correct des UFC vivantes restantes. L'absence de pouvoir bactéricide de l'huile essentielle en association avec le neutralisant était vérifiée.
- Dénombrement des bactéries après dilution en Ringer cystéiné et incubation à 37°C pendant 24 heures sur une gélose Mueller Hinton sur des boîtes contenant entre quinze et cent cinquante colonies.

Résultats :

Les résultats sont reportés sous forme de graphique représentant :

- le temps sur l'axe des abscisses (en minutes) ;
- les logarithmes des numérations de bactéries survivantes (en UFC/ml) sur l'axe des ordonnées. [Annexe 7 page 124]

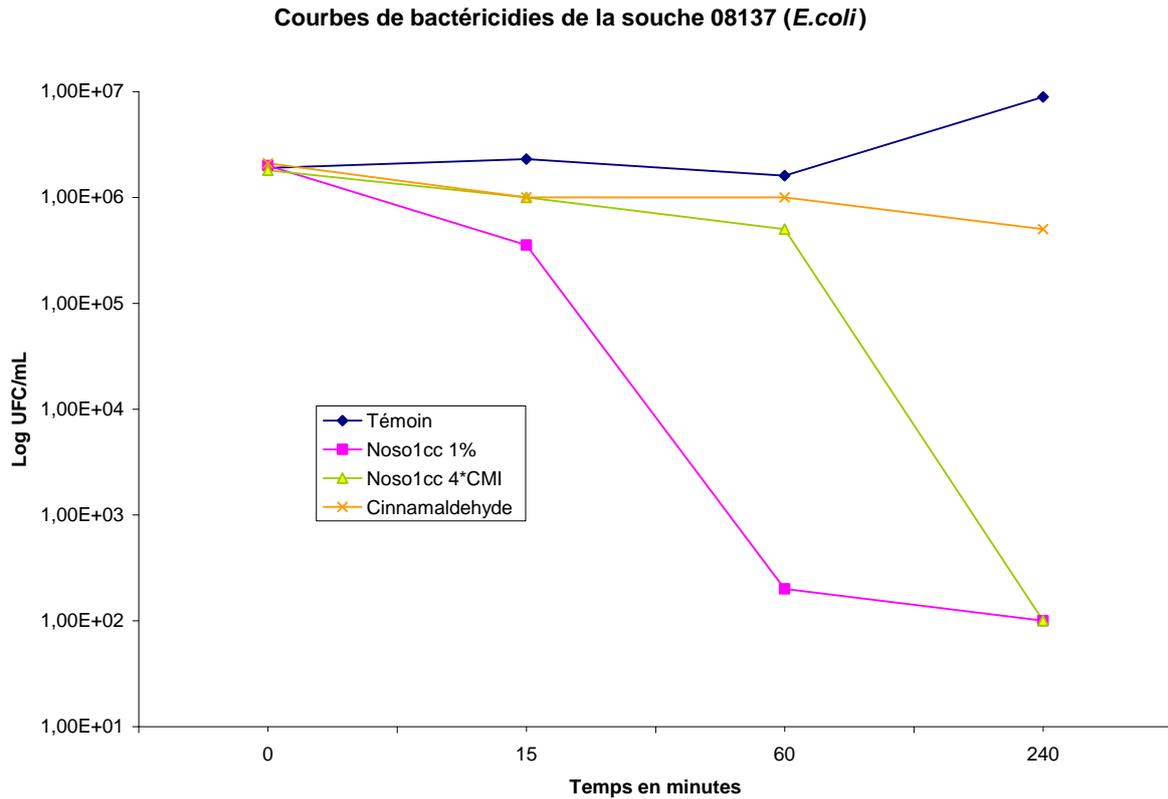


Figure 15 : Courbes de bactéricidies de la souche *E.coli* 08137. Noso1cc était utilisé à quatre fois la CMI et à 1%.

Exemple de courbe obtenue [Figure 15]

Lors de la détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), le pourcentage de bactéries survivantes après culture était évalué, la CMB étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle l'effet bactéricide souhaité est de 99,99 % (soit 0,01% de survivants).

Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI

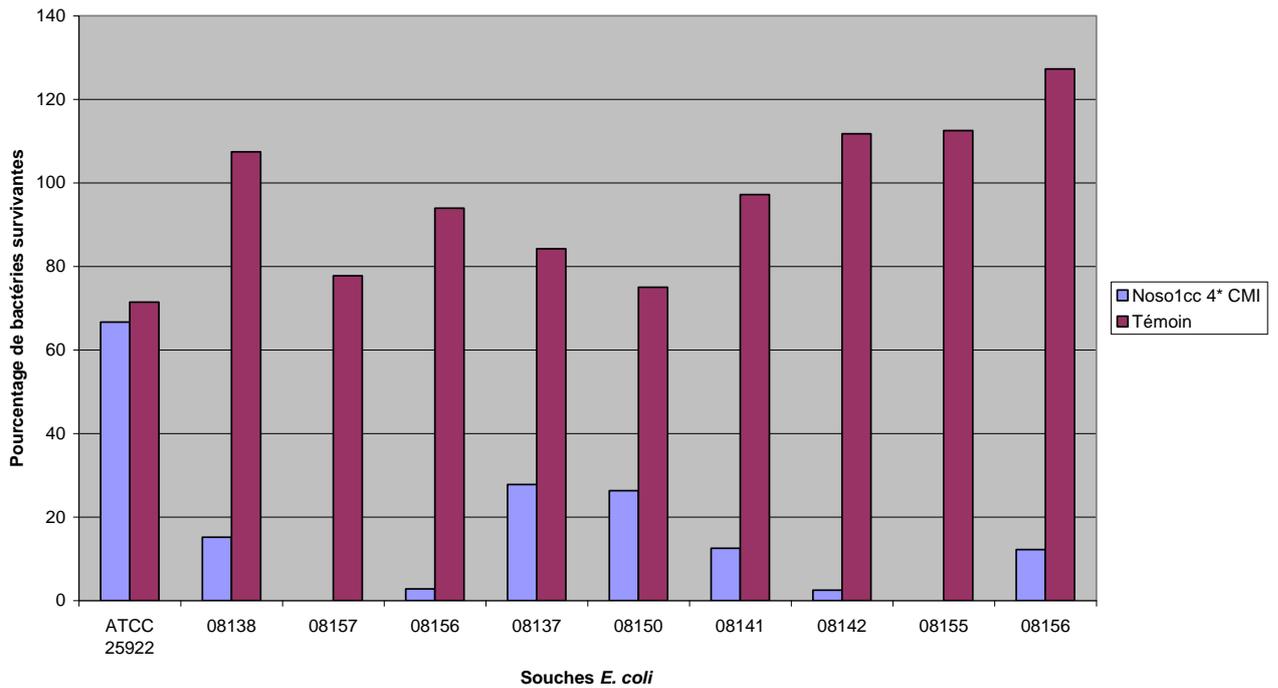


Figure 16 : Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI sur des souches d'*E. coli*

Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI

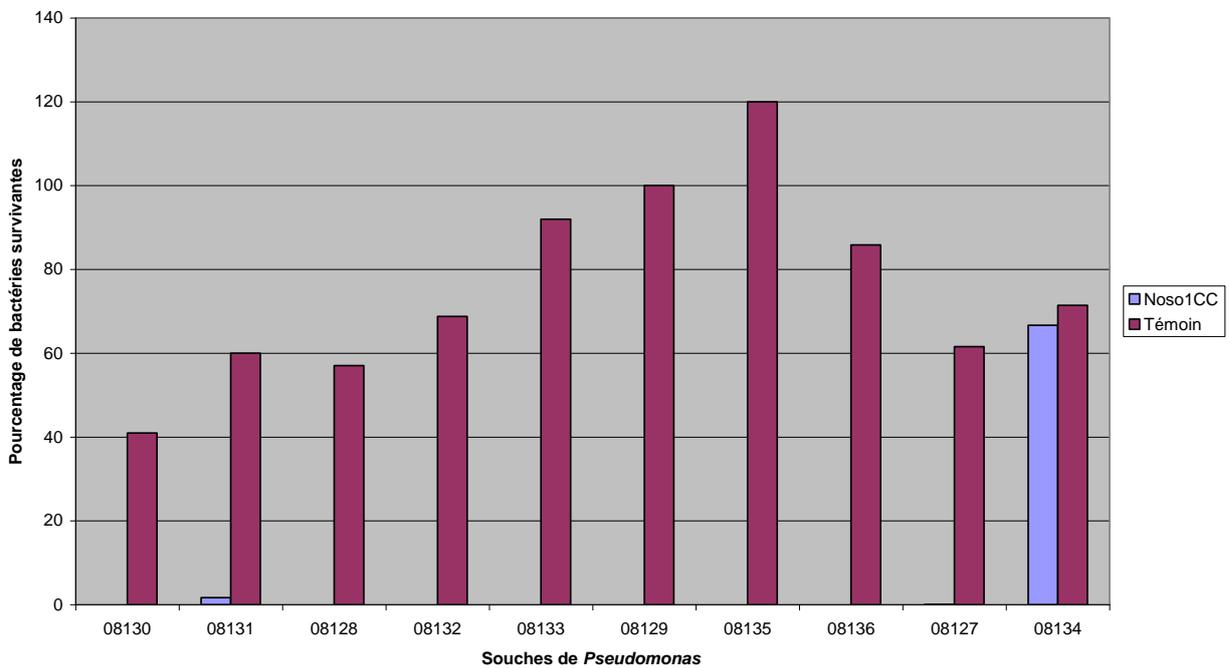


Figure 17 : Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI sur des souches de *Pseudomonas*

Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI

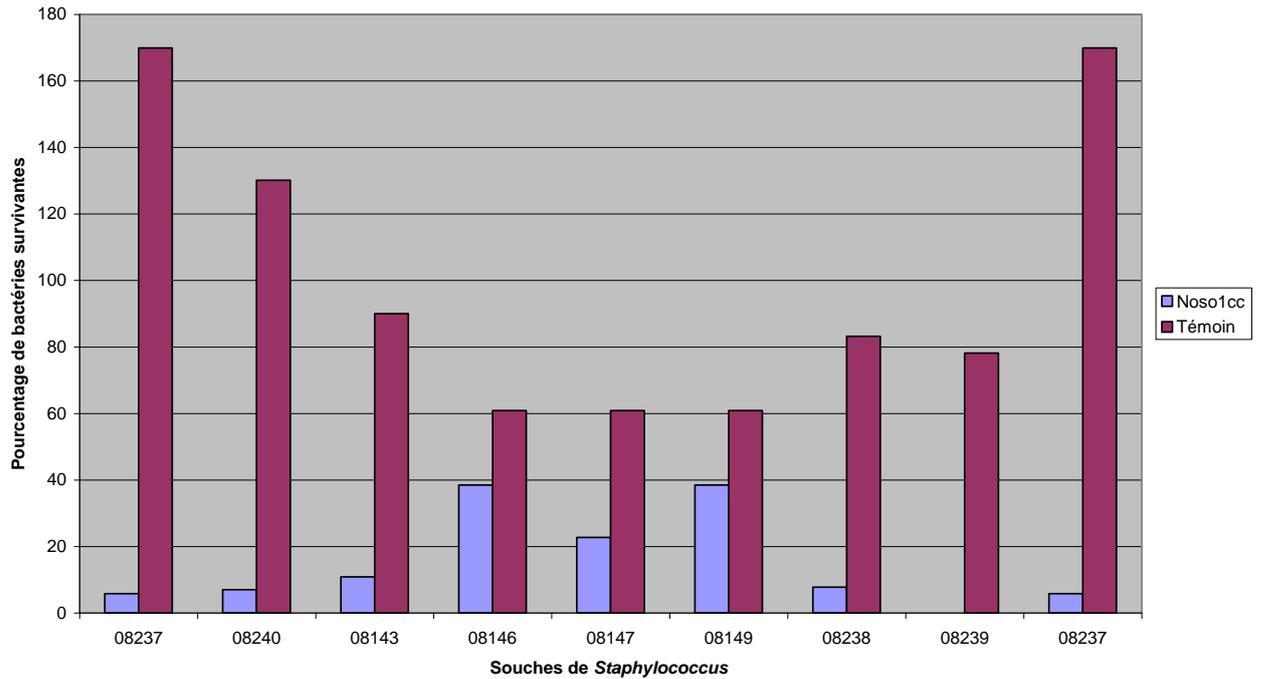


Figure 18 : Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI sur des souches de *Staphylococcus*

Sur ce type de graphique, le pourcentage de bactéries survivantes au bout d'une heure de contact avec Noso1cc concentré à quatre fois la CMI était comparé à un témoin.

On observait systématiquement une décroissance bactérienne avec Noso1cc.

L'activité était très marquée et très rapide sur les souches de *Pseudomonas* testées.

Pourcentage de bactéries vivantes après 240 minutes de contact avec Noso1cc à 4°CMI

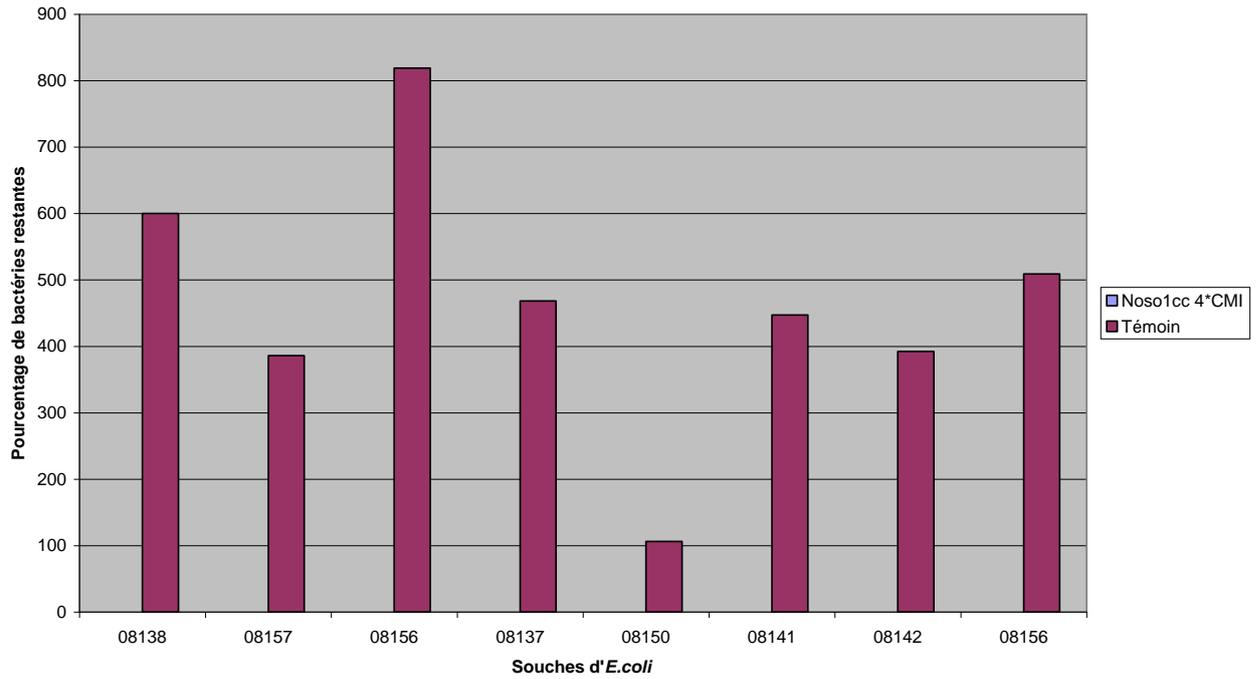


Figure 19 : Pourcentage de bactéries vivantes après 240 minutes de contact avec Noso1cc à 4°CMI sur des souches d'*E.coli*

Au bout de 240 minutes, le pourcentage de bactéries restantes variait entre 0,00 et 0,02%.

Cette activité bactéricide reste très rapide par rapport aux antibiotiques « classiques ».

Tests de croissance bactérienne suite à l'exposition à Nosolcc

Des bactéries étaient soumises à des tests de croissance à différentes concentrations : CMI, CMI/2 et CMI/4.

Le but de ce travail était d'analyser un effet à une concentration subinhibitrice.

Les bactéries étaient aussi exposées pendant deux heures à CMI et 4*CMI. Le but de ce travail était quant à lui d'analyser un effet post-antibiotique.

Les effets persistants (34)

Les effets persistants mettent en évidence une action antibactérienne alors que la concentration de l'antibiotique est inférieure à la CMI voire nulle. On observe trois types d'effets persistants :

L'effet à concentration subinhibitrice

Ces effets décrivent une diminution de croissance et/ou une perte de viabilité de bactéries exposées à une concentration en antibiotique inférieure à la CMI.

Les bactéries traitées montrent fréquemment des altérations morphologiques indiquant des perturbations de leur métabolisme. Ces modifications s'accompagnent souvent d'une diminution d'adhérence et de pathogénicité. Les effets à concentration subinhibitrice complètent l'efficacité du traitement en altérant les bactéries résiduelles : leur recroissance est ralentie.

L'effet post-antibiotique direct

Il s'agit du maintien de la suppression de la croissance bactérienne, après le retrait complet de l'antibiotique. Il est observé pour toutes les classes d'antibiotiques vis-à-vis des bactéries Gram (+) mais demeure généralement modeste. Il est par contre important (plusieurs heures) pour les bactéries Gram (-) dans le cas des antibiotiques affectant directement ou indirectement la synthèse protéique ou la synthèse de l'ADN et ayant une action concentration-dépendante.

Le mécanisme moléculaire est probablement la lenteur de l'efflux de ces antibiotiques après leur capture et leur transfert dans le cytoplasme bactérien.

L'effet de sensibilisation aux leucocytes (observable *in vivo* uniquement)

Des bactéries exposées à des concentrations inhibitrices mais non tuées apparaissent comme plus sensibles à la phagocytose. Ce phénomène est démontré pour les antibiotiques inhibant la synthèse protéique et résulte probablement d'altérations des constituants de la surface des bactéries.

Protocole d'évaluation de l'effet de Noso1cc à concentration subinhibitrice sur les bactéries

L'effet à concentration subinhibitrice était observé de manière suivante : dénombrement des bactéries survivantes après 0 puis 2 heures de contact entre Noso1cc et la souche bactérienne, puis, selon le comportement de la croissance bactérienne.

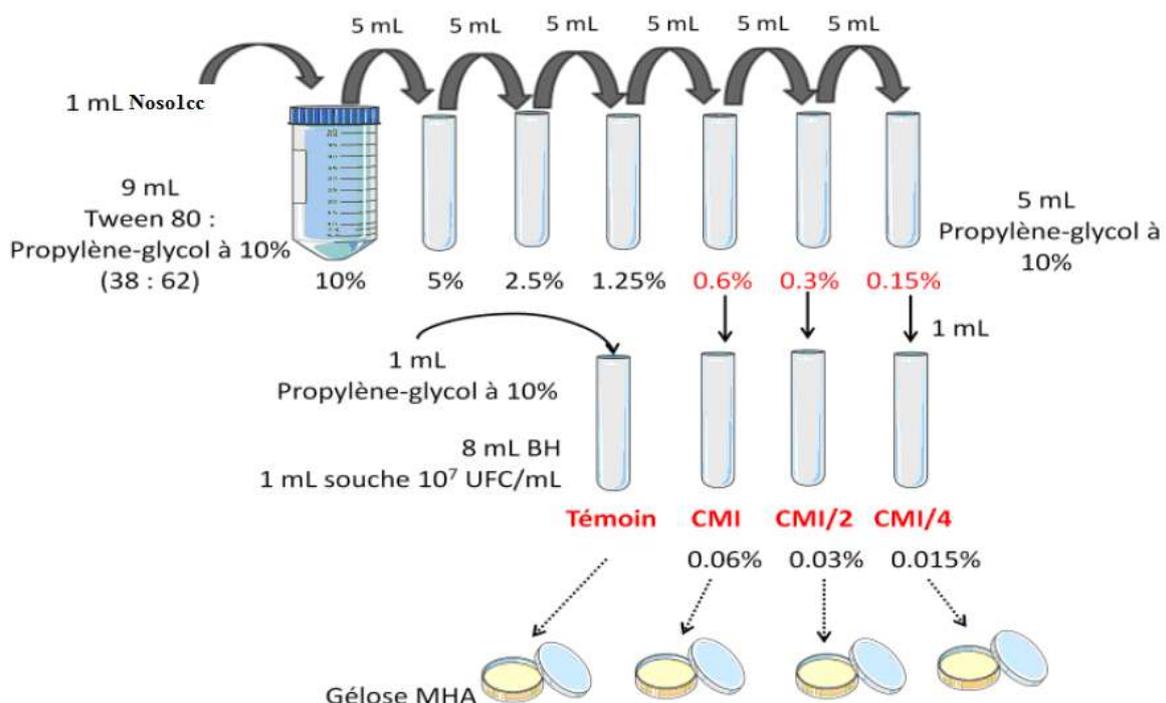


Figure 20 : Schéma du protocole utilisé pour observer l'effet de Noso1cc à concentration subinhibitrice

- Préparation de la solution mère : suspension de Noso1cc à 10%, solubilisé dans du Tween 80 et dans du propylène glycol à 10% (respectivement 38% et 62%).

- A partir de la solution mère, des dilutions au demi étaient réalisées dans du propylène glycol à 10% jusqu'à obtention d'une concentration égale à 10 fois la CMI, 10 fois la CMI/2 et 10 fois la CMI/4.
- Préparation de l'inoculum pour obtenir une suspension bactérienne de 10^7 UFC/ml (bactéries en Ringer Cystéiné).
- Mélange des préparations : dans quatre tubes contenant 8 ml de bouillon cœur-cervelle, 1 ml de l'inoculum bactérien était ajouté et, selon le tube, 1 ml de :
 - Propylène glycol à 10% pour le tube témoin ;
 - Noso1cc à la CMI pour le deuxième tube ;
 - Noso1cc à la CMI/2 pour le troisième tube ;
 - Noso1cc à la CMI/4 pour le quatrième tube.
- Une fois le temps écoulé, le dénombrement était réalisé. Des boîtes de Pétri contenant une gélose Mueller Hinton Agar étaient ensemencées et incubées à 37°C pendant 24 heures.

Résultats de l'effet de Noso1cc à concentration subinhibitrice sur les bactéries

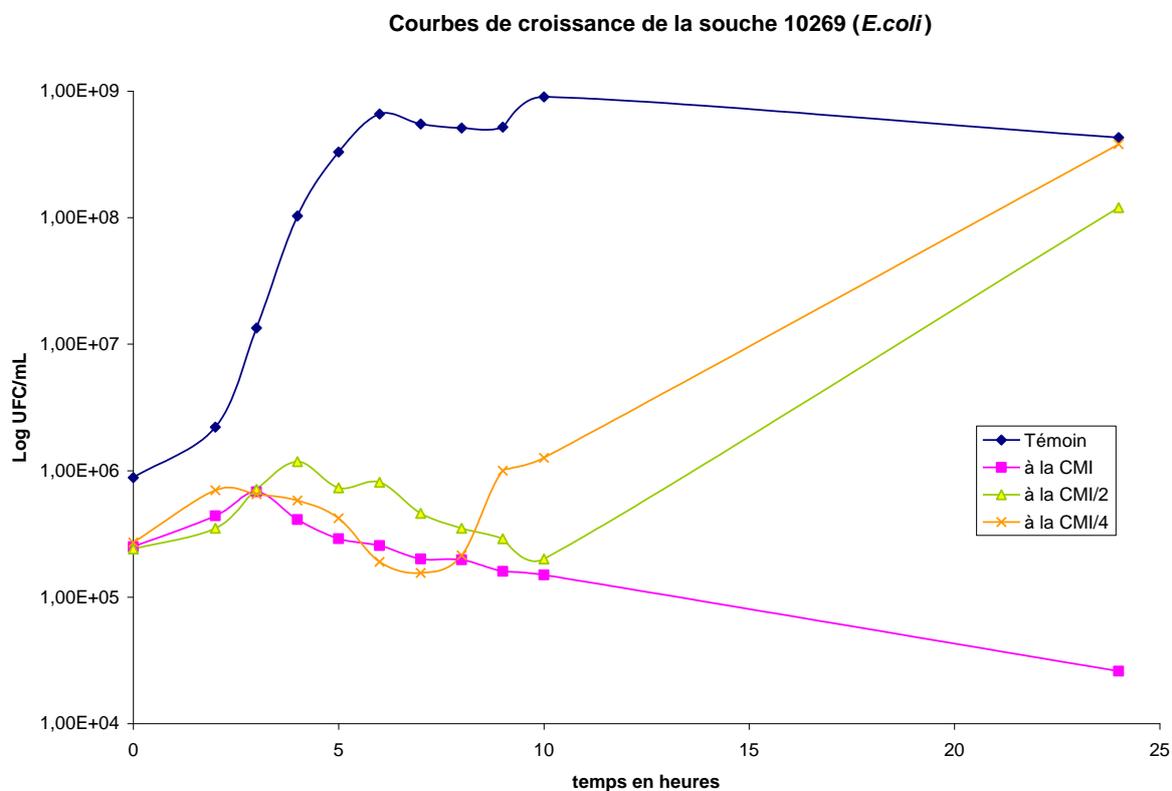


Figure 21 : Courbes de croissance de la souche *E. coli* 10269 après contact avec Noso1cc à des concentrations subinhibitrices

sur cette souche d'*E.coli*, il était observé un effet bactériostatique pendant au moins 10 heures sur toutes les concentrations testées (hors témoin).

A la CMI, la concentration de l'inoculum avait diminué d'un log au bout de 24 heures.

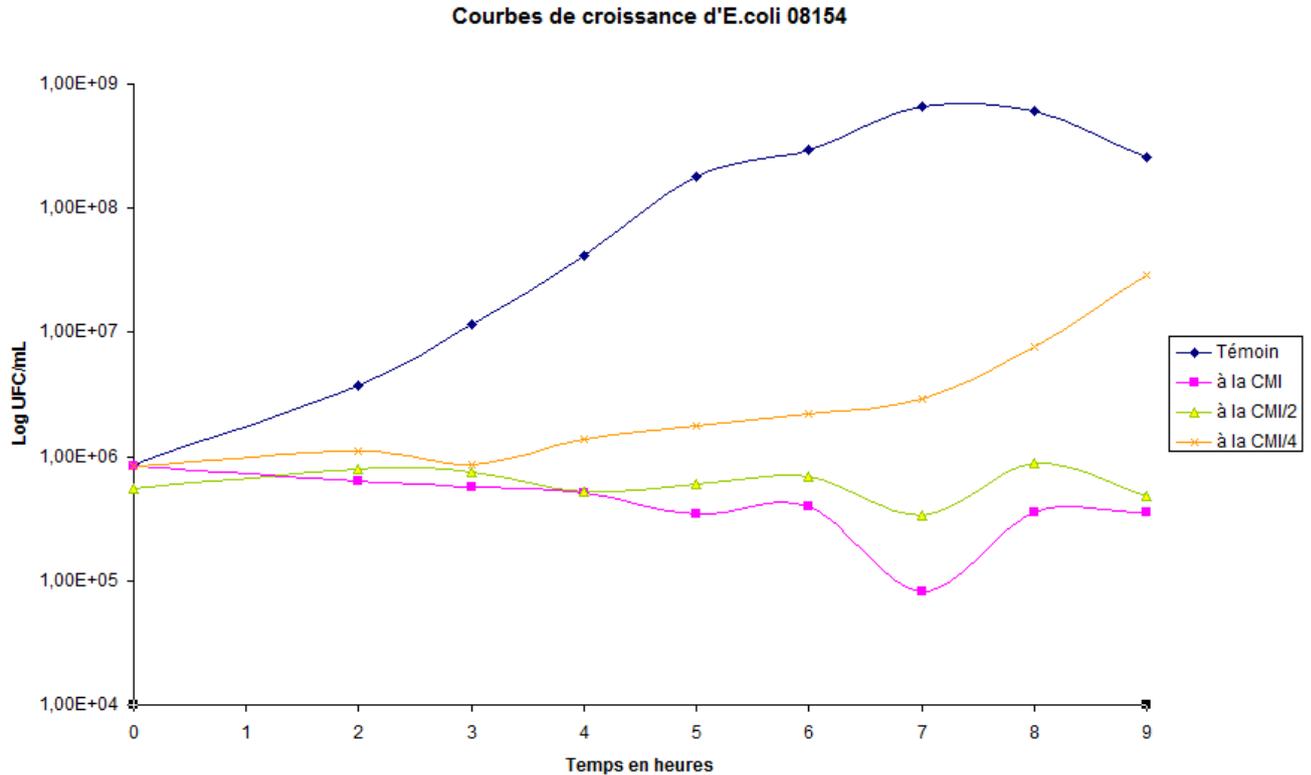


Figure 22 : Courbes de croissance de la souche *E.coli* 08154 après contact avec Nosolcc à des concentrations subinhibitrices -sur neuf heures-

sur cette souche d'*E.coli*, on observait un ralentissement de la croissance à des concentrations inférieures à la CMI. Au bout de neuf heures, on observait un différentiel d'un log entre le témoin et la CMI/4, et un différentiel de deux log entre le témoin et la CMI/2.

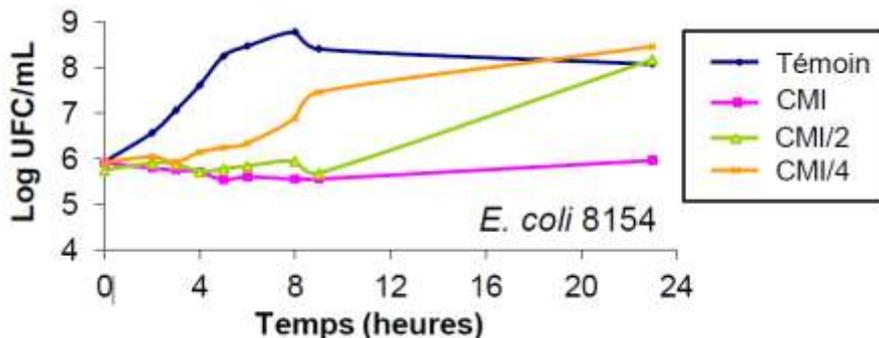


Figure 23 : Courbes de croissance de la souche *E.coli* 08154 après contact avec Nosolcc à des concentrations subinhibitrices -sur vingt quatre heures-

Au bout de vingt quatre heures, comme attendu, seule la CMI conservait un effet bactériostatique.

voici les courbes de croissance de la souche de *P.aeruginosa* :

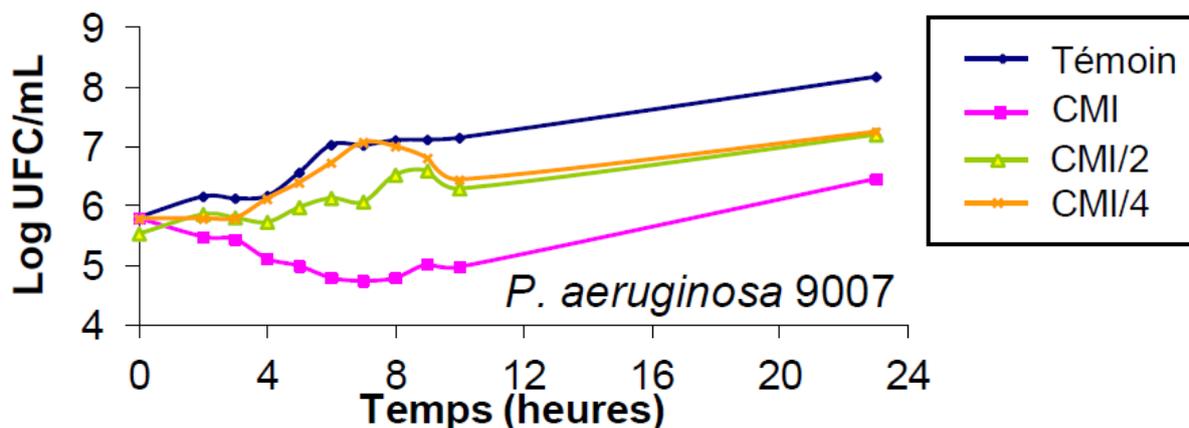


Figure 24 : Courbes de croissance de la souche *P.aeruginosa* 09007 après contact avec Noso1cc à des concentrations subinhibitrices

Un effet à concentration subinhibitricie était mis en évidence : au bout de 24 heures, deux log de différence entre le nombre de bactéries du témoin et le nombre de bactéries mises en contact avec Noso1cc.

L'effet bactériostatique était moins prolongé par rapport aux autres souches testées (3 heures).

Après 12 heures de contact entre Noso1cc à la CMI et l'inoculum bactérien, un effet bactéricide était démontré.

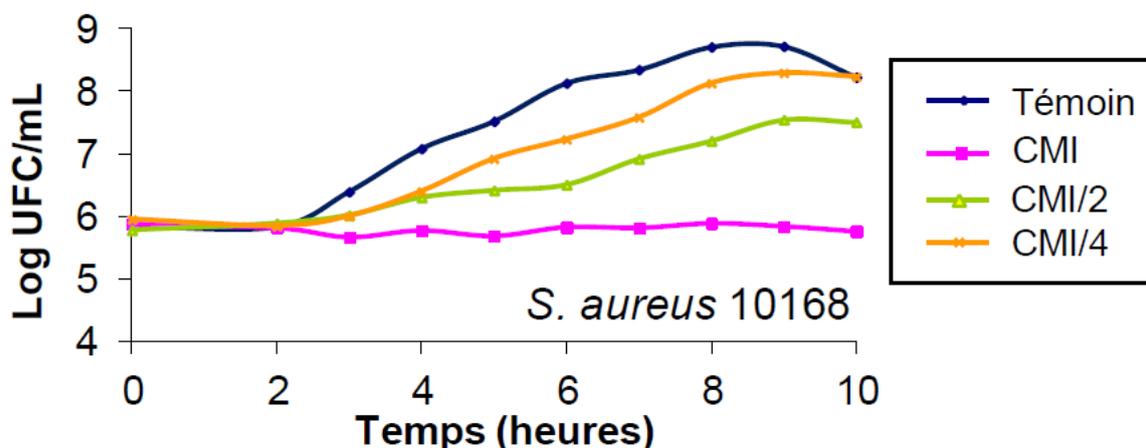


Figure 25 : Courbes de croissance de la souche *S.aureus* 10168 après contact avec Noso1cc à des concentrations subinhibitrices

Sur cette souche bactérienne, on observait un effet bactériostatique à la CMI ainsi qu'un ralentissement de la croissance à des concentrations subinhibitrices.

On peut ici affirmer que Nosolcc possède un effet à concentrations subinhibitrices sur les souches testées : un résultat intéressant pour l'avenir de Nosolcc en clinique pour la détermination des posologies d'administration.

Protocole de détermination de l'effet post-antibiotique de Nosolcc sur les bactéries

L'étude de la détermination de l'effet post-antibiotique de Nosolcc sur les bactéries testées s'est faite de la manière suivante : dénombrement des bactéries survivantes après deux heures de contact « Nosolcc + bactéries », puis, retrait de Nosolcc. L'expérience a été réalisée à la CMI et à quatre fois la CMI.

- Préparation des inocula pour obtenir une suspension bactérienne de 10^7 UFC/mL (bactéries dans du Ringer Cystéiné).
- Solubilisation de Nosolcc dans un mélange de Tween 80 et de propylène glycol à 10%.
- Dilutions au demi dans du propylène glycol à 10% jusqu'à obtention de la CMI.

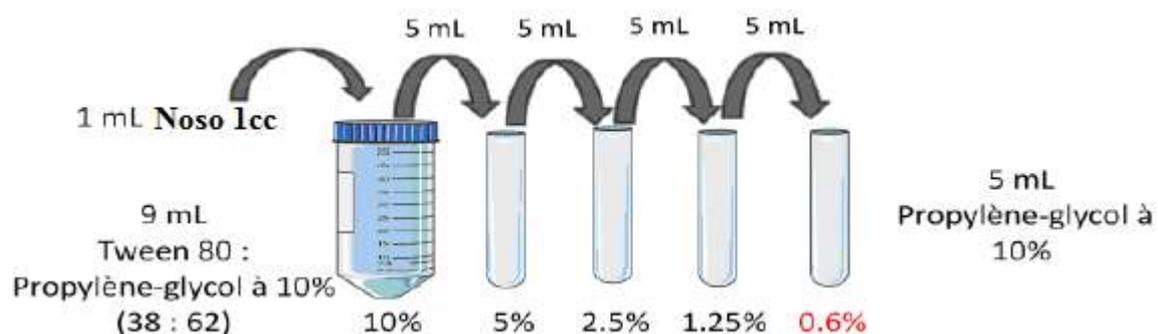


Figure 26 : Illustration de la dilution "au demi" de Nosolcc

- Mise en contact de Nosolcc et des bactéries : dans un tube contenant 8 ml de Brain Heart (bouillon coeur-cerveille) et 1 ml de Ringer Cystéiné avec 10^7 UFC de la souche bactérienne testée, ajout de :

- 1 ml de propylène-glycol à 10% pour le tube témoin ;
- 1 ml de Nosolcc concentré à quatre fois la CMI pour le deuxième tube ;
- 1 ml de Nosolcc concentré à la CMI pour le troisième tube.

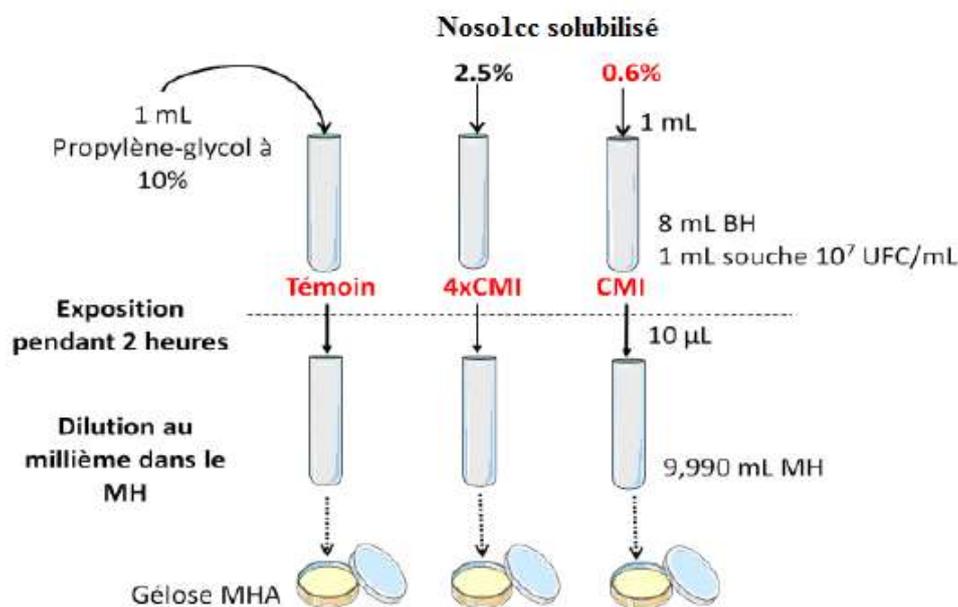


Figure 27 : Illustration de l'obtention des trois boîtes de Petri différentes partant à l'incubateur

- Période d'exposition : 2 heures à 37°C.
- Une fois le temps de contact écoulé, on diluait au millième la culture dans un bouillon Mueller Hinton pour supprimer l'effet de Nosolcc.
- Au bout de 0, 1, 2 heures, puis selon le comportement de la souche, on prélevait un échantillon du tube pour le dénombrement.
- Dénombrement des bactéries après dilution en Ringer cystéiné et incubation à 37°C pendant 24 heures sur une gélose Mueller Hinton (aérobies) ou 48 heures sur une gélose Columbia au sang (anaérobies).

Résultats de l'effet post-antibiotique de Noso1cc sur les bactéries

Gram (+)

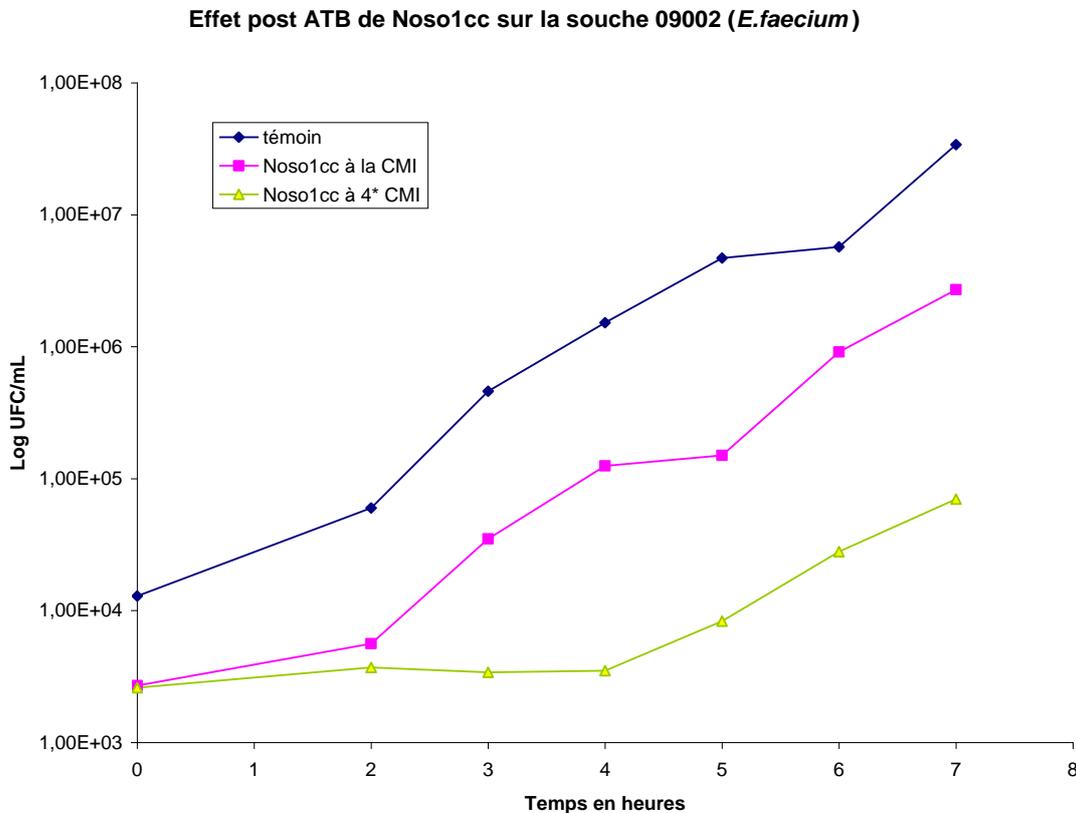


Figure 28 : Observation de l'évolution du nombre de bactéries restantes au bout de huit heures lors d'un contact avec Noso1cc à la CMI et à quatre fois la CMI sur la souche *E. faecium* 09002

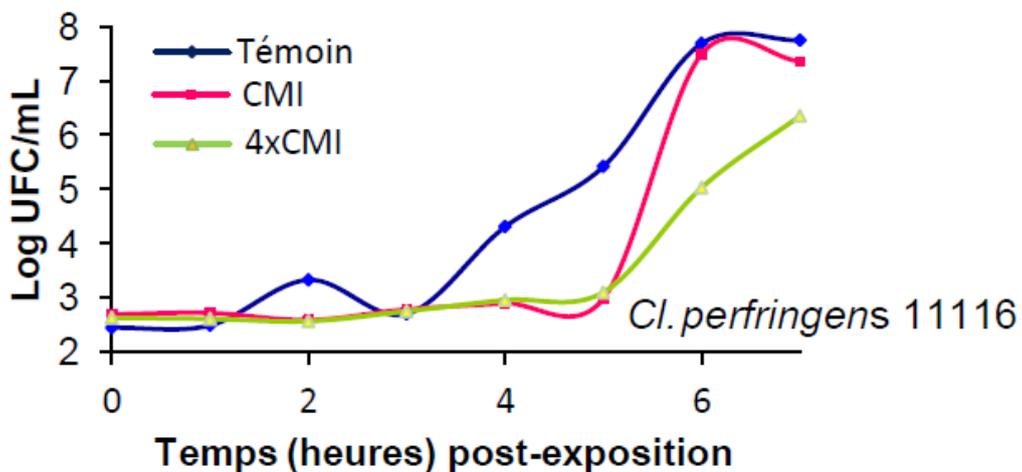


Figure 29 : Observation de l'évolution du nombre de bactéries restantes au bout de sept heures lors d'un contact avec Noso1cc à la CMI et à quatre fois la CMI sur la souche *Clostridium perfringens* 11116

Gram (-)

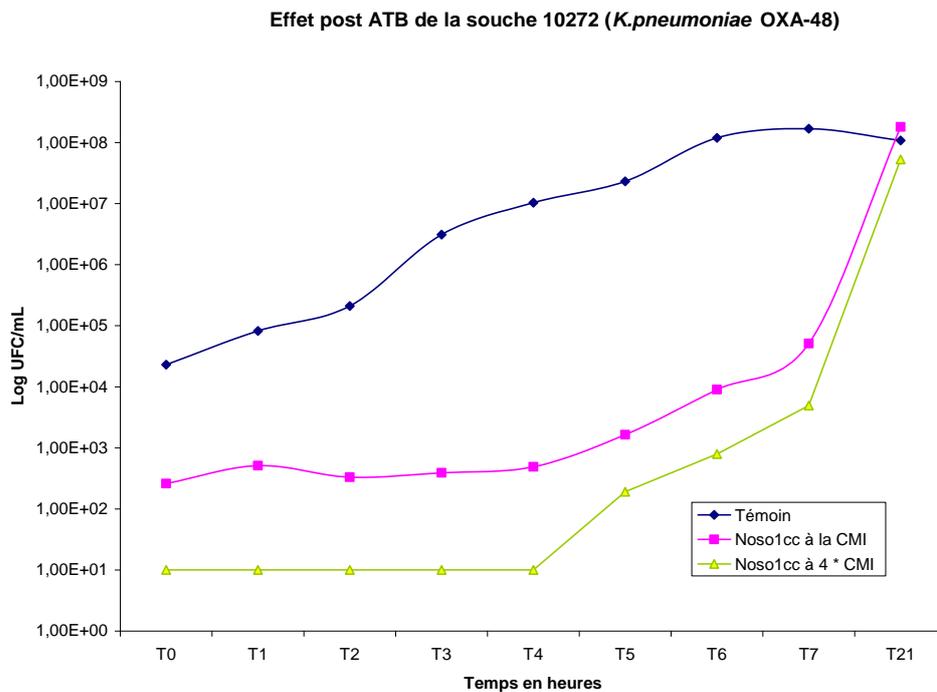


Figure 30 : Observation de l'évolution du nombre de bactéries restantes au bout de vingt et une heures lors d'un contact avec Noso1cc à la CMI et à quatre fois la CMI sur la souche *K.pneumoniae* OXA-48

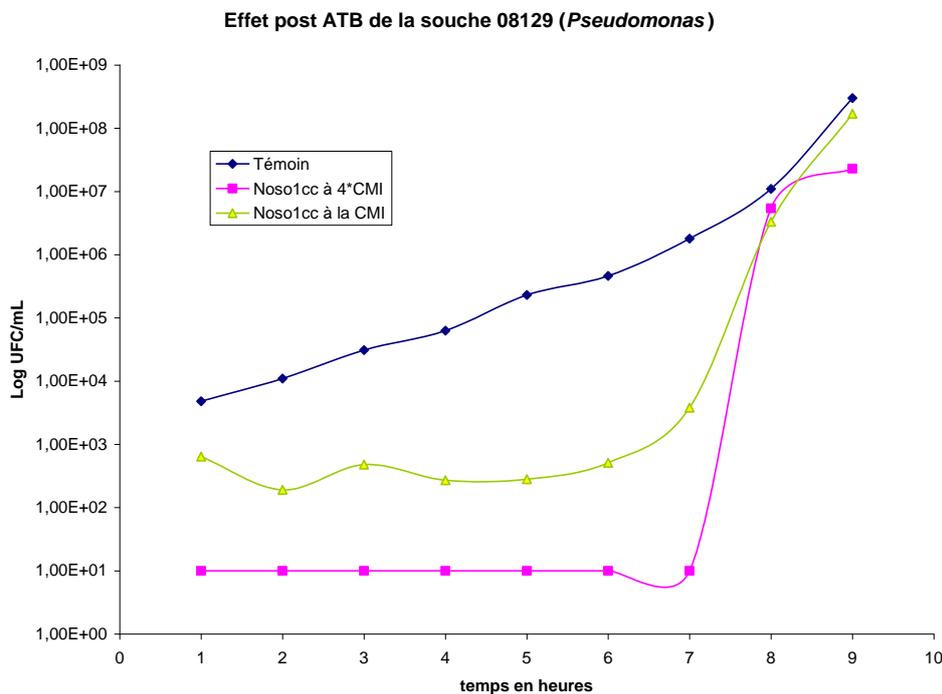


Figure 31 : Observation de l'évolution du nombre de bactéries restantes au bout de neuf heures lors d'un contact avec Noso1cc à la CMI et à quatre fois la CMI sur la souche *Pseudomonas* 08129

Après un contact des bactéries avec Noso1cc puis son élimination, le redémarrage de la phase exponentielle était retardé, la phase de latence était prolongée de plusieurs heures, y compris sur les Gram (+).

Etude sur l'association de Nosolcc avec des antibiotiques

Objectifs de cette étude (35) :

Les associations d'antibiotiques sont fréquemment utilisées en pratique. Elles élargissent le spectre d'activité dans les cas d'infections impliquant plusieurs bactéries, elles permettent de traiter en urgence une infection grave non étiquetée et elles préviennent la sélection de mutants résistants lors des traitements de longue durée.

Un effet synergique peut être obtenu lors d'associations bien choisies.

« Nosolccc » était actif sur toutes les souches bactériennes testées. Dans le futur, son utilisation en dernier recours pourrait être envisagée, ainsi un médecin qui souhaiterait prescrire cet antibiotique aurait besoin de savoir quelles seraient les associations possibles ou impossibles.

En associant deux antibiotiques, la CMI du mélange peut être inférieure, supérieure ou égale à celle attendue sur la base de la somme des pouvoirs antibactériens de chacun des actifs testés.

Synergie

L'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Antagonisme

L'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Addition

L'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Indifférence

L'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre.

Fractional Inhibitory Concentration

Le FIC index (Fractional Inhibitory Concentration) permet un repérage du type d'interaction entre deux antibiotiques. Il n'est pas nécessaire de connaître la CMI d'un antibiotique pour interpréter le FIC index.

Le FIC index se calcule à partir des nouvelles CMI obtenues après mélange des deux antibiotiques à tester. Ces nouvelles CMI sont déterminées après 18 heures d'incubation à 37°C.

Le FIC d'une substance A est le rapport (CMI de l'association (A + B) / CMI A).

Le FIC d'une substance B est le rapport (CMI de l'association (A + B) / CMI B).

Le FIC index est l'addition des deux FIC.

L'interprétation du FIC index se fait de manière suivante :

FIC index inférieur ou égal à 0,5 : synergie.

FIC index supérieur à 0,5 et inférieur à 1,0: addition.

FIC index supérieur à 1,0 et inférieur à 2,0: indifférence.

FIC index supérieur à 2,0 : antagonisme.

Au sein du laboratoire, Nosolcc a donc été mis en contact avec différents antibiotiques dans le but de trouver d'éventuelles associations synergiques.

Protocole

Les antibiotiques testés étaient l'amikacine, la gentamicine, la vancomycine, la ciprofloxacine, l'oxacilline, la clindamycine, l'érythromycine, l'imipénème, la colistine et le métronidazole.

Chaque association « Nosolcc + antibiotique » a été testée à onze concentrations d'antibiotiques différentes ainsi qu'à douze concentrations différentes de Nosolcc. Onze nouvelles CMI « Nosolcc + antibiotique » ont été déterminées.

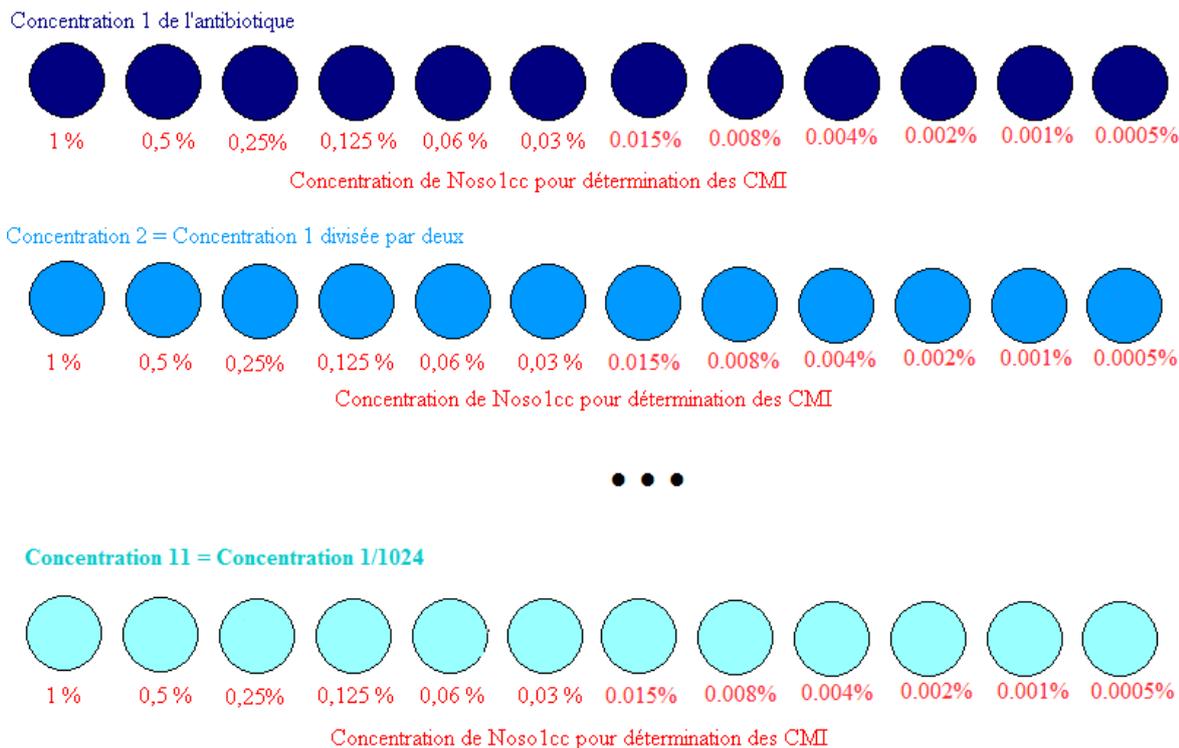


Figure 32 : Illustration de l'étude de la détermination d'une nouvelle CMI "Noso1cc + antibiotique"

La première concentration C1 d'antibiotique était élevée. Elle était fixée à 32 mg/L dans cette expérience.

La deuxième concentration d'antibiotique correspondait à $C1/2$.

La troisième concentration d'antibiotique correspondait à $C2/2$ soit $C1/4$.

La onzième concentration d'antibiotique correspond à $C1/1024$ soit 0.03 mg/L.

La détermination de la nouvelle CMI a été mesurée de la manière suivante :

- Préparation des inocula pour obtenir une suspension de bactéries à 10^6 UFC/ml (bactéries anaérobies) ou 10^5 UFC/ml (bactéries aérobies).
- Préparation des boîtes de Pétri : gélose Mueller Hinton qsp 20 ml, et concentration variable en antibiotique et en Noso1cc.

Les dilutions au demi de l'antibiotique et de Noso1cc étaient réalisées dans du propylène glycol à 10%. 132 combinaisons ont été testées : onze concentrations d'antibiotiques (de 32 à 0.03mg/L) avec douze concentrations de Noso1cc (1% à 0.0005%).

62 souches bactériennes ont été testées. Les boîtes ont été ensemencées à l'aide d'un Steers, les conditions étaient identiques pour toutes les bactéries de la boîte.

- Incubation à 37°C pendant 24 heures (souches aérobies) ou 48 heures sur gélose Columbia (souches en anaérobiose).
- Détermination de la nouvelle CMI pour chaque association.

Une fois les nouvelles CMI des associations « Noso1cc + antibiotique » déterminées, le FIC index de chaque souche était calculé.

Résultats

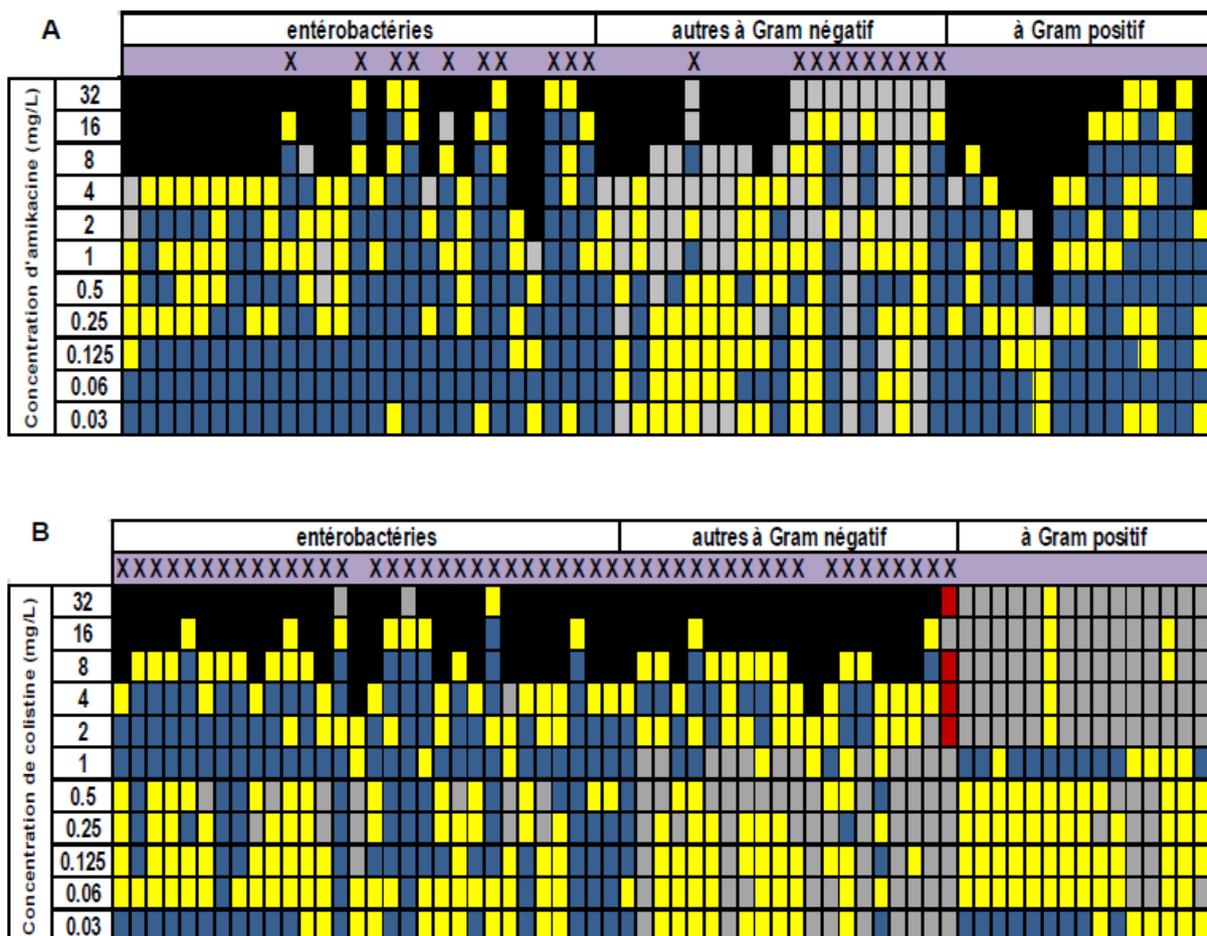


Figure 33 : Représentation des interactions amikacine-Noso1cc (A) et colistine-Noso1cc (B).

(X) : bactérie résistante à l'antibiotique testé.

En bleu : synergie.

En jaune : addition.

En gris : indifférence.

En rouge : antagonisme.

En noir : concentration supérieure à la CMI de l'antibiotique.

Souche: <i>K. pneumoniae</i> OXA-48						
CMI de Noso1cc = 600 mg/L						
Antibiotique en association	amikacine	clindamycine	colistine	érythromycine	gentamicine	vancomycine
CMI de l'Antibiotique seul (mg/L)	16	64	16	64	>64	64
Concentration testée d'Antibiotique (mg/L)	CMI de Noso1cc (mg/L) en association					
0,03	300	150	600	300	300	300
0,06	37,5	300	600	600	300	300
0,125	150	300	300	600	300	300
0,25	300	300	300	300	300	300
0,5	300	300	300	600	300	300
1	300	300	300	300	150	600
2	150	300	37,5	300	150	300
4	150	300	75	300	300	600
8	150	300	5	300	300	
16	75	300	5	300	150	
32		300			150	

Tableau 8 : Détermination des nouvelles CMI lors de l'association Noso1cc-Antibiotiques pour *K.pneumoniae* OXA-48

Souche: <i>K. pneumoniae</i> OXA-48						
Concentration testée d'Antibiotique (mg/L)	FIC Index					
	amikacine	clindamycine	colistine	érythromycine	gentamicine	vancomycine
0,03	0,5	0,3	1	0,5	0,5	0,5
0,06	0,1	0,5	1	1	0,5	0,5
0,125	0,3	0,5	0,5	1	0,5	0,5
0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5
1	0,6	0,5	0,6	0,5	0,3	1
2	0,4	0,5	0,2	0,5	0,3	0,5
4	0,5	0,6	0,4	0,6	0,6	
8	0,8	0,6	0,5	0,6	0,6	
16	1,1	0,8	1	0,8	0,5	
32		1			0,8	

Tableau 9 : Valeurs du FIC Index des associations Noso1cc-Antibiotiques pour *K.pneumoniae* OXA-48

La concentration C1 était proche de la CMI des souches bactériennes testées.

L'antibiotique était suffisamment concentré pour agir seul. On observait surtout une « indifférence », voire une « addition », lorsque Noso1cc était ajouté dans le milieu de culture.

Il n'a donc pas été observé de synergie « Antibiotique - Noso1cc ».

On observait une synergie lorsque la concentration de l'antibiotique diminuait.

A noter que l'association agissait en synergie sur certaines souches résistantes à l'antibiotique seul.

Dans le but d'élucider le mécanisme d'action de Nosolcc, des courbes de croissance à 37°C et 4°C ont été réalisées afin de mimer respectivement la phase de multiplication et de latence bactérienne.

Test de croissance bactérienne après contact avec Noso1cc à 37°C et à 4°C

L'étude de la croissance bactérienne à 37°C et à 4°C s'est faite de manière suivante : dénombrement des bactéries survivantes après 0 puis 2 heures de contact à 37°C et à 4°C entre Noso1cc et la souche bactérienne à la CMI et à la CMI/4 puis selon le comportement de la croissance bactérienne. Pour permettre de comprendre le mécanisme d'action de Noso1cc, la même expérience fut réalisée avec de la colistine et avec de la chlorhexidine.

Protocole

- Préparation des inocula pour obtenir une suspension bactérienne de 10^7 UFC/mL (bactéries dans du Ringer Cystéiné).
- Solubilisation de Noso1cc dans un mélange de Tween 80 et de propylène glycol à 10%.
- Dilutions au demi dans du propylène glycol à 10 % jusqu'à obtention de la CMI/4.
- Mise en contact de l'agent testé avec les bactéries (**deux séries sont réalisées**) : dans un tube contenant 8 mL de Brain Heart, 1 mL de Ringer Cystéiné avec 10^7 UFC de la souche bactérienne testée, et :
 - 1 mL de propylène-glycol à 10 % pour le tube témoin.
 - 1 mL de Noso1cc concentré CMI pour le deuxième tube.
 - 1 mL de Noso1cc concentré à la CMI/4 pour le troisième tube.
 - 1 mL de colistine concentrée à la CMI pour le quatrième tube.
 - 1 mL de chlorhexidine concentrée à la CMI pour le cinquième tube.
- La première série était incubée à 37°C, et la deuxième série à 4°C.
- Dénombrement des bactéries après 0, 2 heures, puis selon le comportement de la croissance bactérienne observée dans les tubes : ensemencement dans des boîtes de Pétri contenant un milieu Mueller Hinton pendant 24 heures à 37°C.

Résultats

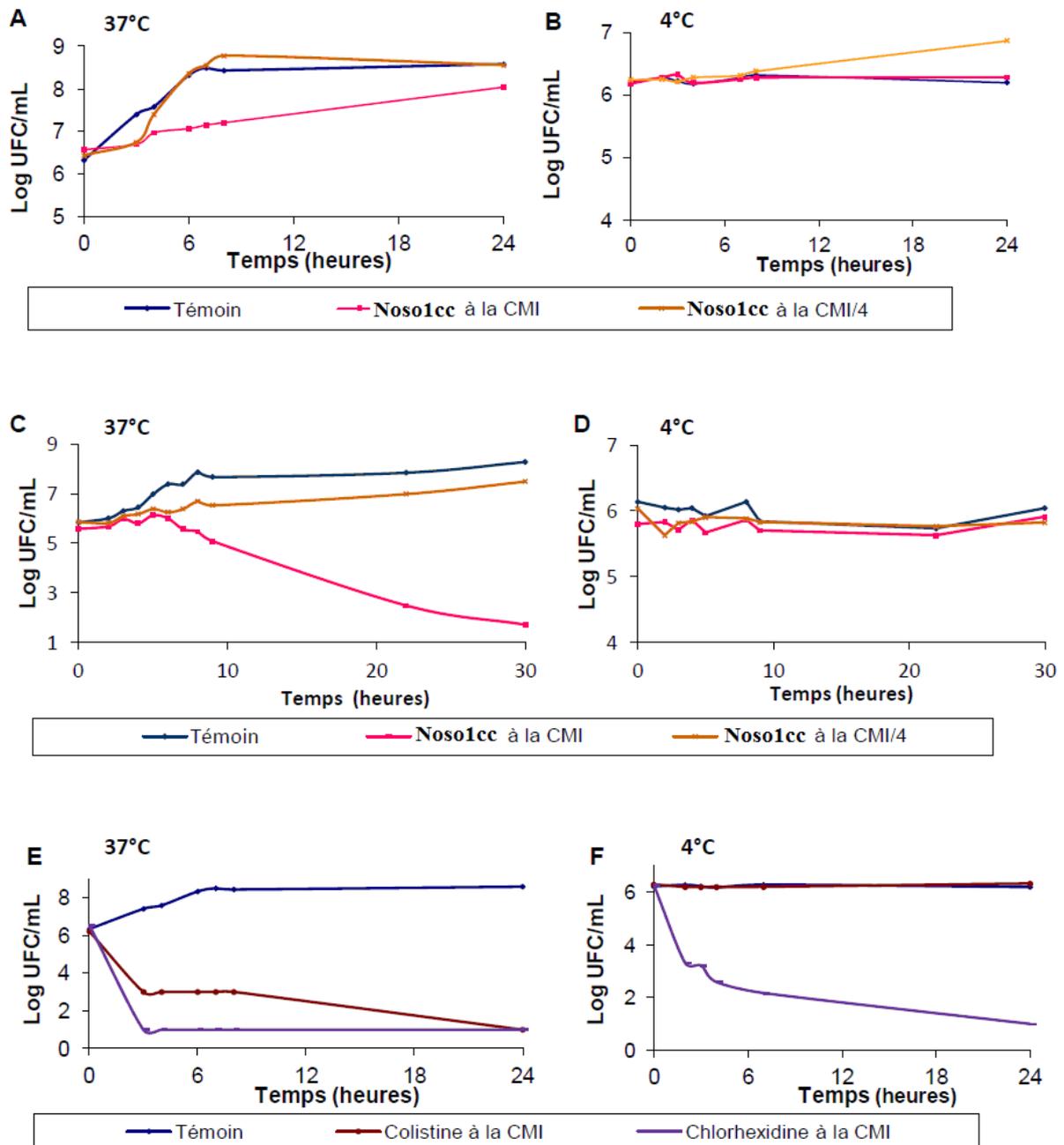


Figure 34 : Observation de la croissance bactérienne sur 24 heures après contact avec Noso1cc à 37°C et à 4°C

Courbes de croissance à 37 et 4°C :

- (A) *E. coli* 8142 à 37°C
- (B) *E. coli* 8142 à 4°C
- (C) *Staphylococcus sp.* 8237 à 37°C
- (D) *Staphylococcus sp.* 8237 à 4°C
- (E) *E. coli* 8142 à 37°C
- (F) *E. coli* 8124 à 4°C.

Les résultats démontraient qu'à 37°C tous les produits testés exerçaient une action : une diminution de la croissance bactérienne était observée pour Noso1cc, la chlorhexidine et la colistine.

A 4°C, seule la chlorhexidine restait active.

Ainsi on montrait que Noso1cc est actif uniquement pendant la phase de multiplication bactérienne.

Hypothèses sur le mécanisme d'action du cinnamaldéhyde

Le cinnamaldéhyde est le composant majoritaire de l'huile essentielle de cannelle.

Son mécanisme d'action antibactérienne n'est pas clairement défini. Plusieurs hypothèses ont été émises suite à des études expérimentales.

Il existerait plusieurs mécanismes d'action différents selon l'espèce bactérienne testée.(36)

Rappel sur la multiplication bactérienne :

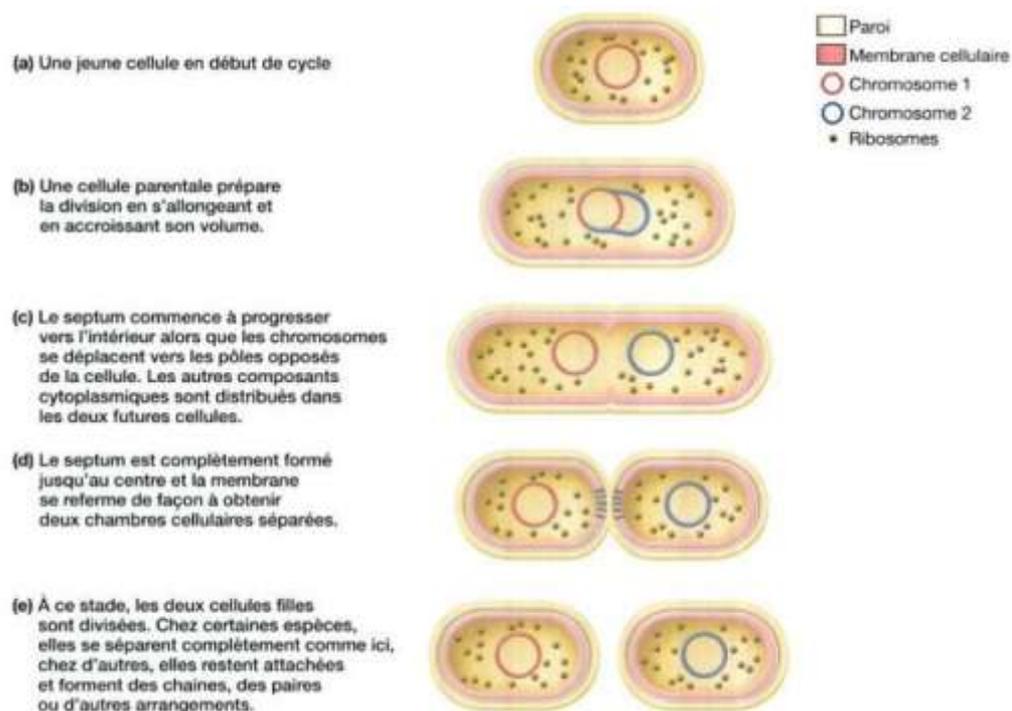


Figure 35 : Illustration d'une multiplication bactérienne(37)

Lors de la formation du septum (paroi transversale), l'anneau Z divise en deux la cellule par constriction. On obtient les deux cellules filles.

L'anneau Z est constitué de filaments, eux-mêmes constitués d'une polymérisation de la protéine FtsZ qui possède un site de liaison au GTP.

L'hydrolyse du GTP libère de l'énergie qui pourrait servir à la constriction de l'anneau.

Le cinnamaldéhyde bloquerait la scissiparité chez *B.cereus*.

Des bactéries traitées par du cinnamaldéhyde (0,03% à 37°C pendant 60 minutes) ont été photographiées en microscopie électronique à balayage.

La forme de *B.cereus* était modifiée, devenant allongée voire filamenteuse.

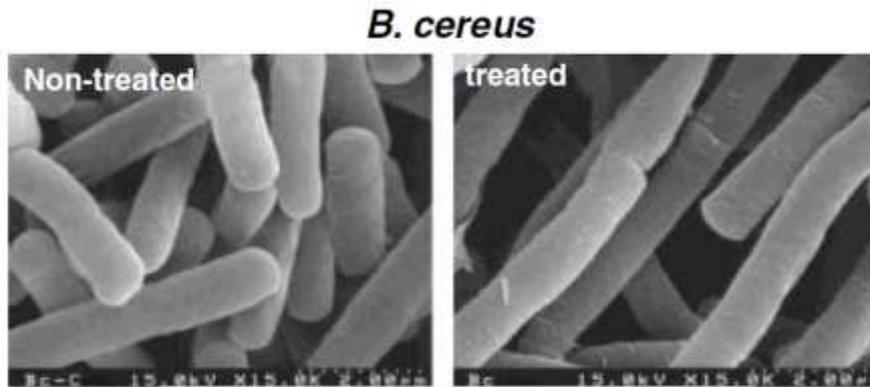


Figure 36 : Observation de *B.cereus* en microscopie à balayage après un contact avec du cinnamaldéhyde (0,03% à 37°C)

On observait un septum entre les deux futures cellules mais sa formation était incomplète.

Il n'a pas été démontré si ce mécanisme d'action pouvait induire ou non la mort cellulaire.(36)

Le cinnamaldéhyde inhiberait la polymérisation de la protéine FtsZ empêchant ainsi la formation de l'anneau Z.(38)

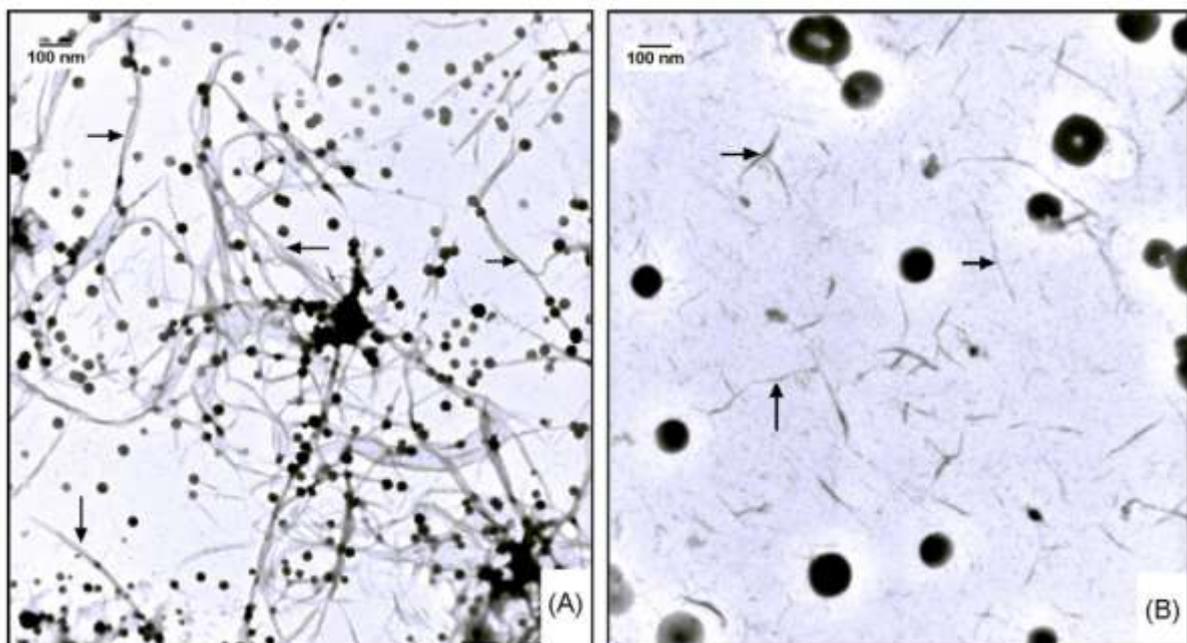


Figure 37 : Photographies en microscopie électronique mettant en évidence l'inhibition de la polymérisation de la protéine FtsZ

La photographie (A) montre de nombreux filaments issus de la polymérisation de FtsZ.

La photographie (B) représente le même milieu additionné de 100 μM de cinnamaldehyde. Les filaments semblent plus fins, suggérant l'inhibition de la polymérisation des filaments de FtsZ.

Le cinnamaldehyde perturberait la morphologie de l'anneau Z *in vivo*. Il a été retrouvé une fréquence plus faible d'anneaux Z chez *E. coli* en présence de cinnamaldehyde. (38)

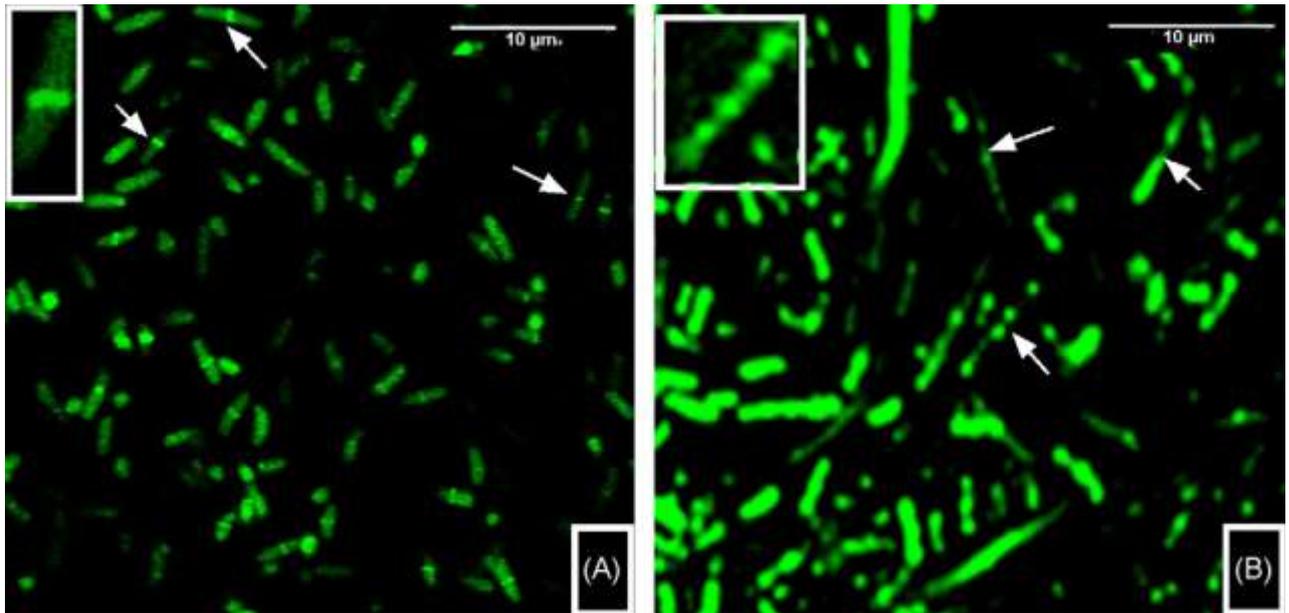


Figure 38 : Observation en microscopie à fluorescence de l'effet du cinnamaldehyde sur la formation de l'anneau Z.

Le complexe « protéine FtsZ-GTP » est ici marqué par un colorant fluorescent.

La photographie (A) présente des anneaux Z typiques : une concentration de FtsZ en forme d'anneau au milieu des bactéries, facilitant leur cloisonnement et leur division.

La photographie (B) présente le même milieu additionné de 100 μM de cinnamaldehyde. On observe une élévation des bactéries avec des anneaux Z beaucoup plus dissipés (voir flèches).

Le cinnamaldehyde diminuait donc le nombre d'anneaux Z dans les cellules en division, l'évaluation du taux d'anneaux Z passant de 85.7% à 58%.

L'hydrolyse du GTP lié à la protéine FtsZ a été montrée comme inhibée en présence de cinnamaldéhyde. (38)

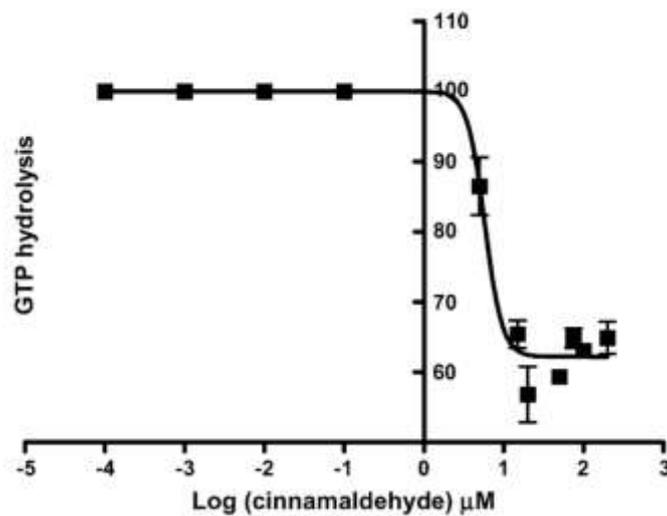


Figure 39 : Mise en évidence de l'hydrolyse du GTP qui diminue avec la présence du cinnamaldéhyde

Rappel sur les ATPases membranaires

Les ATPases membranaires sont des enzymes qui hydrolysent ou synthétisent de l'ATP.

Les ATPases sont utilisées pour le transport actif de molécules à travers la membrane cellulaire.

Lorsqu'une molécule est transportée contre son gradient de concentration, il faut de l'énergie pour la déplacer. Celle-ci est apportée par l'ATPase.

Une étude a démontré une action inhibitrice du cinnamaldéhyde sur l'activité des ATPases membranaires chez *E.coli*.

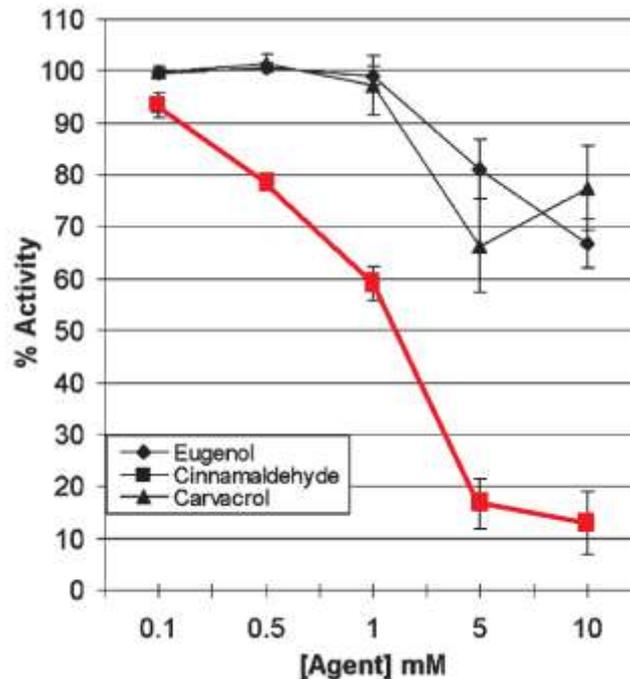


Figure 40 : Pourcentage d'activité des ATPases membranaires chez *E.coli* après incubation pendant 10 minutes à 30°C avec de l'eugéno1, du cinnamaldéhyde ou du carvacrol

Ce mécanisme d'action ne semblait pas être la cause de la mort cellulaire. L'inhibition de ces enzymes jouerait plutôt un rôle dans le ralentissement de la croissance bactérienne.

Le cinnamaldéhyde est une petite molécule hydrophobe. Celle-ci pourrait s'intégrer facilement dans la membrane et interagir sur les protéines membranaires telles que les ATPases en modifiant leur conformation.

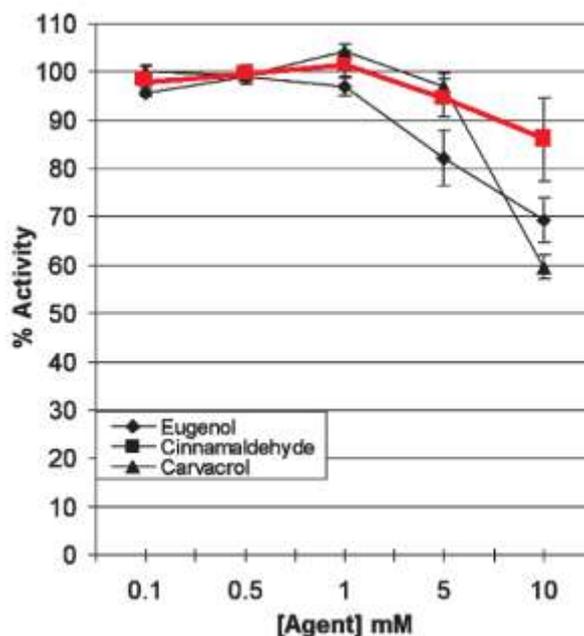
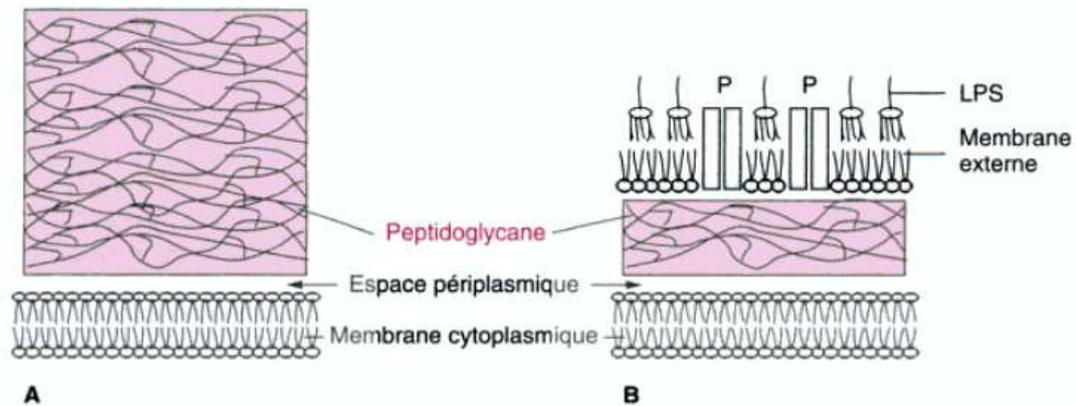


Figure 41 : Pourcentage d'activité des ATPases membranaires chez *L.monocytogenes* lors d'une incubation pendant 10 minutes à 30°C avec de l'eugéno1, du cinnamaldéhyde ou du carvacrol

On voit que l'activité du cinnamaldéhyde était moins puissante sur *L.monocytogenes* que sur *E. coli*. Mais la surface membranaire de *L.monocytogenes* étant Gram(+), elle est donc moins hydrophobe que celle d'*E.coli*, Gram(-).(39)



La paroi des bactéries Gram + et Gram -.

- A) Bactérie à Gram positif avec paroi de peptidoglycane épaisse ;
 B) Bactérie à Gram négatif avec double membrane phospholipidique et paroi de peptidoglycane mince.
 P, porine ou pore membranaire; LPS, lipopolysaccharide.

Figure 42 : Illustration de la paroi des bactéries Gram + et Gram - (40)

Une étude chez le rat a montré une activité du cinnamaldéhyde sur les cellules hépatiques. (41)

Le cinnamaldéhyde inhiberait ici deux ATPases :

- ATPase Na/K de type P
- ATPase Cu^{2+} de type CPX

En revanche, l'ATPase mitochondriale de type F0F1 serait stimulée. La balance électrochimique de la cellule serait ainsi perturbée.

Mais un article faisant référence à cette stimulation a conclu différemment quant aux résultats d'Usta *et al* obtenus.(42)

En effet, ce qui apparaissait comme une stimulation de l'ATPase F0F1 serait un biais et correspondrait en réalité à une rupture membranaire.

Ces contradictions montrent que les mécanismes d'action du cinnamaldéhyde n'ont pas encore été clairement élucidés.

Des contradictions existent aussi quant à l'action du cinnamaldéhyde sur la membrane cellulaire.

Selon certaines études, la membrane externe ne serait pas affectée par le cinnamaldéhyde : celui-ci agirait plutôt dans le périplasma ou dans d'autres parties plus profondes de la cellule.(43)

Rappel sur les décarboxylases

Les décarboxylases sont des enzymes qui conduisent à la décarboxylation des acides aminés.

L'acide aminé décarboxylé devient une amine et il y a libération de CO₂.

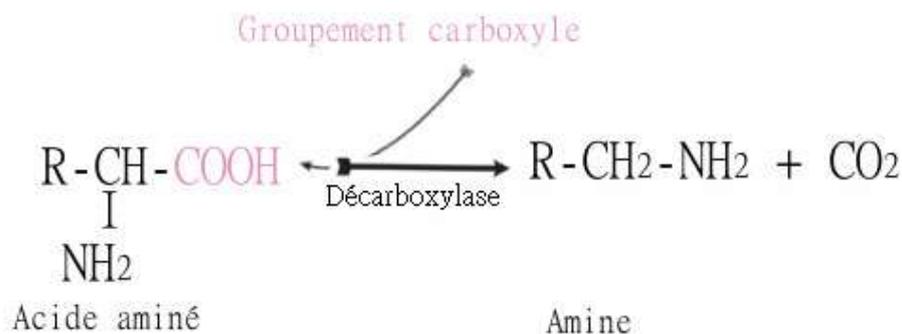


Figure 43 : Effet d'une décarboxylase

À chaque acide aminé correspond une décarboxylase spécifique.

Le cinnamaldéhyde aurait un effet inhibiteur sur certaines décarboxylases.(44)

Rappel sur le quorum sensing (45) :

Le quorum sensing est un système de communication entre les bactéries.

Grâce au quorum sensing, les bactéries peuvent détecter la densité de leur population et mettre en place une réponse communautaire.

La communication se fait *via* des petites molécules qui diffusent à travers la membrane bactérienne. Les molécules les plus étudiées sont les AHL (acylhomosérine lactone).

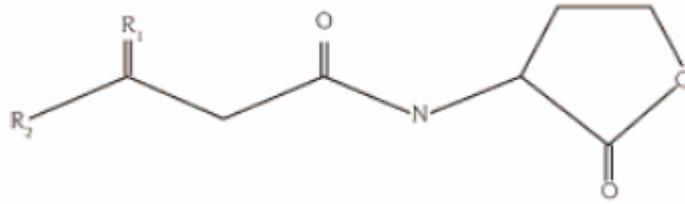


Figure 44 : AHL (acylhomosérinelactone)

Chaque cellule produit l'AHL qui diffuse dans son environnement. Sa concentration augmente avec l'augmentation de la population bactérienne.

Lorsqu'un seuil est atteint (quorum), elle peut alors diffuser à l'intérieur des cellules et se lier à un effecteur. Ceci déclenche l'expression de certains gènes.

Le quorum sensing module des activités telles que la production de biofilm, la différenciation de cellules spécialisées, la production de facteurs de virulence, la biosynthèse d'antibiotique...

Les bactéries agissent alors en synergie.

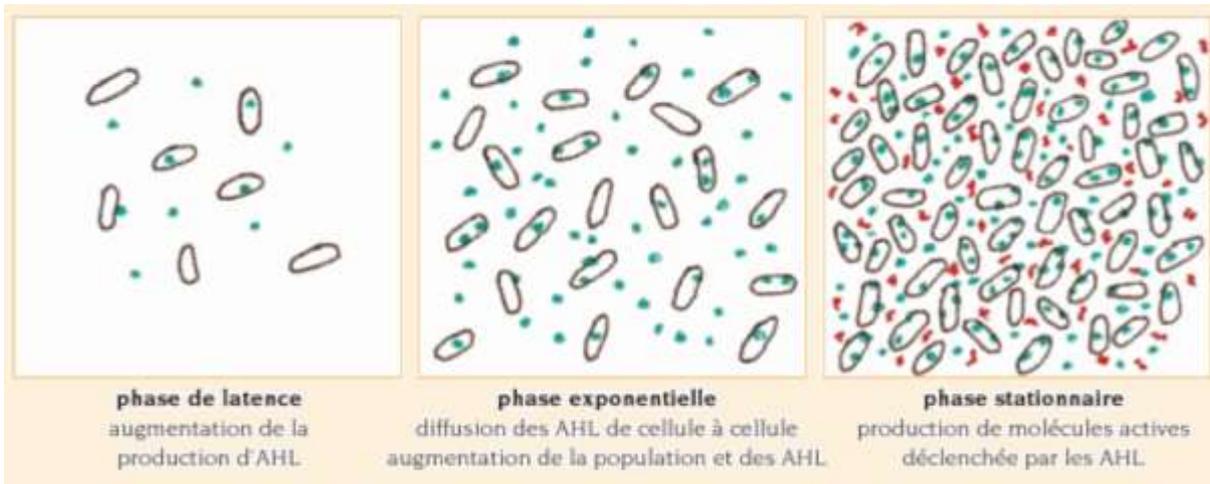


Figure 45 : Illustration du quorum sensing

Une étude a démontré que le cinnamaldéhyde possédait une action sur la formation de biofilm chez certaines bactéries.

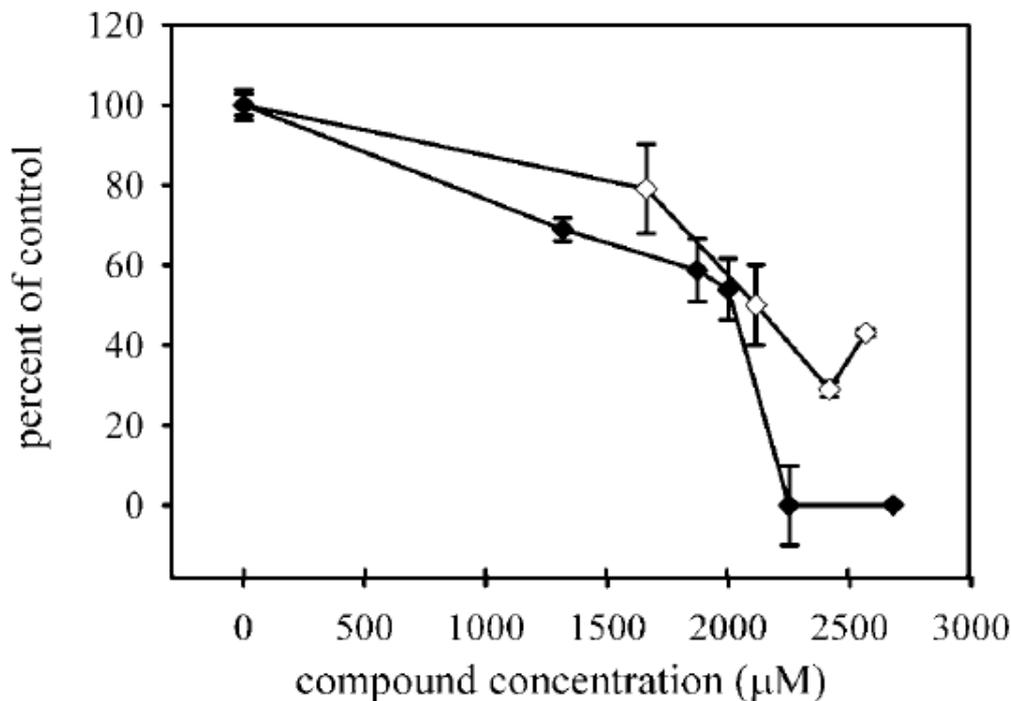


Figure 46 : SBF et SCA selon la concentration d'huile essentielle de cannelle *Cinnamomum zeylanicum* sur une souche d'*E.coli* ATCC 33456 (46)

SBF = Specific Biofilm Formation (symboles pleins).

SCA = Specific Cell Adhesion (symboles creux).

COMSTAT analysis of *E. coli* ATCC 33456 biofilm structure^a

Medium or compound	No. of samples	Total biomass ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	Maximum thickness (μm)	Substratum coverage (%)	Roughness coefficient	Avg diffusion distance (μm)	Surface-to-biovolume ratio ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$)
LB medium	10	1.5 ± 0.9^b	46.2 ± 5.7	34 ± 19	1.7 ± 0.2	0.02 ± 0.02	4.1 ± 0.7
Cinnamaldehyde	20	1.6 ± 0.7^f	$18.3 \pm 1.8^{d,f}$	$16 \pm 5^{d,f}$	$1.5 \pm 0.2^{d,e}$	$0.05 \pm 0.03^{c,f}$	$2.0 \pm 0.2^{d,f}$
Eugenol	19	4.1 ± 2.8^c	22.2 ± 6.1^d	57 ± 19^c	1.1 ± 0.5^d	0.18 ± 0.18^c	2.8 ± 1.0^d
Citronellol	10	4.8 ± 2.0^c	28.5 ± 10.0^d	52 ± 18^c	0.9 ± 0.3^d	0.12 ± 0.09^c	3.5 ± 0.5

^a Biofilms were grown for 18 h in flow cells. Essential oil components were added at concentrations that resulted in 60% inhibition of the planktonic growth rate.

^b All values are means \pm standard deviations.

^c Significantly greater ($P < 0.05$) than the corresponding value for the LB medium control.

^d Significantly less ($P < 0.05$) than the corresponding value for the LB medium control.

^e Significantly greater ($P < 0.05$) than the corresponding value for citronellol.

^f Significantly less ($P < 0.05$) than the corresponding value for citronellol.

Tableau 10 : Analyse de la structure du biofilm d'*E.coli* (46)

COMSTAT est un logiciel permettant d'analyser les biofilms selon plusieurs paramètres.

Il a été observé que les bactéries testées en présence de cinnamaldéhyde présentaient un biofilm altéré.

Le quorum sensing peut entraîner une fluorescence chez certaines bactéries.(47)

Exemple avec le système Lux :

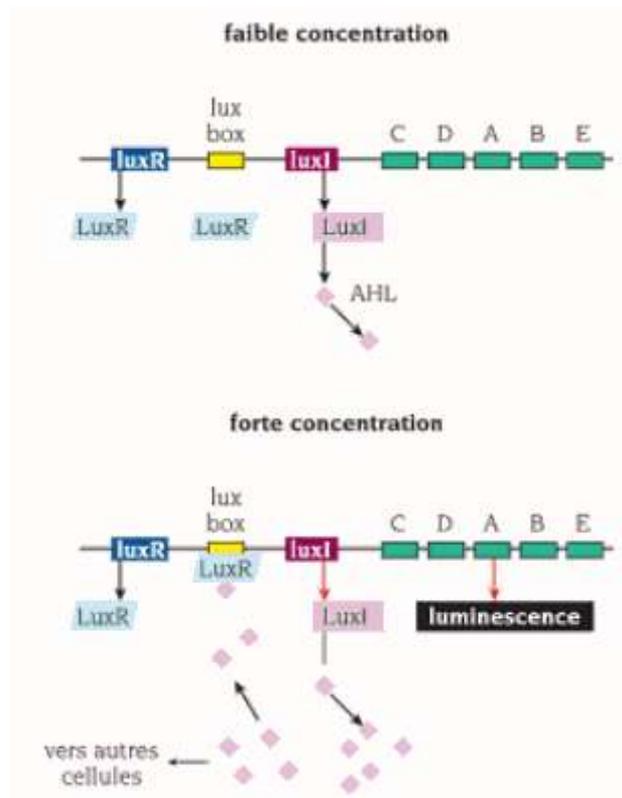


Figure 47 : Illustration du système Lux (45)

Plusieurs composantes interviennent dans ce système :

- Le gène *luxR* qui est un activateur transcriptionnel de l'opéron *luxI-CDABE*.
- 3-oxo-C6-HSL (molécule AHL-*like*) qui est l'auto inducteur de ce système, produit par l'enzyme LuxI.
- La protéine LuxI qui est la 3-oxo-C6-hsl synthase. La production de LuxI est augmentée par le complexe LuxR-auto-inducteur (rétrocontrôle positif).
- Les GFP (Green Fluorescent Protein) qui sont produites lors de l'activation des gènes *CDABE* par le complexe activateur transcriptionnel LuxR-auto-inducteur. Leur fluorescence peut être mesurée.

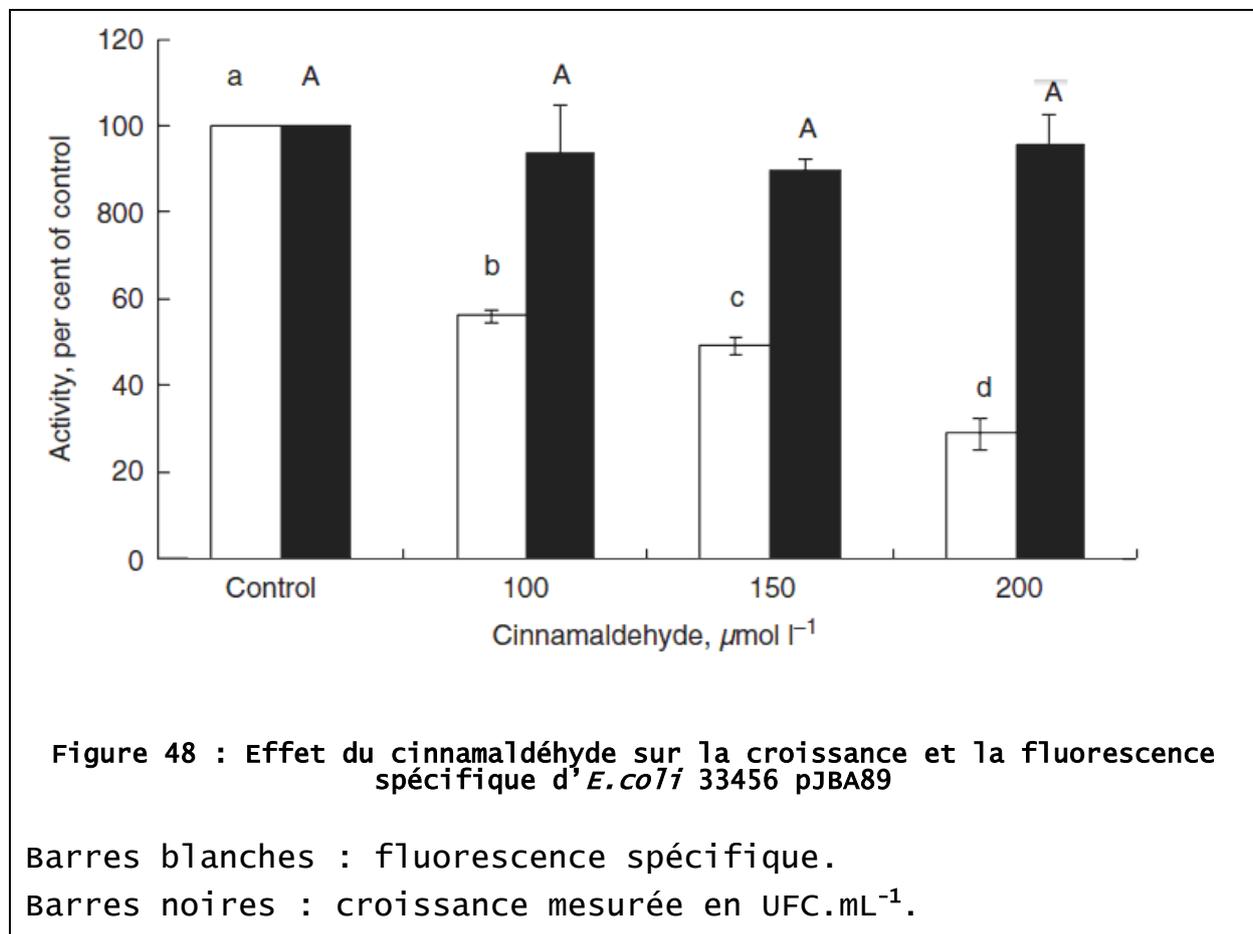
3-oxo-c6-HSL (auto-inducteur) va donc former un complexe d'activation transcriptionnel avec LuxR et induire la transcription de l'opéron *luxI-CDABE* ce qui va mener a une augmentation de la production de LuxI (rétro-contrôle positif) et des GFP.

Il a été démontré que le cinnamaldéhyde interférait avec la régulation du gène *luxR* responsable de l'activation de la fluorescence.

L'activité du système Lux était mesurée grâce à la mesure de la fluorescence des GFP.

Ici, l'expérience a mis en contact une souche d'*E.coli* avec des plasmides pJBA89 produisant des GFP. Ces plasmides possédaient un promoteur sensible à la concentration de 3-oxo-C6-HSL du milieu.

Une concentration fixe de 3-oxo-C6-HSL était ajoutée pour activer la production des GFP.



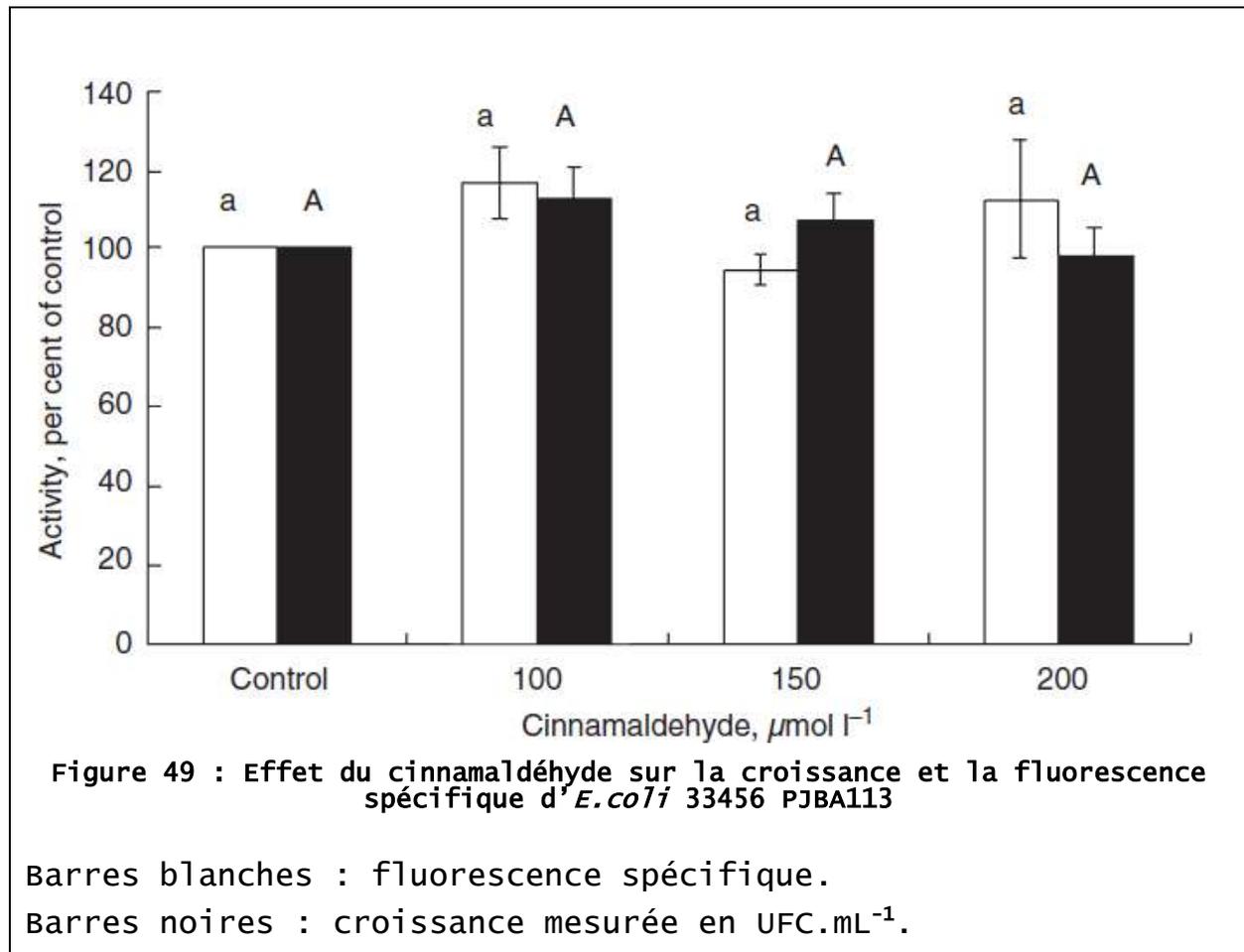
Il n'y avait pas d'action sur la croissance bactérienne : le cinnamaldéhyde était présent à une concentration inférieure à la CMI.

La CMI des souches utilisées n'était pas citée dans l'article. A titre d'exemple, au laboratoire, la CMI des souches d'*E.coli*

oscillait entre 0.015 et 0.03%. Ici, 100 $\mu\text{mol/L}$ correspondaient à 0.0013%.

On observait une diminution de la fluorescence : le cinnamaldéhyde diminuait la transcription qui devait être activée par LuxR grâce aux 3-oxo-C6-HSL.

La même expérience a été réalisée avec des plasmides non inductibles par 3-oxo-C6-HSL : pJBA113 avait une expression constitutive des GFP.



Le cinnamaldéhyde n'avait plus d'effet sur la synthèse de GFP.

Structure de 3-oxo-C6-homoserine lactone :

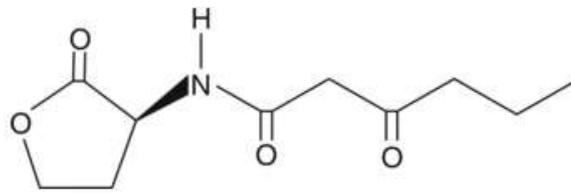


Figure 50 : Structure de 3-oxo-C6-homoserine lactone

Structure du cinnamaldéhyde :

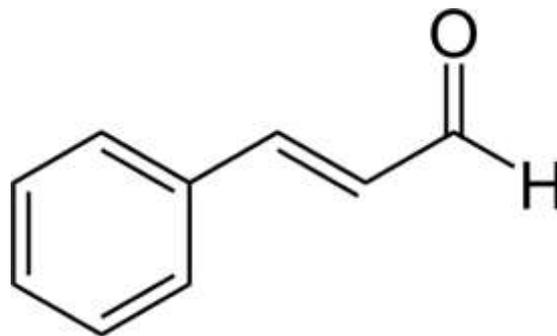


Figure 51 : Structure du cinnamaldéhyde

Les trois carbones de la chaîne aliphatique du cinnamaldéhyde pourraient interférer avec le site de liaison du 3-oxo-C6-HSL sur LuxR, pouvant alors expliquer un effet antagoniste.

D'autres études ont montré une action sur la membrane cellulaire : l'interaction entre le cinnamaldéhyde et la membrane cellulaire pourrait perturber le gradient électrochimique de la cellule : il pourrait y avoir une fuite des petits ions.(39)

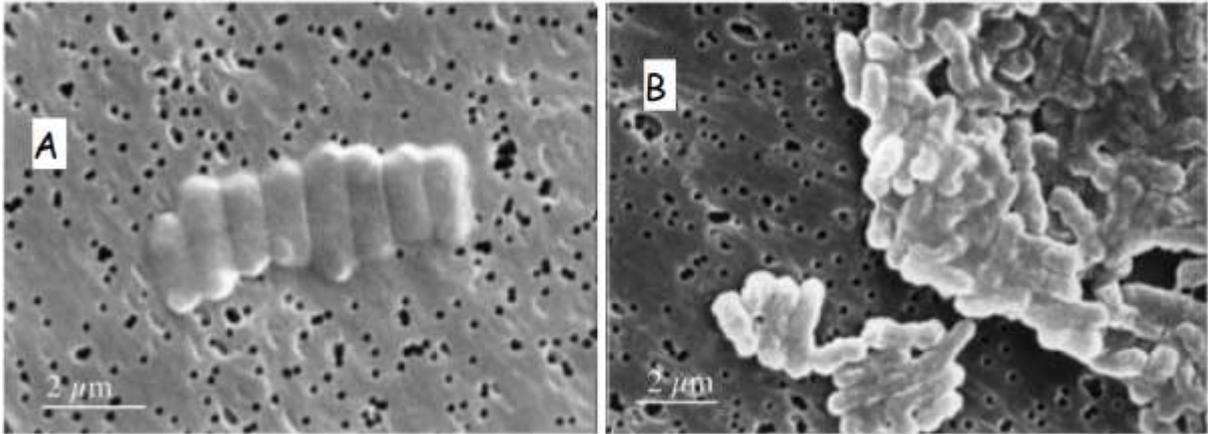


Figure 52 : Images de microscopie électronique à balayage d'*E.coli* 0157:H7 (48)

- (A) cellules non traitées (x 10 000)
- (B) cellules traitées au cinnamaldéhyde à 0,2 M (x 8000)

Note : 0,2 M = 2,64 %

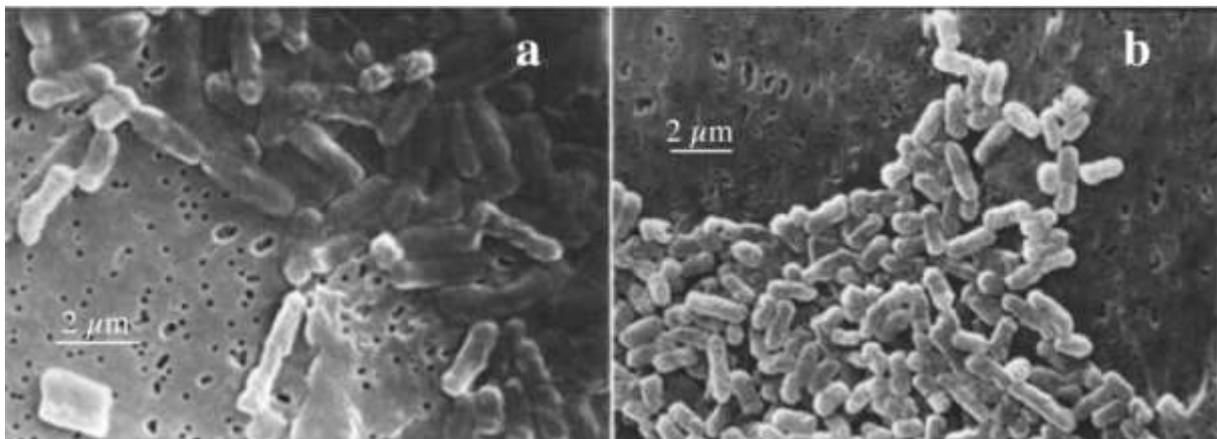


Figure 53 : Images de microscopie électronique à balayage de *S.enterica* serovar Typhimurium(48)

- (A) cellules non traitées (x 8000)
- (B) cellules traitées par du cinnamaldéhyde à 0,2 M (x 6000)

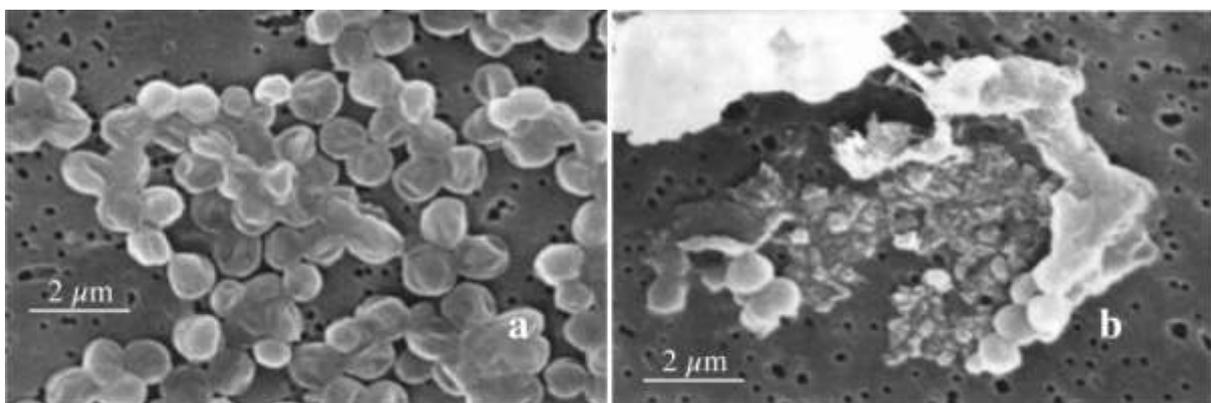


Figure 54 : Images de microscopie électronique à balayage de *S.aureus*

- (A) cellules non traitées (x 10 000)
- (B) cellules traitées par du cinnamaldéhyde à 0,2 M (x 10 000)

On notait la mort cellulaire sur cette souche bactérienne.

Selon l'étude, le cinnamaldéhyde n'aurait pas agit sur la désagrégation de la membrane qui serait le résultat d'un collapsus.

Le cinnamaldéhyde a également montré une action sur la membrane cellulaire. Il aurait provoqué un affaiblissement de la cellule par une altération du profil lipidique de la membrane : le taux d'acides gras insaturés était diminué en présence du cinnamaldéhyde.

Percentage of Total UFAs and Their Changes Occurring in Response to Treatment with EO Compounds^a

compounds	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. serovar</i> Typhimurium		<i>P. fluorescens</i>		<i>B. thermosphacta</i>		<i>S. aureus</i>	
	UFA ^b	ΔUFA ^c	UFA	ΔUFA	UFA	ΔUFA	UFA	ΔUFA	UFA	ΔUFA
control	55.71 a		59.56 a		67.46 a		58.05 a		70.66 a	
thymol	42.80 b	-12.91	47.50 b	-12.06	30.95 b	-36.52	34.23 b	-23.82	39.73 b	-30.92
limonene	18.38 b	-37.33	25.59 b	-33.98	9.80 b	-57.67	64.70 b	6.66	32.23 b	-38.42
eugenol	43.57 b	-12.14	44.21 b	-15.35	1.66 b	-65.80	48.23 b	-9.82	53.19 b	-17.47
carvacrol	30.99 b	-24.72	49.38 b	-10.19	42.64 b	-24.82	39.66 b	-18.39	19.23 b	-51.43
<u>cinnamaldehyde</u>	14.12 b	<u>-41.58</u>	7.75 b	<u>-51.81</u>	1.13 b	<u>-66.33</u>	2.74 b	<u>-55.31</u>	3.27 b	<u>-67.38</u>

^a Means in the same column followed by a letter other than the control value differ from this ($P < 0.05$). ^b Values are means of triplicate determinations. ^c UFAs control - UFAs treated cells.

Tableau 11 : Pourcentage d'acides gras insaturés et leur variation en réponse à un traitement avec des composés d'huiles essentielles. (48)

La membrane altérée entraînait donc un relargage des métabolites et des enzymes de la cellule, causant la mort cellulaire.

A noter toutefois ici que les concentrations de cinnamaldéhyde utilisées étaient bien supérieures aux CMI de **toutes** les souches bactériennes (photos à 2.64g/100mL). Ces doses sont également létales pour les animaux.

Tests effectués à Institut Polytechnique de Lyon :

Observation d'*E.coli* et de SARM au microscope électronique. Lorsque ces bactéries étaient exposées au cinnamaldéhyde à 1% ou au Nosolcc à 1 %, leur morphologie était modifiée.

Lorsqu'elles étaient colorées (donc vivantes), leur contour et leur coloration apparaissaient hétérogènes. Lors d'un contact avec Noso1cc, beaucoup de débris cellulaires étaient observés.

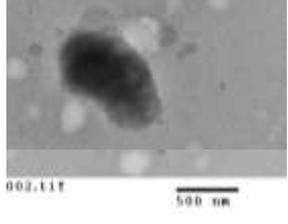
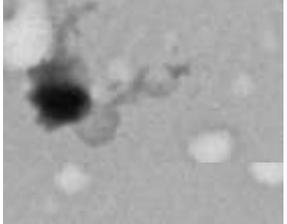
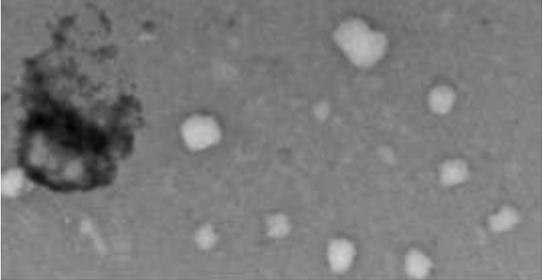
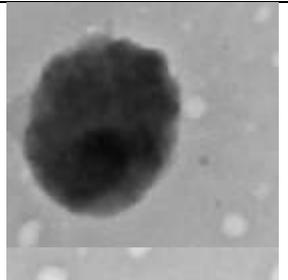
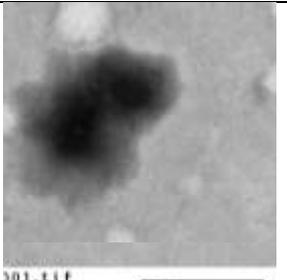
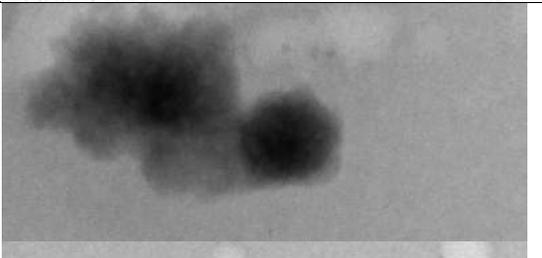
	Témoin	Cinnamaldéhyde 1%	Noso1cc 1%
<i>E. coli</i>	 Micrograph showing a single, dark, rod-shaped <i>E. coli</i> bacterium. A scale bar of 500 nm is present at the bottom right. File name: 002.tif	 Micrograph showing a dark, rod-shaped <i>E. coli</i> bacterium surrounded by some faint, diffuse material. A scale bar of 500 nm is present at the bottom right. File name: 001.tif	 Micrograph showing a dark, rod-shaped <i>E. coli</i> bacterium surrounded by numerous small, bright, circular debris. A scale bar of 500 nm is present at the bottom right. File name: :entri+lavage).005.tif, 14000x @ 100 nm
SARM	 Micrograph showing a single, dark, spherical SARM cell. A scale bar of 500 nm is present at the bottom right. File name: 008.tif	 Micrograph showing a dark, spherical SARM cell surrounded by some faint, diffuse material. A scale bar of 500 nm is present at the bottom right. File name: 001.tif	 Micrograph showing a dark, spherical SARM cell surrounded by some faint, diffuse material. A scale bar of 500 nm is present at the bottom right. File name: rage).006.tif

Tableau 12 : Photographie suite à l'observation d'un *E. coli* et d'un SARM en contact avec du cinnamaldéhyde ou de Noso1cc

Connaissances actuelles à propos de la toxicité du cinnamaldéhyde

Etudes sur l'animal

Administration par voie orale

- Administration du cinnamaldéhyde par voie orale chez le rat

La DL50 calculée variait de 2,22 à 3,4 g/kg selon les études.(21)

DL50 : Dose létale 50 (49)

Elle permet de mesurer la toxicité aiguë. Après administration d'une forte quantité de produit en une seule fois ou plusieurs fois très rapprochées, on observe la mort ou la survie des animaux.

La dose qui aura abouti à la mort de la moitié de la population étudiée est appelée la dose létale 50.

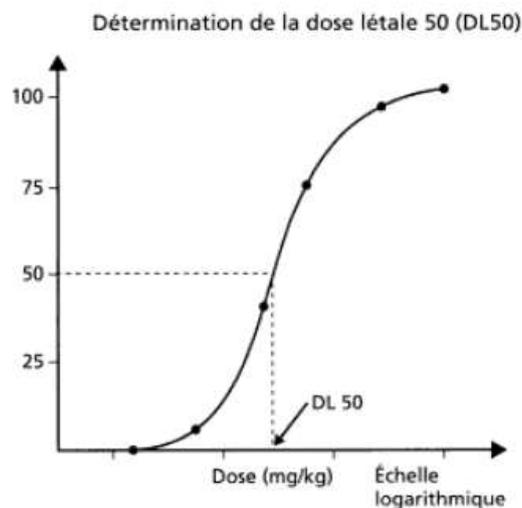


Figure 55 : Détermination de la dose létale 50

Various Routes of Administration					
Toxicity Rating	Commonly Used Term	LD ₅₀ Single Oral Dose Rats	Inhalation 4-hr Vapor Exposure Mortality 2/6-4/6 Rats	LD ₅₀ Skin Rabbits	Probable Lethal Dose for Man
1	Extremely toxic	≤1 mg/kg	<10 ppm	≤5 mg/kg	A taste, 1 grain
2	Highly toxic	1-50 mg	10-100 ppm	5-43 mg/kg	1 teaspoon, 4 cc
3	Moderately toxic	50-500 mg	100-1000 ppm	44-340 mg/kg	1 ounce, 30 gm
4	Slightly toxic	0.5-5 g	1000-10,000 ppm	0.35-2.81 g/kg	1 cup, 250 gm
5	Practically nontoxic	5-15 g	10,000-100,000 ppm	2.82-22.59 g/kg	1 quart, 1000 gm
6	Relatively harmless	>15 g	>100,000 ppm	>22.6 g/kg	>1 quart

Tableau 13 : Classification de la toxicité d'une substance selon la valeur de la DL50 (50)

La mort des rats était constatée deux à trois heures après l'administration du cinnamaldéhyde. Les signes cliniques observés étaient l'abattement, des diarrhées et un amaigrissement sévère.

Une population de dix rats de la lignée F344/N a reçu 12 doses de cinnamaldéhyde, réparties sur 14 jours. Les doses variaient de 235 mg/kg/jour à 3750 mg/kg/jour par **gavage** avec de l'huile de maïs.

On administrait, dans un autre groupe, du cinnamaldéhyde dans des **microcapsules** dans l'alimentation, les doses variant de 0,625 à 10 % de cinnamaldéhyde. Les animaux étaient pesés, ainsi que leur foie, leur rate et leur rein droit.

Une brève dissection était pratiquée sur chaque animal, dont les organes étaient examinés à la recherche de lésions évidentes. Des examens anatomiques et histologiques complémentaires étaient réalisés chez les animaux morts prématurément ou ayant reçu une dose élevée de cinnamaldéhyde.

Chez les rats ayant reçu le cinnamaldéhyde par gavage :

- aucun effet n'était observé aux plus faibles doses ;
- tous les animaux des deux groupes avec les doses les plus élevées moururent durant les sept premiers jours d'administration ;
- une hyperplasie légère à modérée du pré-estomac était observée chez les mâles à partir de 470 mg/kg ;
- le tractus gastro-intestinal était distendu aux doses 1880 et 3750 mg/kg ;

- le poids corporel des femelles était légèrement diminué dans le groupe 940 mg/kg.

Chez les rats dont la nourriture comportait des microcapsules de cinnamaldéhyde :

- tous les animaux survécurent jusque la fin de l'étude ;
- aucun effet n'était observé à la dose 0,625% ;
- un amaigrissement important, corrélé à la dose, était observé à partir de 1,25% chez les mâles et à partir de 2,5% chez les femelles ;
- une légère diminution du poids du foie des mâles était observée à la plus haute dose ;
- l'incidence et la sévérité de l'hyperplasie du pré-estomac étaient corrélées à la dose reçue chez les mâles et les femelles à partir de la dose 1,25% ;
- une hypoplasie des organes reproducteurs chez les mâles et les femelles était observée à partir de la dose 2,5%.

Cinq études de toxicité à plus long terme (douze à seize semaines) sur 20 à 24 souris ou rats à des doses qui étaient de 275 à 5475mg/kg ont relevé (51) :

- une diminution de l'appétit et du poids corporel ;
- une augmentation de la concentration des sels biliaires sériques avec toutes les doses chez les rats mâles et avec les trois doses les plus hautes chez les rates ;
- une légère hépatomégalie et une légère hyperkératose de l'estomac à la dose la plus élevée ayant entraîné une augmentation du poids du foie des rats. L'activité du cytochrome P450 était augmentée ;
- des nodules et une hyperplasie squameuse du pré-estomac chez les rats aux trois doses les plus hautes.

Il était également retrouvé, à doses élevées, une hyperplasie squameuse et une hyperkératose du pré-estomac des souris.

Des coupes histologiques d'estomac ont été réalisées :

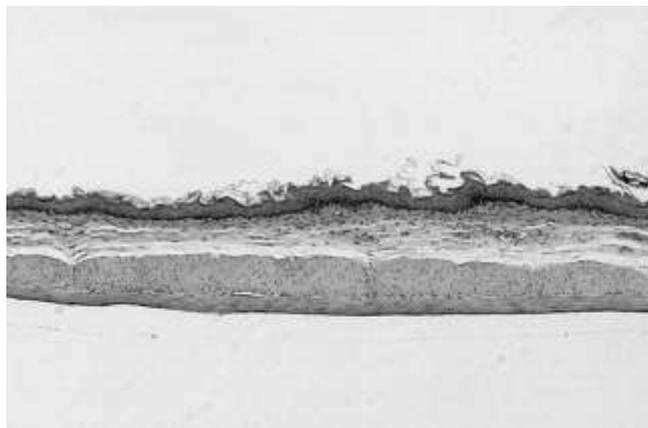


Figure 56 : Le pré-estomac d'un rat mâle témoin (52)

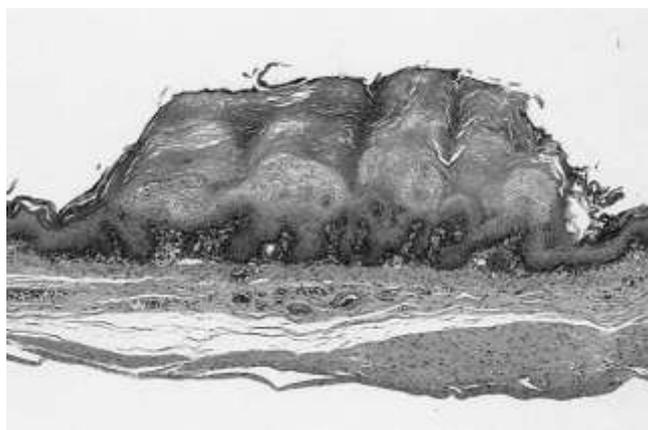


Figure 57 : Hyperplasie squameuse de l'épithélium du pré-estomac chez le rat mâle exposé à 0,82% de cinnamaldéhyde dans l'alimentation pendant 3 mois (52)

Il était observé des couches de kératine anormales.

Egalement :

- inflammation chronique du pré-estomac chez les rats à doses élevées ;
- dégénérescence de l'épithélium olfactif de la cavité nasale chez les souris à doses élevées.
- chez les souris, forte mortalité aux doses les plus élevées.

Une étude de toxicité chronique pendant deux ans a suivi 100 rats et 100 souris nourris avec du cinnamaldéhyde encapsulé dans la nourriture. Les doses variaient de 50 à 200 mg/kg chez le rat et de 125 à 550 mg/kg chez la souris.

Il était observé un poids moyen plus faible chez les souris et les rats dont la nourriture comportait du cinnamaldéhyde par rapport aux souris et rats témoins.

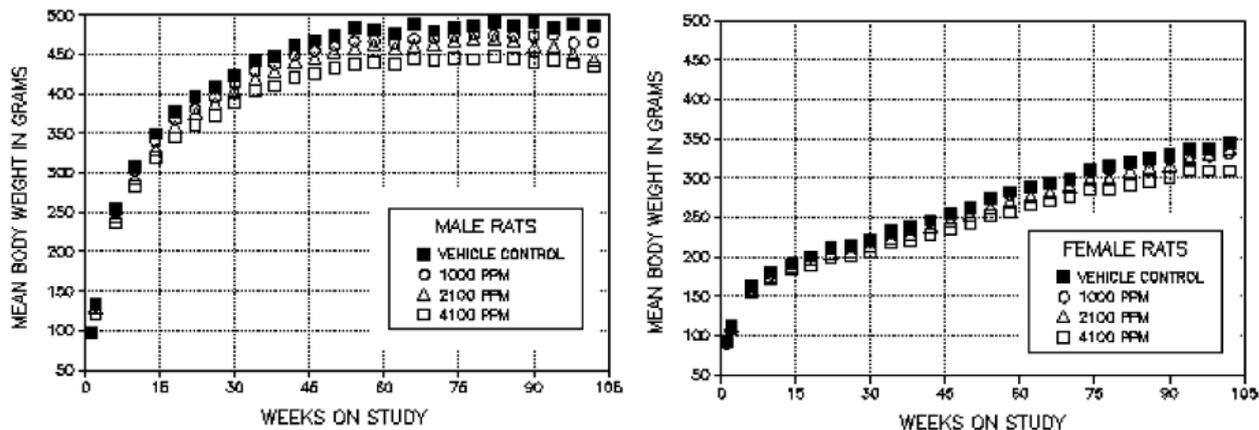


Figure 58 : Courbes de croissance des rats mâles et femelles ayant été exposés avec du *trans*-cinnamaldéhyde dans la nourriture pendant deux ans

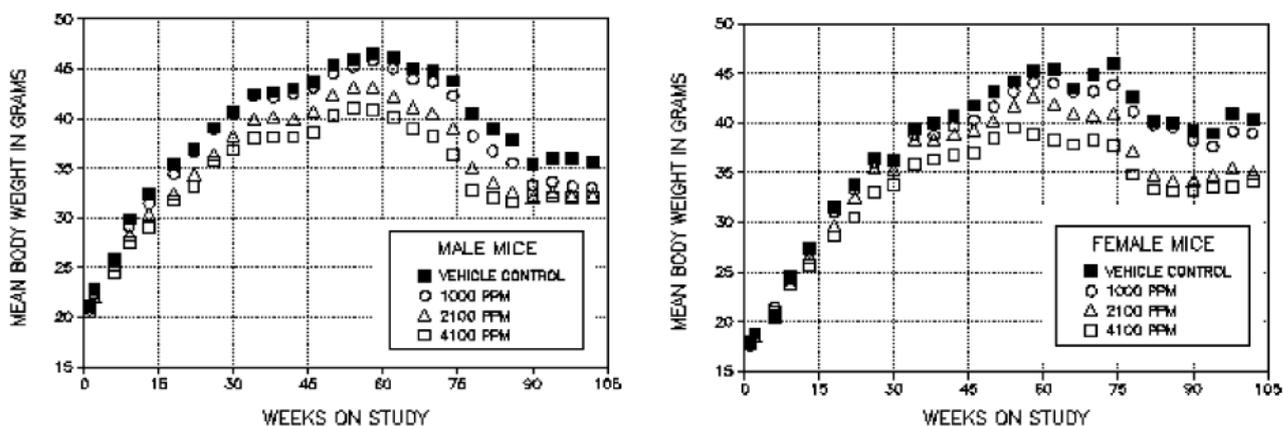


Figure 59 : Courbes de croissance des souris mâles et femelles ayant été exposées avec du *trans*-cinnamaldéhyde dans la nourriture pendant deux ans

Incidences of forestomach proliferative lesions in mice in the two-year feed study of *trans*-cinnamaldehyde

	Vehicle control	Concentration (ppm)			Historical controls
		1000	2100	4100	
<i>Male</i>					
Number examined microscopically	50	50	48	50	
Hyperplasia ^a	1	0	1	0	
Squamous cell papilloma	0	0	1	1	1.3% (12/959); range 0–6%
Squamous cell carcinoma	0	0	1	0	0.2% (2/959); range 0–2%
Squamous cell papilloma or carcinoma	0	0	2	1	1.5% (14/959); range 0–6%
<i>Female</i>					
Number examined microscopically	50	50	50	50	
Hyperplasia ^a	0	1	1	0	
Squamous cell papilloma	0	0	3	0	1.5% (14/959); range 0–6%
Squamous cell carcinoma	0	0	1	0	0.1% (1/959); range 0–2%
Squamous cell papilloma or carcinoma	0	0	4	0	1.6% (15/959); range 0–6%

^a Number of animals with lesions.

Tableau 14: Incidences des lésions prolifératives dans le pré-estomac chez des souris ayant été exposées avec du *trans*-cinnamaldéhyde pendant deux ans

Il n'a pas été rapporté d'effet significativement toxique. La dose qui n'a pas entraîné d'effet adverse (NOAEL) a donc été fixée à 200 mg/kg chez le rat et 550 mg/kg chez la souris.(52)

- Administration du cinnamaldéhyde par voie orale chez le cobaye

La DL50 mesurée était de 1,16 g/kg.(51)

Administration du cinnamaldéhyde par voie cutanée chez le lapin

Chez le lapin, les DL50 mesurées variaient de 0,59 ml/kg à 1,2 ml/kg.(21)

Les signes cliniques observés durant l'étude étaient la léthargie, des diarrhées ou au contraire peu de déjections, un amaigrissement, une moiteur de la région ano-génitale, des escarres sévères, une nécrose cutanée et une diminution de la mobilité des lapins due aux lésions cutanées.

Les dissections réalisées sur les lapins révélaient des lésions de divers organes (poumons, reins, foie, peau, utérus chez un animal).

Au niveau des effets cutanés, on retrouvait des érythèmes sévères, des œdèmes modérés à sévères, des fissures et une rigidité de la peau allant d'un stade léger à un stade marqué. Des hémorragies sous-cutanées, un blanchissement, des escarres, des exfoliations, des desquamations et une nécrose ont aussi été observés notamment chez les lapins ayant reçu la DL50 de cinnamaldéhyde.(21)

Etudes de sensibilisation allergique immunologique

Le cinnamaldéhyde a entraîné des réactions d'hypersensibilité allergique lors de tests sur des porcs.

Des souris ont été sensibilisées au cinnamaldéhyde. Dans un échantillon de 40 µL, le cinnamaldéhyde concentré à 21,6% sensibilisait la moitié des souris testées. Cette concentration n'était plus que de 5% lorsque les souris avaient été supplémentées en vitamine A pendant 21 jours avant le test.

Etudes de phototoxicité

Définition de la phototoxicité : réaction toxique aiguë apparaissant après une première exposition de la peau à certains produits chimiques et exposition subséquente à la

lumière, ou déclenchée par l'irradiation de la peau après administration systémique d'un produit.(53)

Une molécule qui absorbe de l'énergie lumineuse peut s'activer et conduire à des réactions phototoxiques et/ou photoallergiques.(54)

Le cinnamaldéhyde absorbe la lumière UVB (290-320 nm), avec un maximal à 287 nm et un retour à l'état fondamental à 330 nm.(21)

In vitro :

Le test "3T3 NRU PT" ou 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicité :

Le rouge neutre est un colorant qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires et s'accumule dans les lysosomes.

La cytotoxicité est exprimée comme étant la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation intra lysosomale du colorant vital rouge neutre 24 heures après traitement par le produit testé.

L'altération de la surface cellulaire de la membrane lysosomale par le rayonnement UVA et/ou visible entraîne une diminution de la fixation du rouge neutre.

Des essais de phototoxicité *in vitro* ont été conduits sur le cinnamaldéhyde : (21)

Selon les études, une phototoxicité avait été ou n'avait pas été observée : dans l'essai 3T3 NRU PT, une étude se révélait positive et deux autres études se révélaient négatives.

Deux essais utilisant la photohémolyse étaient positifs.

Dans un essai utilisant un modèle de peau, la phototoxicité du cinnamaldéhyde n'avait pas été retrouvée.

Dans un essai sur des levures telles que *Candida utilis*, une phototoxicité avait été observée après exposition aux UVA. Dans un deuxième et troisième essai ayant utilisé *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*, la phototoxicité n'avait pas été retrouvée après exposition aux UVA.

In vivo : (21)

Une phototoxicité a été recherchée chez des porcs : aucun n'a présenté de réponse positive aux tests.

Le cinnamaldéhyde a été testé chez les cobayes à des concentrations de 1% à 20% : il n'a pas entraîné d'altérations cutanées consécutives à une phototoxicité ou une photoallergie.

Administration du cinnamaldéhyde par voie intrapéritonéale

Selon les études, chez la souris, la DL50 était de 460 (51), 610 ou 2 318 mg/kg. (21)

Administration du cinnamaldéhyde par inhalation

Chez la souris, la DE25 (la dose provoquant une réduction de 25% de la fréquence respiratoire) a été évaluée à 241 µg/L, après exposition d'une minute à l'aide d'un nébuliseur.

Administration du cinnamaldéhyde par voie intraveineuse

Chez la souris, la DL50 a été estimée à 132 mg/kg.

Une étude chez le chien a montré que la concentration de catécholamines doublait après administration de 20 mg/kg de cinnamaldéhyde.

Administration du cinnamaldéhyde par voie oculaire

Summary of eye irritation studies in animals

Concentration	Vehicle	Results	References
100	NA	Irritation	Troy (1977)
1.25%	Alcohol SDA 39C	Intense irritation	RIFM (1963)
1.0%	Alcohol SDA 39C	Mild irritation	RIFM (1972b)
0.125%	Alcohol SDA 39C	Irritation	RIFM (1964c)

Tableau 15 : Résumé des études animales concernant la toxicité du cinnamaldéhyde administré par voie oculaire de l'article concerné (21)

A la concentration de 1,25% de cinnamaldéhyde apparaissaient d'intenses irritations oculaires, accompagnées d'un sévère chémosis (*gonflement œdémateux de la conjonctive*) et d'importantes sécrétions oculaires chez tous les lapins testés.

L'irritation de la conjonctive semblait réversible lorsque la concentration était $\leq 1,0\%$.

Effets tératogènes et fœtotoxiques

L'effet tératogène est à l'origine des malformations. C'est pendant la période d'organogenèse (ou embryonnaire), J15 à J60 chez l'Homme, que l'embryon est le plus sensible aux agents tératogènes.

L'effet fœtotoxique entraîne rarement un syndrome malformatif. La période fœtale va du troisième mois de grossesse jusqu'à l'accouchement, on observe une croissance et une maturation fonctionnelle du fœtus.

L'effet fœtotoxique provoque des hypotrophies, des retards de croissance ou des effets sur le système nerveux central.(56)

Du cinnamaldéhyde était injecté en dose unique sur des embryons de poulet à J3.

Le cinnamaldéhyde concentré à 0,125 μM ($1.65 \cdot 10^{-6}\%$) entraînait 4,6% d'embryons malformés et 25,6 % de mortalité.

Le cinnamaldéhyde concentré à 2,5 μM ($3.30 \cdot 10^{-5}\%$) entraînait 8% d'embryons malformés et 96% de mortalité.(21)

Une dose de cinnamaldéhyde était administrée par voie orale chez des rates de J7 à J17.

Dès 5 mg/kg, une faible ossification crânienne était observée.

Il était observé une augmentation de l'incidence des dilatations du pelvis, des anomalies des papilles rénales, et des dilatations des uretères dans les groupes de faible et moyenne doses. Il était également noté une augmentation du nombre de fœtus avec au moins deux sternèbres anormaux dans le groupe de moyenne dose.

Cependant, ces effets n'étaient pas corrélés à la dose et les auteurs conclurent qu'ils pouvaient être dus à la diminution du gain de poids maternel qui était remarqué dans les groupes de moyenne et forte doses.

Génotoxicité et mutagénèse

- Mutations géniques

Le test d'Ames (ou Mutatest)(56)

Le potentiel génotoxique d'une substance sur des souches de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* mutées a été étudié. Ces souches portaient une mutation (His-) les rendant incapables de se reproduire dans un milieu sans histidine.

Cette mutation peut « reverser » sous l'effet d'un mutagène et la bactérie peut alors se multiplier dans le milieu dépourvu d'histidine. Les souches mutées varient selon le gène muté, ceci donnant une indication du type de mutation qu'induit le xénobiotique testé.

Exemple : la souche TA 100 permet la détection des mutations ponctuelles (substitution de paires de bases) : elle possède la mutation hisG46, qui est une transition GC -> AT correspondant à la substitution d'un codon proline par un codon leucine.

Au moins dix-huit études ont montré que le cinnamaldéhyde n'entraînait pas de mutations lors du test d'Ames.(21)

Dans le test d'Ames, il est possible d'incorporer un mélange métabolisant provenant d'un extrait de foie de rat (S9 mix) qui permet de mimer *in vitro* certains systèmes hépatiques. (56)

Une étude a montré un faible effet mutagène du cinnamaldéhyde dans des souches TA100 sur des souris S9 à des doses de 25 à 300 µg/puits (21).

L'essai a été réalisé sur des souches de *B. subtilis*, le cinnamaldéhyde a été révélé comme induisant un faible effet mutagène à des doses entre 1 et 10 µL/puits.

Test du lymphome de souris :

Des souris L5178Y sont utilisées pour ce test. Ces souris sont hétérozygotes pour le locus thymidine kinase (Tk1) sur le chromosome 11, elles possèdent donc un allèle Tk^+ et un allèle tk^- .

Lors d'une mutation sur l'allèle Tk^+ , les mutants deviennent $tk^{-/-}$. Ces mutants sont résistants à la trifluorothymidine. On les sélectionne grâce au milieu de culture.(56)

Le cinnamaldéhyde pourrait induire une augmentation des mutations sur l'allèle Tk^+ .

La concentration nécessaire pour l'induction de l'augmentation de fréquence des mutations était de 0,2 - 16,7 $\mu\text{g/ml}$.(21)

- Mutations chromosomiques

Echange des chromatides sœurs :

Les échanges entre chromatides sœurs sont physiologiques et normaux. Dans le cadre d'une étude toxicologique, la fréquence de ces échanges représente un moyen d'évaluer la capacité d'un xénobiotique à induire des cassures de brin de l'ADN.(56)

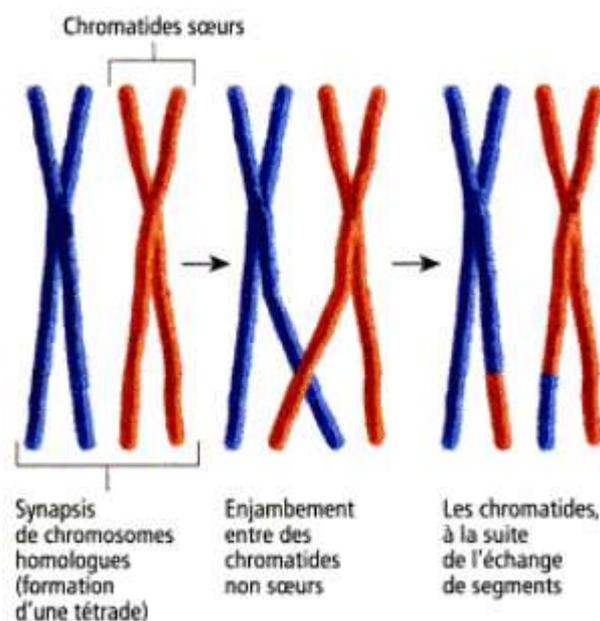


Figure 60: Illustration d'un échange de segments de chromatides sœurs (57)

Des cellules sont cultivées en présence de 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) pendant deux cycles cellulaires. On obtient des chromosomes dont d'ADN d'une chromatide contient du BrdU sur un des deux brins tandis que l'autre chromatide contient du BrdU sur les deux brins.

Ces cellules en métaphase sont observées au microscope optique et le nombre d'échanges entre chromatides sœurs est compté. (56)

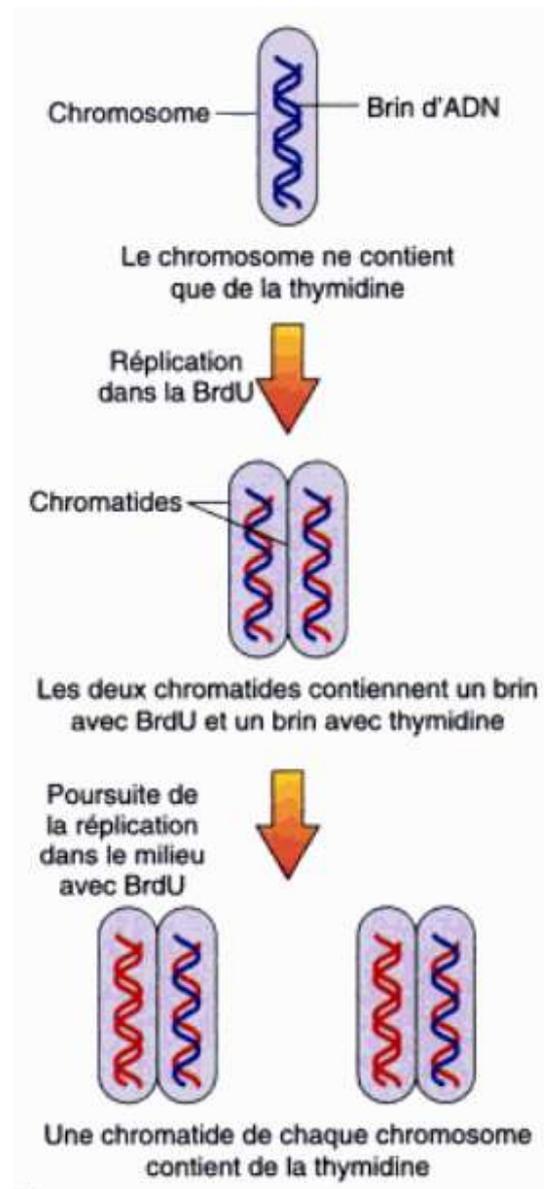


Figure 61 : Illustration d'un échange de segments de chromatides sœurs (58)

Des cultures de cellules de cobaye en présence de cinnamaldéhyde pendant 22 heures ont été réalisées. Les doses de cinnamaldéhyde étaient de 3,3 ou 10 ou 33 μM ($4,36 \cdot 10^{-4}$ g/L ou $1,32 \cdot 10^{-3}$ g/L ou $4,36 \cdot 10^{-3}$ g/L).

Il a été montré que le cinnamaldéhyde n'induisait pas d'augmentation d'échanges de chromatides sœurs.(21)

Lorsque les concentrations étaient de 0,34 à 10,2 µg/ml sans S9 et de 34 à 91,8 µg/ml avec le S9, une autre étude a montré que les échanges des chromatides sœurs étaient faiblement induits.(21)

Ces concentrations sont encore plus faibles que l'étude ci-dessus, pourtant les résultats (datant de 1987) sont contraires.

Des aberrations chromosomiques ont été recherchées.

Ces cellules de cobaye étaient mises en contact avec 15 µg/ml de cinnamaldéhyde pendant 24 ou 48 heures, puis elles étaient bloquées en métaphase et observées. Il a été noté une augmentation d'aberrations chromosomiques, quantitativement et qualitativement.

Des effets clastogènes (atteinte de la qualité du chromosome, souvent cassé puis mal réparé) ont été mis en évidence après culture de cellules de poumon de cobaye en présence de cinnamaldéhyde dosé à 7,5-30 µg/ml. La dose entraînant un effet clastogène était plus élevée (18,1-72,5 µg/ml) lorsque le milieu de culture contenait du S9 activant la métabolisation du cinnamaldéhyde.

La fréquence des aberrations chromosomiques était augmentée lors d'un contact entre des cellules de cobaye et du cinnamaldéhyde dosé à 2, 10 et 20 nM (de $2,34 \cdot 10^{-7}$ g/L à $2,64 \cdot 10^{-6}$ g/L) pendant 24 heures.

Un effet cytotoxique important était observé à 20 nM.

Des aberrations chromosomiques ont été recherchées sur des cellules de fibroblastes humains. Il n'a pas été détecté d'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques.
(51)

Test des micronoyaux

Les micronoyaux sont des fragments de noyau, indépendants du noyau principal, et présents dans le cytoplasme des cellules en interphase.

Ils sont formés au cours d'une division cellulaire soit par fragmentation chromosomique sans centromère qui ne peut pas se positionner sur l'appareil mitotique soit par chromosome entier qui ne migre pas pendant l'anaphase.(56)

Au moins cinq études n'ont pas trouvé d'augmentation de la fréquence des micronoyaux après administration de cinnamaldéhyde par voie orale ou injectable chez des souris ou des rats.

Dans une étude, le cinnamaldéhyde avait induit une faible augmentation de la fréquence des micronoyaux chez le rat après administration d'eau contenant du cinnamaldéhyde à 500 µg/ml.(21)

Remarque : le cinnamaldéhyde pouvait aussi diminuer les effets de certains toxiques. Par exemple il permettait de limiter l'augmentation de la fréquence des micronoyaux due à la 2-amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline.

- **Cancérogénèse**

Au moins quatre études ont recherché un effet cancérogène du cinnamaldéhyde. Il n'a pas été trouvé d'effet cancérogène.(51)

LLNA weighted mean EC3 values (µg/cm ²) [No. Studies]	Potency Classification Based on Animal Data ¹	Human Data			WoE NESIL ³ (µg/cm ²)
		NOEL – HRIPT (induction) (µg/cm ²)	NOEL – HMT (induction) (µg/cm ²)	LOEL ² (induction) (µg/cm ²)	
262 [23]	Moderate	591 ⁴	NA	775	590

NOEL = No observed effect level; HRIPT = Human Repeat Insult Patch Test; HMT = Human Maximization Test;
LOEL = lowest observed effect level; NA = Not Available

¹ Based on animal data using classification defined in ECETOC, Technical Report No. 87, 2003

² Data derived from HRIPT or HMT

³ WoE NESIL limited to three significant figures

⁴ MT-NOEL = Maximum Tested No Effect Level. No sensitization was observed in human predictive studies. Doses reported reflect the highest concentration tested, not necessarily the highest achievable NOEL

Administration du cinnamaldéhyde chez l'Homme

Voie cutanée

- Réactions d'irritations

Human studies for skin irritation with cinnamaldehyde

Method	Dose (%)	Exposure time (h)	Vehicle	Results	Reference
Induction phase (HRIPT)	3% plus α -tocopherol	Nine (24 hr) exposures	3:1 DEP:EtOH	2/28	RIFM (2003a)
Induction phase (HRIPT)	3% plus α -tocopherol	Nine (24 hr) exposures	3:1 EtOH:DEP	8/30	RIFM (2003a)
Induction phase (HRIPT)	1.25	Nine (24 hr) exposures	Ethanol	No reactions (0/10)	RIFM (1964a)
Induction phase (HRIPT)	1.0	Nine (24 hr) exposures	Alcohol SDA 39C	No reactions (0/41)	RIFM (1973b)
Induction phase (HRIPT)	0.5	Nine (24 hr) exposures	Ethanol	No reactions (0/38)	RIFM (1965)
Induction phase (HRIPT)	0.5% plus α -tocopherol	Nine (24 hr) exposures	3:1 DEP:EtOH	No reactions (0/22)	RIFM (2002)
Induction phase (HRIPT)	0.5% plus α -tocopherol	Nine (24 hr) exposures	3:1 EtOH:DEP	No reactions (0/19)	RIFM (2002)
Induction phase (HRIPT)	0.125	Nine (24 hr) exposures	Ethanol	No reactions (0/41)	RIFM (1964b)
Maximization pre-test	8	48	Petrolatum	Severe irritation in 5/5 subjects	RIFM (1973c)
Maximization pre-test	3	48	Butylene glycol	No reactions (0/5)	RIFM (1974a)
Maximization pre-test	0.5	48	Petrolatum	No reactions (0/25)	RIFM (1977a)
Maximization pre-test	0.5	48	Petrolatum	No reactions (0/25)	RIFM (1977b)
Maximization pre-test	0.5	48	Petrolatum	No reactions (0/25)	RIFM (1977c)
Maximization pre-test	0.5	48	Petrolatum	No reactions (0/25)	RIFM (1977d)

Tableau 16 : Résumé des études sur l'Homme concernant la toxicité du cinnamaldéhyde administré par voie cutanée de l'article concerné (21)

Skin irritation: humans

Material	Method	Concentration	Subjects	Results	References
Cinnamaldehyde	Maximization pre-test, 48-h closed patch test	8% in petrolatum	5 male volunteers	Severe irritation in 5/5 subjects	RIFM (1973c)
Cinnamaldehyde	Maximization pre-test, 48-h closed patch test	3% in butylene glycol	5 male and female volunteers	No reactions	RIFM (1974a)
Cinnamaldehyde	Irritation evaluated during the induction phase of a Human Repeated Insult Patch Test	3% cinnamaldehyde in 3:1 DEP:EtOH with 0.5% α -tocopherol	28 male and female volunteers	2/28 reactions	RIFM (2003b)
Cinnamaldehyde	Irritation evaluated during the induction phase of a Human Repeated Insult Patch Test	3% cinnamaldehyde in 3:1 EtOH:DEP with 0.5% α -tocopherol	30 male and female volunteers	8/30 reactions	RIFM (2003b)
Cinnamaldehyde	Irritation evaluated during the induction phase of a Human Repeated Insult Patch Test	0.125% in ethanol	41 male and female volunteers	No reactions	RIFM (1964b)
Cinnamaldehyde	Irritation evaluated during the induction phase of a Human Repeated Insult Patch Test	0.5% in ethanol	38 male and female volunteers	No reactions	RIFM (1965)
Cinnamaldehyde	Irritation evaluated during the induction phase of a Human Repeated Insult Patch Test	0.5% cinnamaldehyde in 3:1 DEP:EtOH with 0.5% α -tocopherol	22 male and female volunteers	No reactions	RIFM (2002a)
Cinnamaldehyde	Irritation evaluated during the induction phase of a Human Repeated Insult Patch Test	0.5% cinnamaldehyde in 3:1 EtOH:DEP with 0.5% α -tocopherol	19 male and female volunteers	No reactions	RIFM (2002b)
Cinnamaldehyde	Irritation evaluated during the induction phase of a Human Repeated Insult Patch Test	1.0% in alcohol SDA 39C	41 male and female volunteers	No reactions	RIFM (1973d)
Cinnamaldehyde	Irritation evaluated during the induction phase of a Human Repeated Insult Patch Test	1.25% in ethanol	10 male and female volunteers	No reactions	RIFM (1964a)

Tableau 17 : Résumé des études sur l'Homme concernant la toxicité du cinnamaldéhyde administré par voie cutanée de l'article concerné (51)

Après une application unique d'huile de paraffine contenant 8% de cinnamaldéhyde, on observait chez tous les volontaires sains une irritation sévère de la peau.

Après l'application d'un patch contenant 2% de cinnamaldéhyde dans de l'huile de paraffine durant vingt minutes, tous les sujets testés présentaient une réaction cutanée.

Une étude a montré que le cinnamaldéhyde concentré à 1% dans de l'huile de paraffine, et appliqué sur la peau, entraînait des irritations au bout de 45 minutes sur plus de deux tiers des sujets volontaires.

On pouvait observer des irritations après application du cinnamaldéhyde concentré à 0,2 % dans une crème, en pansement occlusif.

- Allergies

Human studies for skin sensitization with cinnamaldehyde				
Human test method	Test concentration (%)	Vehicle	Results	References
HRIPT	0.5%	3:1 DEP:EtOH	0/94	RIFM (2004)
HRIPT	3% plus α -tocopherol	3:1 DEP:EtOH	4/28	RIFM (2003a)
HRIPT	1.25	Ethanol	5/10	RIFM (1964a)
HRIPT	1.0	Alcohol SDA 39C	5/41	RIFM (1973b)
HRIPT	1.0	Ethanol	1/55	Marzulli and Maibach (1976, 1980)
HRIPT	1.0	Petrolatum	0/53	Marzulli and Maibach (1976, 1980)
HRIPT	0.5	Ethanol	0/38	RIFM (1965)
HRIPT	0.5 plus α -tocopherol	3:1 DEP:EtOH	0/22	RIFM (2002)
HRIPT	0.5 plus α -tocopherol	3:1 EtOH:DEP	0/19	RIFM (2002)
HRIPT	0.125	Ethanol	0/41	RIFM (1964b)
HRIPT	0.1	Ethanol	0/41	Danneman et al. (1983)
	0.5		0/38	
	1		5/41	
	1.25		5/10	
MAX	3	Butylene glycol	3/25	RIFM (1974a)
MAX	2	Petrolatum	11/25	RIFM (1973c)

Tableau 18: Résumé des études sur l'Homme concernant le potentiel allergisant du cinnamaldéhyde de l'étude concernée (21)

Skin sensitization: humans

Material	Method	Concentration	Subjects	Results	References
Cinnamaldehyde	MAX	2% in petrolatum	25 male volunteers	11/25 reactions	RIFM (1973c)
Cinnamaldehyde	MAX	3% in butylene glycol	25 male and female volunteers	3/25 reactions	RIFM (1974a)
Cinnamaldehyde	HRIPT	0.5% in 3:1 DEP:EtOH	94 male and female volunteers	No reactions	RIFM (2004)
Cinnamaldehyde	HRIPT	3% in 3:1 DEP:EtOH with 0.5% α -tocopherol	28 male and female volunteers	4/28 reactions	RIFM (2003b)
Cinnamaldehyde	HRIPT	3% in 3:1 EtOH:DEP with 0.5% α -tocopherol	Male and female volunteers	Study aborted during induction phase due to the number of irritant reactions	RIFM (2003b)
Cinnamaldehyde	HRIPT	0.125% in ethanol	41 male and female volunteers	No reactions	RIFM (1964a)
Cinnamaldehyde	HRIPT	0.5% in ethanol	38 male and female volunteers	No reactions	RIFM (1965)
Cinnamaldehyde	HRIPT	0.5% in 3:1 DEP:EtOH with 0.5% α -tocopherol	22 male and female volunteers	No reactions	RIFM (2002a)
Cinnamaldehyde	HRIPT	0.5% in 3:1 EtOH:DEP with 0.5% α -tocopherol	19 male and female volunteers	No reactions	RIFM (2002b)
Cinnamaldehyde	HRIPT	1.0% in alcohol SDA 39C	41 male and female volunteers	5/41 reactions	RIFM (1973d)
Cinnamaldehyde	HRIPT	1.0% in ethanol 1.0% in petrolatum	108 male and female volunteers	1/55 reactions with ethanol as vehicle; no reactions with petrolatum as vehicle	Mazzeoli and Maibach (1976, 1980)
Cinnamaldehyde	HRIPT	1.25% in ethanol	10 male and female volunteers	5/10 reactions	RIFM (1964b)

Tableau 19: Résumé des études sur l'Homme concernant le potentiel allergisant du cinnamaldéhyde de l'étude concernée(51)

Le test HRIPT ou "Human Repeated Insult Patch Test":(55)

Ce test permet de connaître le caractère allergisant ou non d'une substance.

Il se déroule en deux phases : la phase de sensibilisation et la phase de *challenge*.

La phase de sensibilisation dure trois semaines. Un patch occlusif contenant la molécule à tester est appliqué sur l'avant bras ou le dos pendant 24 heures le lundi, mercredi et vendredi.

La phase de *challenge* se déroule 15 jours plus tard. Un patch est appliqué sur une zone différente de celle utilisée lors de la phase de sensibilisation. Une recherche d'eczéma est réalisée 24, 48 et/ou 72 heures après le *challenge*. Il est possible de confirmer la positivité du test quelques semaines plus tard en réalisant un second *challenge*. La positivité traduit le caractère permanent de la réponse de sensibilisation.

Après l'application sur une période de trois semaines de neuf patchs contenant 0,5 ml d'éthanol ainsi que 1,25% de cinnamaldéhyde, des réactions de sensibilisation allergique ont été observées chez la moitié des sujets volontaires.

Après ré-application des sujets sensibilisés neuf mois plus tard, de fortes réactions ont été observées chez tous les sujets testés.

À 0,5% aucune réaction n'a été observée.

À 1,125 % l'application du patch était semi occlusive, et aucune réaction n'était observée.(21)

Lors d'études à plus grande échelle (plusieurs centaines de volontaires), des réactions positives aux tests allergiques par le cinnamaldéhyde ont été observées. Les sujets testés étaient sensibilisés avec les fragrances à base de cinnamaldéhyde retrouvé dans les cosmétiques.(21)

Pharmacocinétique du cinnamaldéhyde

Une étude ayant utilisé un modèle de peau humaine *in vitro* a déterminé la dose de cinnamaldéhyde absorbée par la peau après application.

En 72 heures, la peau avait absorbé 24% du cinnamaldéhyde (pansement non occlusif) ou 52% du cinnamaldéhyde (pansement occlusif).(51)

Une dose de 5 mg/kg de cinnamaldéhyde marqué au ¹⁴C était administrée par voie orale chez le rat. Il était retrouvé après 24 heures 85,1% de la radioactivité dans les urines et 5,1% dans les fèces.(21)

Une dose de 2,5 mmol/kg (0,33g/kg) de cinnamaldéhyde marqué au ¹⁴C était administrée par voie orale chez le rat. Il était retrouvé après 24 heures 62% de la radioactivité dans les urines et 16% dans les fèces. Lorsque la même dose était administrée par voie intra péritonéale, on retrouvait après 24 heures 54% de la radioactivité dans les urines et 15% dans les fèces.(51)

Chez l'Homme, une dose de 0,7 mg/kg de cinnamaldéhyde a été administrée par voie orale chez deux volontaires. Au bout de 8 heures, 100% du ¹⁴C était retrouvé dans les urines.(21)

Chez l'Homme, une dose de 5 mg/kg d'acide cinnamique a été administrée par voie intraveineuse chez onze volontaires. Au bout de 20 minutes, le plasma ne contenait plus d'acide cinnamique.(51)

Métabolisme

Une dose de 0,7 mg/kg de cinnamaldéhyde marqué au ¹⁴C a été administrée par voie orale chez deux hommes. Au bout de 8 heures, il était retrouvé 93,1% de la radioactivité sous forme d'acide hippurique dans les urines.(21)

SUJET 1	SUJET 2
93.1% d'acide hippurique	93.1% d'acide hippurique
0.6% glucuronide de benzoyle	Pas de detection de glucuronide de benzoyle
1.2% 3-hydroxy-3-phenylpropionic acid (HPPA)	1.5% 3-hydroxy-3-phenylpropionic acid (HPPA)
3.0% S1 et S2 (dérivés mercapturiques)	2.1% S1
	1.0% S2
1.3% d'acide benzoïque	1.1% d'acide benzoïque

Tableau 20 : Métabolites retrouvés chez l'Homme après administration par voie orale de 0,7 mg/kg

La voie de la conjugaison au glutathion (56) :

La réaction est catalysée par des GST (Glutathion-S-transférases) avec le glutathion (glutamine-cystéine-glycine). Les glutathion-conjugués peuvent subir un clivage enzymatique et une acylation pour former des dérivés N-acétylcystéine qui seront éliminés par l'urine.

Après administration par voie orale de 250 mg/kg de cinnamaldéhyde, on a retrouvé chez le rat deux dérivés mercapturiques : N-acétyl-S-(1-phenyl-3-hydroxypropyl)cysteine et N-acétyl-S-(1-phenyl-3-carboxypropyl)cysteine.

La voie de conjugaison au glutathion représente 6-15% de la métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat.(51)

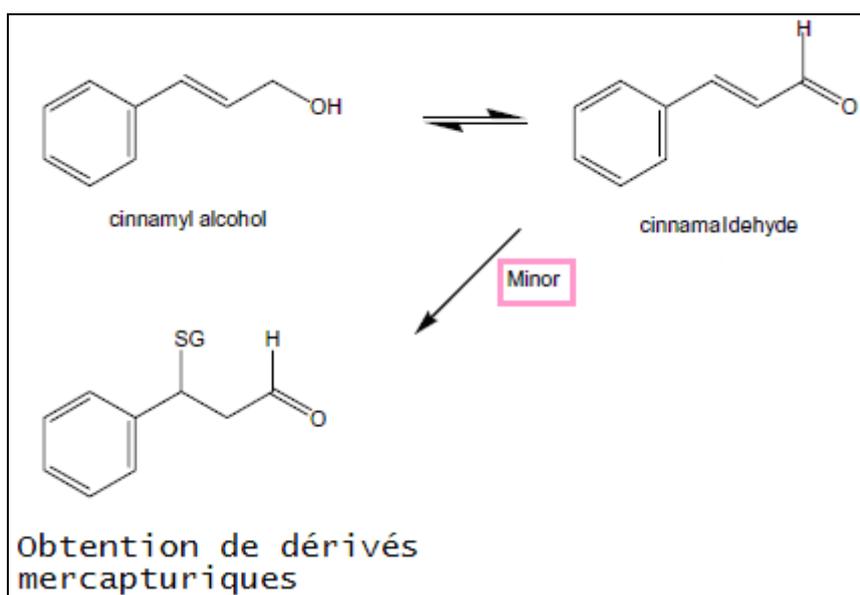


Figure 62: Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat

La voie de la β -oxydation : (59)

A chaque « passage » dans cette voie, le composé métabolisé perd deux atomes de carbone.

Cette voie comporte plusieurs étapes :

- L'activation : le Coenzyme A est greffé sur la molécule à métaboliser.

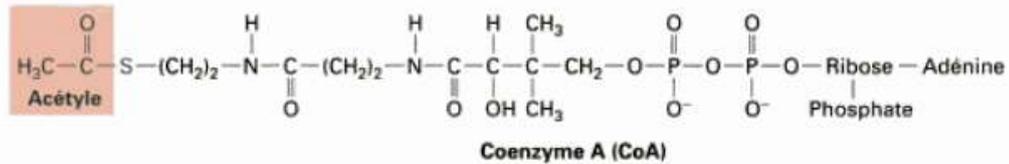


Figure 63 : Le Coenzyme A (60)

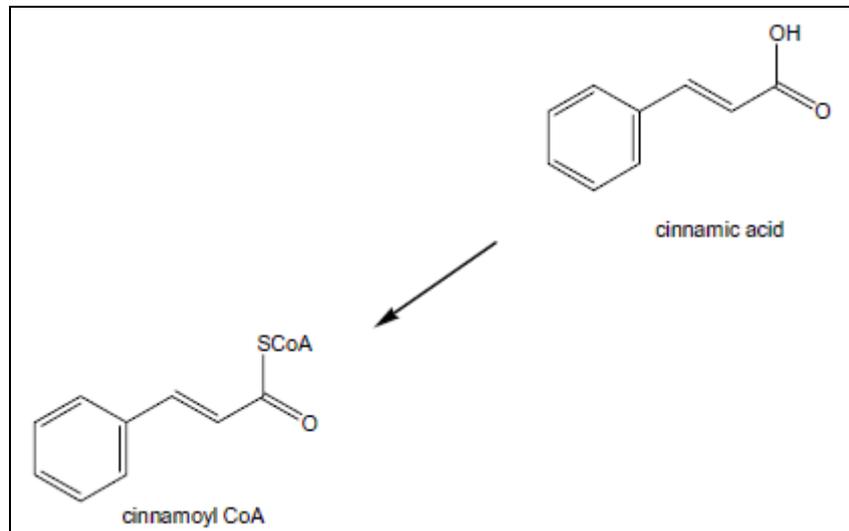


Figure 64 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat (51)

- L'hydratation : elle se fait au niveau du carbone en β du groupement CoA.

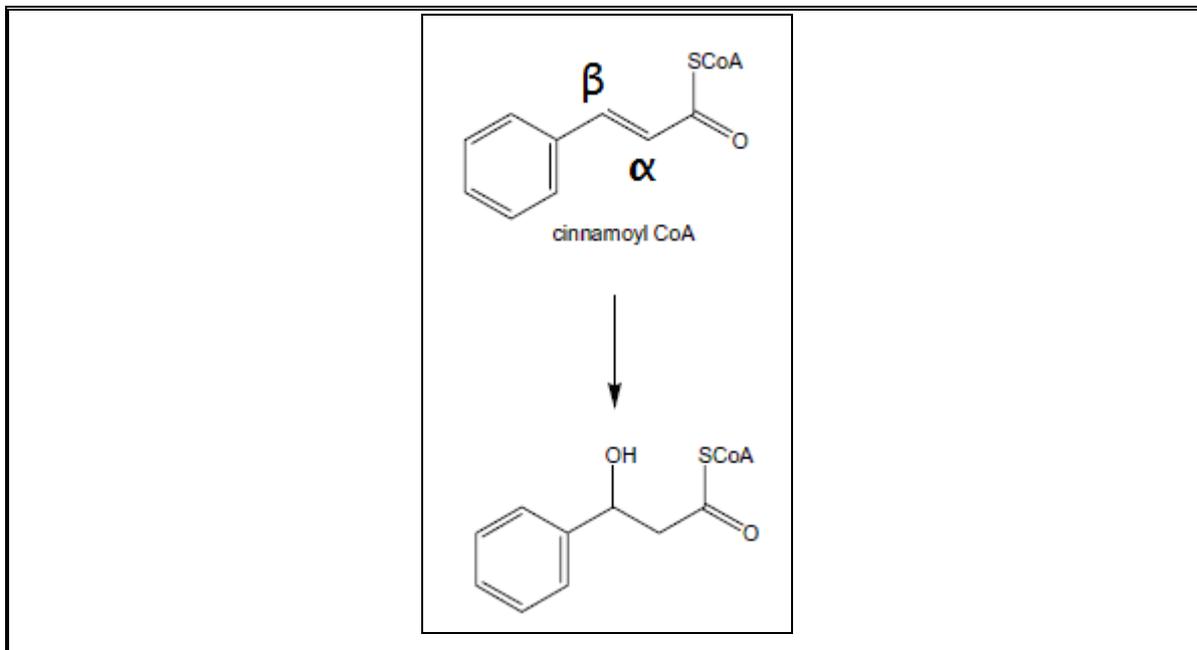


Figure 65 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat

- La déshydrogénation :

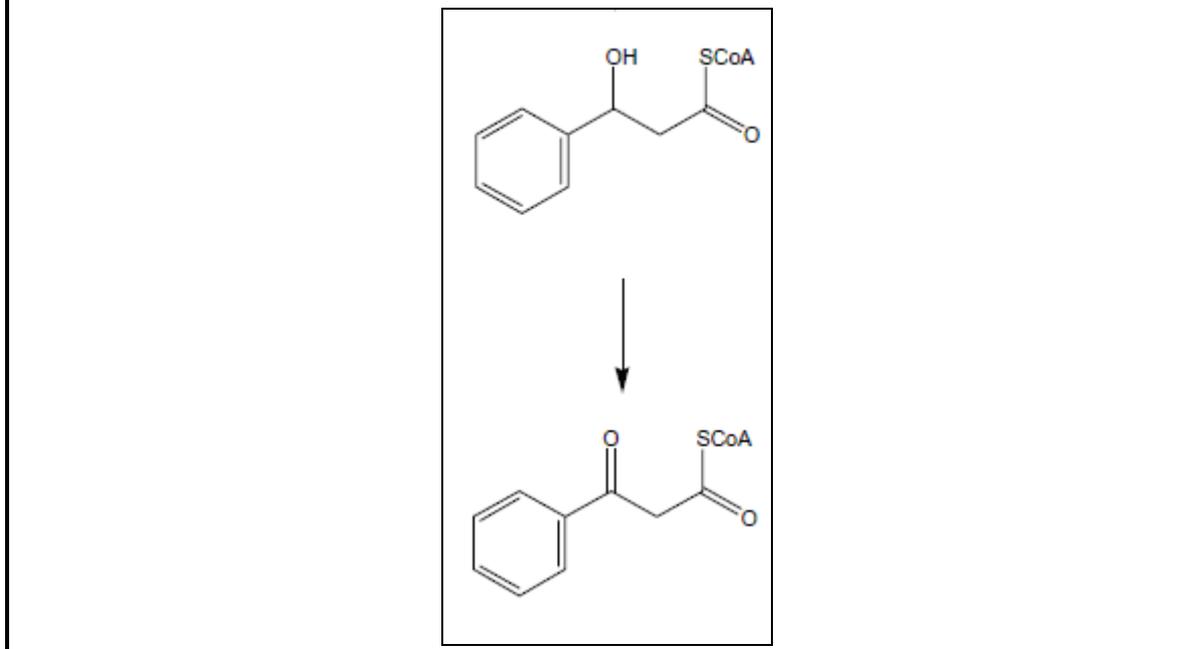


Figure 66 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat

- Le clivage par thiololyse :

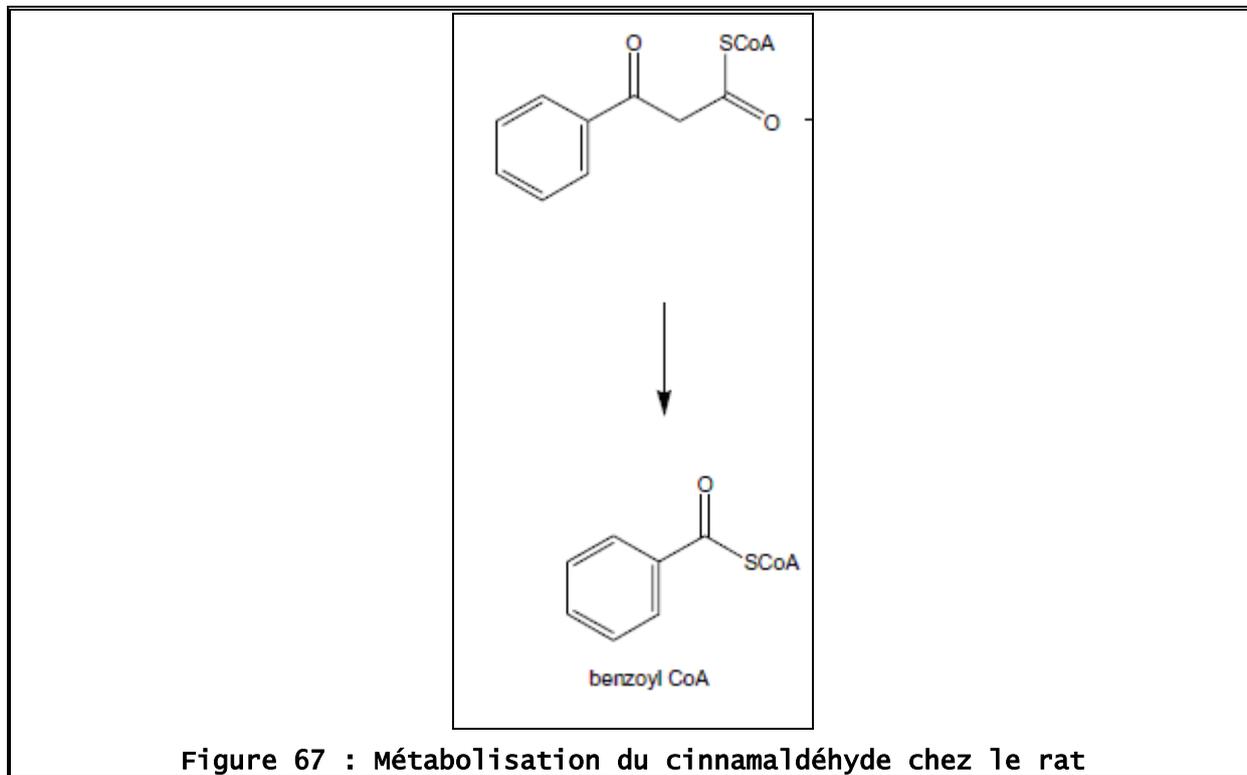


Figure 67 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat

Cette voie permet l'amputation de deux atomes de carbone de l'acide cinnamique. On obtient ainsi l'acide benzoïque qui est facilement éliminé en acide hippurique après ajout de glycine. L'acide hippurique est le principal métabolite et il est retrouvé dans les urines.

Les différentes voies de métabolisation dépendent de la dose administrée. La réaction qui permet l'obtention de l'acide hippurique après ajout de glycine sur le benzoyl CoA est saturable : l'enzyme permettant cette réaction possède une haute affinité mais une petite capacité.

L'obtention de glucuronide de benzoyl et d'acide benzoïque augmentait après administration par voie orale chez le rat de 0,5 mmol/kg ou plus d'acide cinnamique.(51)

Une autre étude a montré que le mécanisme n'était pas saturable.(52)

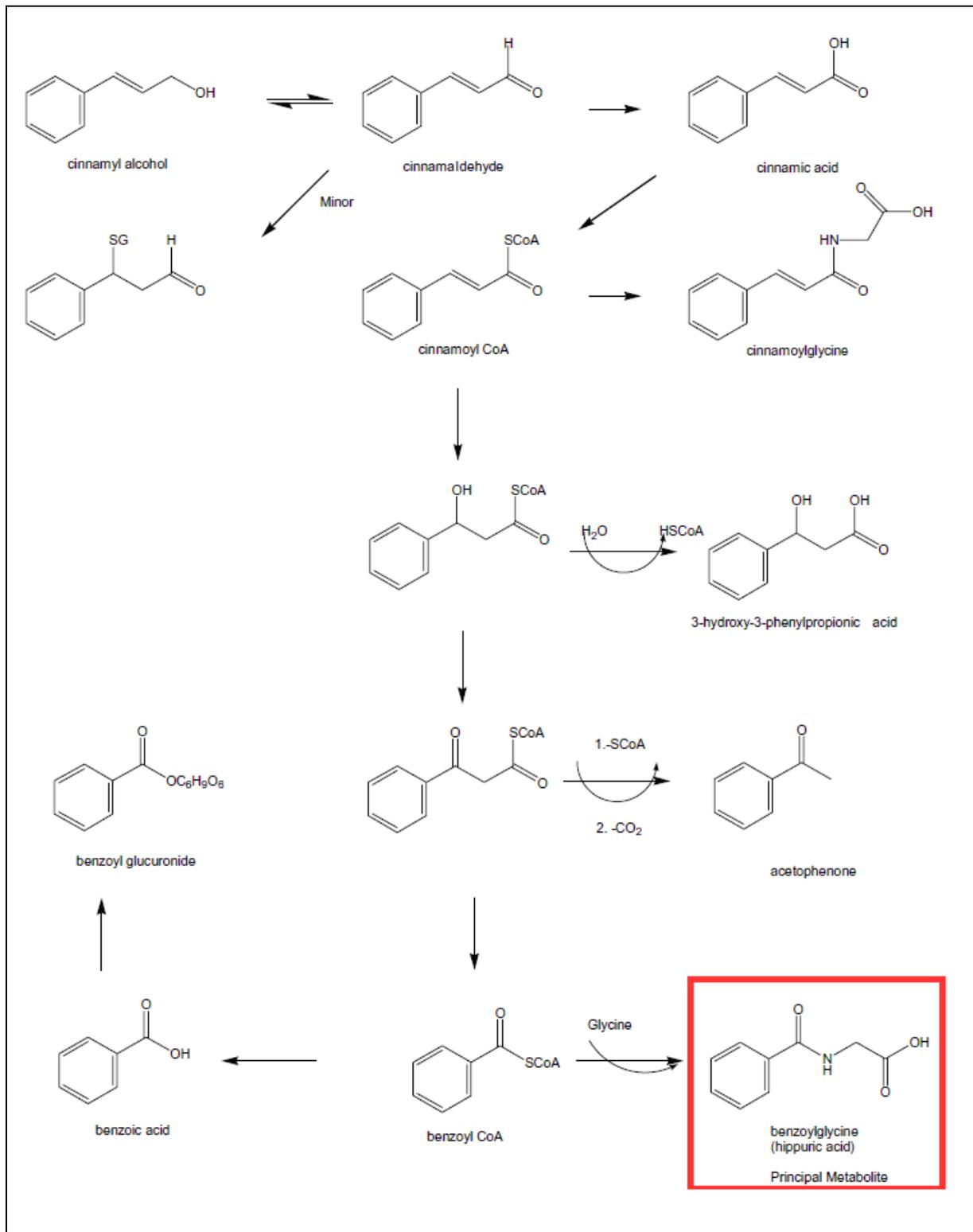


Figure 68 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat

Inhibition et induction enzymatique (21)

In vitro, une étude a montré que les composés tels que le cinnamaldéhyde, comportant une chaîne carbone α,β -insaturée, avaient une légère action inhibitrice sur la glutathion-S-transférase.

Cette activité a également été démontrée sur les cellules de foie chez le rat ainsi qu'*in vivo*, chez des rats ayant reçu une dose de cinnamaldéhyde (0.5 ml/kg) par voie intra-péritonéale.

Une étude a montré que cette inhibition serait temps-dépendante et concentration-dépendante.

Le cinnamaldéhyde concentré à 25 μM ($3,3 \cdot 10^{-3}$ g/L) n'entraînait pas de changement d'activité sur la glutathion-S-transférase. Concentré à 2,5 mM (0,33 g/L), au bout que 4h, seule 17% de l'activité initiale du glutathion-S-transférase perdurait.

Le cinnamaldéhyde concentré à 110 μM ($1,45 \cdot 10^{-2}$ g/L) a montré un puissant effet inducteur sur la quinone réductase lors d'un test sur des cellules murines.

Du cinnamaldéhyde concentré à 5% dans de l'acétone était appliqué sur des souris. Elles étaient sacrifiées quatre heures plus tard. L'activité de l'ornithine decarboxylase avait augmenté. Cette activité coïnciderait avec les effets cutanés irritants.

Le cinnamaldéhyde a montré un léger effet inhibiteur sur le relarguage de β -hexosaminidase (un équivalent de l'histamine).

La mise sur le marché d'un médicament

Avant d'obtenir le titre de médicament, une molécule passe par plusieurs étapes. (61) (62) (63)

On peut diviser celles-ci en deux grands groupes : les études précliniques et les études cliniques.

Les études précliniques se font *in vitro* puis chez l'animal. Ces études se font au sein du laboratoire pharmaceutique. L'efficacité du « candidat médicament » est évaluée en premier lieu.

Son profil de tolérance est également évalué. La « pharmacologie de sécurité » étudie, chez l'animal, les effets pharmacodynamiques secondaires a priori non voulus que peut entraîner une substance médicamenteuse sur les fonctions physiologiques en relation avec l'exposition obtenue aux doses thérapeutiques et au-delà.

Les effets délétères sont recherchés au niveau des fonctions vitales : système nerveux central, système cardiovasculaire et système respiratoire.

La pharmacodépendance et le risque d'abus sont aussi évalués. La tolérance détermine si les essais cliniques peuvent avoir lieu.

Les études cliniques, extérieures au laboratoire, sont réalisées sur l'être humain et comportent plusieurs phases :

La phase I est réalisée sur un petit nombre de volontaires sains.

La dose maximale tolérable est recherchée : une dose faible est administrée, puis augmentée progressivement jusqu'à l'apparition de signes d'intolérance.

La phase II est la phase de recherche de doses ayant une activité pharmacologique optimale.

Les essais sont réalisés chez le volontaire sain (IIa) puis chez le sujet malade (IIb).

La phase III mesure précisément l'efficacité thérapeutique du médicament. Le nombre de sujets et plus important qu'en phase

II. Les essais sont randomisés dans des bras thérapeutiques et réalisés en double aveugle lorsque c'est possible.

Le rapport bénéfice/risque de la molécule est évalué et comparé avec des médicaments de même indication thérapeutique.

Le promoteur dépose ensuite un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) qui comporte l'ensemble des recherches effectuées sur le candidat médicament.

Les autorités évaluent :

- la qualité pharmaceutique ;
- les données de pharmacologie ;
- l'efficacité thérapeutique ;
- le rapport bénéfice/risque ;
- l'étiquetage et la notice.

Une fois l'AMM obtenue, les essais de phase IV approfondissent encore les résultats.

Ces essais sont réalisés dans les conditions habituelles de prescription. Le nombre de sujets, plus élevé que lors des études pré-AMM permet la découverte d'effets indésirables très rares. Des effets indésirables tardifs peuvent être mis en évidence.

Cas particulier des antibiotiques(64)

« Depuis 1996, l'Europe, au-delà des recommandations générales, a défini un niveau d'exigence pour l'évaluation des antibiotiques, par le biais d'un document spécifique (Note for guidance on evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections). Ce document est disponible sur le site Internet de l'EMA (<http://www.emea.europa.eu>) et fait l'objet d'actualisations régulières. Cette « Note for guidance » s'attache à décrire les principes importants aux niveaux microbiologiques, pharmacocinétique et clinique mais ne détaille pas le développement recommandé par type d'indication. Elle décrit, de plus, les spécificités requises pour la rédaction du document destiné au professionnel de santé (RCP) dont notamment le principe de rédaction du spectre d'activité antibactérienne, élément critique parmi les propriétés pharmacodynamiques du produit. » (65)

Lors des essais de phase I, la recherche sur un potentiel nouvel antibiotique doit comporter des études sur le mécanisme d'action.

Les isolats cliniques sélectionnés pour les tests de sensibilité *in vitro* doivent appartenir à des espèces pathogènes qui présentent un intérêt dans les indications recherchées du candidat médicament. De plus, ces souches cliniques doivent provenir de différents pays et régions, dont un échantillon représentatif des espèces rencontrées en EU.

Des études *in vitro* complémentaires appropriées doivent être menées.

Elles peuvent comprendre une évaluation de l'activité bactéricide du candidat médicament, la recherche d'éventuels antagonismes ou synergies, d'un effet post-antibiotique, ou pour certains antibiotiques, une estimation de la fréquence de sélection de mutants résistants, et si des concentrations supérieures aux CMI permettent d'éviter la sélection de ces mutants résistants.

Si l'antibiotique testé est transformé en un ou plusieurs métabolites importants, alors l'activité anti-bactérienne *in vitro* de ces derniers doit être évaluée séparément.

Si un agent antibactérien inclus dans une association médicamenteuse est nouveau, ses propriétés microbiologiques doivent être explorées séparément. Cependant, la majorité des données de tests de sensibilité *in vitro* doit être obtenue avec l'association, incluant une recherche du pourcentage optimal de chaque composant utilisé.

Discussion

De nombreux médicaments comportent un principe actif issu de la nature : la digitaline ou l'acide acétylsalicylique sont extraits respectivement de la digitale et de l'écorce de saule.

Ces molécules sont des métabolites secondaires : ce sont des molécules transformées et complexes. Elles ne servent pas à la nutrition mais elles peuvent être utilisées par les plantes comme moyen de défense contre les parasites, insectes ou herbivores.

Les huiles essentielles sont très concentrées en métabolites secondaires, il est donc intéressant de les isoler de la plante pour en extraire ce qu'il y a probablement de plus actif en elle.

Pour développer Nosolcc, les recherches ont débuté par une étude bibliographique : « Quelles huiles essentielles sont réputées antibiotiques ? ».

Cinquante-trois huiles ont été sélectionnées suite à cette étude bibliographique. Le travail suivant consistait à vérifier la réputation des huiles.

Le laboratoire a donc mis au point un protocole d'étude pour mesurer la concentration minimale inhibitrice de ces huiles essentielles. Contrairement à d'autres études, la très faible solubilité aqueuse de l'huile essentielle a été prise en compte dans la mise en place du protocole. L'hypothèse a été la suivante : pour exercer son activité supposée, l'huile essentielle doit pénétrer à l'intérieur de la cellule. Celle-ci a été solubilisée à l'aide d'un tensioactif (Tween® 80). Sa concentration a également été prise en compte : une limite de 1% a été fixée pour apprécier son efficacité. Cette concentration maximale de 1% est réaliste pour un « candidat médicament » : au-delà, la quantité à administrer à un patient risque d'être trop importante.

Les trente-trois souches bactériennes testées étaient variées et comportaient des souches résistantes à d'autres antibiotiques.

Une fois le protocole établi et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues, trois huiles sont sorties du lot.

Parmi elles, l'huile essentielle d'ail dont l'odeur a été un facteur limitant la poursuite de l'étude. Le choix d'approfondir les recherches s'est porté sur les huiles essentielles de deux cannelles : *Cinnamomum cassia* et *Cinnamomum zeylanicum* (écorce). Leurs profils étaient très intéressants : il était retrouvé une CMI de 0,25% maximum sur les trente-trois souches testées. Ces huiles ont été « décortiquées » pour découvrir quels étaient le(s) principe(s) actif(s).

Les huiles essentielles de cannelles ont subi d'autres tests en mélange dans lesquels leur activité était augmentée. Lorsque le mélange le plus actif a été trouvé, une analyse de la composition a été réalisée pour former un composé synthétique qui gardait les proportions naturellement présentes dans ce mélange. Le composé (Nosolcc) était alors reproductible et débarrassé de molécules annexes pouvant être toxiques.

L'association 50/50 des deux cannelles a été très efficace. La CMI pour la totalité des souches variait de 0,03 % (29 souches) à 0,06% (4 souches).

Des tests supplémentaires de bactéricidie ont été réalisés. Là encore, une efficacité notable a été observée. Nosolcc a une action très rapide : l'unité de temps utilisée pour mesurer l'efficacité bactéricide de Nosolcc était la minute. Les tests ont été effectués à 0, 15, 30, 45, 60 voire 240 minutes de contact entre Nosolcc et la souche bactérienne.

Nosolcc a une action prolongée : il possède un effet bactériostatique à concentrations subinhibitrices. Cela permettrait *in vivo*, lorsque la métabolisation diminuerait la concentration de Nosolcc, un contrôle de l'éradication bactérienne.

Après un contact des bactéries avec Nosolcc puis son élimination, le démarrage de la phase exponentielle était retardé, la phase de latence prolongée de plusieurs heures, y compris sur les Gram (+). Des dommages semblent être causés sur les bactéries sans qu'elles ne meurent mais il leur faut du temps pour les réparer avant de reprendre leur croissance.

Ces données serviront dans l'avenir de Nosolcc : cliniquement, la détermination des posologies d'administration s'appuie sur ce type de données. Nosolcc pourrait ainsi être administré à

des doses qui ne seraient pas trop élevées et à des intervalles qui ne seraient pas trop rapprochés.

On observe souvent en pratique des associations d'antibiotiques. Elles permettent de traiter en urgence une infection grave non diagnostiquée, préviennent la sélection des mutants résistants lors des traitements de longue durée, et élargissent le spectre d'activité dans les cas d'infections impliquant plusieurs bactéries. L'association d'antibiotique peut aboutir à une action synergique sur la bactérie : l'activité antibactérienne est plus grande en association que celle obtenue pour chaque substance prise individuellement. La synergie d'une association d'antibiotiques permet également de diminuer les doses administrées et ainsi de diminuer les effets indésirables liés à la dose de médicament.

Parmi les souches résistantes à l'amikacine pour lesquelles une association synergique avec Nosolcc a été observée, on trouvait : *E. coli*, *Se. marcescens*, *K. pneumoniae*, *Ent. cloacae*, *A. baumannii* et *B. cepacia*.

Parmi les souches résistantes à la colistine pour lesquelles une association synergique avec Nosolcc a été retrouvée, on trouvait : *E. coli*, *Se. marcescens*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

Pour élucider le mécanisme d'action de Nosolcc le laboratoire a réalisé des courbes de croissance à deux températures différentes : 4°C et 37°C. Les résultats montrent que Nosolcc possède une activité uniquement à 37°C. Nosolcc est actif uniquement pendant la phase de multiplication bactérienne. Cela laisse supposer que Nosolcc possède une cible d'action lors de la multiplication bactérienne.

De plus, il a été observé un effet synergique avec la colistine. Cet antibiotique est capable d'altérer l'intégrité des membranes bactériennes. Ceci faciliterait l'accès de Nosolcc à l'intérieur de la bactérie où il exercerait son effet.

Cette hypothèse s'affine grâce à la littérature : on retrouve que le cinnamaldéhyde bloque la scissiparité chez *B.cereus*.

Après traitement au cinnamaldéhyde, on observait une modification de leur forme : les bacilles devenaient allongés voire filamenteux. On observait un septum entre les deux futures cellules mais sa formation était incomplète.

Le cinnamaldéhyde perturberait la morphologie de l'anneau Z. Il a été retrouvé une fréquence plus faible d'anneaux Z chez *E. coli* en présence de cinnamaldéhyde. Le cinnamaldéhyde inhiberait la polymérisation de la protéine FtsZ empêchant ainsi la formation de l'anneau Z. L'hydrolyse du GTP lié à la protéine FtsZ a été inhibée en présence de cinnamaldéhyde. Cette cible thérapeutique est très intéressante car on la retrouve chez la bactérie mais pas dans la cellule eucaryote (FtsZ a évolué en tubuline).

D'autre part, il est probable que les autres composants de Nosolcc, en possédant un caractère lipophile, puissent faciliter sa pénétration à travers la structure lipidique de la membrane cellulaire bactérienne.

Une étude a montré une action inhibitrice du cinnamaldéhyde sur l'activité des ATPases membranaires chez *E. coli*. Ce mécanisme d'action n'a pas été la cause de la mort cellulaire, mais l'inhibition de ces enzymes jouerait un rôle dans la diminution de la croissance bactérienne.

Le cinnamaldéhyde est une petite molécule hydrophobe. Celle-ci pourrait s'intégrer facilement dans la membrane et interagir sur les protéines membranaires telles que les ATPases pour modifier leur conformation.

Le cinnamaldéhyde aurait un effet inhibiteur sur certaines décarboxylases.

Le cinnamaldéhyde a montré une action sur la membrane cellulaire.

Il provoquerait un affaiblissement de la cellule grâce à une altération du profil lipidique de la membrane. En effet, le taux d'acides gras insaturés diminuait en présence de cinnamaldéhyde.

Une étude a démontré que le cinnamaldéhyde possédait une action sur la formation du biofilm chez certaines bactéries. Le cinnamaldéhyde serait un perturbateur du *quorum sensing*. Le cinnamaldéhyde est une petite molécule de taille comparable à celles qui servent à la « communication » entre les bactéries. Nous avons vu pour exemple les trois carbones de la chaîne aliphatique du cinnamaldéhyde pouvant interférer avec le site de liaison du 3-oxo-C6-HSL sur la protéine d'activation transcriptionnelle LuxR dans le système opéron *luxICDABE*.

Lorsque ces bactéries étaient exposées au cinnamaldéhyde à 1% ou au Nosolcc à 1%, leur morphologie se modifiait. Lorsqu'elles étaient colorées, leur contour et leur coloration devenaient hétérogènes. Après contact avec Nosolcc, beaucoup de débris cellulaires étaient observés.

Le composant principal de Nosolcc est le cinnamaldéhyde. Celui-ci est déjà utilisé comme excipient dans quatorze spécialités pharmaceutiques sur le marché.

Il est aussi utilisé comme principe actif dans un patch cutané aidant au diagnostic des allergènes responsables d'eczéma de contact.

Ses effets indésirables les plus notables sont une irritation cutanée et un effet sensibilisant.

L'irritation est augmentée selon la dose : une irritation sévère est observée après application de cinnamaldéhyde dilué dans de l'huile de paraffine à 8%. L'effet irritant est augmenté selon le mode d'application : en patch occlusif, le produit est plus irritant. Si le cinnamaldéhyde est absorbé, il irrite la muqueuse stomacale.

Pour devenir un médicament, une molécule doit subir des tests précliniques puis cliniques.

Nosolcc doit donc prouver son efficacité antibiotique *in vivo* sur des animaux puis chez l'Homme.

Nosolcc est composé de plusieurs molécules, ce qui augmente le nombre d'études à effectuer si on considère chaque molécule comme étant un principe actif.

L'acétate de cinnamyle, le linalol, le beta-caryophyllène, le cinéole, et le benzoate de benzyle sont déjà utilisés comme excipients dans d'autres spécialités actuellement sur le

marché.

Toutefois, utiliser le cinnamaldéhyde comme seul principe actif peut poser des soucis de propriété intellectuelle quant au monopole de la commercialisation d'un princeps...

De plus, l'indication de Nosolcc n'est pas encore établie. Les perspectives d'indications peuvent être larges : antibiotique réservé pour les infections sévères et multirésistantes, infections cutanées...

Actuellement, des recherches sont en cours quant à son utilisation dans la maladie de Crohn. Le cinnamaldéhyde pourrait avoir un effet sur la flore bactérienne intestinale qui est déséquilibrée dans cette maladie.

Une fois l'indication de Nosolcc trouvée, il faudra étudier ses propriétés pharmacocinétiques.

L'absorption de Nosolcc par l'organisme devrait être bonne *a priori* (petit poids moléculaire, pas d'hydrogène donneur et un hydrogène accepteur). Le souci majeur étant que Nosolcc est inspiré d'huile essentielle donc est à tendance volatile. La galénique du médicament devra être bien étudiée pour pouvoir conserver le principe actif jusqu'à l'arrivée sur la cible thérapeutique.

La métabolisation du cinnamaldéhyde est déjà décrite. Il existe deux grandes voies de métabolisation : la conjugaison au glutathion (obtention de dérivés mercaptopuriques) et la voie de bêta-oxydation. On retrouvait quelques effets sur les enzymes. Par exemple, un léger effet inhibiteur sur la glutathion-S-transférase ainsi qu'un puissant effet inducteur sur la quinone réductase.

L'élimination du cinnamaldéhyde est principalement urinaire sous forme d'acide hippurique (plus de 90%) ou sous forme de dérivés mercaptopuriques (environ 3%).

Conclusion

Ce travail avait pour but de présenter une des activités réalisées au laboratoire de bactériologie de la Faculté. Idéalement, elle consiste à partir d'une substance naturelle pour aboutir à un médicament. Le laboratoire est ici parti de l'huile essentielle de cannelle pour parvenir aujourd'hui à un « candidat médicament » aux propriétés antibiotiques très intéressantes.

Cette thèse a donc présenté la logique adoptée par l'équipe pour obtenir les informations nécessaires à une potentielle mise sur le marché. Tout d'abord, le screening : la recherche documentaire sur les huiles essentielles possédant « traditionnellement » des propriétés antibiotiques. Ensuite, la recherche de protocoles pour tester les huiles : il n'existe pas de norme pour tester l'activité des huiles essentielles sur les bactéries. La réflexion sur les protocoles est capitale : elle va conditionner la valeur de l'étude. Par exemple, l'équipe a pensé à chercher à solubiliser l'huile essentielle : pour avoir accès à la bactérie, l'huile essentielle doit se trouver dans une phase aqueuse. Les expériences ont été réalisées dans un ordre logique : la recherche de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) a été faite en premier : elle permet d'effectuer un deuxième screening. Les tests suivants ont ainsi été réalisés uniquement sur l'huile essentielle choisie pour poursuivre l'étude. L'équipe a ensuite décidé de travailler sur un mélange reproductible : le but étant de mettre sur le marché un médicament antibiotique. L'étude s'est poursuivie avec « Nosolcc », le mélange s'approchant au mieux du mélange d'huiles essentielles le plus actif. L'équipe s'est concentrée ensuite sur la recherche d'informations utiles en pratique comme les effets persistants, l'association avec d'autres antibiotiques, la recherche du mécanisme d'action, les effets indésirables possibles.

Les résultats obtenus au laboratoire de la faculté sont très encourageants. Nosolcc est actif sur toutes les bactéries testées y compris les plus résistantes aux antibiotiques

classiques. Nosolcc ne semble pas favoriser pas la résistance aux antibiotiques : aucun mutant résistant n'a été détecté dans les conditions du test. Nosolcc possède un effet à concentration subinhibitrice, ainsi qu'un effet post-antibiotique. Nosolcc peut être associé avec la plupart des antibiotiques. Il peut même agir en synergie et potentialiser l'action d'antibiotiques déjà existants.

La mise sur le marché d'un médicament nécessite de nombreuses étapes. Pour un laboratoire de recherche, il faut une quinzaine d'années pour « sortir » un médicament. Le maximum de connaissances possibles sur le candidat médicament est exigible dans un dossier de mise sur le marché. Il est souhaitable d'étudier le mécanisme d'action de la molécule et d'anticiper les effets indésirables de celle-ci. L'antibiothérapie est un sujet sensible : la lutte contre la résistance aux antibiotiques est omniprésente. Les critères de mise sur le marché sont renforcés pour les antibiotiques. Cela allonge donc la durée de la recherche.

Ce travail a débuté il y a plusieurs années et continue encore. Il faudra encore par exemple définir les indications précises dans lesquelles utiliser Nosolcc, le rôle de chacun des composants de Nosolcc, et définir une ligne de route pour les études cliniques.

Annexes

Annexe 1 : Liste des huiles essentielles utilisées lors du screening

	nom français	nom latin
1	armoise blanche	<i>Artemisia vulgaris</i>
2	bay st thomas	<i>Pimenta racemosa</i>
3	bois de rose	<i>Aniba rosaeodora</i>
4	cannelle de chine	<i>Cinnamomum cassia</i>
5	cannelle feuille	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
6	chénopode	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
7	camphre	<i>Cinnamomum camphora var formosanum</i>
8	citron jaune	<i>Citrus limonum</i>
9	citronnelle	
10	eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>
11	genièvre baie	<i>Juniperus communis</i>
12	géranium	<i>Geranium rosat</i>
13	girofle clou	<i>Eugenia caryophyllata</i>
14	laurier feuille	<i>Laurus nobilis</i>
15	lavande officinale	<i>Lavandula angustifolia</i>
16	marjolaine à coquilles	<i>Origanum majorana</i>
17	arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i>
18	menthe poivrée	<i>Mentha piperita</i>
19	myrrhe résine	<i>Commiphora myrrha</i>
20	niaouli	<i>Melaleuca viridiflora</i>
21	oliban	<i>Boswellia carterii</i>
22	origan	<i>Origanum compactum</i>
23	palmarosa	<i>Cymbopogon martinii</i>
24	patchouli	<i>Pogostemon cablin</i>
25	pin sylvestre	<i>Pinus sylvestris</i>
26	ravintsara	<i>Cinnamomum camphora</i>
27	romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>
28	sarriette sommités	<i>Satureja montana</i>
29	sauge	<i>Salvia officinalis</i>
30	teinture d'ail	
31	thym rouge	<i>Thymus vulgaris</i>
32	wintergreen	
33	ail	
34	écorce cannelle	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
35	mélisse	<i>Melissa officinalis</i>
36	inule	
37	héliochryse	
38	estragon	
39	cumin	
40	santal blanc	
41	cardamone	
42	hysope	
43	matricaire	
44	ciste	
45	camomille romaine	

46	lemongrass	<i>Cymbopogon citratus</i>
47	mandarine	
48	gingembre	
49	persil	
50	baume du Pérou	
51	citronnelle de java	<i>Cymbopogon nardus</i>
52	bergamotier	
53	oranger bigarade	

Annexe 2 : Liste des souches utilisées au laboratoire de la faculté de pharmacie de Lille 2

ATCC 25922	E.coli	collection	NA
8127	<i>Pseudomonas</i>	urine	Resistant Fluoroquinolones
8128	<i>Pseudomonas</i>	coproculture	souche multirésistante
8129	<i>Pseudomonas</i>	pus	Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique
8130	<i>Pseudomonas</i>	coproculture	Production d'une penicillinase
8131	<i>Pseudomonas</i>	coproculture	Sauvage (aucune résistance acquise)
8132	<i>Pseudomonas</i>	crachat	Multirésistante dont défaut de porine D2
8133	<i>Pseudomonas</i>	crachat	Sauvage (aucune résistance acquise)
8134	<i>Pseudomonas</i>	urine	Résistance aux Fluoroquinolones et aminosides
8135	<i>Pseudomonas</i>	pus	Sauvage (aucune résistance acquise)
8136	<i>Pseudomonas</i>	pus	Production d'une penicillinase et défaut porine D2
8137	<i>E.coli</i>	pus	Sauvage (aucune résistance acquise)
8138	<i>E.coli</i>	hémoculture	Production d'une penicillinase
8141	<i>E.coli</i>	urine	Sauvage (aucune résistance acquise)
8142	<i>E.coli</i>	urine	Production d'une penicillinase et résistance à l'acide nalidixique
8150	<i>E.coli</i>	pus	Sauvage (aucune résistance acquise)
8151	<i>E.coli</i>	liquide amniotique	Sauvage (aucune résistance acquise)
8154	<i>E.coli</i>	urine	Production d'une penicillinase
8155	<i>E.coli</i>	urine	Sauvage (aucune résistance acquise)
8156	<i>E.coli</i>	urine	Sauvage (aucune résistance acquise)
8157	<i>E.coli</i>	hémoculture	Production d'une penicillinase et résistance aux fluoroquinolones
8143	<i>Staphylococcus</i>	pus	Résistance à la méthicilline, kanamycine et tobramycine (phénotype KT)
8146	<i>Staphylococcus</i>	pus	Résistance à la méthicilline, kanamycine
8147	<i>Staphylococcus</i>	pus	Sauvage (aucune résistance acquise)
8148	<i>Staphylococcus</i>	crachat	Resistance à la méthicilline et fluoroquinolones
8149	<i>Staphylococcus</i>	pus	Sauvage (aucune résistance acquise)
8237	<i>Staphylococcus</i>	urine	Sauvage (aucune résistance acquise)
8238	<i>Staphylococcus</i>	pus	Sauvage (aucune résistance acquise)
8239	<i>Staphylococcus</i>	pus	Resistance à la méthicilline
8240	<i>Staphylococcus</i>	crachat	Resistante à la methicilline et Fluoroquinolones
8241	<i>Staphylococcus</i>	pus	Résistance à la méthicilline, kanamycine et tobramycine (phénotype KT), et fluoroquinolones
8152	<i>Enterococcus</i>	coproculture	Resistante naturelle aux aminosides bas niveau
8153	<i>Enterococcus</i>	coproculture	Resistance MLSb (Resistance à erythromycine et clindamycine et

			sensibilité pristinamycine
09001	<i>Enterococcus faecium</i>	Néphrologie	multi R
09002	<i>Enterococcus faecium</i>	Rhumatologie	multi R
09003	<i>E. coli</i>	CHU Val.	BLSE
09004	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CHU Val.	BLSE
09007	<i>Ps aeruginosa</i>	CHU Val.	1(VIM-2)
09008	<i>Ps aeruginosa</i>	CHU Val.	2(BLSE+)
09010	<i>A baumannii</i>	CHU Val.	VEB-1
09011	<i>A baumannii</i>	CHU Val.	multi R
ATCC 27583	<i>Pseudomonas</i>	collection	NA
10168	<i>Staphylococcus</i>	CIP 64.54	SASM
10267	<i>S marcescens</i>		KPC-2
10268	<i>C freundii</i>		KPC-2
10269	<i>E. coli</i>		NDM-1
10270	<i>K pneumoniae</i>		VIM
10271	<i>S marcescens</i>		SME-1
10272	<i>K pneumoniae</i>		OXA-48
10273	<i>E. coli</i>		KPC-2
10274	<i>Enterobacter cloacae</i>		GES-5
10275	<i>A baumannii</i>		VIM-4
10276	<i>Ps aeruginosa</i>		PER-1
10277	<i>K pneumoniae</i>		KPC-2
10278	<i>Ps aeruginosa</i>		GES-2
10279	<i>S marcescens</i>		SME-2
10280	<i>Ps aeruginosa</i>		VIM-2
10281	<i>Enterobacter cloacae</i>		KPC-2
10282	<i>B cepacia</i>	produit cosmétique	
10286	<i>Candida albicans</i>		
10385	<i>E. coli</i>		NDM-1
10386	<i>E. coli</i>		NDM-1
11002	<i>E. coli</i>	tractus urinaire d'un chat	
05003	<i>Mycobaterium smegmatis</i>	CIP 73.26	
11003	<i>E. coli</i>		CTX M1
11004	<i>E. coli</i>		CTX M3
11005	<i>E. coli</i>		CTX M14
11006	<i>E. coli</i>		CTX M15
11007	<i>E. coli</i>		TEM-12
11008	<i>E. coli</i>		SHV 2A
11009	<i>E. coli</i>		SHV 12
11010	<i>E. coli</i>		OXA 30
11011	<i>E. coli</i>		CMY.2
11012	<i>E. coli</i>		OXA.48
11013	<i>E. coli</i>		VIM.1
11014	<i>E. coli</i>		VIM.2
11015	<i>E. coli</i>		VIM.19
11016	<i>K pneumoniae</i>		Sauvage
11017	<i>K pneumoniae</i>		Penicillinase
11018	<i>K pneumoniae</i>		ACT.1
11019	<i>K pneumoniae</i>		DHA.2
11020	<i>K pneumoniae</i>		LAT.1
11021	<i>K pneumoniae</i>		CTX M2
11022	<i>K pneumoniae</i>		CTX M3
11023	<i>K pneumoniae</i>		CTX M14
11024	<i>K pneumoniae</i>		CTX M15

11025	<i>K pneumoniae</i>		SHV 2A
11026	<i>K pneumoniae</i>		SHV
11027	<i>K pneumoniae</i>		SHV 12
11028	<i>K pneumoniae</i>		TEM 3
11029	<i>K pneumoniae</i>		TEM 2
11030	<i>K pneumoniae</i>		KPC 3
11031	<i>K pneumoniae</i>		NDM 1
11032	<i>K pneumoniae</i>		NDM 1
11033	<i>Salmonella sp</i>		Sauvage
11034	<i>Salmonella sp</i>		Sauvage
11035	<i>Salmonella sp</i>		Sauvage
11036	<i>Salmonella sp</i>		Sauvage
11037	<i>Salmonella sp</i>		CMY 2
11038	<i>P stuartii</i>		Sauvage
11039	<i>P stuartii</i>		Sauvage
11040	<i>P stuartii</i>		TEM 24
11041	<i>C freundii</i>		Sauvage
11042	<i>C freundii</i>		Céphalosporinase
11043	<i>C freundii</i>		TEM 3
11044	<i>C freundii</i>		CTX M1
11045	<i>C freundii</i>		CTX M15
11046	<i>C freundii</i>		NDM 1
11047	<i>K oxytoca</i>		Sauvage
11048	<i>K oxytoca</i>		Surexpression OXY
11049	<i>K oxytoca</i>		CTX M15
11050	<i>E cloacae</i>		Sauvage
11051	<i>E cloacae</i>		Céphalosporinase HN2
11052	<i>E cloacae</i>		Céphalosporinase
11053	<i>E cloacae</i>		NDM 1
11054	<i>E cloacae</i>		NMC A
11055	<i>E cloacae</i>		OXA 43
11056	<i>S marscescens</i>		Sauvage
11057	<i>S marscescens</i>		Céphalosporinase HN 2
11058	<i>S marscescens</i>		Céphalosporinase HN 1
11059	<i>P mirabilis</i>		Sauvage
11060	<i>P mirabilis</i>		Sauvage
11061	<i>P mirabilis</i>		Pénicillinase
11062	<i>P mirabilis</i>		TEM 21
11063	<i>P mirabilis</i>		TEM 52
11064	<i>P mirabilis</i>		ACC 1

Annexe 3 : CMI des huiles essentielles de cannelles

Référence	Nom	écorce cannelle	cannelle de chine
ATCC 25922	<i>E.coli</i>	0,06	0,03
8127	<i>Pseudomonas</i>	0,125	0,13
8128	<i>Pseudomonas</i>	0,125	0,13
8129	<i>Pseudomonas</i>	0,15	0,13
8130	<i>Pseudomonas</i>	0,25	0,13
8131	<i>Pseudomonas</i>	0,125	0,13
8132	<i>Pseudomonas</i>	0,25	0,25
8133	<i>Pseudomonas</i>	0,125	0,13
8134	<i>Pseudomonas</i>	0,125	0,13
8135	<i>Pseudomonas</i>	0,125	0,13
8136	<i>Pseudomonas</i>	0,125	0,25
8137	<i>E.coli</i>	0,06	0,03
8138	<i>E.coli</i>	0,06	0,03
8141	<i>E.coli</i>	0,06	0,03
8142	<i>E.coli</i>	0,06	0,03
8150	<i>E.coli</i>	0,06	0,06
8151	<i>E.coli</i>	0,06	0,06
8154	<i>E.coli</i>	0,06	0,06
8155	<i>E.coli</i>	0,06	0,06
8156	<i>E.coli</i>	0,06	0,06
8157	<i>E.coli</i>	0,06	0,06
8143	<i>Staphylococcus</i>	0,06	0,03
8146	<i>Staphylococcus</i>	0,06	0,03
8147	<i>Staphylococcus</i>	0,06	0,06
8148	<i>Staphylococcus</i>	0,06	0,03
8149	<i>Staphylococcus</i>	0,06	0,03
8237	<i>Staphylococcus</i>	0,03	0,03
8238	<i>Staphylococcus</i>	0,03	0,03
8239	<i>Staphylococcus</i>	0,06	0,06
8240	<i>Staphylococcus</i>	0,06	0,06
8241	<i>Staphylococcus</i>	0,06	0,03
8152	<i>Enterococcus</i>	0,06	0,06
8153	<i>Enterococcus</i>	0,06	0,06

Annexe 4 : CMI après changement de proportion des huiles essentielles

Référence	Nom	Huile essentielle 2/3 écorce cannelle 1/3 cannelle de chine	Huile essentielle 1/3 écorce cannelle 2/3 cannelle de chine	cannelle de chine	écorce cannelle	Aldéhyde trans cinnamique
ATCC 25922	<i>E.coli</i>	0,02	0,06	0,03	0,06	0,02
8127	<i>Pseudomonas</i>	0,06	0,13	0,13	0,13	0,13
8128	<i>Pseudomonas</i>	0,06	0,13	0,13	0,13	0,06
8129	<i>Pseudomonas</i>	0,06	0,13	0,13	0,15	0,06
8130	<i>Pseudomonas</i>	0,13	0,25	0,13	0,25	0,13
8131	<i>Pseudomonas</i>	0,06	0,13	0,13	0,13	0,06
8132	<i>Pseudomonas</i>	0,13	0,25	0,25	0,25	0,13
8133	<i>Pseudomonas</i>	0,06	0,13	0,13	0,13	0,06
8134	<i>Pseudomonas</i>	0,06	0,13	0,13	0,13	0,06
8135	<i>Pseudomonas</i>	0,06	0,25	0,13	0,13	0,13
8136	<i>Pseudomonas</i>	0,13	0,25	0,25	0,13	0,13
8137	<i>E.coli</i>	0,02	0,06	0,03	0,06	0,02
8138	<i>E.coli</i>	0,03	0,06	0,03	0,06	0,02
8141	<i>E.coli</i>	0,02	0,06	0,03	0,06	0,02
8142	<i>E.coli</i>	0,02	0,06	0,03	0,06	0,02
8150	<i>E.coli</i>	0,03	0,06	0,06	0,06	0,02
8151	<i>E.coli</i>	0,03	0,06	0,06	0,06	0,02
8154	<i>E.coli</i>	0,03	0,06	0,06	0,06	0,02
8155	<i>E.coli</i>	0,03	0,06	0,06	0,06	0,02
8156	<i>E.coli</i>	0,02	0,06	0,06	0,06	0,02
8157	<i>E.coli</i>	0,02	0,06	0,06	0,06	0,02
8143	<i>Staphylococcus</i>	0,02	0,06	0,03	0,06	0,02
8146	<i>Staphylococcus</i>	0,03	0,06	0,03	0,06	0,02
8147	<i>Staphylococcus</i>	0,03	0,06	0,06	0,06	0,02
8148	<i>Staphylococcus</i>	0,02	0,06	0,03	0,06	0,02
8149	<i>Staphylococcus</i>	0,03	0,06	0,03	0,06	0,02
8237	<i>Staphylococcus</i>	0,01	0,03	0,03	0,03	0,02
8238	<i>Staphylococcus</i>	0,02	0,06	0,03	0,03	0,02
8239	<i>Staphylococcus</i>	0,03	0,06	0,06	0,06	0,02
8240	<i>Staphylococcus</i>	0,03	0,06	0,06	0,06	0,02
8241	<i>Staphylococcus</i>	0,02	0,06	0,03	0,06	0,02
8152	<i>Enterococcus</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02
8153	<i>Enterococcus</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02

Annexe 5 : CMI après affinage du changement de proportion des huiles essentielles

Genre	Cannelle écorce	Cannelle de Chine	Cannelle 1/3 et Chine 2/3	Cannelle 2/3 et Chine 1/3	Cannelles écorce et Chine 1/1
<i>E.coli</i>	0.06 %	0.06 %	0.06 %	0.03 %	0.015 %
<i>Pseudomonas</i>	0.25 %	0.25 %	0.25 %	0.125 %	0.06 %
<i>Staphylococcus</i>	0.06 %	0.06 %	0.06 %	0.03 %	0.015 %
<i>Enterococcus</i>	0.06 %	0.06 %	0.06 %	0.06 %	0.015 %
<i>Acinetobacter</i>	0.06 %	0.015	NA	NA	0.0004 %

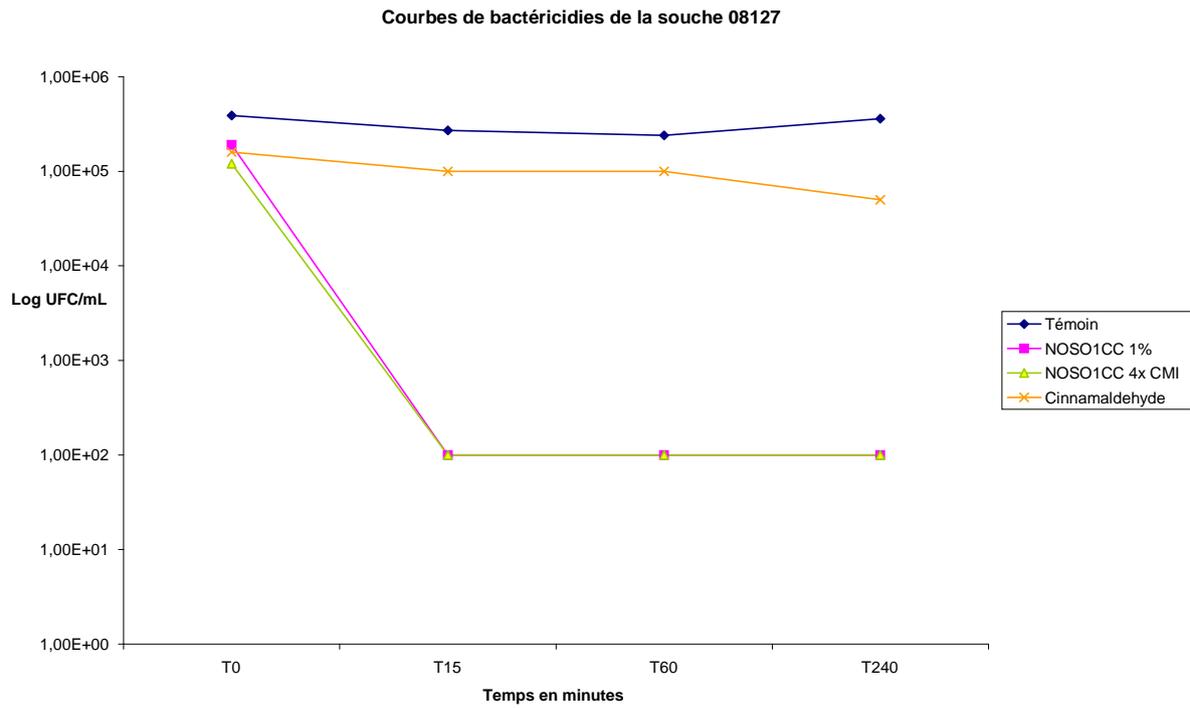
Annexe 6 : Efficacité des huiles essentielles de cannelles sur des souches résistantes

Souche	Type de souche	Cannelle de Chine			Mélange des deux cannelles		
		T = 0	T = 60 min	Délai -3 log	T = 0	T = 60 min	Délai -3 log
8132	<i>Pseudomonas</i> multi résistant (défaut de porine)	2.25E+07	9.00E+02	15	4.40E+06	9.00E+02	15
8134	<i>Pseudomonas</i> résistant à FQ et aminosides	3.10E+07	8.50E+06	NA	1.08E+06	7.20E+03	NA
9008	<i>Pseudomonas</i> BLSE	5.20E+06	1.00E+02	NA	5.10E+06	1.00E+02	NA
8239	SARM			NA			NA
8148	SARM Résistant aux FQ	6.40E+07	3.14E+06	NA	6.70E+07	3.00E+04	60
8237	<i>Staphylococcus</i> sauvage	9.00E+04	9.00E+02	NA	9.00E+04	9.00E+02	NA
8154	<i>E. coli</i> avec pénicillinase	5.60E+07	9.10E+06	NA	5.80E+07	9.00E+02	15
8152	<i>E. coli</i> , MLSB	2.52E+07	1.44E+05	NA	2.16E+07	9.00E+02	15
8155	<i>E. coli</i> sauvage	2.52E+07	9.00E+02	45	2.07E+07	9.00E+02	15
25922	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2.70E+07	9.00E+02	15	3.15E+07	9.00E+02	15
9011	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.88E+06	9.00E+02	15	5.04E+06	9.00E+02	15
9002	<i>Enterococcus</i> , multirésistant	6.00E+07	>	NA	5.10E+07	5.08E+06	NA
9004	<i>Enterobacter aerogenes</i> , BLSE	4.50E+06	1.00E+02	15	3.90E+06	1.00E+02	15
9001	<i>Enterococcus</i> , multirésistant	9.10E+06	>	NA	9.60E+06	4.00E+03	60

Annexe 7 : Résultats de bactéricidie

09/01/10 souche 08127

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	3,90E+05	1,90E+05	1,20E+05	1,60E+05
T15	2,70E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+05
T60	2,40E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+05
T240	3,60E+05	1,00E+02	1,00E+02	5,00E+04

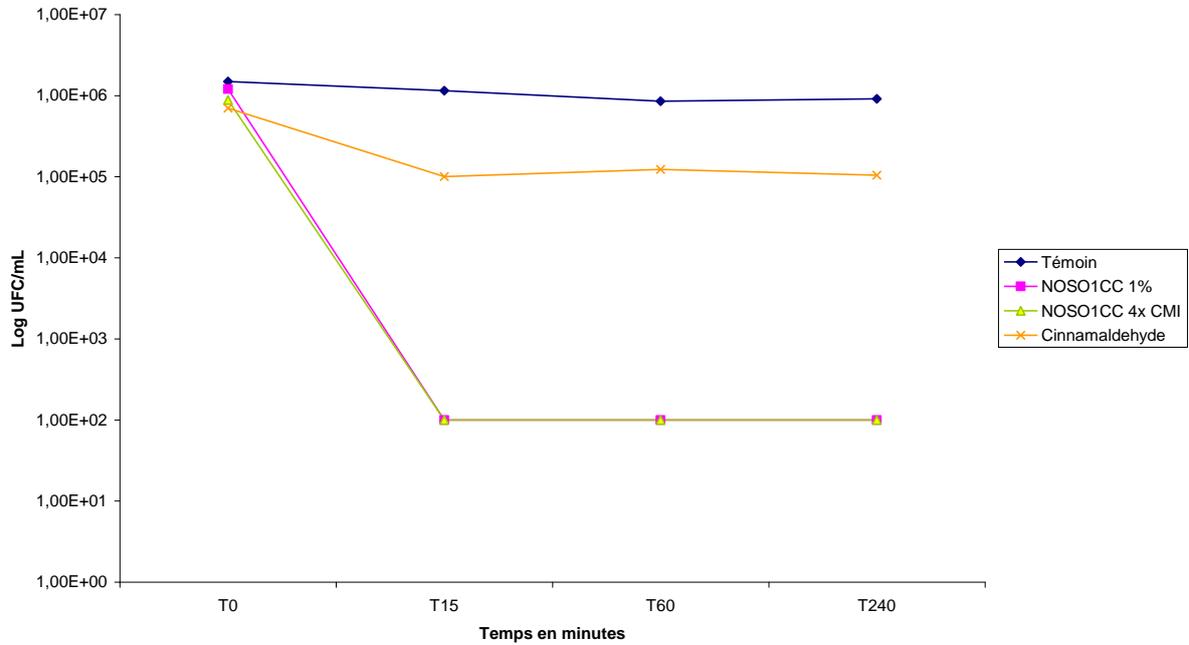


Pas de mutants

09/01/10 souche 08128

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,49E+06	1,20E+06	8,80E+05	7,00E+05
T15	1,15E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+05
T60	8,50E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,23E+05
T240	9,10E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,04E+05

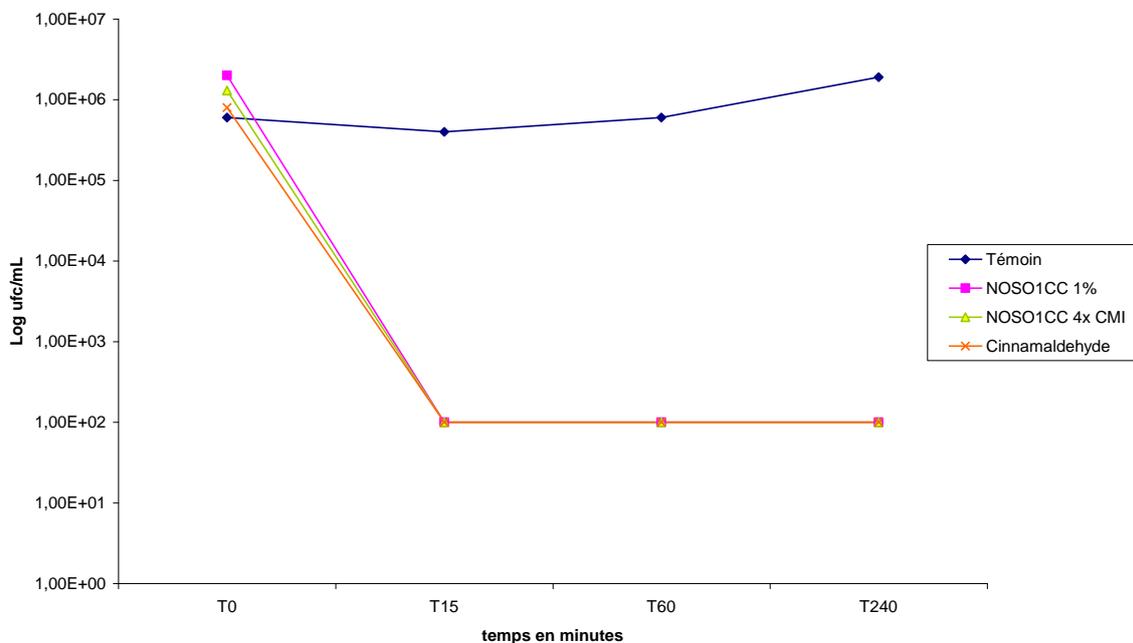
Courbes de bactéricidies de la souche 08128



Pas de mutants

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	6,00E+05	2,00E+06	1,30E+06	8,00E+05
T15	4,00E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T60	6,00E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T240	1,90E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

Courbes de bactericidie de la souche 08129

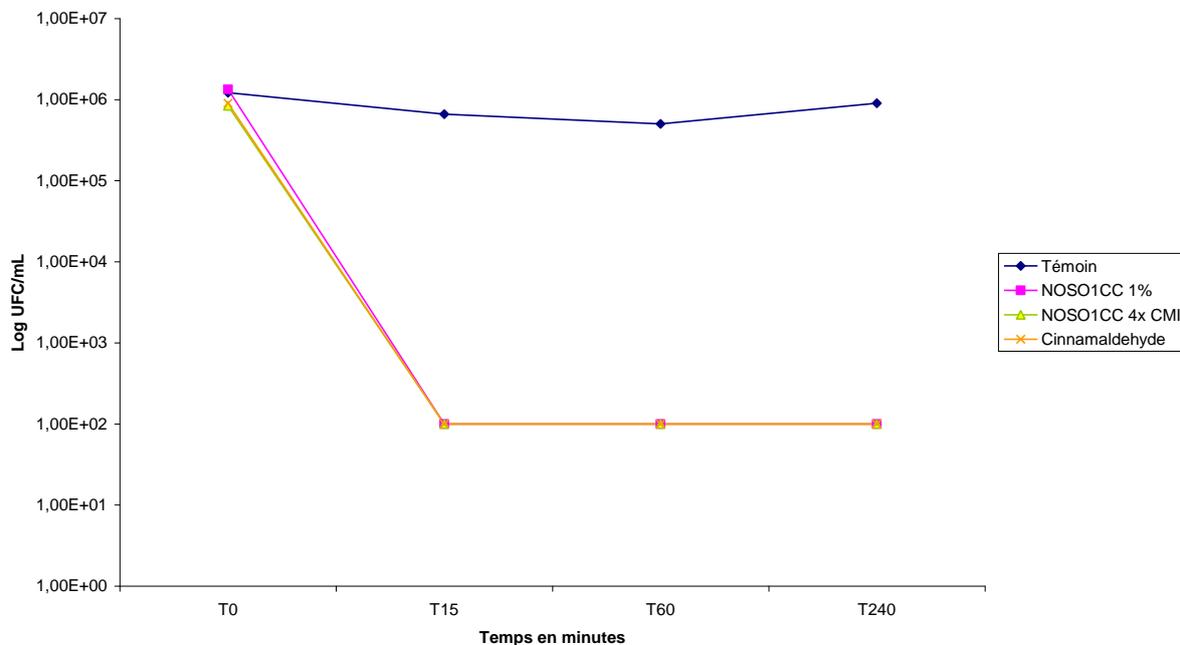


Pas de mutants

15/09/10 souche 08130

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,22E+06	1,34E+06	8,40E+05	9,00E+05
T15	6,60E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T60	5,00E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T240	9,00E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08130

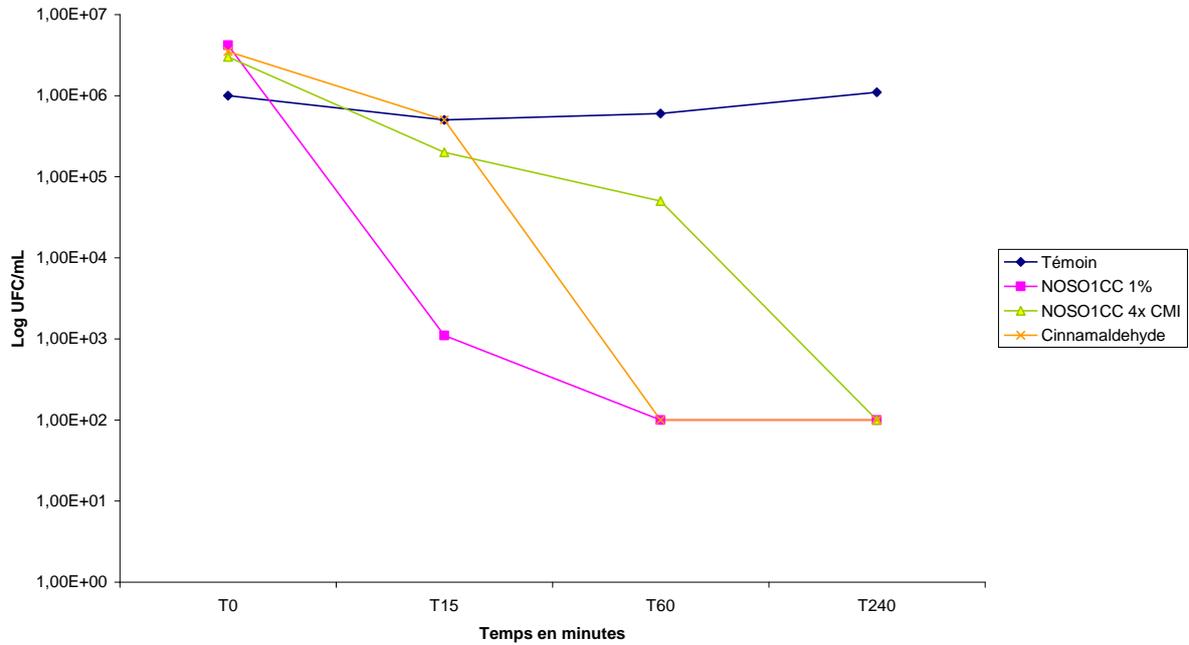


Pas de mutants

03/09/10 souche 08131

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,00E+06	4,20E+06	3,00E+06	3,50E+06
T15	5,00E+05	1,10E+03	2,00E+05	5,00E+05
T60	6,00E+05	1,00E+02	5,00E+04	1,00E+02
T240	1,10E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08131

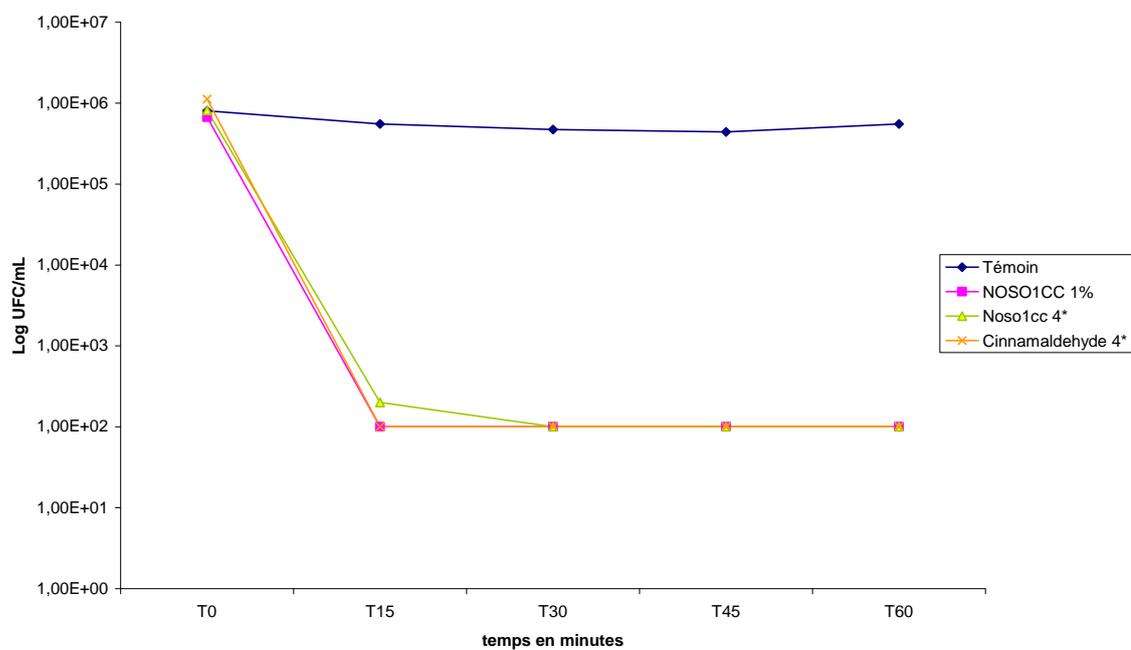


Pas de mutants

Souche 08132

	Témoin	NOSO1CC 1%	Noso1cc 4*	Cinnamaldéhyde
T0	8,00E+05	6,70E+05	8,10E+05	1,12E+06
T15	5,50E+05	1,00E+02	2,00E+02	1,00E+02
T30	4,70E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T45	4,40E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T60	5,50E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

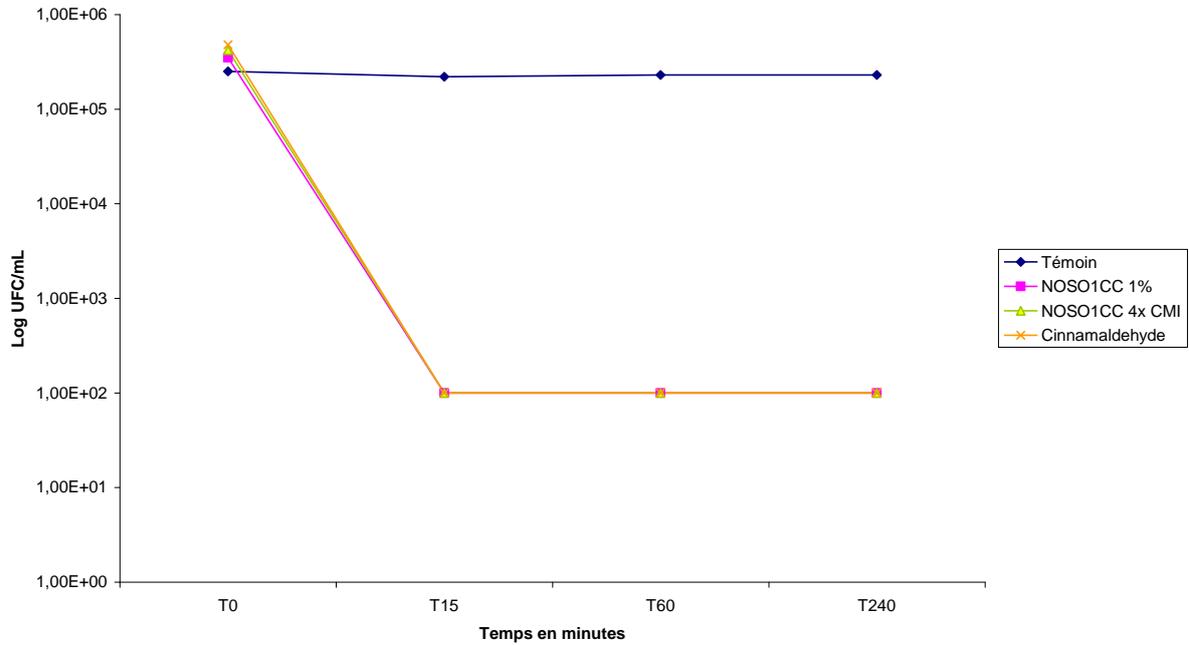
Courbes de bactéricidies de la souche 08132



03/09/10 souche 08133

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	2,50E+05	3,50E+05	4,20E+05	4,80E+05
T15	2,20E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T60	2,30E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T240	2,30E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08133

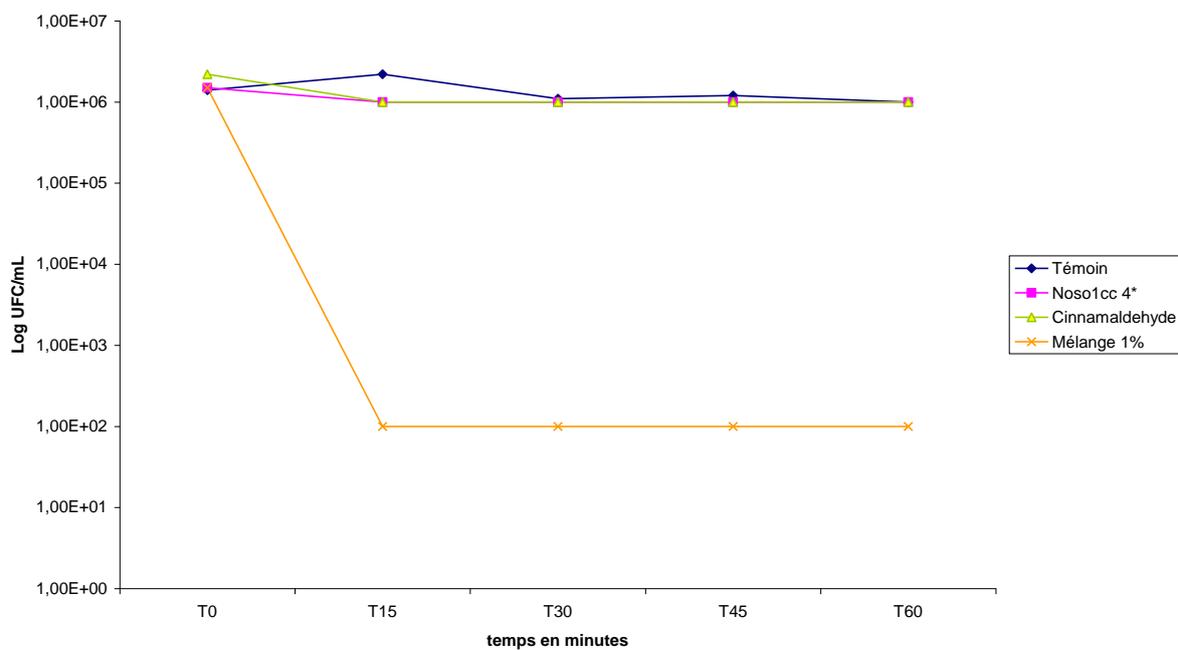


Pas de mutants

Souche 08134

	Témoin	Noso1cc 4*	Cinnamaldéhyde	Mélange 1%
T0	1,40E+06	1,50E+06	2,20E+06	1,50E+06
T15	2,20E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+02
T30	1,10E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+02
T45	1,20E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+02
T60	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+02

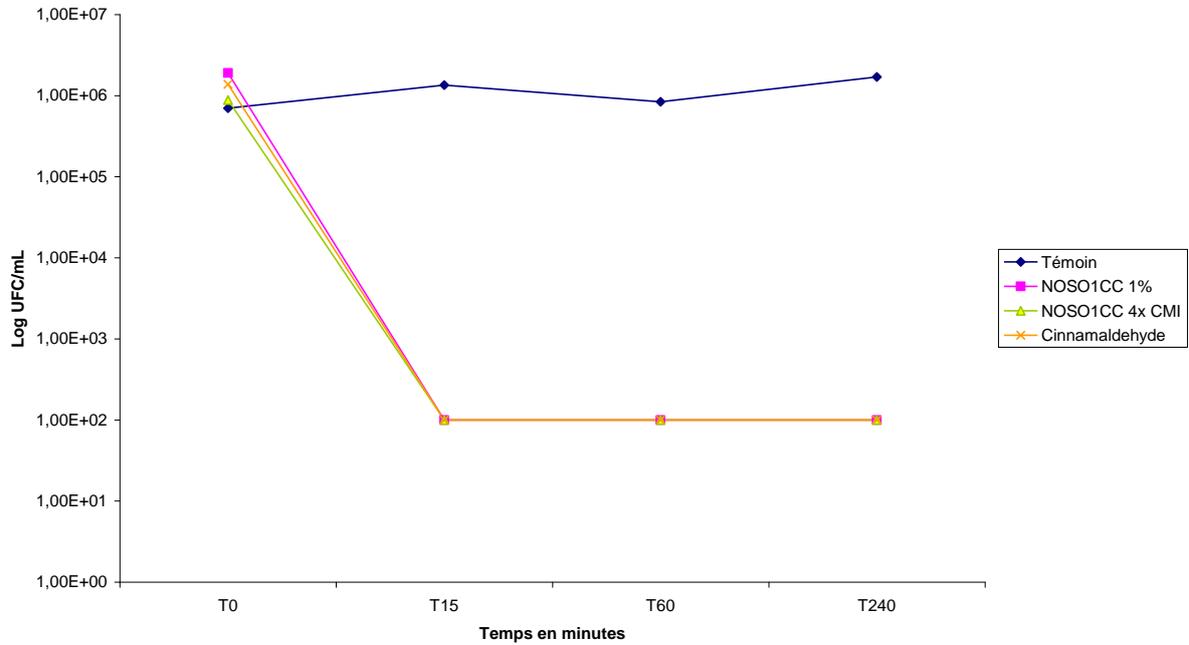
Courbes de bactéricidies de la souche 08134



15/09/10 souche 08135

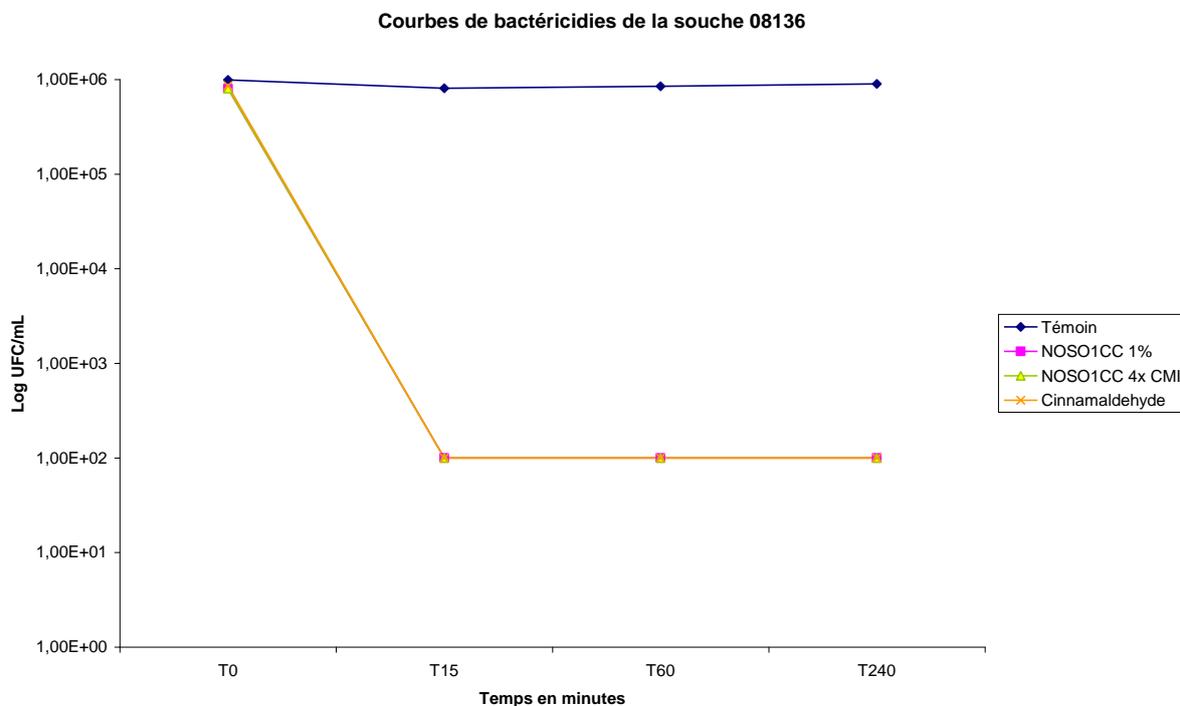
	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	7,00E+05	1,90E+06	8,80E+05	1,38E+06
T15	1,35E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T60	8,40E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T240	1,70E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08135



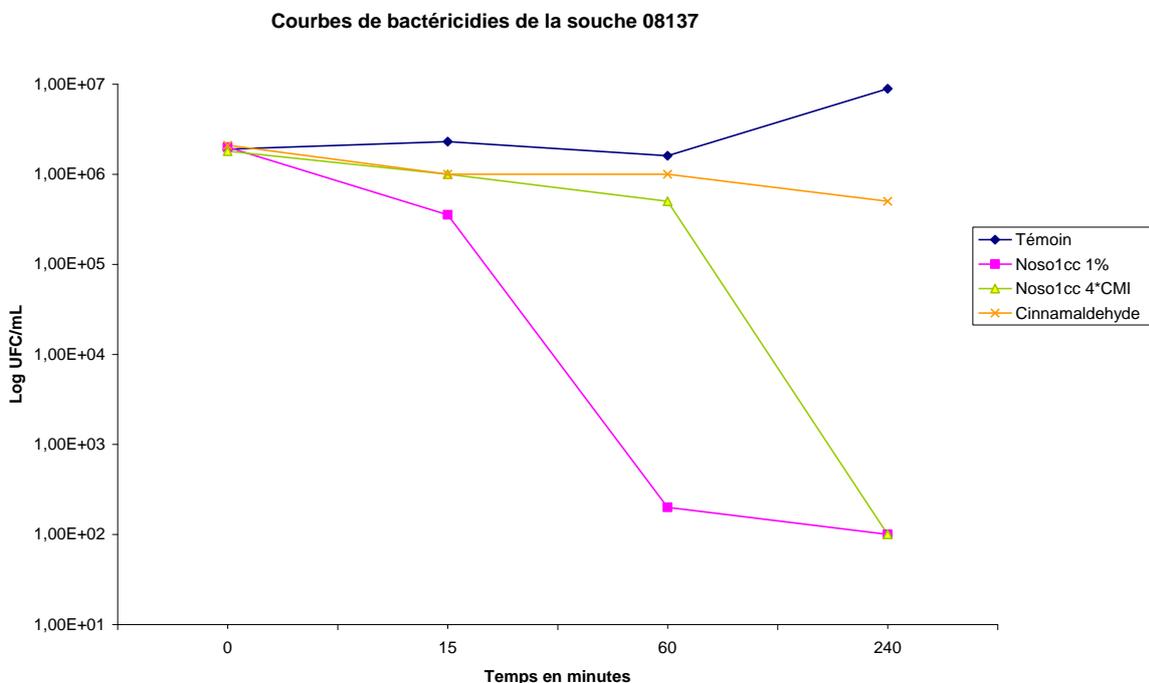
Pas de mutants

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	9,90E+05	8,00E+05	8,00E+05	8,60E+05
T15	8,10E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T60	8,50E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T240	9,00E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02



Pas de mutants

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,90E+06	2,00E+06	1,80E+06	2,10E+06
T15	2,30E+06	3,54E+05	1,00E+06	1,00E+06
T60	1,60E+06	2,00E+02	5,00E+05	1,00E+06
T240	8,90E+06	1,00E+02	1,00E+02	5,00E+05

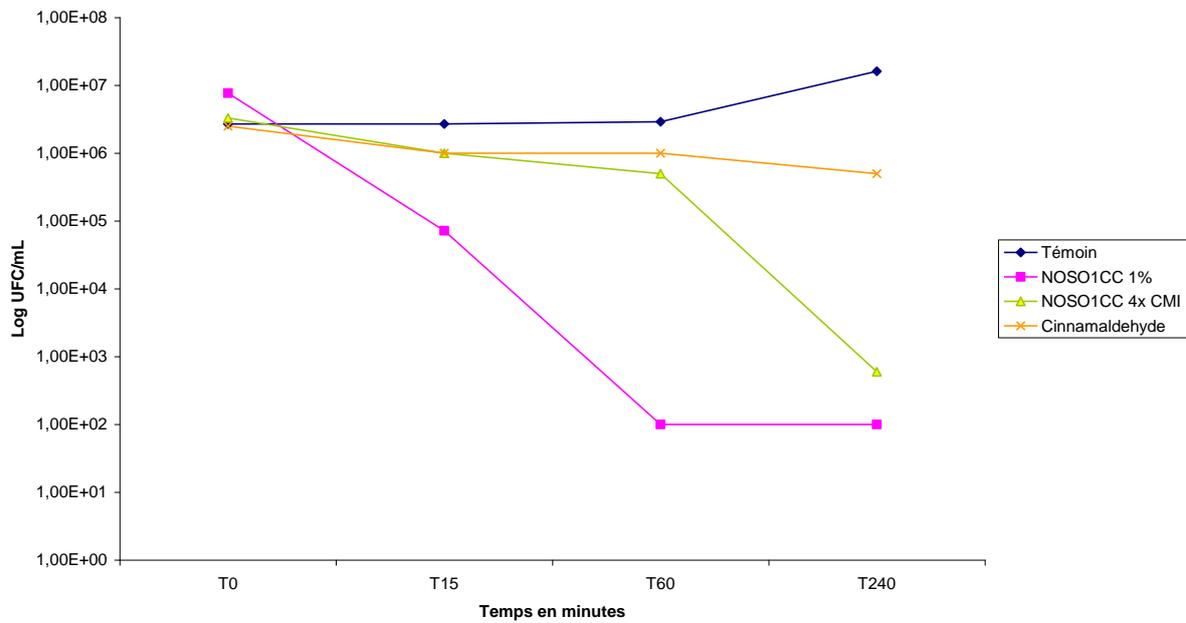


Pas de mutants

01/10/10 souche 08138

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	2,70E+06	7,70E+06	3,30E+06	2,50E+06
T15	2,70E+06	7,20E+04	1,00E+06	1,00E+06
T60	2,90E+06	1,00E+02	5,00E+05	1,00E+06
T240	1,62E+07	1,00E+02	6,00E+02	5,00E+05

Courbes de bactéricidies de la souche 08138

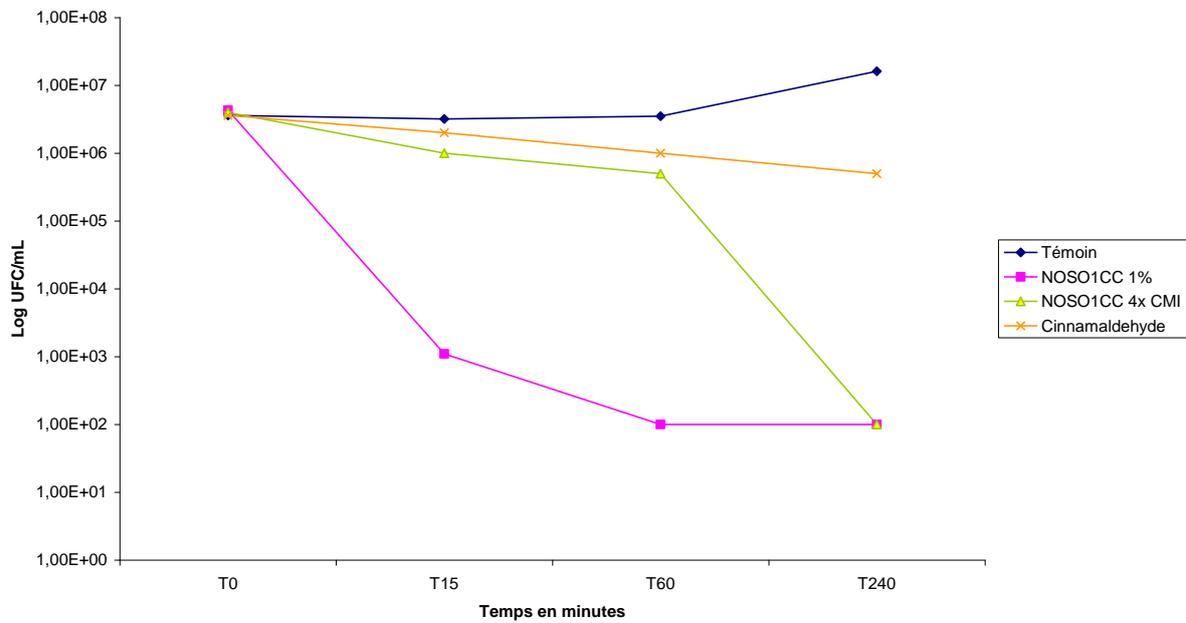


Pas de mutants

06/10/10 souche 08141

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	3,60E+06	4,30E+06	4,00E+06	3,60E+06
T15	3,20E+06	1,10E+03	1,00E+06	2,00E+06
T60	3,50E+06	1,00E+02	5,00E+05	1,00E+06
T240	1,61E+07	1,00E+02	1,00E+02	5,00E+05

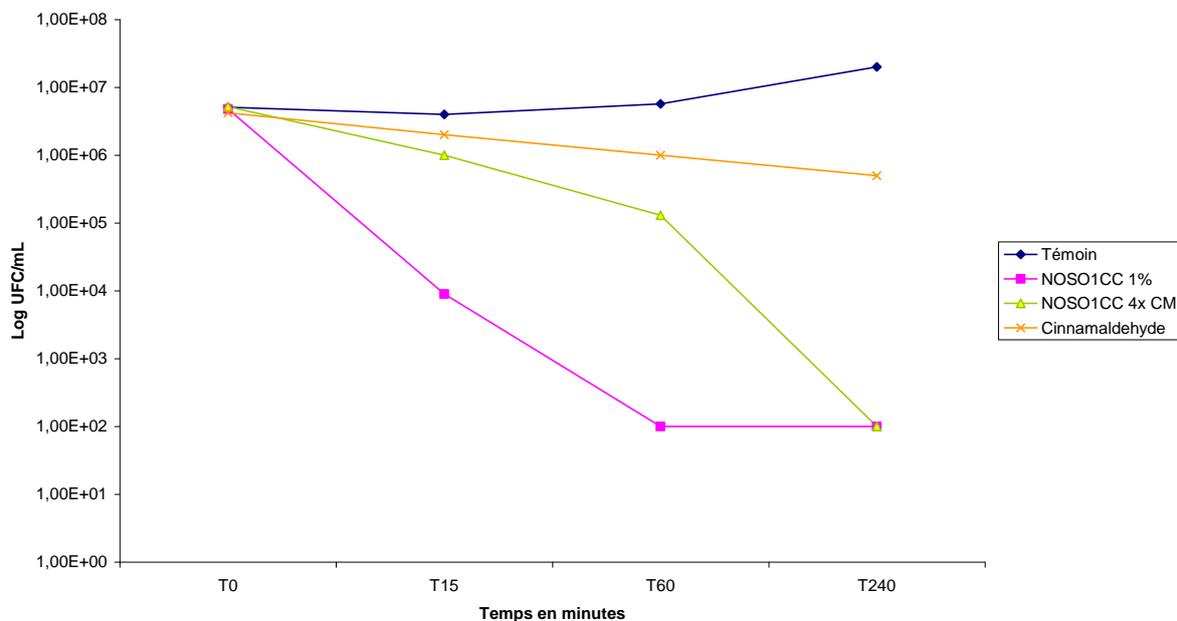
Courbes de bactéricidies de la souche 08141



Pas de mutants

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	5,10E+06	4,80E+06	5,20E+06	4,20E+06
T15	4,00E+06	9,00E+03	1,00E+06	2,00E+06
T60	5,70E+06	1,00E+02	1,30E+05	1,00E+06
T240	2,00E+07	1,00E+02	1,00E+02	5,00E+05

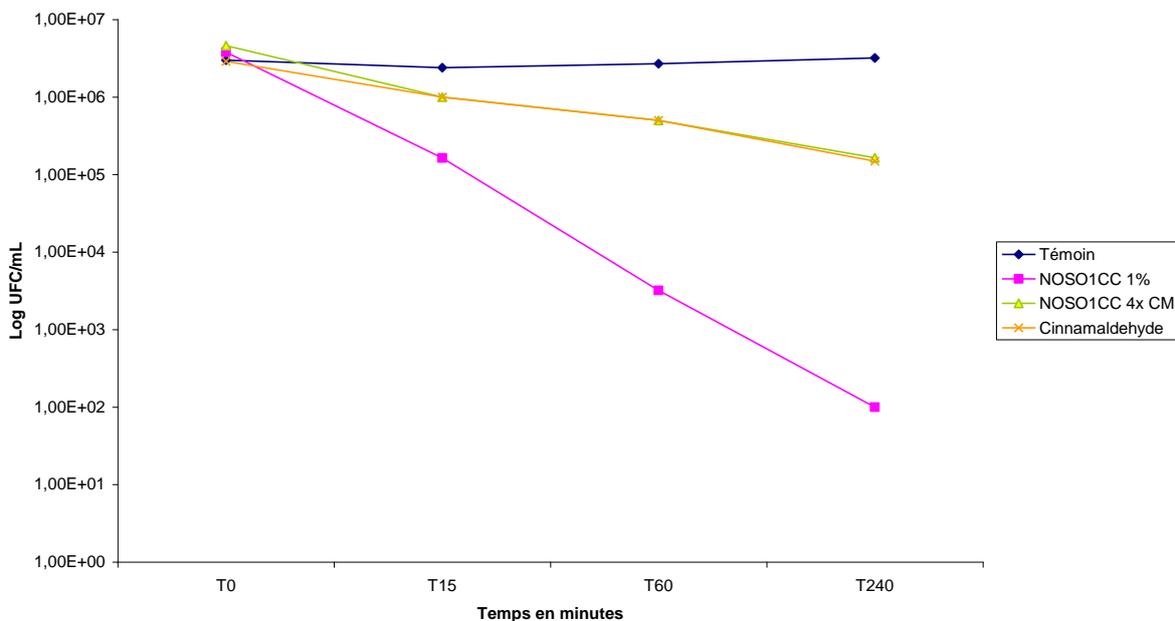
Courbes de bactéricidies de la souche 08142



Pas de mutants

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	3,00E+06	3,80E+06	4,60E+06	2,90E+06
T15	2,40E+06	1,64E+05	1,00E+06	1,00E+06
T60	2,70E+06	3,20E+03	5,00E+05	5,00E+05
T240	3,20E+06	1,00E+02	1,65E+05	1,49E+05

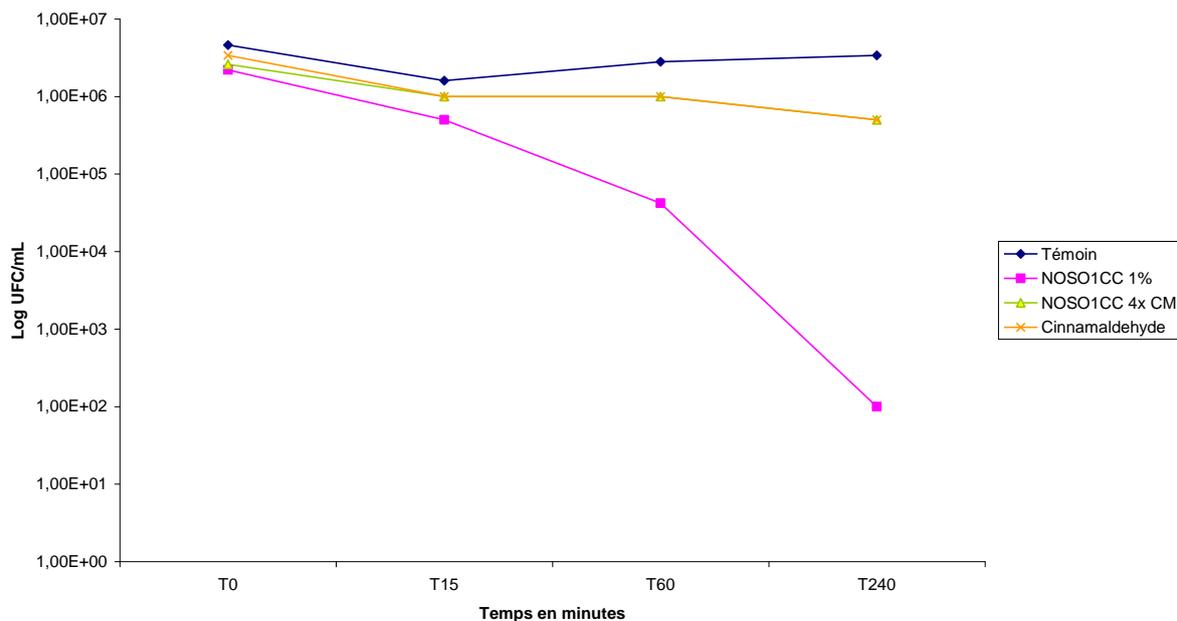
Courbes de bactéricidies de la souche 08143



Pas de mutants

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	4,60E+06	2,20E+06	2,60E+06	3,40E+06
T15	1,60E+06	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+06
T60	2,80E+06	4,20E+04	1,00E+06	1,00E+06
T240	3,40E+06	1,00E+02	5,00E+05	5,00E+05
T24	8,90E+06	1,00E+02	1,00E+02	3,00E+02

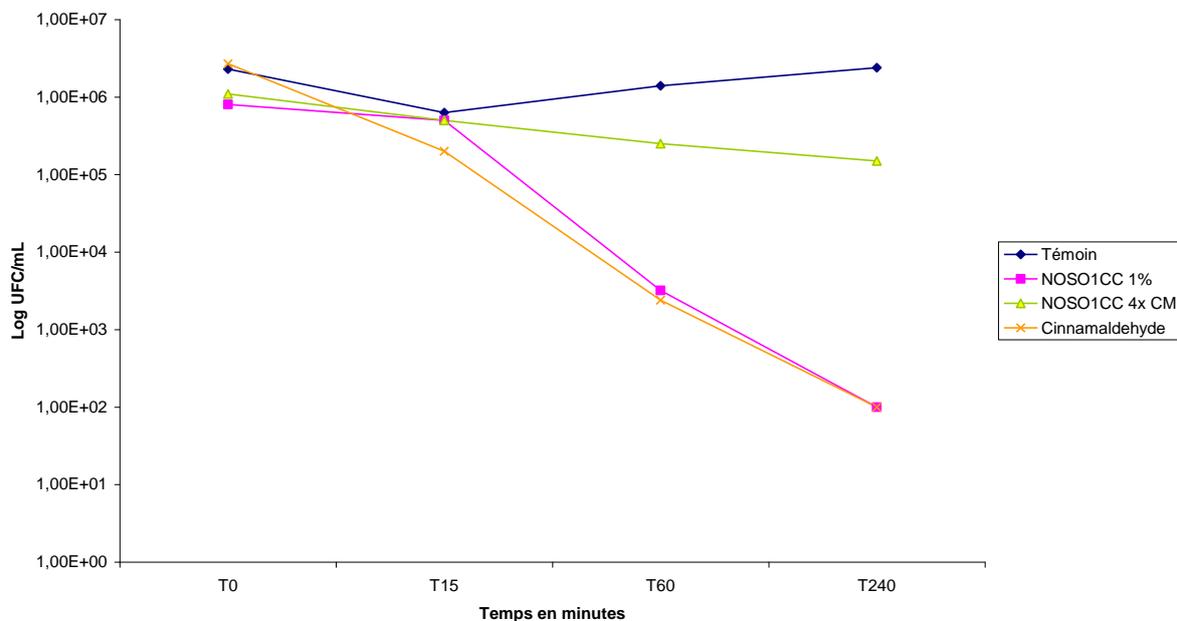
Courbes de bactéricidies de la souche 08146



Pas de mutants

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	2,30E+06	8,00E+05	1,10E+06	2,70E+06
T15	6,30E+05	5,00E+05	5,00E+05	2,00E+05
T60	1,40E+06	3,20E+03	2,50E+05	2,40E+03
T240	2,40E+06	1,00E+02	1,50E+05	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08147

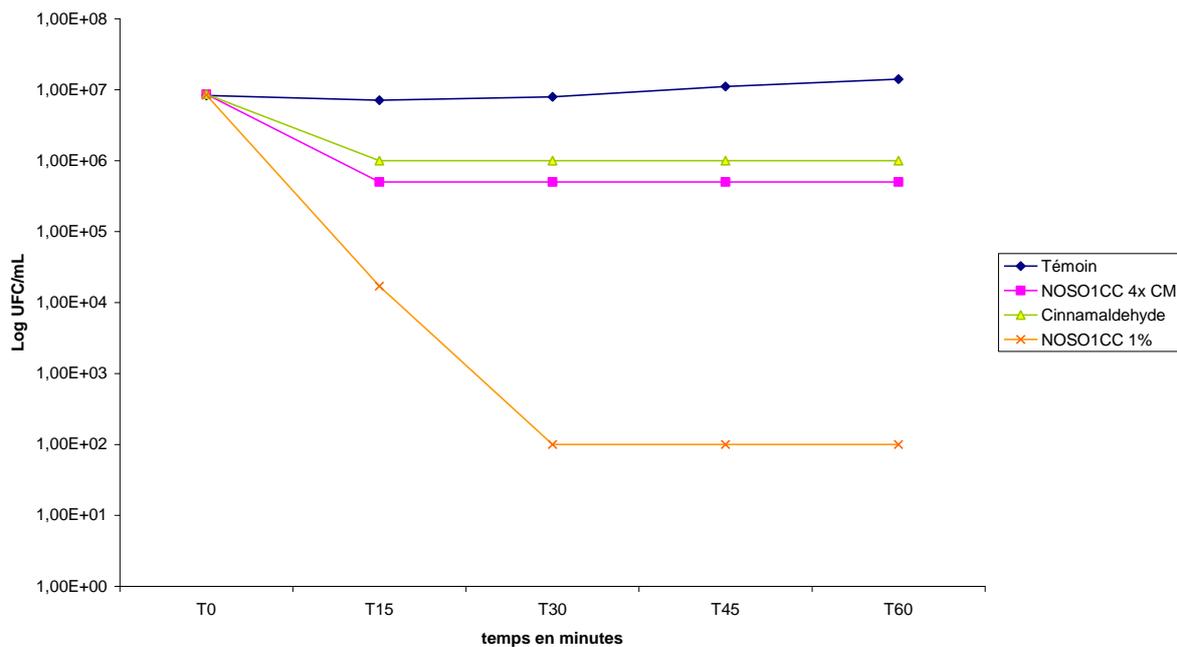


Pas de mutants

08148

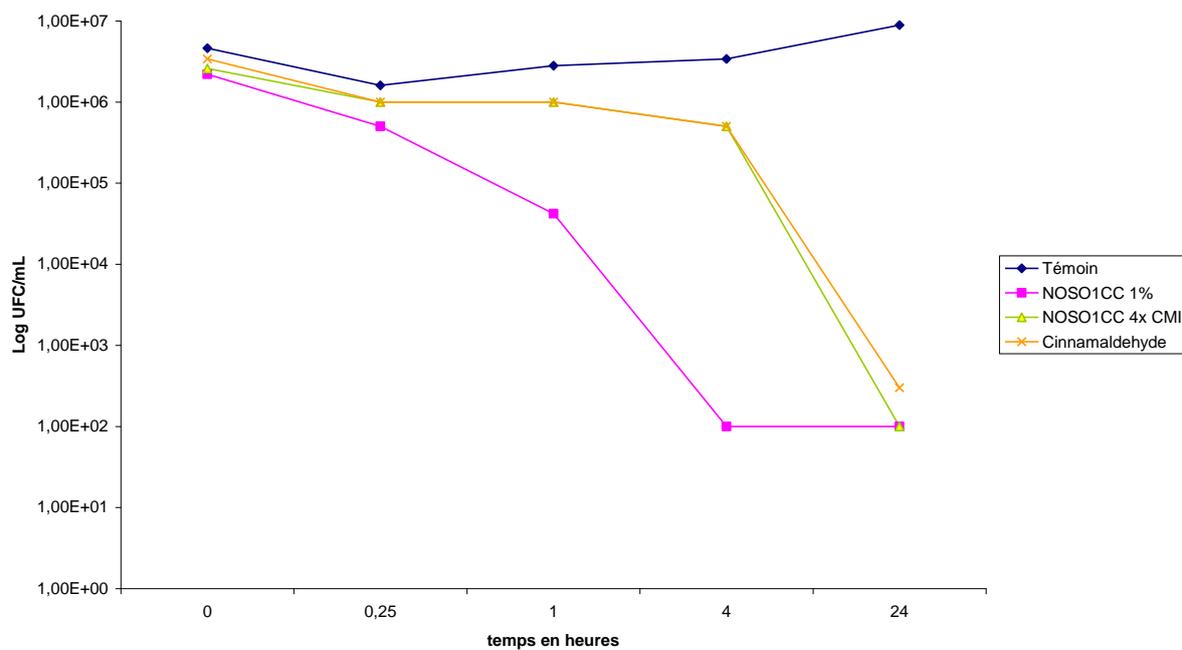
	Témoïn	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde	NOSO1CC 1%
T0	8,30E+06	8,60E+06	8,60E+06	8,40E+06
T15	7,10E+06	5,00E+05	1,00E+06	1,70E+04
T30	7,90E+06	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+02
T45	1,11E+07	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+02
T60	1,41E+07	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08148



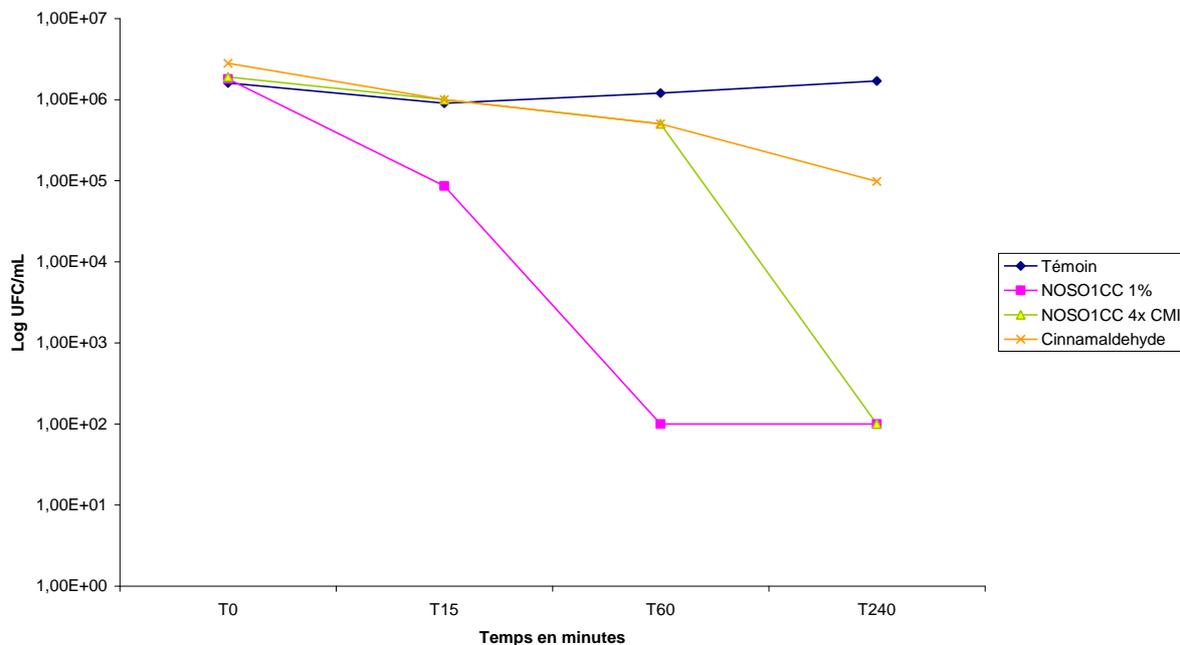
	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
0	4,60E+06	2,20E+06	2,60E+06	3,40E+06
0,25	1,60E+06	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+06
1	2,80E+06	4,20E+04	1,00E+06	1,00E+06
4	3,40E+06	1,00E+02	5,00E+05	5,00E+05
24	8,90E+06	1,00E+02	1,00E+02	3,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08149



	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,60E+06	1,80E+06	1,90E+06	2,80E+06
T15	9,00E+05	8,60E+04	1,00E+06	1,00E+06
T60	1,20E+06	1,00E+02	5,00E+05	5,00E+05
T240	1,70E+06	1,00E+02	1,00E+02	9,80E+04

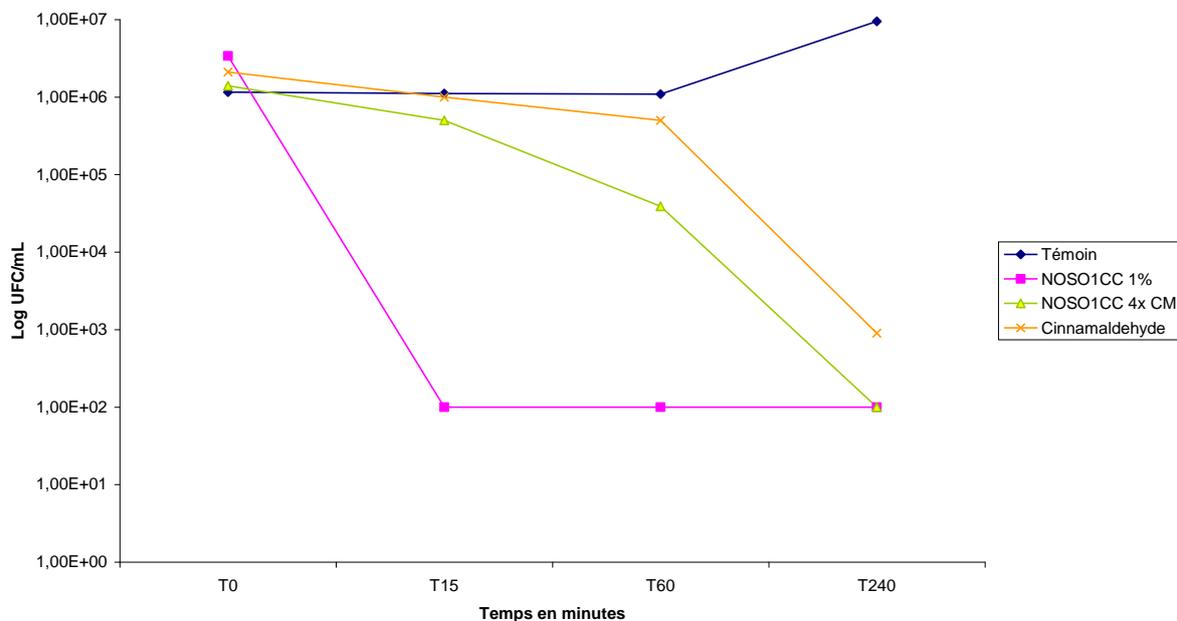
Courbes de bactéricidies de la souche 08150



Pas de mutants

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,16E+06	3,40E+06	1,40E+06	2,10E+06
T15	1,11E+06	1,00E+02	5,00E+05	1,00E+06
T60	1,09E+06	1,00E+02	3,90E+04	5,00E+05
T240	9,50E+06	1,00E+02	1,00E+02	9,00E+02

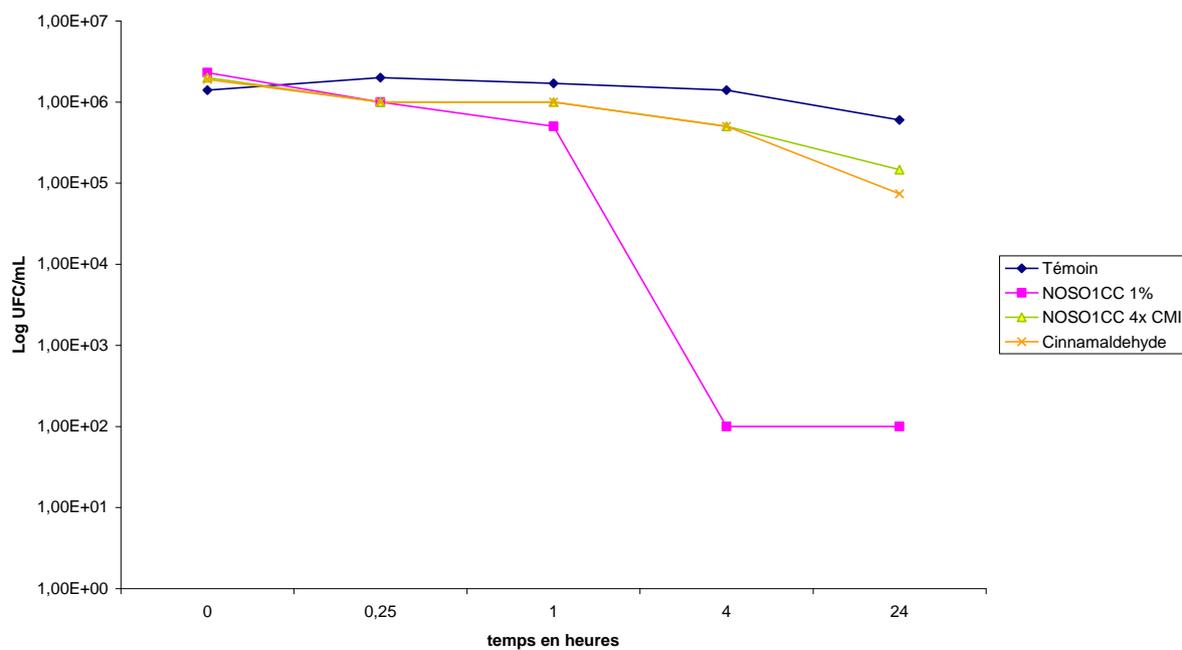
Courbes de bactéricidies de la souche 08151



Pas de mutants

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
0	1,40E+06	2,30E+06	2,00E+06	1,90E+06
0,25	2,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06
1	1,70E+06	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+06
4	1,40E+06	1,00E+02	5,00E+05	5,00E+05
24	6,00E+05	1,00E+02	1,46E+05	7,40E+04

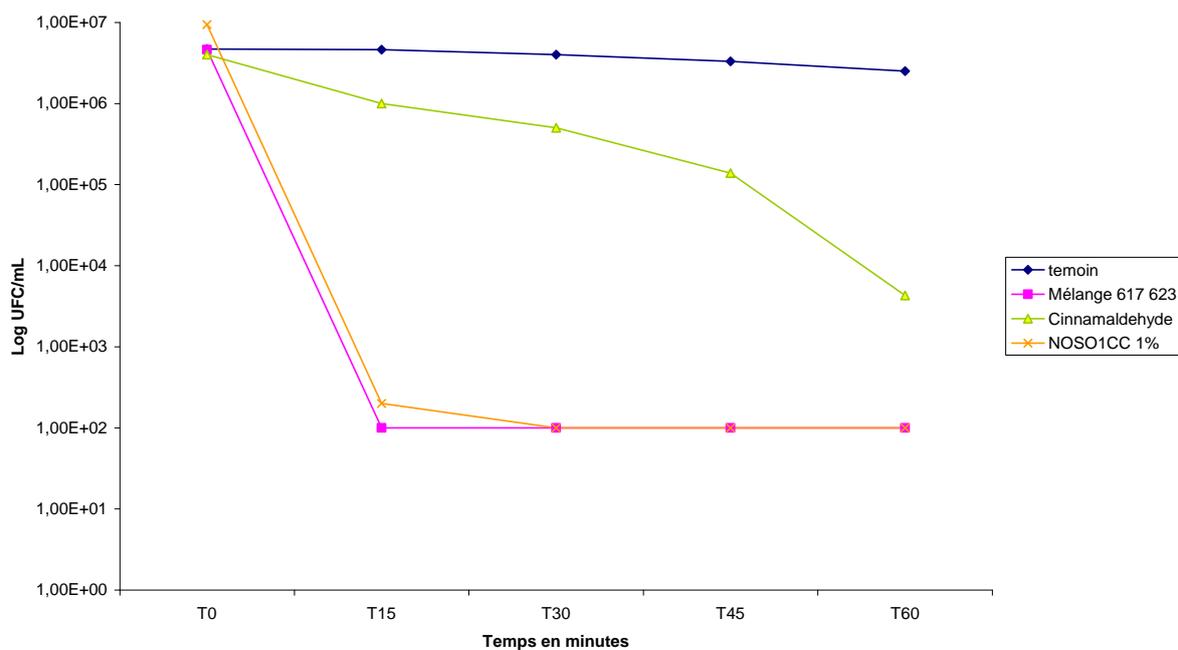
Courbes de bactéricidies de la souche 08152



Souche 08154

	temoin	Mélange 617 623	Cinnamaldéhyde	NOSO1CC 1%
T0	4,70E+06	4,60E+06	4,00E+06	9,40E+06
T15	4,60E+06	1,00E+02	1,00E+06	2,00E+02
T30	4,00E+06	1,00E+02	5,00E+05	1,00E+02
T45	3,30E+06	1,00E+02	1,38E+05	1,00E+02
T60	2,50E+06	1,00E+02	4,30E+03	1,00E+02

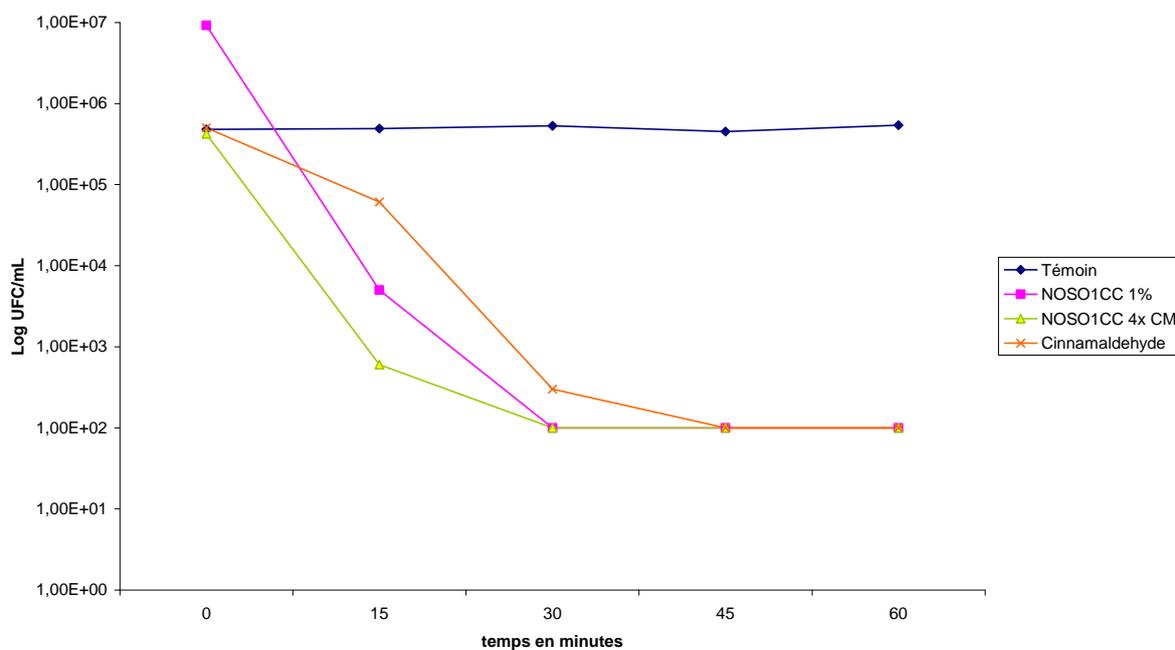
Courbes de bactéricidies de la souche 08154



Souche 08155

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
0	4,80E+05	9,20E+06	4,20E+05	5,00E+05
15	4,90E+05	5,00E+03	6,00E+02	6,10E+04
30	5,30E+05	1,00E+02	1,00E+02	3,00E+02
45	4,50E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
60	5,40E+05	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

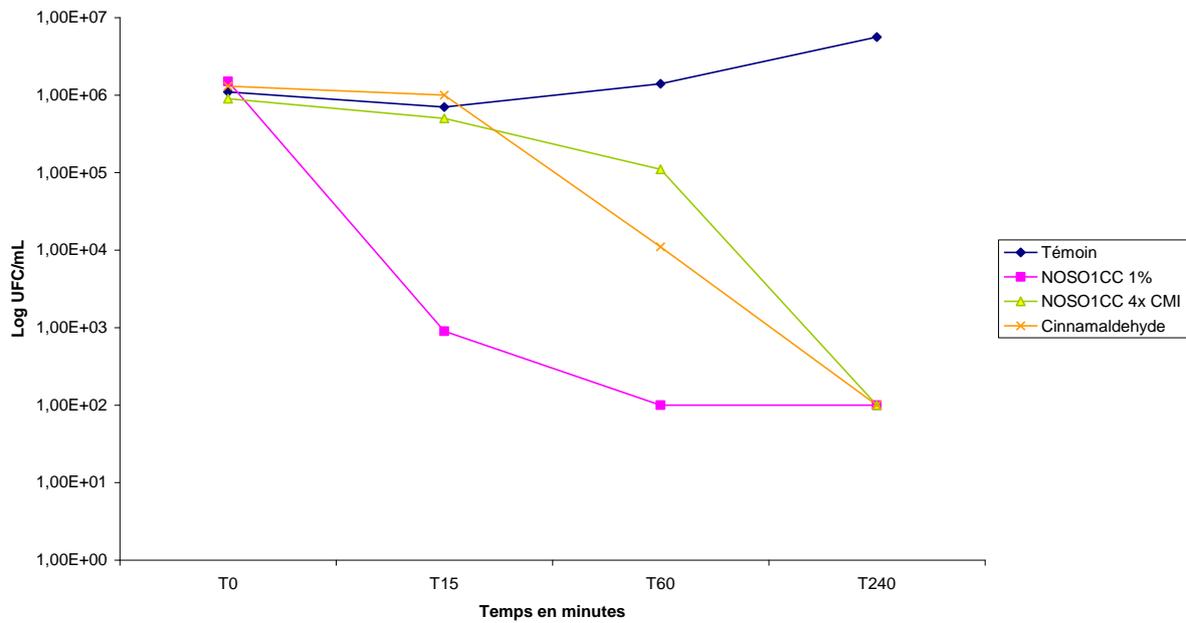
Courbes de bactéricidie de la souche 08155



07/10/10 souche 08156

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,10E+06	1,50E+06	9,00E+05	1,30E+06
T15	7,00E+05	9,00E+02	5,00E+05	1,00E+06
T60	1,40E+06	1,00E+02	1,10E+05	1,10E+04
T240	5,60E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08156

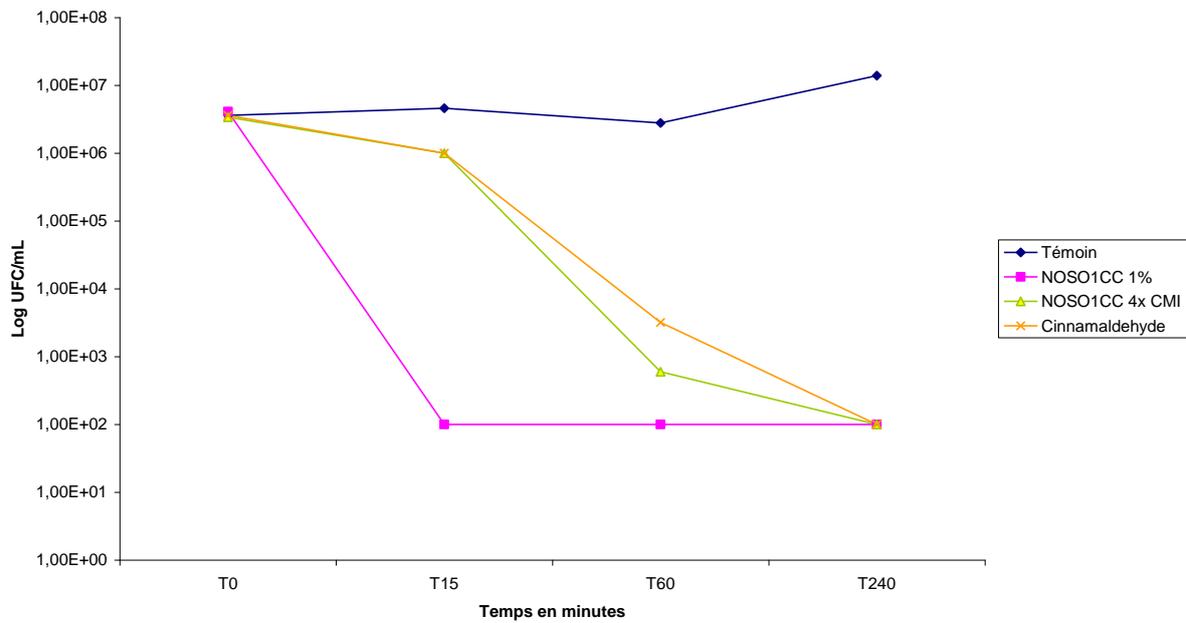


Pas de mutants

07/10/10 souche 08157

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	3,60E+06	4,10E+06	3,40E+06	3,60E+06
T15	4,60E+06	1,00E+02	1,00E+06	1,00E+06
T60	2,80E+06	1,00E+02	6,00E+02	3,20E+03
T240	1,39E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08157

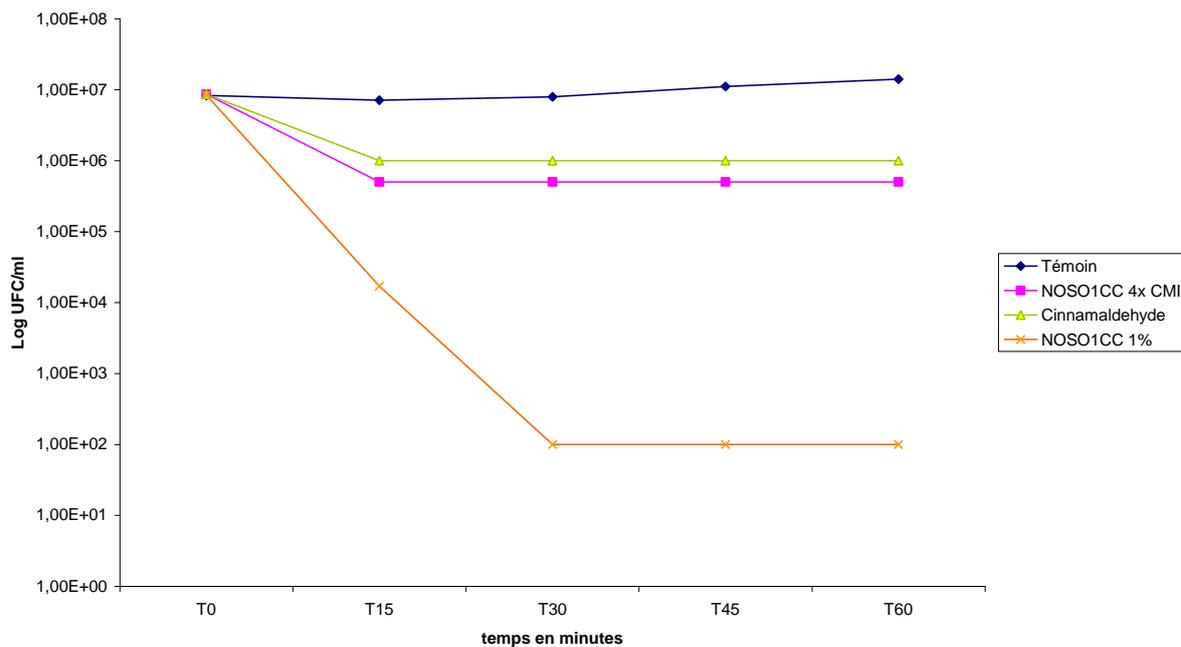


Pas de mutants

Souche 08237

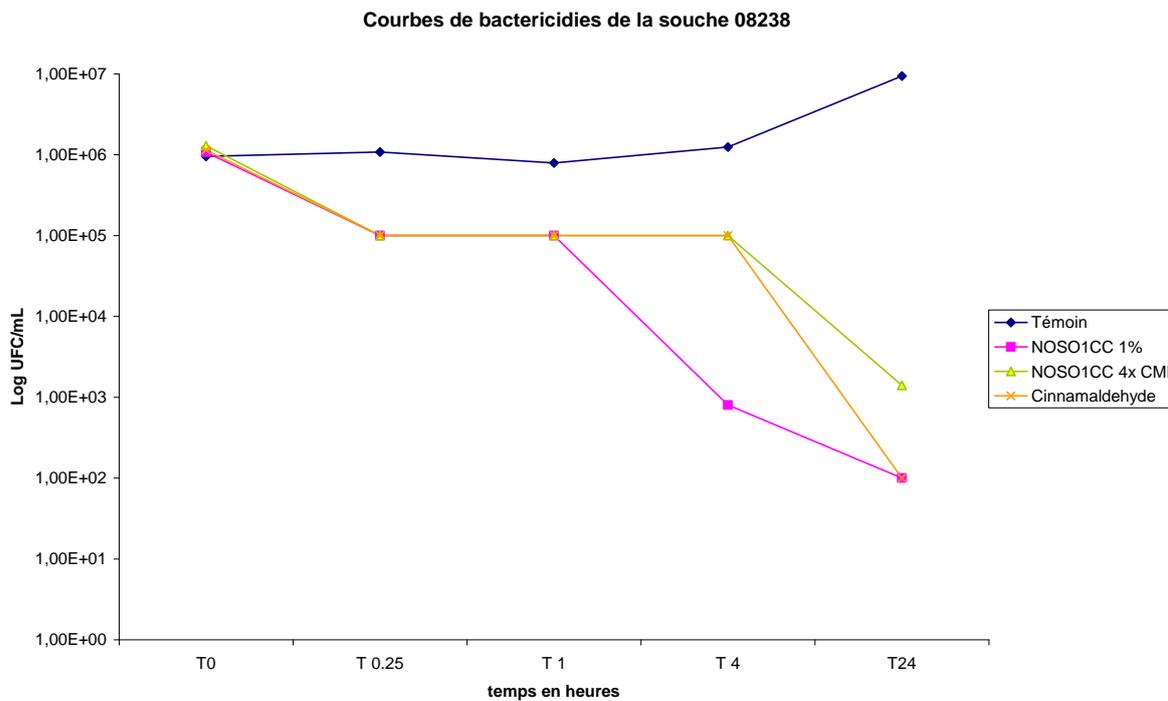
	Témoïn	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde	NOSO1CC 1%
T0	8,30E+06	8,60E+06	8,60E+06	8,40E+06
T15	7,10E+06	5,00E+05	1,00E+06	1,70E+04
T30	7,90E+06	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+02
T45	1,11E+07	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+02
T60	1,41E+07	5,00E+05	1,00E+06	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08237



Souche 08238

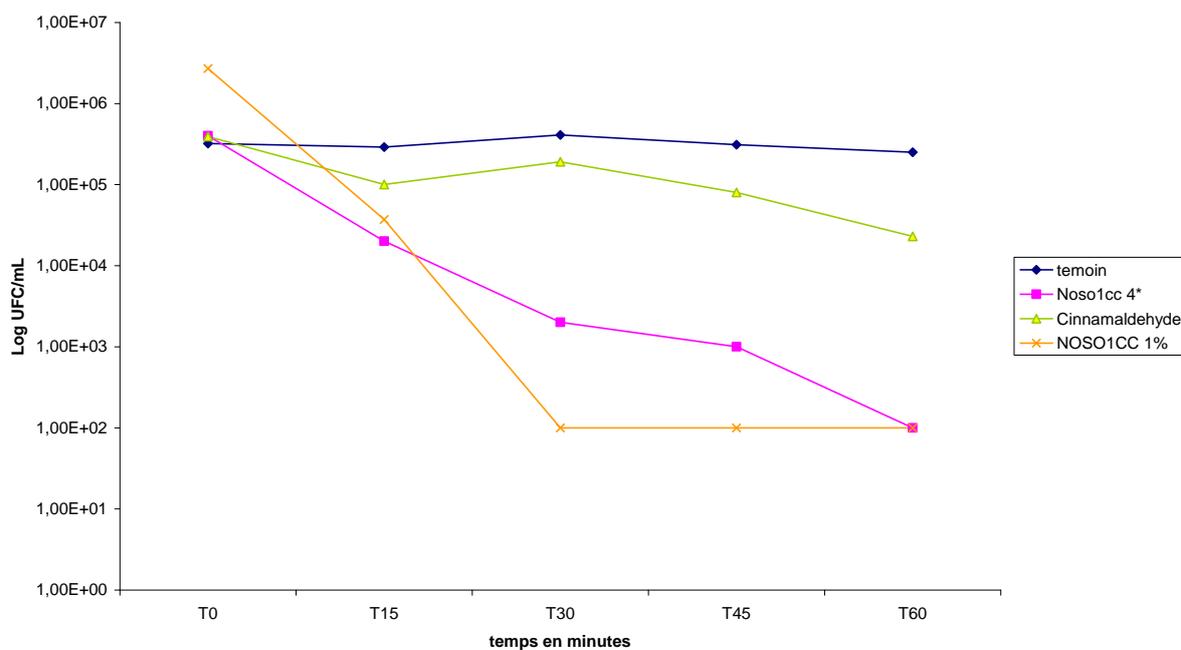
	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	9,50E+05	1,07E+06	1,29E+06	1,14E+06
T 0.25	1,08E+06	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05
T 1	7,90E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05
T 4	1,24E+06	8,00E+02	1,00E+05	1,00E+05
T24	9,40E+06	1,00E+02	1,40E+03	1,00E+02



Souche 08239

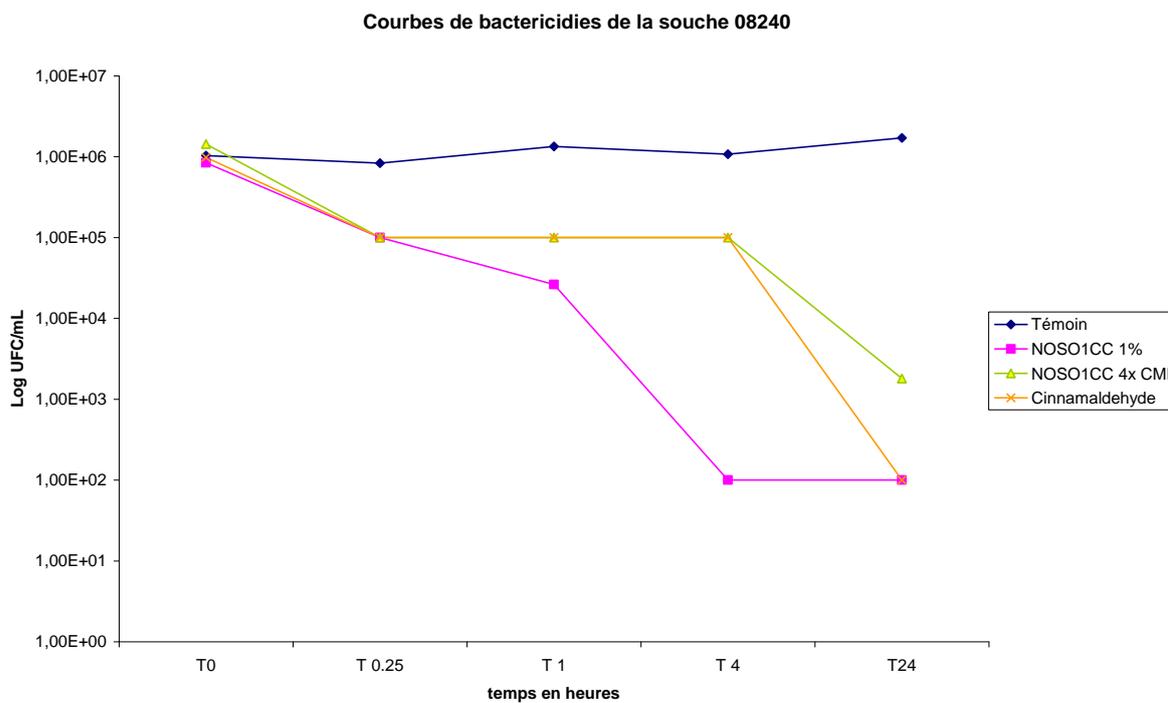
	témoïn	Noso1cc 4*	Cinnamaldéhyde	NOSO1CC 1%
T0	3,20E+05	4,00E+05	3,90E+05	2,70E+06
T15	2,90E+05	2,00E+04	1,00E+05	3,70E+04
T30	4,10E+05	2,00E+03	1,91E+05	1,00E+02
T45	3,10E+05	1,00E+03	8,00E+04	1,00E+02
T60	2,50E+05	1,00E+02	2,30E+04	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 08239



Souche 08240

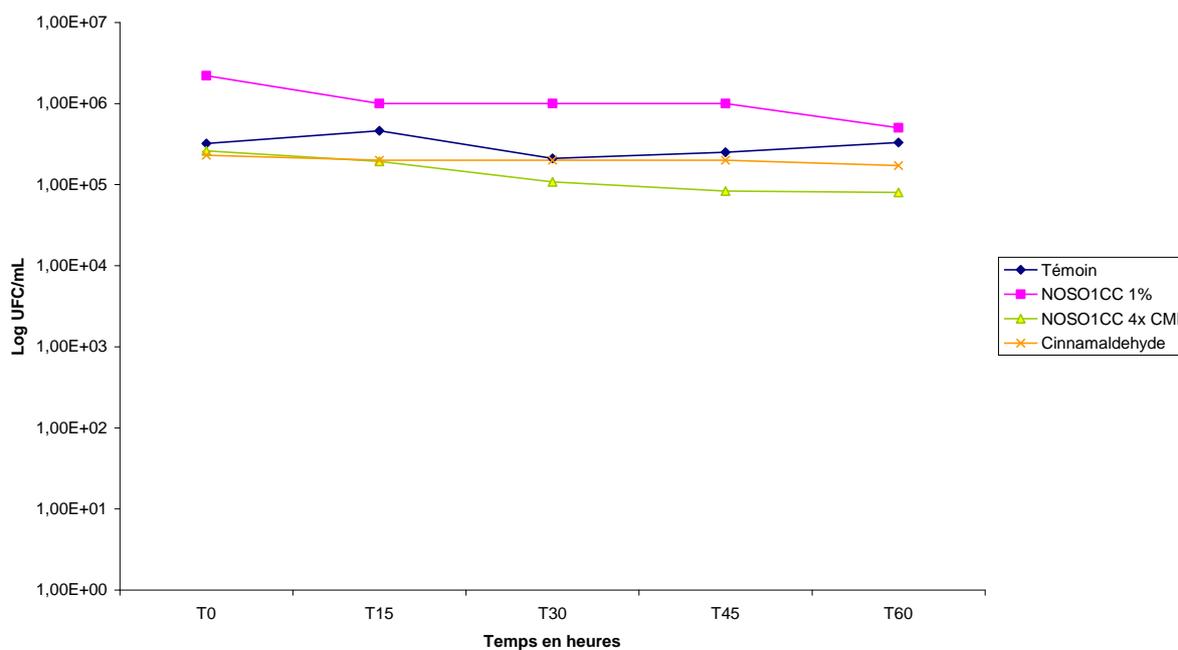
	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,03E+06	8,40E+05	1,43E+06	9,80E+05
T 0.25	8,30E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05
T 1	1,34E+06	2,62E+04	1,00E+05	1,00E+05
T 4	1,07E+06	1,00E+02	1,00E+05	1,00E+05
T24	1,71E+06	1,00E+02	1,80E+03	1,00E+02



Souche 09001

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	3,20E+05	2,20E+06	2,60E+05	2,30E+05
T15	4,60E+05	1,00E+06	1,93E+05	2,00E+05
T30	2,10E+05	1,00E+06	1,08E+05	2,00E+05
T45	2,50E+05	1,00E+06	8,30E+04	2,00E+05
T60	3,30E+05	5,00E+05	8,00E+04	1,71E+05

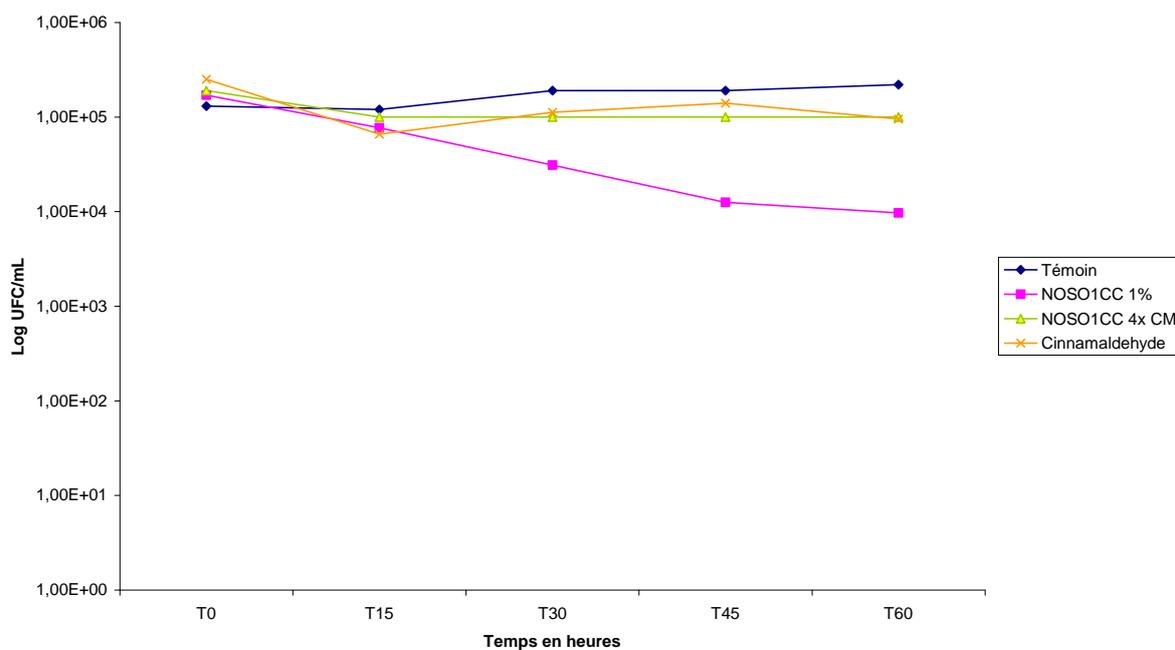
Courbes de bactéricidies de la souche 09001



Souche 09002

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,30E+05	1,70E+05	1,90E+05	2,50E+05
T15	1,20E+05	7,70E+04	1,00E+05	6,60E+04
T30	1,90E+05	3,10E+04	1,00E+05	1,12E+05
T45	1,90E+05	1,25E+04	1,00E+05	1,40E+05
T60	2,20E+05	9,70E+03	1,00E+05	9,50E+04

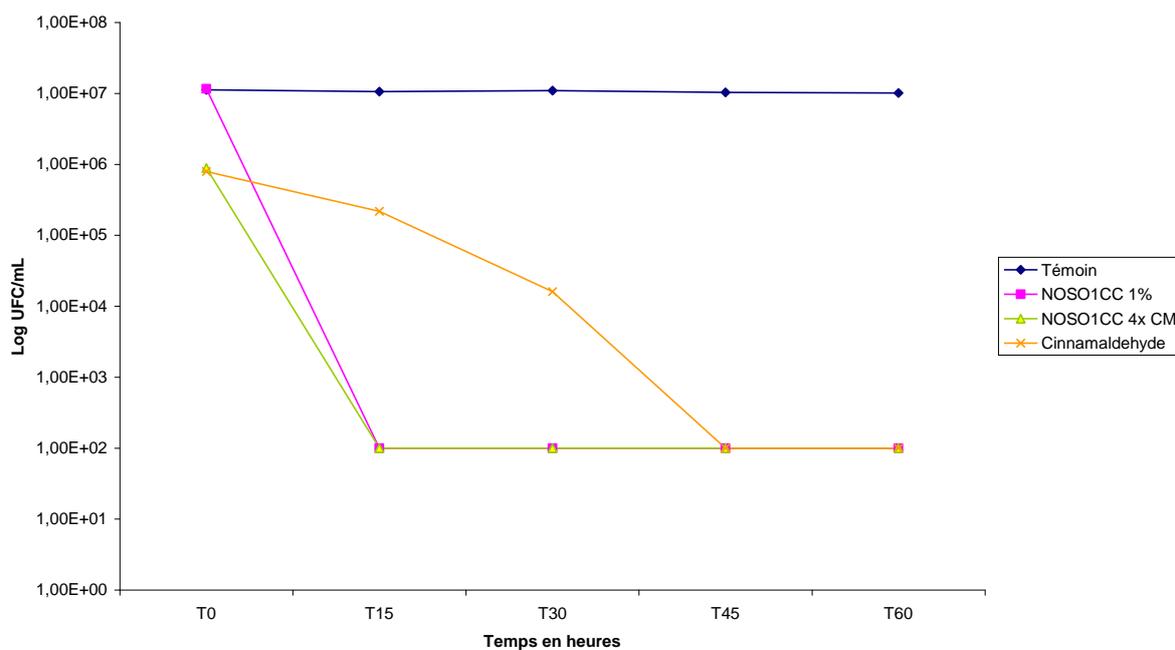
Courbes de bactéricidies de la souche 09002



Souche 09004

	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,12E+07	1,16E+07	8,90E+05	7,90E+05
T15	1,06E+07	1,00E+02	1,00E+02	2,18E+05
T30	1,09E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,60E+04
T45	1,03E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
T60	1,01E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

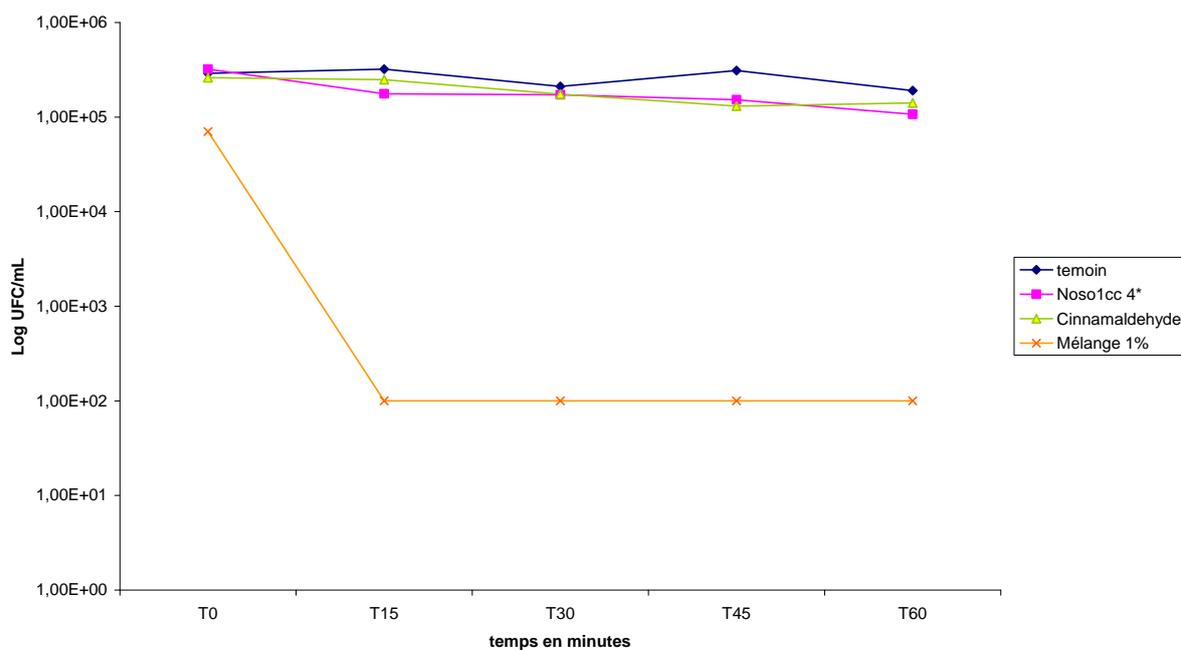
Courbes de bactéricidies de la souche 09004



Souche 09008

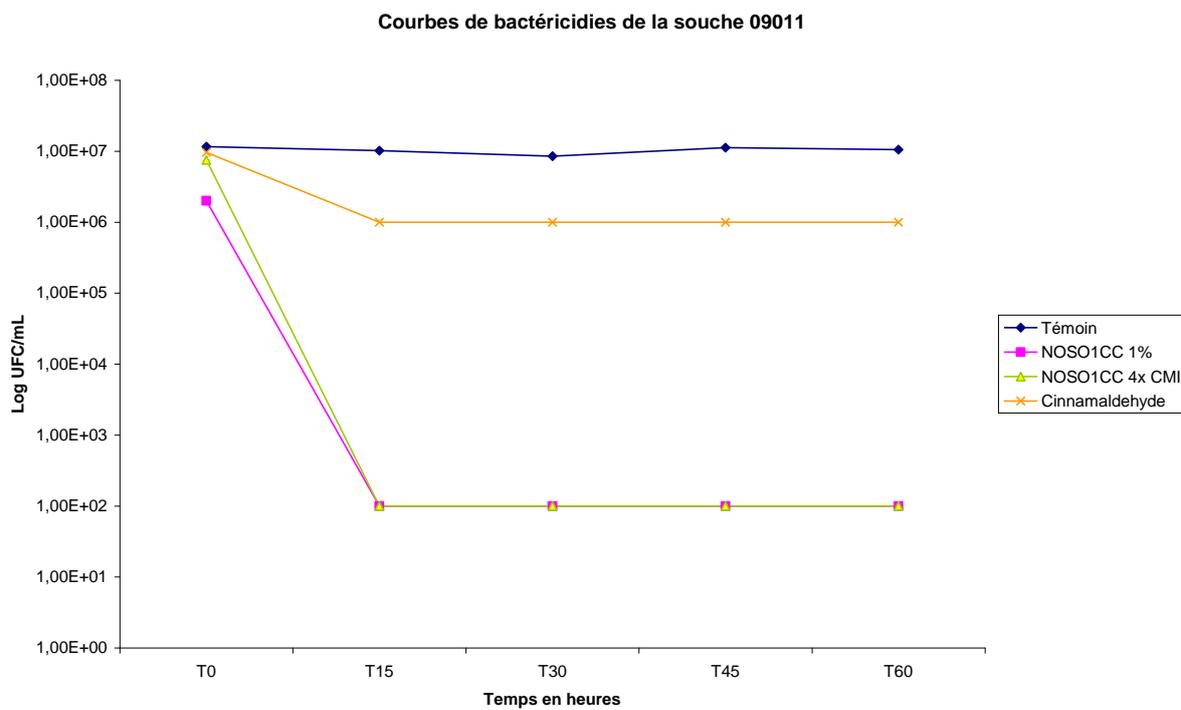
	témoïn	Noso1cc 4*	Cinnamaldéhyde	Mélange 1%
T0	2,90E+05	3,20E+05	2,60E+05	7,00E+04
T15	3,20E+05	1,76E+05	2,48E+05	1,00E+02
T30	2,10E+05	1,72E+05	1,74E+05	1,00E+02
T45	3,10E+05	1,52E+05	1,30E+05	1,00E+02
T60	1,90E+05	1,07E+05	1,41E+05	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche 09008



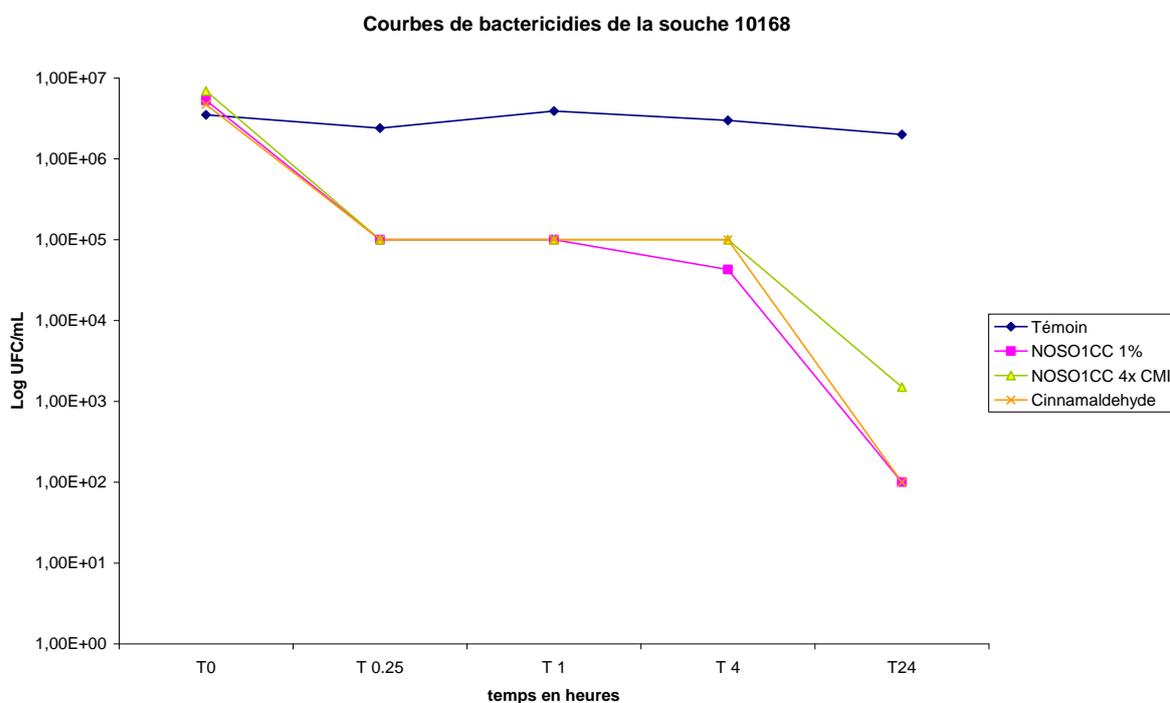
Souche 09011

	Témoïn	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	1,16E+07	2,00E+06	7,50E+06	9,60E+06
T15	1,02E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+06
T30	8,50E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+06
T45	1,12E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+06
T60	1,05E+07	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+06



Souche 10168

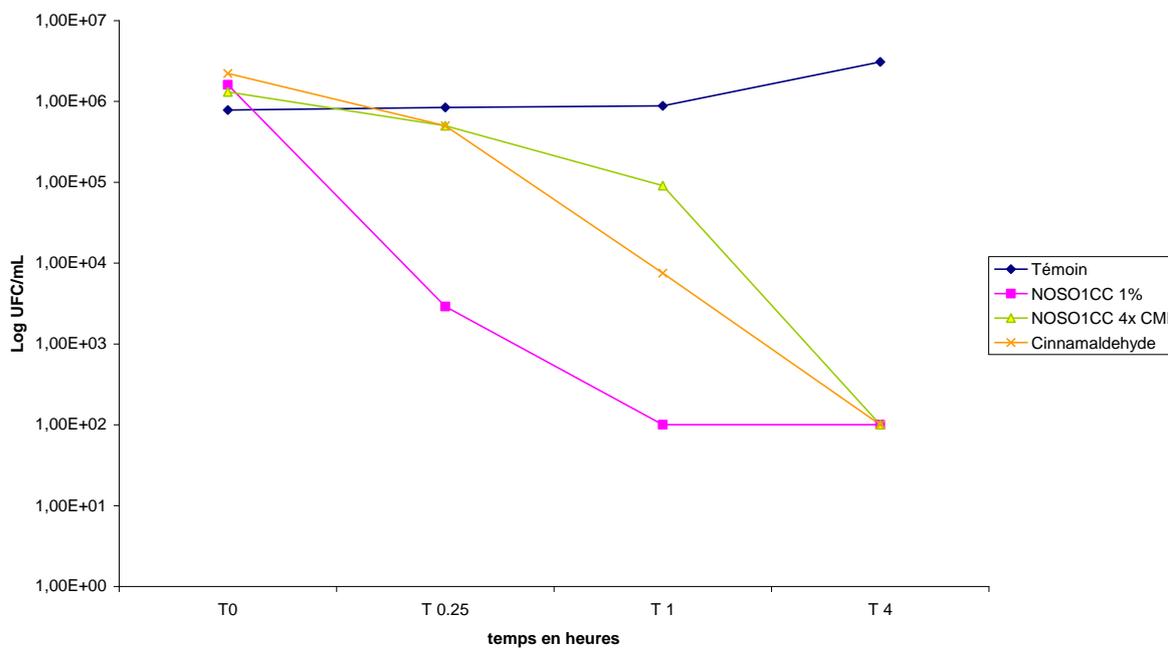
	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	3,50E+06	5,30E+06	6,90E+06	4,70E+06
T 0.25	2,40E+06	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05
T 1	3,90E+06	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05
T 4	3,00E+06	4,26E+04	1,00E+05	1,00E+05
T24	2,00E+06	1,00E+02	1,50E+03	1,00E+02



Souche 10267

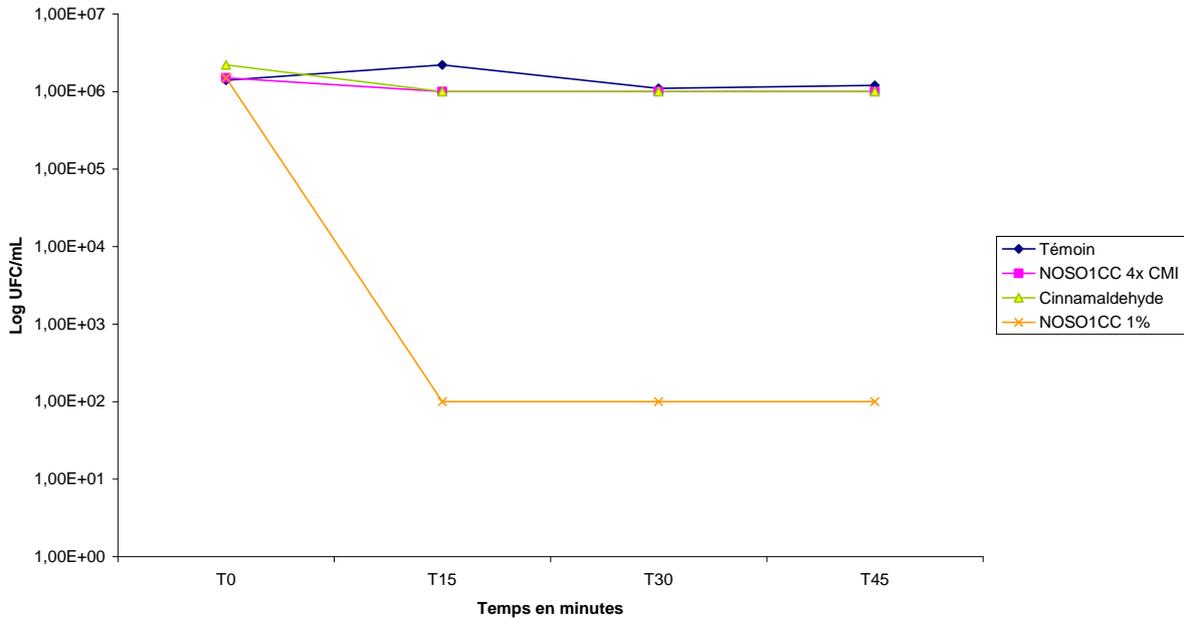
	Témoin	NOSO1CC 1%	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde
T0	7,80E+05	1,60E+06	1,31E+06	2,21E+06
T 0.25	8,40E+05	2,90E+03	5,00E+05	5,00E+05
T 1	8,80E+05	1,00E+02	9,10E+04	7,50E+03
T 4	3,08E+06	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02

Courbes de bactericidies de la souche 10267



	Témoin	NOSO1CC 4x CMI	Cinnamaldéhyde	NOSO1CC 1%
T0	1,40E+06	1,50E+06	2,20E+06	1,50E+06
T15	2,20E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+02
T30	1,10E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+02
T45	1,20E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+02
T60	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+02

Courbes de bactéricidies de la souche ATCC 25922



Pas de mutants

Annexe 8 : CMI des composants de Nosolcc

Référence	Nom	Cinéole	Benzoate de benzyle	Trans méthoxy cinnamaldehyde	Béta caryophyllène	Acétate cinnamyle	Linalol	Aldehyde trans cinnamique
ATCC 25922	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8127	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,125
8128	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,06
8129	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,06
8130	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,125
8131	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,06
8132	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,125
8133	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,06
8134	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,06
8135	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,125
8136	<i>Pseudomonas</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,125
8137	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8138	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8141	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8142	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8150	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8151	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8154	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8155	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8156	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8157	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8143	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8146	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8147	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8148	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8149	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8237	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8238	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8239	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,25	0,015
8240	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8241	<i>Staphylococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8152	<i>Enterococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
8153	<i>Enterococcus</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	1	0,015
ATCC 27583	<i>PS aeruginosa</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,03
9001	<i>Enterococcus faecium</i>	>1	>1	>0,1	0,125	0,5	0,5	0,03
9002	<i>Enterococcus faecium</i>	>1	>1	>0,1	0,125	0,5	0,5	0,03
9003	<i>E.coli</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	0,5	0,06
9004	<i>Enterobacter aerogenes</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,06
9007	<i>PS aeruginosa</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,06
9008	<i>Ps aeruginosa</i>	>1	>1	>0,1	>1	>1	>1	0,015
9010	<i>A baumannii</i>	>1	>1	>0,1	>1	0,25	0,25	0,015
9011	<i>A baumannii</i>	>1	>1	>0,1	>1	0,5	0,25	0,015

Annexe 9 : Table de correspondance des unités présentées (g/L, mg/L, µM, M)

% (g/100 ml)	g/L	mg/L (µg/ml)	µM (µmol/L)	M (mol/L)
$1.32 \cdot 10^{-3}$	$1.32 \cdot 10^{-2}$	13.2	100	10^{-4}
2.64	26.4	26 400	$2 \cdot 10^5$	0,2
$1.65 \cdot 10^{-6}$	$1.65 \cdot 10^{-5}$	0.02	0.12	$1.25 \cdot 10^5$
$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	0.2	1.51	$1.515 \cdot 10^6$
$1.67 \cdot 10^{-3}$	$1.67 \cdot 10^{-2}$	16.7	126	$1.265 \cdot 10^8$
$4.36 \cdot 10^{-5}$	$4.36 \cdot 10^{-4}$	0.44	3.3	$3.3 \cdot 10^6$
$1.32 \cdot 10^{-4}$	$1.32 \cdot 10^{-3}$	1.32	10	$10 \cdot 10^6$
$4.36 \cdot 10^{-4}$	$4.36 \cdot 10^{-3}$	4.36	33	$3.3 \cdot 10^7$
0.03	0.30	300	$2.27 \cdot 10^3$	$2.27 \cdot 10^9$
$3.30 \cdot 10^{-4}$	$3.30 \cdot 10^{-3}$	3.3	25	$2.5 \cdot 10^7$
$3.30 \cdot 10^{-5}$	$3.30 \cdot 10^{-4}$	0.33	2.5	$2.5 \cdot 10^6$
$1.45 \cdot 10^{-3}$	$1.45 \cdot 10^{-2}$	14.5	110	$1.10 \cdot 10^8$

Table des illustrations : Figures

Figure 1 : Appareil de distillation des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau (11)	17
Figure 2 : Appareil de condensation répondant aux normes de la pharmacopée européenne (dimensions en millimètres) (7)	18
Figure 3 : Photo d'un appareil de Steers (par Séverine Mahieux)	20
Figure 4 : Exemple de boîtes de Petri partant en incubation : dans chaque boîte on retrouve une concentration donnée en huile essentielle qui varie selon les boîtes pour des souches à tester inoculées de manière identique dans toutes les boîtes.....	20
Figure 5 : Représentation d'une boîte de Petri avant puis après 24 heures d'incubation.....	21
Figure 6 : Dénombrement des bactéries selon le temps et selon la présence d'huile essentielle de cannelle dans le milieu	30
Figure 7 : Cinnamaldéhyde	34
Figure 8 : Trans-2-methoxycinnamaldéhyde	35
Figure 9 Cinnamyl acetate.....	35
Figure 10 : Linalol.....	36
Figure 11 : bêta-caryophyllène.....	37
Figure 12 : Cinéole.....	38
Figure 13 : Benzoate de benzyle	39
Figure 15 : Courbes de bactéricidies de la souche <i>E.coli</i> 08137. Noso1cc était utilisé à quatre fois la CMI et à 1%	42
Figure 16 : Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI sur des souches d' <i>E.coli</i>	43
Figure 17 : Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI sur des souches de <i>Pseudomonas</i>	43
Figure 18 : Pourcentage de bactéries vivantes après 60 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI sur des souches de <i>Staphylococcus</i>	44
Figure 19 : Pourcentage de bactéries vivantes après 240 minutes de contact avec Noso1cc à 4*CMI sur des souches d' <i>E.coli</i>	45
Figure 20 : Schéma du protocole utilisé pour observer l'effet de Noso1cc à concentration subinhibitrice.....	47
Figure 21 : Courbes de croissance de la souche <i>E.coli</i> 10269 après contact avec Noso1cc à des concentrations subinhibitrices	48
Figure 22 : Courbes de croissance de la souche <i>E.coli</i> 08154 après contact avec Noso1cc à des concentrations subinhibitrices –sur neuf heures-	49
Figure 23 : Courbes de croissance de la souche <i>E.coli</i> 08154 après contact avec Noso1cc à des concentrations subinhibitrices -sur vingt quatre heures-.....	49
Figure 24 : Courbes de croissance de la souche <i>P.aeruginosa</i> 09007 après contact avec Noso1cc à des concentrations subinhibitrices	50
Figure 25 : Courbes de croissance de la souche <i>S.aureus</i> 10168 après contact avec Noso1cc à des concentrations subinhibitrices.....	50
Figure 26 : Illustration de la dilution "au demi" de Noso1cc.....	51
Figure 27 : Illustration de l'obtention des trois boîtes de Petri différentes partant à l'incubateur	52
Figure 28 : Observation de l'évolution du nombre de bactéries restantes au bout de huit heures lors d'un contact avec Noso1cc à la CMI et à quatre fois la CMI sur la souche <i>E.faecium</i> 09002.....	53
Figure 29 : Observation de l'évolution du nombre de bactéries restantes au bout de sept heures lors d'un contact avec Noso1cc à la CMI et à quatre fois la CMI sur la souche <i>Clostridium perfringens</i> 11116	53

Figure 30 : Observation de l'évolution du nombre de bactéries restantes au bout de vingt et une heures lors d'un contact avec Noso1cc à la CMI et à quatre fois la CMI sur la souche <i>K.pneumoniae</i> OXA-48.....	54
Figure 31 : Observation de l'évolution du nombre de bactéries restantes au bout de neuf heures lors d'un contact avec Noso1cc à la CMI et à quatre fois la CMI sur la souche <i>Pseudomonas</i> 08129.....	54
Figure 32 : Illustration de l'étude de la détermination d'une nouvelle CMI "Noso1cc + antibiotique"	57
Figure 33 : Représentation des interactions amikacine-Noso1cc (A) et colistine-Noso1cc (B).	58
Figure 34 : Observation de la croissance bactérienne sur 24 heures après contact avec Noso1cc à 37°C et à 4°C.....	62
Figure 35 : Illustration d'une multiplication bactérienne(37).....	64
Figure 36 : Observation de <i>B.cereus</i> en microscopie à balayage après un contact avec du cinnamaldéhyde (0,03% à 37°C).....	65
Figure 37 : Photographies en microscopie électronique mettant en évidence l'inhibition de la polymérisation de la protéine FtsZ.....	65
Figure 38 : Observation en microscopie à fluorescence de l'effet du cinnamaldéhyde sur la formation de l'anneau Z.	66
Figure 39 : Mise en évidence de l'hydrolyse du GTP qui diminue avec la présence du cinnamaldéhyde.....	67
Figure 40 : Pourcentage d'activité des ATPases membranaires chez <i>E.coli</i> après incubation pendant 10 minutes à 30°C avec de l'eugénol, du cinnamaldéhyde ou du carvacrol	68
Figure 41 : Pourcentage d'activité des ATPases membranaires chez <i>L.monocytogenes</i> lors d'une incubation pendant 10 minutes à 30°C avec de l'eugénol, du cinnamaldéhyde ou du carvacrol	68
Figure 42 : Illustration de la paroi des bactéries Gram + et Gram – (40)	69
Figure 43 : Effet d'une décarboxylase	70
Figure 44 : AHL (acylhomosérinelactone).....	71
Figure 45 : Illustration du quorum sensing	71
Figure 46 : SBF et SCA selon la concentration d'huile essentielle de cannelle <i>Cinnamomum zeylanicum</i> sur une souche d' <i>E.Coli</i> ATCC 33456 (46).....	72
Figure 47 : Illustration du système Lux (45).....	73
Figure 48 : Effet du cinnamaldéhyde sur la croissance et la fluorescence spécifique d' <i>E.coli</i> 33456 pJBA89.....	74
Figure 49 : Effet du cinnamaldéhyde sur la croissance et la fluorescence spécifique d' <i>E.coli</i> 33456 PJBA113.....	75
Figure 50 : Structure de 3-oxo-C6-homoserine lactone	76
Figure 51 : Structure du cinnamaldéhyde	76
Figure 52 : Images de microscopie électronique à balayage d' <i>E.coli</i> O157:H7 (48)	77
Figure 53 : Images de microscopie électronique à balayage de <i>S.enterica</i> serovar Typhimurium(48).....	77
Figure 54 : Images de microscopie électronique à balayage de <i>S.aureus</i>	77
Figure 55 : Détermination de la dose létale 50.....	80
Figure 56 : Le pré-estomac d'un rat mâle témoin (52)	83
Figure 57 : Hyperplasie squameuse de l'épithélium du pré-estomac chez le rat mâle exposé à 0,82% de cinnamaldéhyde dans l'alimentation pendant 3 mois (52)	83
Figure 58 : Courbes de croissance des rats mâles et femelles ayant été exposés avec du <i>trans</i> -cinnamaldéhyde dans la nourriture pendant deux ans.....	84
Figure 59 : Courbes de croissance des souris mâles et femelles ayant été exposées avec du <i>trans</i> -cinnamaldéhyde dans la nourriture pendant deux ans	84
Figure 60 : Illustration d'un échange de segments de chromatides sœurs (57).....	90
Figure 61 : Illustration d'un échange de segments de chromatides sœurs (58).....	91

Figure 62: Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat.....	99
Figure 63 : Le Coenzyme A (60)	100
Figure 64 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat (51)	100
Figure 65 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat.....	101
Figure 66 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat.....	101
Figure 67 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat.....	102
Figure 68 : Métabolisation du cinnamaldéhyde chez le rat.....	103

Table des illustrations : Tableaux

Tableau 1 : Concentration en eugénol et en cinnamaldéhyde dans l'huile essentielle de <i>Cinnamomum verum</i> selon une extraction de la feuille ou de l'écorce.....	16
Tableau 2 : Répartition du nombre de souches inhibées selon la CMI et selon l'huile essentielle testée	21
Tableau 3 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) en % (v/v) des huiles essentielles de <i>Cinnamomum verum</i> selon la provenance : écorce ou feuille (12)	23
Tableau 4 : Concentration de quelques molécules dans l'huile essentielle de cannelle selon la variété du cannelier (7).....	25
Tableau 5 : Concentration sériques maximales observées après administration d'une dose d'antibiotique (16)	29
Tableau 6 : Dénombrement des bactéries selon le temps et selon la présence d'huile essentielle de cannelle.....	30
Tableau 7 : Concentration des différents composés de Noso1cc en comparaison avec la concentration contenue dans les huiles essentielles de deux différentes cannelles.....	33
Tableau 8 : Détermination des nouvelles CMI lors de l'association Noso1cc-Antibiotiques pour <i>K.pneumoniae</i> OXA-48	59
Tableau 9 : Valeurs du FIC Index des associations Noso1cc-Antibiotiques pour <i>K.pneumoniae</i> OXA-48.....	59
Tableau 10 : Analyse de la structure du biofilm d' <i>E.coli</i> (46)	72
Tableau 11 : Pourcentage d'acides gras insaturés et leur variation en réponse à un traitement avec des composés d'huiles essentielles. (48)	78
Tableau 12 : Photographie suite à l'observation d'un <i>E.coli</i> et d'un SARM en contact avec du cinnamaldéhyde ou de Noso1cc	79
Tableau 13 : Classification de la toxicité d'une substance selon la valeur de la DL50.....	81
Tableau 14: Incidences des lésions prolifératives dans le pré-estomac chez des souris ayant été exposées avec du <i>trans</i> -cinnamaldéhyde pendant deux ans.....	84
Tableau 15 : Résumé des études animales concernant la toxicité du cinnamaldéhyde administré par voie oculaire de l'article concerné (21)	87
Tableau 16 : Résumé des études sur l'Homme concernant la toxicité du cinnamaldéhyde administré par voie cutanée de l'article concerné (21)	94
Tableau 17 : Résumé des études sur l'Homme concernant la toxicité du cinnamaldéhyde administré par voie cutanée de l'article concerné (51)	94
Tableau 18: Résumé des études sur l'Homme concernant le potentiel allergisant du cinnamaldéhyde de l'étude concernée (21)	95
Tableau 19: Résumé des études sur l'Homme concernant le potentiel allergisant du cinnamaldéhyde de l'étude concernée(51).....	96
Tableau 20 : Métabolites retrouvés chez l'Homme après administration par voie orale de 0,7 mg/kg.....	99

BIBLIOGRAPHIE

1. Michel-Briand Y. Une histoire de la résistance aux antibiotiques: à propos de six bactéries. L'Harmattan; 2009.
2. Direct Lille. N°1334. 2010 Sep 14;10.
3. ANSM. Évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012. 2013 Juin.
4. OMS. La résistance aux antibiotiques [Internet]. [cited 2014 Feb 7]. Available from: <http://www.euro.who.int/fr/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/antibiotic-resistance>
5. Plan national 2011-2016 d'alerte sur les antibiotiques [Internet]. Available from: [http://ansm.sante.fr/Dossiers/Antibiotiques/Plan-national-d-alerte-sur-les-antibiotiques-Contribution-de-l-ANSM/\(offset\)/1](http://ansm.sante.fr/Dossiers/Antibiotiques/Plan-national-d-alerte-sur-les-antibiotiques-Contribution-de-l-ANSM/(offset)/1)
6. Robert P, Rey-Debove J, Rey A. Le Nouveau Petit Robert: Dictionnaire alphabétique et analogique de la langue française. Le Robert; 2009.
7. Pharmacopée européenne. 7th ed. 2013.
8. Baudoux D, Zhiri A. Les cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'école française. Vol. 2, Dermatologie. Luxembourg: Ed. Inspir; 2003.
9. Tung Y-T, Yen P-L, Lin C-Y, Chang S-T. Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*. 2010;48(10):1130–6.
10. Lefebvre P. Intérêts et risques des huiles essentielles □: mise au point à travers l'exemple de trois plantes couramment utilisées □: lavande, menthe poivrée. [Lille]: Université du droit et de la santé; 2009.
11. Goëb P. Aromathérapie pratique et familiale. I.A.P.M Publishing. 1998.
12. Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett Appl Microbiol*. 2008 Sep;47(3):167–73.
13. Pharmacopée française, Xe édition. ADRAPHARM; 1983.
14. Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (Drees). L'état de santé de la population en France - Suivi des objectifs annexés à la loi de santé publique - [Internet]. 2011. Available from: http://www.drees.sante.gouv.fr/IMG/pdf/esp2011_39_antibiotiques_obj30.pdf
15. Ferran A. Impact de l'administration précoce d'une fluoroquinolone sur l'éradication bactérienne et sur la sélection de résistances □: approche PK/PD in vitro et in vivo. 2009.
16. Gaudy C, Buxeraud J. Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. Paris: Elsevier; 2005.
17. Site de microbiologie médicale [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.microbe-edu.org/>
18. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris - Nord. Antiseptiques et désinfectants [Internet]. 2000. Available from: http://www.cclinparisnord.org/Guides/guide_desinfectant.pdf
19. Demande d'analyses selon la norme NF EN 1040 [Internet]. Available from: http://www.bas-rhin.fr/eCommunityDocuments/E34C4D98-631D-459B-AA4E-61C91D2F7BA0/2005/document_conseil-g%C3%A9n%C3%A9ral-bas-rhin-Demande-analyses-NF-EN-1040.pdf
20. Cinnamaldehyde [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.553117.html>
21. Cocchiara J, Letizia CS, Lalko J, Lapczynski A, Api AM. Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(6):867–923.
22. Monographie de la spécialité "TRUE TEST" dispositif transdermique [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=25830>
23. 4-Methoxycinnamaldehyde [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.556586.html>

24. Cinnamyl acetate [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4445319.html>
25. Linalol [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13849981.html>
26. Monographie de la spécialité □: "BIOGAZE COMPRESSE 9x12CM" [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=2405>
27. Monographie du linalol - substance active - [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SAC&id=5294>
28. l-Caryophyllene [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444848.html>
29. Eucalyptol [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2656.html>
30. Spécialités contenant du cinéole [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: http://www.theriaque.org/apps/recherche/rch_datagrid_iframe.php?noprec=1&critere=SIMPLE_M&type=SP_SAC&search=3258&id_page=5&page=1&typeIndic=undefined&mode=IMPRIMER
31. Monographie de l'eucalyptol -substance active- [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SAC&id=3258>
32. Benzyl benzoate [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13856959.html>
33. Monographie de la spécialité □: "ASCABIOL" [Internet]. [cited 2013 May 26]. Available from: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=4571>
34. F. VAN BAMBEKE, D. TYTECA, Y. OUADRHIRI et P.M. TULKENS. Optimisation des traitements antibactériens sur base de propriétés pharmacodynamiques des antibiotiques. *LOUVAIN MED.* 1999;118:43–63.
35. Méthodes d'études des antibiotiques [Internet]. Available from: <http://ticem.sante.univ-nantes.fr/ressources/120.pdf>
36. J.A. Kwon, C.B. Yu and H.D. Park. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology.* 2003;(37):61–5.
37. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiologie.* De Boeck Supérieur; 2003.
38. Domadia P, Swarup S, Bhunia A, Sivaraman J, Dasgupta D. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology.* 2007 Sep;74(6):831–40.
39. Gill AO, Holley RA. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology.* 2006 Apr;108(1):1–9.
40. Robert D, Vian B. *Éléments de biologie cellulaire.* Wolters Kluwer France; 2004.
41. Usta J, Kreydiyyeh S, Barnabe P, Bou-Moughlabay Y, Nakkash-Chmaisse H. Comparative study on the effect of cinnamon and clove extracts and their main components on different types of ATPases. *Hum Exp Toxicol.* 2003 Jul;22(7):355–62.
42. Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology.* 2006 Sep;111(2):170–4.
43. Ilkka M, Helander *, † Hanna-Leena Alakomi, † Kyo`sti Latva-Kala, † Tiina Mattila-Sandholm, † Irene Pol, ‡ Eddy J. Smid, ‡ Leon G. M. Gorris, ‡, § and Atte von Wright†. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J Agric Food Chem.* 1998;(46):3590–5.
44. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of *Enterobacter aerogenes* by Active Components in Spices. *Journal of Food Protection.* 1995;58(3):280–3.
45. Branger A, Richer M-M, Roustel S. *Microbiochimie et alimentation.* Educagri Editions; 2007.
46. Niu C, Gilbert ES. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. *Applied and Environmental Microbiology.* 2004 Dec 1;70(12):6951–6.

47. Niu C, Afre S, Gilbert ES. Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology*. 2006 Nov;43(5):489–94.
48. Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(12):4863–70.
49. Claverie I, Hedde H. *Pharmacologie générale - Toxicologie: Mécanismes fondamentaux*. Wolters Kluwer France; 2008.
50. Derelanko MJ, Hollinger MA. *Handbook of Toxicology*. CRC Press; 2002.
51. Bickers D, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients: The RIFM expert panel. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(6):799–836.
52. Hooth MJ, Sills RC, Burka LT, Haseman JK, Witt KL, Orzech DP, et al. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated trans-cinnamaldehyde in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2004;42(11):1757–68.
53. OECD. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques Quinzième addendum - 2004: Quinzième addendum - 2004. OECD Publishing; 2004.
54. *Progrès en dermato-allergologie: Paris [sic] 2008*. John Libbey Eurotext; 2008.
55. Raison-Peyron N. *Progrès en Dermato-Allergologie: Montpellier 2011*. John Libbey Eurotext; 2011.
56. Viala A, Botta A. *Toxicologie*. Paris; Cachan: Tec & Doc; Éd. médicales internationales; 2005.
57. Mader SS. *Biologie humaine*. De Boeck Supérieur; 2010.
58. Karp G. *Biologie cellulaire et moléculaire*. De Boeck Supérieur; 2004.
59. *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Supérieur; 1997.
60. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Supérieur; 2005.
61. Mouly S, Delcey V, Diemer M, Bergmann J-F. Évaluation de l'efficacité d'un médicament : de la découverte à la mise sur le marché. *Journal Français d'Ophtalmologie*. 2008;31(1):75–9.
62. Robert J-A, Regniault A. *Médicaments: les règles du jeu*. Cachan : Éditions médicales internationales; Lavoisier; 2010.
63. Guillon J-M. Place et rôle de la pharmacologie de sécurité dans le développement des médicaments. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2010;68(5):291–300.
64. European Medicines Agency. Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections [Internet]. 2012. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003417.pdf
65. Dhanani A, Pellanne I, Morgensztejn N, Abadie E. L'Europe des médicaments : Modalités d'enregistrement et cas particulier des antibiotiques. *Antibiotiques*. 2009 Feb;11(1):3–10.

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2013/2014

Nom : Chemam
Prénom : Vanessa

Titre de la thèse : Un nouveau produit d'origine naturelle à activité antibactérienne à spectre large

Mots-clés : bactériologie, huile essentielle, cannelle, recherche, antibiotique

Résumé :

Ce travail a suivi de façon chronologique la façon d'aboutir à un « candidat médicament » dont les propriétés sont antibactériennes. Le laboratoire de la Faculté de Pharmacie de Lille 2 a démarré ses recherches en consultant la bibliographie puis en testant des huiles essentielles réputées antibiotiques pour enfin aboutir à un mélange de principes actifs.

Ce mélange a été testé pour apprécier son efficacité sur différentes souches bactériennes. Il en est ressorti une très grande efficacité sur toutes les souches testées puisqu'aucune n'a résisté à ce mélange. Le mécanisme d'action n'a pas été pas clairement établi mais la cible pourrait être une protéine présente dans toutes les bactéries au moment de la multiplication. Cette protéine aurait l'avantage de ne pas se trouver dans les cellules eucaryotes. D'autres recherches – telles que la cinétique d'action, le potentiel associatif avec d'autres antibiotiques ou encore l'apparition de souches mutantes résistantes – ont été effectuées en vue de répondre à des questions pratiques lors d'une future éventuelle mise sur le marché.

Membres du jury :

Président : Neut Christel, Maître de Conférences Universitaire, Lille II

Assesseur(s) : Rivière Céline, Maître de Conférences Universitaire, Lille II

Membre(s) extérieur(s) : Tesse Nicolas, Docteur en Pharmacie