

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE DE CADE SUR QUELQUES SOUCHES DE STAPHYLOCOQUES: APPLICATION SUR DES EAUX USEES TRAITES PAR LAGUNAGE AERE

HADJI Warda¹ et MESSAITFA Amar²

⁽¹⁾*Departement de Génie des Procédés, Faculté des Sciences appliquées,
Laboratoire de Génie de l'eau et de l'environnement en milieu saharien
Université Kasdi Merbah Ouargla, 30000 Ouargla, Algerie*

⁽²⁾*Laboratoire de Génie de l'eau et de l'environnement en milieu saharien
Université Kasdi Merbah Ouargla, 30 000 Ouargla, Algérie*

E-mail: warda.hadji@yahoo.fr

(Received 17 November 2019 - Accepted 22 December 2019)

Résumé. - L'huile de cade est obtenue après distillation par pyrogénéation de *Juniperus oxycedrus*. Elle est utilisée traditionnelle pour parfumer les eaux de consommation dans le sud algérien. Elle enduit en général le fond des jarres à eau, les cruches et l'intérieur des guerba, sans compréhension de la raison de cette rituelle traditionnelle. La présente étude vise à explorer la propriété antibactérienne de cette huile sur des eaux usées traitées de la station d'épuration par lagunage aéré de la ville de Ouargla (Algérie). Au vu des résultats, il apparaît que l'huile de cade a un pouvoir bactéricide notable sur les souches du genre staphylocoques testées (zones d'inhibition allant de 20.84 mm à 32.51 mm). L'addition de cette huile à un échantillon d'eau usée traitée par lagunage aérée, provoque une diminution de 97% du taux des souches de staphylocoques après 24 heures.

Mots-clés: Huile de cade, *J. oxycedrus*, *Staphylocoques*, *S. aureus*, inhibition, eaux, désinfectant.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CADE OIL ON SOME STAPHYLOCOCCUS STRAINS: APPLICATION TO THE WASTEWATER TREATED BY AERIAL LAGUNAGE

Abstract. - Cade oil is obtained after pyrogenation distillation of *Juniperus oxycedrus*. It is traditionally used to perfume drinking water in southern Algeria. It usually coats the bottom of water jars, jugs and the inside of guerba, without understanding the reason for this traditional ritual. The present study aims to explore the antibacterial property of this oil on treated wastewater from the aerated lagoon treatment plant in the city of Ouargla (Algeria). In view of the results, it appears that cade oil has a notable bactericidal power on the strains of the staphylococcus genus tested (zones of inhibition ranging from 20.84 mm to 32.51 mm). The addition of this oil to a sample of wastewater treated by aerated lagooning causes a 97% decrease in the level of staphylococcal strains after 24 hours.

Key words: Cade oil, *J. oxycedrus*, *Staphylococci*, *S. aureus*, inhibition, waters, disinfection.

Introduction

Juniperus oxycedrus est une essence résineuse méditerranéenne très répandue en Afrique du nord. Il occupe avec d'autres essences principales, 135.000 hectares. Il s'étend sur une superficie de 112.000 ha, depuis les dunes littorales jusqu'aux limites du grand Sahara [1-3], soit sous la forme d'un arbre de 10 m de hauteur avec un tronc de 1m de diamètre, soit plus souvent sous la forme d'un arbuste buissonnant plus petit [4]. C'est une espèce très commune dans le sous-bois et les zones dégradées des régions semi-arides mais s'adapte bien à l'étage subhumide du moyen Atlas, plutôt sur calcaire ou sur sols acides,

mais il supporte les sols siliceux. Il se retrouve en Algérie, en France, en Tunisie et au Maroc [5]. Le bois de genévrier donne par distillation sèche de goudron antiseptique (huile de cade).

L'huile de cade ou goudron de cade, est une huile végétale extraite par la pyrogénéation (distillation sèche) du bois d'un conifère de *J. oxycedrus* [6].

L'usage de cette huile remonte à fort longtemps. Elle est utilisée dans divers domaines (médecine, pharmacie, et cosmétique) [7]. Dans des prescriptions pharaoniques, l'huile de cade est mentionnée comme une recette thérapeutique pour calmer les douleurs articulaires, traiter les rhumatismes, soigner les brûlures locales, traiter les maladies cardiaques, l'épilepsie, l'inflammation des voies urinaires, contre les douleurs dentaires, thoraciques et contre la toux [1]. Elle traite également les maux d'estomac, cicatrice les plaies, coagule le sang et soigne les piqûres d'insectes [8]. Le goudron de genévrier renferme cadinène, crésol et guaiacol [9]. Dans de nombreuses régions du sud Algérien, l'huile de cade (*El Gatrane*) a de tout temps été utilisée d'une manière empirique dans le traitement des eaux de consommation. Face à ce constat, le présent travail est l'étude de l'activité antibactérienne de cette huile sur quatre souches de *Staphylococcus*, et déterminer son pouvoir désinfectant, pour une éventuelle réutilisation des eaux usées, en agriculture ou en industrie.

1.- Matériel et méthodes

1.1.- Matériel

1.1.1.- Matériel végétal

Les rameaux de *J. oxycedrus* ayant servi pour la production d'huile de cade, ont été collectés en Octobre 2018 dans la forêt de Sénalba Chergui à Djelfa (Algérie). Ils ont été séchés à la température ambiante à l'ombre durant 15 jours.

1.1.2.- Eaux usées

Pour tester l'efficacité et l'effet désinfectant de l'huile de cade, il est utilisé des eaux usées traitées de la station d'épuration par lagunage aéré de la ville de Ouargla (Algérie).

1.1.3.- Souches microbiennes

Pour la présente étude, des souches bactériennes pathogènes du genre *Staphylococcus*, sont choisies. Ce choix est orienté par leur pathogénicité et leur implication fréquente dans la contamination environnementale. Il s'agit de quatre souches dont *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, et *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp. S. aureus*, *Staphylococcus sp* proviennent du milieu hospitalier de Mohamed Boudiaf de Ouargla (Algérie) à partir de prélèvements sur des malades. Les souches sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance.

1.2.- Méthodes

1.2.1.- Extraction de l'huile de cade

L'extraction de l'huile de cade est effectuée par la méthode de distillation sèche (la pyrogénéation). Les branches du conifère sont entassées dans une grande fosse en guise de four. L'ensemble est alors soumis à une ignition. Les vapeurs qui s'en échappent sont recueillies et liquéfiées après refroidissement. Après décantation, 3 phases non miscibles apparaissent: un surnageant de couleur brun-rougeâtre (très fluide avec une odeur empyreumatique), une couche intermédiaire de couleur noire constituée d'un mélange d'huile et d'eau, et une substance dense de couleur brun-noire très prononcée, constituant le matériel d'étude «goudron de cade».

1.2.2.- Activité antibactérienne

Pour ensemercer une culture bactérienne de concentration d'environ 10^6 UFC/ml est utilisée. Elle est préparée à partir d'une pré-culture de 18 heures. Le milieu de culture est de la gélose Mueller Hinton (MHA). Les tests sont effectués trois fois, avec de l'huile de cade pure. L'incubation est 37°C pendant 24 h. Il est à rappeler que la lecture s'effectue toujours en comparaison avec une boîte témoin ne contenant que le milieu de culture et le germe à tester. Il est utilisé comme témoin positif de l'hypochlorite de sodium.

1.2.2.1.- Méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile de cade de *J. oxycedrus* a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé [13]. C'est une technique de distribution du produits à tester à partir d'un disque en papier filtre Wattman N°4 (6 mm de diamètre), pour estimer qualitativement l'action antimicrobienne [14]. Il est utilisé 10 μl d'huile de cade par disque.

La sensibilité à l'huiles de cade est fonction du diamètre des zones d'inhibition, avec non sensible (-) pour un diamètre moins sensible de 6 mm; sensible (+) pour un diamètre entre 9-14 mm; très sensible (++) pour un diamètre entre 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour plus de 20 mm de diamètre [17].

1.2.2.2.- Méthode de diffusion en puits

La méthode de diffusion en puits, assure une diffusion radiale de l'huile à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. Elle consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'huile de cade (10 μl). L'huile essentielle diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne [15].

1.2.2.3.- Méthode de micro-atmosphère

La méthode de micro-atmosphère consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boites de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile de cade qui est placé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation. Celle-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile en s'évaporant dans l'atmosphère de la boîte, exerce son effet inhibiteur

sur les microorganismes testés [16].

1.2.3.- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée sur milieu gélosé (Mueller-Hinton) [18]. Des dilutions allant de 0,97 µl/ml à 500 µl/ml d'huile de cade, sont testées. Pour la formulation des concentrations, l'huile de cade est diluée dans du Tween 80 (Emulsifiant/huile de cade) puis incorporée (10 µl) sur des disques préalablement stérilisés, de 6 mm de diamètre. La suspension bactérienne test est standardisée à 10⁶ UFC/ml. L'incubation s'effectue à 37 °C pendant 24H [19]. La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé a été choisie pour sa simplicité.

2.2.4. Etude du pouvoir désinfectant de l'huile de cade

La recherche du pouvoir désinfectant de l'huile de cade est effectuée sur les eaux usées traitées par le lagunage aéré de la station de la ville de Ouargla (Algérie). C'est un suivi de la cinétique de développement par dénombrement, des souches microbiennes sur milieu Chapman [20], en fonction des concentrations d'huile de cade, comprises entre 1ml/l et 12ml/l.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) adoptée pour étudier la cinétique de développement du genre *Staphylococcus* présent dans les eaux usées traitées par le lagunage aéré sera celle obtenue pour la souche bactérienne qui affichera une CMI moyenne d'huile de cade. Il est multiplié la valeur CMI retenue, par un coefficient de 4 comme le préconise BURT (2004) [21]. Les prélèvements sont effectués toutes les 72 heures, pendant 10 jours de réaction.

2.- Résultats et discussion

L'huile de cade semble inhiber même à faible concentration, la croissance de toutes les souches de *Staphylococcus* ciblées. Les plus grands diamètres d'inhibition (32.51±0.71mm, 29.26±0.66 mm) ont été enregistrés avec *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et les plus petits diamètres (20.84 ±0.82mm, 25.91±0.33mm) avec *Staphylococcus sp*, par la méthode de diffusion sur disque et la méthode de puits respectivement. Cette huile semble donc extrêmement sensible contre les souches bactériennes ciblées puisque les diamètres d'inhibition sont supérieurs à 20 mm [17]. Il apparaît que la méthode de micro-atmosphère n'est pas efficace en comparaison avec les méthodes de diffusion sur disque et de diffusion en puits. Ces deux dernières donnent des résultats très significatifs sur les souches étudiées (tab. I).

Tableau I.- Activité antibactérienne de l'huile de cade de *J. oxycedrus* selon différentes méthodes

Souches	Diamètre d'inhibition (mm)					
	Méthode de disque		Méthode de puits		Méthode de micro-atmosphère	
	Huile de cade	Hypochlorite de sodium	Huile de cade	Hypochlorite de sodium	Huile de cade	Hypochlorite de sodium
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	32.51±0.71	32.83±0.96	29.26±0.66	54.55±0.98	06.00	59.03±0.89
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	31.15±0.93	33.55±0.82	29.25±0.23	54.34 ±0.78	06.00	60.22±0.86

<i>S. aureus</i>	25.33±0.54	30.21±0.71	27.04±0.19	41.36±0.71	06.00	46.01±0.73
<i>S. sp</i>	20.84±0.82	28.05±0.45	25.91±0.33	50.21±0.72	06.00	50.54±0.33

La CMI de l'huile de cade varie de 3.90 µl /ml pour les espèces *S. aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* ATCC 43300 à 15.62 µl/ml pour l'espèce d'origine hospitalière (*Staphylococcus sp*). Comparativement à l'hypochlorite de sodium qui affiche une CMI de 1.95 µl/ml pour *S. aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* 43300 et 3.90 µl /ml pour *Staphylococcus sp* et *S. aureus*, l'huile de cade a des effets plus faible. Toutefois, il est remarqué que les CMI de l'huile de cade pour les espèces référencées, sont proches de celles obtenues avec l'hypochlorite de sodium pour les souches d'origine hospitalière (tab. II).

Tableau II.- Valeurs des CMI (µl/ml) de l'huile de cade et de l'hypochlorite de sodium par méthode de disque

Souches	CMI de l'huile de cade (µl /ml)	CMI de l'hypochlorite de sodium (µl /ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	03.90	1.95
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	03.90	1.95
<i>S. aureus</i>	07.81	3.90
<i>Staphylococcus sp</i>	15.62	3.90

D'après la figure I, la concentration qui provoque l'élimination des staphylocoques (4 ml/l) correspond presque à la concentration minimale inhibitrice (CMI) obtenue pour *S. aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* ATCC 43300.

En se basant sur les résultats obtenus "in vitro", en présence de l'huile de cade (tab. II), il est possible de suivre la cinétique de développement du genre staphylocoque présent dans les eaux usées traitées par le lagunage aéré (fig. II). Les concentrations utilisées d'huile de cade correspondent à la CMI obtenue avec *S aureus*, soit 7,81 µl/ml, et à sa valeur corrigée par le coefficient 4, soit 31.25 µl/ml [21].

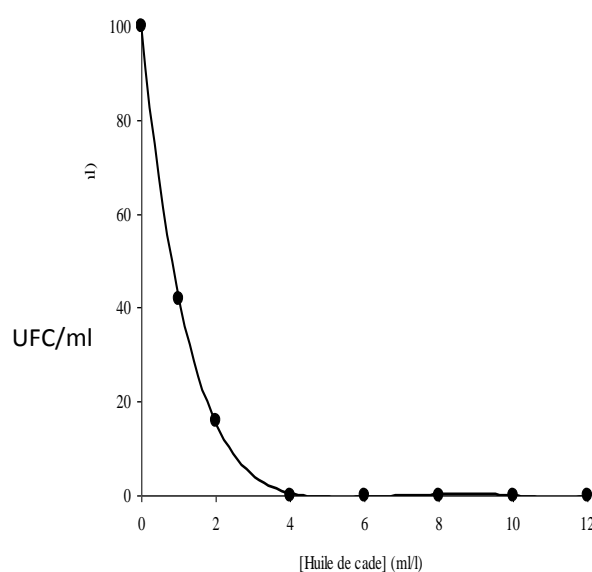


Figure 1.- Evolution de la biomasse des souches investies en fonction de la concentration en huile de cade

Les résultats des expériences effectuées sur une eau usée traitée, montrent que 97% des Staphylocoque étaient détruits en une journée de réaction (de 60 à 2 ufc/ml) lorsque la concentration en huile de cade est égale à la valeur CMI (7.81 µl/ml), et que leur disparition totale (100%) est obtenue avec une concentration égale 4 x CMI.

Par ailleurs, l'analyse de l'effet de la concentration de l'huile de cade sur l'évolution de la concentration des Staphylocoque, montre que la concentration des Staphylocoque diminue exponentiellement quelle que soit la concentration de l'huile de cade (fig. II).

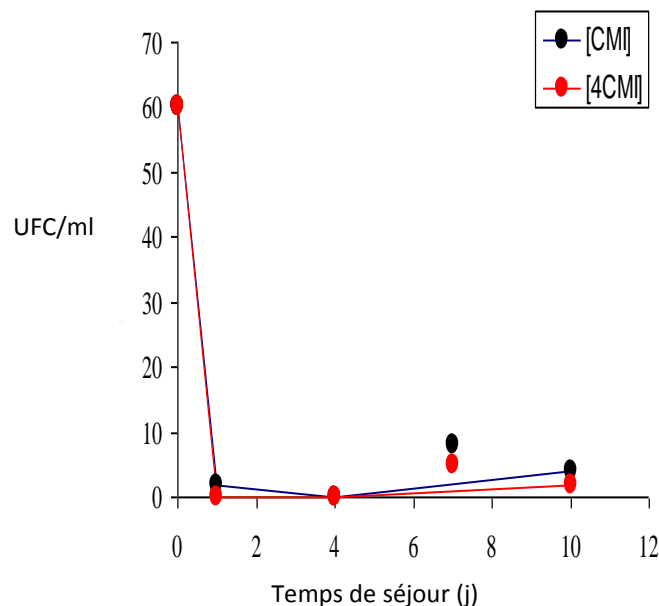


Figure 2.- Effet inhibiteur de l'huile de cade, à différentes concentrations sur les souches investies

Conclusion

L'huile de cade a un effet antibactérien appréciable sur les souches de staphylocoque testées. Elle diminue la concentration de la biomasse microbienne à 97%, pendant 24 heures de réaction, dans les eaux usées traitées par lagunage aérée.

Références bibliographiques

- [1].- Boudy P. 1950.- Guide du forestier en Afrique du Nord. Éd. La Maison rustique. Paris, vol 1: 105-122.
- [2].- Maire R., 1952.- Flore de l'Afrique du Nord. Encyclopédie biologique. Vol 1. Éd. Paul Le Chevalier, Paris, Pp 94-114.
- [3].- Quézel P. et SANTA S., 1962.- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol 2. Éd. CNRS, Paris, Pp 323-384
- [4].- Hafsi Z., Belhadj S., Derridj A., Mevy J-P., Notonier R., Tonetto A., Gauquelin T., , 2017.- Étude de la variabilité morphologique (aiguilles, galbules) du complexe

- spécifique *Juniperus oxycedrus* L., le Genévrier oxycède, au sein de sept populations d'Algérie, *Revue d'Ecologie*, 72 (4): 353-373.
- [5].- Hassan K., 2002.- Glossaire des herbes et des plantes médicinales. Éd. Dar livres scientifiques, Beyrouth le Liban, Pp 34-88.
- [6] Cheriti A., Rouissat. A, Sekkoum. K et Balansard. G, 1995.- Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région de El Bayadh (Algérie). *Fitoterapia*, 66(6) : 525.
- [7].- Moreno L., Bello R., Beltran B., 1998.- Calatayud S. Primo Yufera E. and Esplugues J; Pharmacological screening of different *Juniperus oxycedrus* L. extracts. *Pharmacology and Toxicology* ,82 : 108-112.
- [8].- Ashour Abdul Latif, 1992.- Médecin à base de plantes naturelles: Herbal et plantes. Dar Al-Huda, Aine Melilla, l'Algérie, p : 94-102.
- [9].- Al-Snafi A. E., 2016.- Medicinal plants with anticancer effects, plant based review. *Sch Acad J. Pharm.*, 5(5): 175-93.
- [10].- BEZANGER- BEAU QUESNE L., 1989.- Valeur médicinale des Flavonoïdes. *Actualités pharmaceutiques.*, 280: 70-74.
- [11].- Barrero A., Sanchez F., Oltra J., Altarejos J., Ferrol J. N. and Barragan A., 1991.- Oxygenated sesquiterpenes from the wood of *Juniperus oxycedrus*. *Phytochemistry*, 30 (5): 1551-1554.
- [12].- A.G.1-f."f.M., 1991.- Faut-il maintenir une désinfection résiduelle dans les réseaux de distribution d'eau? Synthèse des communications exposées au cours de la journée du 13 Juin 1991 à l'institut Pasteur de Lyon. Département d'hygiène appliquée à l'homme et à son environnement, 117 p.
- [13].- Julia A. Kiehlbauch, George E. Hannett, Max Salfinger, Wendy Archinal, Catherine Monserrat, and Cynthia Carlyn., 2000.- Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Guidelines for Disk Diffusion Susceptibility Testing in New York State Laboratories, *J Clin Microbiol*, 38(9): 3341–3348.
- [14].- Aouni M., Pelen F. and Soulimani R., 2013.- Etude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytotherapie*, 11 : 225-236.
- [15]. - Eymard S., 2003.- Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et la transformation chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de doctorat en génie des procédés, Nante, France, 58 p.
- [16].- Pibiri M. C., 2005.- Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne, Pp 20-26.
- [17].- Ponce A. G., Fritz R., del Valle C. E. et Roura S. I., 2003.- Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-*

Wissenschaft und -Technologie, 36: 679-684.

- [18].- Benabderrahmane M., Benali M., Aouissat H. and Bueso M.J.J., 2009.- Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf de l'Algérie. *Fitoterapia*,7: 304-308.
- [19].- Oussou K. R., Kanko C., Guessend N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., N'Guessan Y. T., Figueredo G., Chalcha J-C.; 2004.- Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. Académie des sciences, Elsevier SAS, 7(7) :1081–1086.
- [20].- Mann C. M. et Markham J. L.; 1998.- A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils; *Journal of Applied Microbiology*, (4):44-538.
- [21].- BURT S.A., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods. *International Journal of Food Microbiolog*, 94 (3), 22-25.