

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou
Faculté des sciences biologiques et agronomiques
Département biochimie-microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques

Option : **Microbiologie Appliquée**

Thème

LES HUILES ESSENTIELLES ET LEURS EFFETS SYNERGIQUES: LUTTE CONTRE LES BACTERIES MULTIRESISTANTES

Réalisé par :

BELOUNIS Yousra
SAOUDI Bilal

Encadré par: Mr. BARIZ. K

Composition du jury

Président: Pr. HOUALI. K

Professeur

Examineur: Mr. SEBBANE. H

Maitre assistant de classe (A)

Année universitaire : 2019/2020

REMERCIEMENT

Au terme de notre travail

Nous tenons avant tout à exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus profonds tout d'abord au bon Dieu éternel le plus puissant.

*On adresse notre profonde gratitude à notre enseignant Monsieur **Karim Bariz** pour avoir accepté de nous encadrer. On vous remercie vivement pour votre aide précieuse, vos conseils éclairés, tout au long de ce travail et pour la qualité de votre encadrement si sérieux. C'était vraiment un grand plaisir de travailler avec vous.*

On adresse nos vifs remerciements à Mr HOUALI. K professeur à l'université de MOULOUD MAMMERI. Vous nous faites le grand honneur d'avoir accepté de présider ce jury.

On adresse nos sincères remerciements à Mr SEBBANE. H, maitre assistant classe (A) à l'université de MOULOUD MAMMERI. On vous remercie de nous honorer par votre présence en tant que examinateur et pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

A nos familles et nos amis qui nous ont soutenue, encourager, de près ou de loin et qui ont cru en nous.

Cher parents, merci de nous avoir élevé, éduqué, soutenus et sacrifié tous pour notre bien.

Enfin on remercie tous nos enseignants qui ont contribué à notre éducation et formation, et qui ont tout donné pour transmettre leurs savoirs et sans eux, nous ne serions pas là aujourd'hui.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 12

Chapitre 01 : La résistance aux antibiotiques

I- Les antibiotiques..... 15

I.1- Définition et caractéristiques 15

I.2- Historique..... 15

I.3- Classification des antibiotiques..... 16

I.4- Les mécanismes d'action des antibiotiques 19

II- La résistance bactérienne 22

II.1- Définition de la résistance aux antibiotiques..... 22

II.2- Historique 22

II.3- Les modes de résistance aux antibiotiques..... 23

II.3.1- La résistance naturelle (intrinsèque) 23

II.3.2- La résistance acquise..... 23

II.3.2.1- La résistance mutationnelle..... 24

II.3.2.2- La résistance acquise par transfert horizontal des gènes (THG)..... 24

II.4- Les mécanismes de la résistance bactérienne..... 28

II.4.1- Modification de l'antibiotique 28

II.4.1.1- Dégradation de l'antibiotique..... 28

II.4.1.2- Modification enzymatique de la structure de l'antibiotique.....29

II.4.2- Diminution de la pénétration et de l'efflux d'antibiotiques.....30

II.4.2.1- Diminution de perméabilité 30

II.4.2.2- Les Pompes à efflux 31

II.4.3- Changements dans la cible de l'antibiotique..... 32

II.4.3.1- Protection de la cible..... 32

II.4.3.2- Modification de la cible 32

A- Mutation de la cible 32

B- Modification enzymatique de la cible..... 33

C- Remplacement complet ou contournement de la cible33

II.5-	Les origines et l'évolution de la résistance	33
II.6-	Les bactéries multirésistantes	35

Chapitre 02: Les huiles essentielles (HEs)

1	Généralités et définition	39
2	Historique	41
3	Caractéristiques des huiles essentielles	42
3.1	Propriétés physiques	42
3.2	Composition chimique.....	43
3.2.1	Les terpènes et les terpénoïdes	44
3.2.2	Les composés aromatiques (phénylpropènes).....	44
4	Techniques d'extraction des huiles essentielles	46
4.1	Méthodes conventionnelles (classiques)	46
4.1.1	L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur	46
4.1.2	Extraction par solvant.....	47
4.1.3	Expression à froid.....	48
4.2	Méthodes innovantes	48
4.2.1	Extraction par fluide à l'état supercritique	48
4.2.2	L'extraction assistée par chauffage micro-ondes (MAE).....	49
4.2.3	L'extraction assistée par ultrasons (UAE).....	50
5	Les activités biologiques des huiles essentielles	50

Chapitre 03: Activité antibactérienne des HEs et leurs effets synergiques

I-	Activité antibactérienne des HEs seules	53
I.1-	L'activité antibactérienne des HEs et leurs composants	53
I.2-	Mécanismes d'action des huiles essentielles	55
I.3-	Facteurs influençant l'activité antibactérienne des HEs	57
I.4-	Sensibilité des bactéries aux huiles essentielles.....	58
I.5-	Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne des HEs.....	60
I.5.1-	Méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme).....	61
I.5.2-	Méthode de dilution.....	62
I.5.3-	Méthode de microatmosphère (non conventionnelle)	63
II-	Les combinaisons d'HEs dans la lutte contre la résistance bactérienne	64
II.1-	Définition et preuves sur l'existence des effets synergiques	66
II.2-	La « synergie » ; une stratégie naturelle pour combattre les infections	67

II.3- Méthode d'étude des interactions entre les agents antimicrobiens	68
II.3.1- Méthode d'échiquier (damier)	68
II.3.2- Méthode du Time-kill	71
II.4- Les effets synergiques des HEs contre les pathogènes et les bactéries multirésistantes	72
II.4.1- Synergie entre les composants des huiles essentielles	72
II.4.2- Synergie entre différentes huiles essentielles.....	74
II.4.3- Synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques	75
II.4.4- Synergie entre les constituants individuels des HEs et les antibiotiques.....	77
II.5- Mode d'action des effets synergiques	83
II.5.1- Action simultanée sur plusieurs voies ou cibles	83
II.5.2- Effets pharmacocinétiques ou physicochimiques	86
II.5.3- Inhibition des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries	86
Conclusion.....	89
Références bibliographiques.....	91

Abstract

With the increase in antibiotic-resistant bacteria and the lack of new antibiotics being brought onto the market, alternative strategies need to be found to cope with infections resulting from resistant and multi-drugs resistant bacteria. Essential oils (EOs) and their components possess an important antibacterial activity and so have been investigated for this propos. Nevertheless, the toxicity of EOs and the necessity of high concentration to eliminate target bacteria limit their individual uses. To overcome these limitations, the combination of EOs with each other or with conventional antibiotics is amongst the potential strategies proposed. Indeed, the efficacy of synergistic interactions between EOs and antibiotics has been reported in numerous studies, including several instances of antibiotic resensitization in resistant isolates, in support of this strategy to control antibiotic resistance. This work aims to review recent literature concerning the antibacterial activity of individual EOs and there synergistic interaction in combination, with consideration of their mechanisms of action, as potential solution to combat multi-drug resistant bacteria.

Résumé

Avec l'augmentation des bactéries résistantes aux antibiotiques et le manque de nouveaux antibiotiques mis sur le marché, des stratégies alternatives doivent être trouvées pour faire face aux infections résultant de bactéries résistantes et multi-résistantes. Les huiles essentielles (HEs) et grâce à leur activité antibactérienne connue, constitue l'une des sources les plus exploitées dans ce but. Toutefois, les fortes concentrations d'HEs requises pour éliminer les bactéries, ainsi que leur toxicité, limitent leur l'utilisation individuelle huiles. Afin de surmonter ces limitations, la combinaison des HEs entre elles ou avec des antibiotiques conventionnels, fait partie des stratégies potentielles qui ont été proposées. En effet, plusieurs études ont rapporté la présence de combinaisons synergiques efficaces entre les HEs, avec les antibiotiques, y compris des cas de resensibilisation des isolats résistants aux antibiotiques, ce qui confirme l'importance de cette stratégie dans le contrôle la résistance bactérienne. Ce travail vise ainsi, à revoir la littérature récente concernant l'activité antibactérienne des HEs seules et leurs effets synergiques en combinaison, toute en décrivant, les mécanismes d'action possibles, comme solution potentielle pour lutter contre les bactéries multi-résistantes.

Liste des abréviations

AAC: Aminoside N-acétyl transférase ;

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ANT: Aminoside nucléotidyl transférase.

APH: Aminoside Phospho transférase.

ARN: Acide ribonucléique.

ATCC: American Type Culture Collection.

BLSE: Bêta-lactamases à spectre étendu.

CASFM: Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute.

CMB: Concentration minimale bactéricide.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CPG-SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

DMSO: Sulfoxyde de diméthyle.

EGM: Eléments génétiques mobiles.

EMA: Enzymes modificatrices d'aminosides.

ERV: Entérocoques résistantes à la vancomycine.

FDA: Food and Drug Administration.

FIC: Concentration inhibitrice fractionnelle.

FICI: Indice de concentration inhibitrice fractionnelle.

HEs: Huiles essentielles.

HSV-1: Virus de l'herpès simplex de type 1.

ICE: Integrative and conjugative elements (Elément intégratif et conjugatif).

IL: Interleukine.

IMP: Imipenamase.

IPP: Isopentylpyrophosphate.

KPC: *Klebseilla pneumoniae* Carbapenamase.

LDPE: Low density polyethylene (polyéthylène à basse densité).

LPS: Lipopolysaccharide.

MAE: Microwave-assisted extraction (extraction assistée par chauffage micro-ondes).

MAHD: Microwave-assisted Hydro-distillation (l'hydrodistillation assistée par micro-ondes).

MDR: Multi-drug resistance (multirésistance aux médicaments).

MEB: Microscope électronique à balayage.

MHC: Méthoxyhydnocarpine.

NDM: New Delhi metallo- β -lactamase.

OMS: Organisation mondiale de la santé.

PLPou PBP : Protéine liant la pénicilline ou penicillin-binding proteine.

QMI: Quantité minimale inhibitrice.

RMN: Résonance magnétique nucléaire.

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

SFE: Extraction par fluide supercritique.

SFME: Solvant Free Microwave Extraction (extraction par micro-ondes sans solvants).

SOS: Save Our Souls (sauvez nos âmes).

STX: Shiga-toxin.

THG: Transfert horizontal des gènes.

TNF: Facteur de nécrose tumorale.

TTC: Chlorure de triphényltétrazolium.

UAE: Ultrasound-assisted extraction (L'extraction assistée par ultrasons).

UFC: Unité formant colonie.

UNEP-WCMC: United nation environment programme-World conservation monitoring center.

VHA: Virus de l'Hépatite A.

VIH: virus de l'immunodéficience humaine.

VIM: Verona integron-encoded metallo β -lactamase.

XDR : Extensively drug-resistance (bactéries extrêmement résistantes).

Liste des figures

Figure 01: Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique	16
Figure 02: Mode d'action des antibiotiques	21
Figure 03: Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries.....	27
Figure 04: L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme mécanismes de résistance.....	31
Figure 05: Structures chimiques de certains composants d'huile essentielles.....	45
Figure 06: Principe schématisé de l'extraction à l'entraînement à la vapeur et de l'hydrodistillation.....	46
Figure 07: Hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	49
Figure 08: La méthode isobole pour identifier la synergie.....	70
Figure 09: Micrographies électroniques à balayage de cellules d' <i>E. coli</i> non traitées (A) (G× 3000) et des cellules traitées avec la combinaison d'HE d'origan/basilic (B) (G × 20000).	84
Figure 10: Micrographies électroniques à balayage de cellules <i>S. aureus</i> non traitées (A) (G×100000) et des cellules traitées avec la combinaison d'HE de basilic/bergamote (B) (G× 50 000).	85
Figure 11: Micrographies électroniques à balayage de cellules de <i>B. subtilis</i> non traitées (A) (G×30000) et de cellules traitées avec les combinaisons d'huile d'origan/bergamote (B) (G × 50 000).	85
Figure 12: Mécanismes pouvant contribuer à une synergie entre les HEs et antibiotiques avec des exemples.....	87

Liste des tableaux

Tableau 01: Structure chimique de base des grandes familles d'antibiotiques.....	17
Tableau 02 : Les grandes familles d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action.....	19
Tableau 03: Composants majoritaires de certaines huiles essentielles.....	43
Tableau 04: Mécanismes d'actions antibactériens des HEs et leurs composants.....	55
Tableau 05: Combinaisons synergiques, antibiotique/HE et antibiotique/composant d'HEs, avec les réductions des CMI d'antibiotique qui en résulte.....	79

Introduction

Introduction Générale

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus efficaces qui ont été développés, pour le traitement des infections bactériennes, et depuis leur découverte au 20^{ème} siècle, ils ont considérablement réduit la menace posée par les maladies infectieuses (**Martinez, 2014**). Cependant, peu de temps après, l'utilisation excessive de ces produits a contribué à l'émergence de souches résistantes, ou encore même, multirésistantes (**Bougaard et Stobberigh, 2000; Chibane et al., 2019**). L'évolution continue de cette résistance dans le temps, a conduit à la diminution de l'efficacité des antibiotiques, et ce phénomène est devenu, désormais, un vrai problème mondial de santé publique. En effet, les bactéries multirésistantes provoquent au moins 700 000 morts chaque année, et d'ici 30 ans, elles devraient tuer environ 10 millions par an, dépassant ainsi, largement, les décès par le cancer (**O'Neill, 2014**). En 2017, l'organisation mondiale de la santé a, par conséquent, tiré la sonnette d'alarme en publiant une liste de bactéries contre lesquelles, il est urgent de trouver de nouveaux antibiotiques ou de nouvelles stratégies pour les traiter (**World Health Organization, 2017**).

Au cours des dernières décennies, il y'a eu un intérêt croissant pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens (**Boonyanugomol, 2017; Chaib et al., 2017**). Ainsi, de nouvelles sources, en particulier les composés antimicrobiens d'origines végétales, ont fait l'objet de recherches approfondies (**Hemaiswarya et al., 2008**). En fait, les plantes et leurs métabolites secondaires, sont connues comme l'origine de plusieurs molécules thérapeutiques, telle que, l'aspirine (produite à partir de la Reine-des-prés et le saule blanc) et la morphine (issue de l'opium du pavot) (**UNEP-WCMC, 2002**).

Les huiles essentielles de plantes, sont l'un des métabolites les plus importants, auxquels les chercheurs se sont intéressés. Celles-ci sont des mélanges naturels, complexes et volatils, synthétisés par plusieurs espèces de plantes. En fait, ces huiles sont connues pour plusieurs propriétés biologiques intéressantes (**Bakkali et al., 2008**), par conséquent, elles ont été utilisées depuis très longtemps. Ainsi, les anciens égyptiens, les employaient dans différents domaines, notamment, en cosmétique, en thérapie et dans leurs rituels religieux (**England, 1993**). Ensuite, leur application s'est propagée de plus en plus, au cours du temps, à travers le monde entier, et au début des années 2000, environ 3000 huiles essentielles ont été connues, dont 300 ont une importance commerciale, destinées principalement au marché des arômes et des parfums (**Burt, 2004**).

Introduction Générale

L'efficacité des huiles essentielles comme antimicrobiens, a été rapportée dans plusieurs études (**Kaloustian *et al.*, 2008; Sakkas et Papadopoulou, 2016, Braga paiano *et al.*, 2019**), indiquant ainsi, qu'elles peuvent servir d'outil puissant pour réduire les agents pathogènes et les bactéries multirésistantes (**Stefanakis *et al.*, 2014**). Par conséquent, l'intérêt des chercheurs pour ces huiles ne cesse de croître et plusieurs travaux sont menés dans ce domaine. De plus, certains de ces travaux ont testé, non seulement, l'activité des huiles seules, mais aussi, en combinaison avec d'autres huiles ou antibiotiques (**Ouedrhiri *et al.*, 2017; El Atki *et al.*, 2019**). Ces combinaisons, servent de stratégie qui vise à améliorer l'efficacité des médicaments antimicrobiens, tout en réduisant leurs concentrations (**Yap *et al.*, 2014**). Un tel effet résulte, principalement, d'un type d'interaction entre les différents composés contenus dans ces combinaisons, qui est appelée « synergie ». L'objectif des chercheurs consiste, donc, à valoriser cette interaction synergique dans ces combinaisons et de comprendre ses mécanismes, afin, de développer une nouvelle génération de médicaments alternatifs aux antibiotiques, pour résoudre le problème d'antibiorésistance (**Owen et Laird, 2018**).

Notre travail a ainsi, pour objet, de revoir la littérature récente concernant l'activité antibactérienne des huiles essentielles et leurs interactions synergiques entre elles et avec différents antibiotiques, tout en prenant compte de leur mécanisme d'action combiné, comme solution potentielle à la résistance aux antibiotiques.

Chapitre 01
La résistance aux antibiotiques

I- Les antibiotiques

I.1- Définition et caractéristiques

Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » (**Prescott et al., 1995**).

L'origine du terme « antibiotique » est reliée au mot « antibiose », utilisé pour la première fois en 1889 par Paul Vuillemin pour décrire le phénomène d'antagonisme entre les micro-organismes (**Bentley et Bennett, 2003**). En 1942, le découvreur de la streptomycine, Selman Waksman, a défini ce terme comme suit « Un antibiotique est une substance chimique, produite par des micro-organismes et qui a la capacité d'inhiber la croissance et même de détruire les bactéries et les autres micro-organismes » (**Waksman, 1947**). Actuellement, ce terme est employé dans un sens plus large qui inclut, en outre, toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de ces propriétés (**Singleton, 2005**).

Ces composés se caractérisent par une activité antibactérienne qui peut atteindre les différents milieux organiques (sang, tissus) grâce à leur bonne absorption et diffusion dans l'organisme. Leur mode d'action étant spécifique aux micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (**Yala et al., 2001**).

I.2- Historique

La découverte de l'activité antibactérienne des sulfamides synthétiques par Paul Gerhard Domagk dans les années 1930, est un événement important dans l'histoire des antibiotiques. Ces produits, sont ainsi, les premiers antibiotiques synthétiques utilisés cliniquement dès 1936. Cependant, la véritable naissance de l'ère antibiotique, est marquée par la découverte d'Alexander Fleming, en 1929, pour la pénicilline, un antibiotique naturellement produit par les moisissures de genre *Penicillium* sp. Toutefois, Fleming, n'a pas pu produire des quantités appréciables ni élucider la structure de ce composé, il a donc fallu attendre jusqu'à 1945 pour que ce Beta-lactamine soit disponible pour les populations (**Mohr, 2016**).

Cet événement a ouvert ainsi la voie pour l'identification de plusieurs autres classes d'antibiotiques d'origine naturelles, incluant les phénicolés, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les streptogramines, les céphalosporines et enfin les carbapénèmes à la fin des années 1970. Dans les années 1980, une autre substance antibiotique naturelle nommée daptomycine a été découverte, celle-ci, est produite par

Streptomyces roseosporus, et possède une activité exclusive contre les bactéries à Gram positif. Elle fut commercialisée à partir des années 2000 (Taylor et Palmer, 2016).

Durant cette période, les efforts fournis dans l'industrie pharmaceutique ont permis aussi, d'élucider deux autres classes d'antibiotiques synthétiques, les quinolones et les oxazolidinones. La figure suivante résume l'enchaînement chronologique de la découverte des antibiotiques:

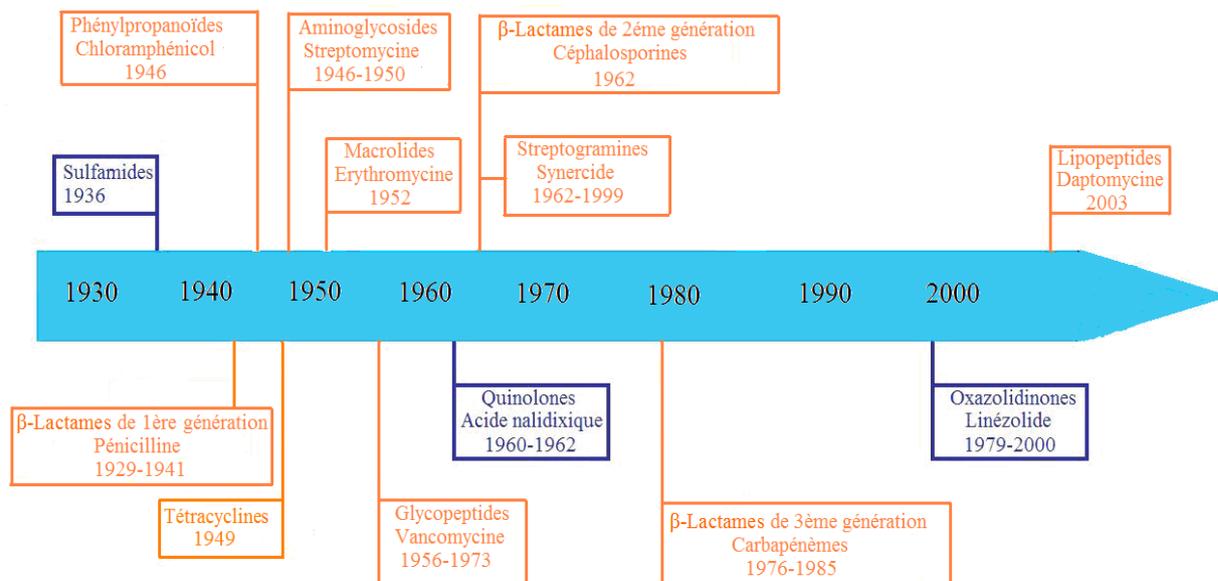


Figure 01 : Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle () et d'origine synthétique () (Singh et Barrett, 2006)

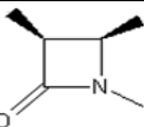
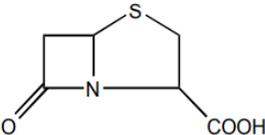
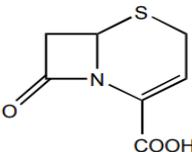
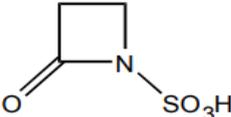
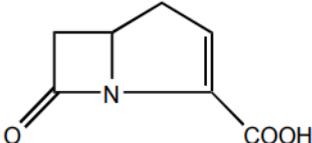
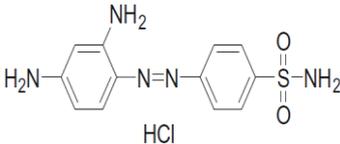
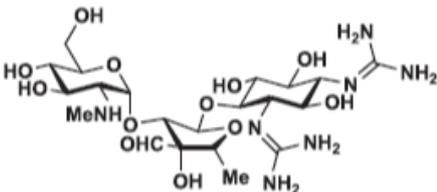
I.3- Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

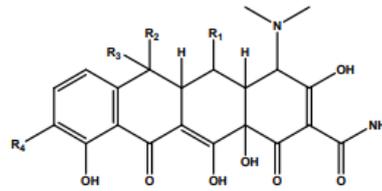
- L'origine de l'antibiotique** : Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine **naturelle** et leurs dérivés (pénicilline). Ils peuvent aussi être d'origine **synthétique** (sulfamides) ou **semi-synthétique** (Newman *et al.*, 2003; Singh et Barrett, 2006). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro-organismes, tandis que les semi-synthétiques, sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes (méthicilline dérivé de la pénicilline) (Guinoiseau, 2010).

- **La composition chimique** : Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales (**Küçükbay et Küçükbay, 2017**). Les grandes familles d'antibiotiques ainsi que leur structure de base, sont représentées dans le tableau suivant :

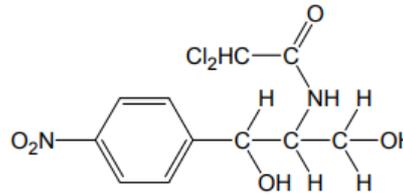
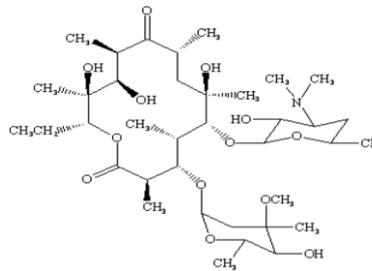
Tableau 01 : Structure chimique de base des grandes familles d'antibiotiques

Familles d'antibiotiques	Cycle	Structure chimique	Références
Beta-Lactamine	Cycle β -lactame		Cohen et Jacquot, 2008
	Pénames (Pénicillines)		Tulkens et Van Bambeke, 2008
	Céphèmes (Céphalosporines)		
	Monobactames (l'aztréonam)		
	Pénèmes (Carbapénèmes)		
Sulfamides (Prontosil)		 HCl	Mohr, 2016
Aminosides (Streptomycine)			Nicolaou et Rigol, 2017

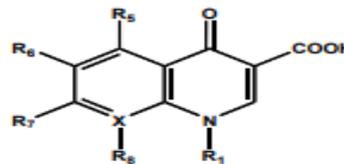
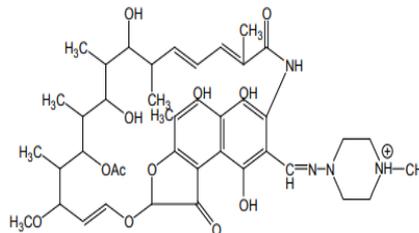
Tétracyclines

Tulkens et Van
Bambeke, 2008

Chloramphénicol

Macrolides
(Erythromycine)

Quinolones

Rifamycine
(Rifampicine)

- **Le spectre d'activité:** L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. Cette propriété est directement liée à la structure chimique (configuration spatiale) de l'antibiotique et à la cible microbienne (structure et fonction) (Eyler et Shvets, 2019). On distingue ainsi, des antibiotiques à **large spectre** comme les aminoglycosides, et ceux à **spectre étroit** comme les macrolides (Singleton, 2005).
- **L'effet antimicrobien :** L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui

inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «**bactériostatiques**» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «**bactéricides**» (Soilleux, 2007).

- **Le mode d'action :** les antibiotiques peuvent agir sur la paroi bactérienne (peptidoglycane), la structure de la membrane cytoplasmique bactérienne, la synthèse protéique bactérienne, la synthèse de l'ADN de la bactérie, la synthèse de l'acide folique (Yala *et al.*, 2001) (Tableau 02).

Tableau 02 : Les grandes familles d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action (Levy et Marshall, 2004)

Mécanisme d'action	Famille d'antibiotique
Inhibition de la synthèse de la paroi	Pénicillines ; céphalosporines ; carbapénèmes ; daptomycine ; monobactames ; glycopéptides
Inhibition de la synthèse protéique	Tétracyclines ; aminosides ; oxazolidinones ; streptogramines ; macrolides ; lincosamides
Inhibition de la synthèse de l'ADN	Quinolones et fluoroquinolones
Inhibition compétitive de la synthèse de l'acide folique	Sulfamides ; triméthoprim
Inhibition de la synthèse de l'ARN	Rifampicine
Autres mécanismes	Métronidazole

I.4- Les mécanismes d'action des antibiotiques

L'application très répandue des antibiotiques en médecine pendant de nombreuses années, peut être expliquée par la variabilité des cibles qu'ils affectent et des mécanismes d'action qu'ils présentent (Tableau 02) (Levy et Marshall, 2004).

Le mode d'action de quelques familles d'antibiotiques est décrit comme suit :

- **Les β -lactamines :** Les β -lactamines sont les premières classes d'antimicrobiens naturels utilisées pour traitement des infections (Habich *et al.*, 2006). Cette classe inhibe la croissance bactérienne en interagissant avec les protéines de liaison à la pénicilline (PBP ou PLP), des enzymes essentielles qui interviennent dans la transpeptidation, l'une étape terminale de la biosynthèse du peptidoglycane (Labischinski, 1992, Ghuysen, 1994). Ces enzymes (PLP) confondent les β -lactamines avec l'extrémité C-terminale D-ala, D-ala des chaînes peptidiques à réticuler pour former le peptidoglycane, car cette extrémité est analogue avec la liaison CO-N du cycle β -lactame, et la sérine du site actif de l'enzyme ouvre le cycle β -lactame ce qui bloque la PLP et forme un intermédiaire enzyme-acyle inactif et irréversible

(Tipper et Strominger, 1965; Holtje, 1998). Une mal réticulation du peptidoglycane se produit, et cela induit la mort de la bactérie sensible, dans la plupart des cas, par une destruction complète de la bactérie par des enzymes autolytiques de la paroi bactérienne (autolysines) (Lewis, 2000).

- **Les quinolones** : les quinolones inhibent les deux topoisomérases présentes dans les cellules bactériennes : la topoisomérase II (gyrase), responsable du déenroulement de l'ADN et la topoisomérase IV, responsable de la séparation des chromosomes naissants après réplication (Drlica *et al.*, 2008). Les deux topoisomérases sont essentielles à la survie bactérienne, et cibler l'une d'entre elles seule est, principalement, suffisant pour inhiber la croissance (Kahne *et al.*, 2005). A l'état normal, la gyrase ou la topoisomérase IV introduisent une cassure au niveau des brins d'ADN (Mizuuchi *et al.*, 1980 ; Morrison *et al.*, 1980) avant de les réarrangés. En présence des quinolones, ces dernières se lient rapidement aux complexes enzyme-ADN (Compranis et Maxwell, 1998), probablement avant le clivage de l'ADN; la liaison s'effectue entre l'antibiotique et la sous-unité Gyr A de la gyrase ou la sous-unité ParC de la topoisomérase IV. Cela, provoque un ralentissement dans le clivage d'ADN et inhibe la relégation des extrémités de l'ADN par les topoisomérases (Anderson *et al.*, 1999). L'une des conséquences de la formation de ce complexe ternaire enzyme-ADN-antibiotique est l'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques. Selon la cible de l'antibiotique, l'inhibition se produit plus lentement lorsque l'enzyme ciblée est la topoisomérase IV (Khodursky *et al.*, 1995).

- **Les glycopeptides**: Les glycopeptides, agissent, également, sur la synthèse de la paroi bactérienne, mais, à la différence des β -lactamines, ces antibiotiques ciblent un substrat enzymatique, le peptide précurseur II du peptidoglycane. Ce dernier, doit être rassemblé par des transpeptidases pour former le peptidoglycane (Kahne *et al.*, 2005). L'inhibition de la synthèse, se fait dans ce cas, par la liaison des glycopeptides aux extrémités lysine-D ala-D ala, des brins précurseurs du peptide du côté externe de la membrane. De cette façon, les transpeptidases sont empêchées d'effectuer la réticulation (Sheldrick *et al.*, 1978 ; Allen et Nicas, 2003; Kahne *et al.*, 2005), ce qui conduit à la mort cellulaire. Ces antibiotiques sont efficaces contre les bactéries à Gram positif mais pas contre les bactéries à Gram négatif, à cause de l'imperméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui empêche les glycopeptides d'atteindre leurs cibles sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique (Kahne *et al.*, 2004).

- **Les macrolides** : les macrolides bloquent la biosynthèse des protéines bactériennes en se liant à l'ARNr 23s de la sous-unité 50s, et interfèrent avec l'allongement des chaînes peptidiques pendant la traduction (**Hansen et al., 1999**). Le site de liaison de l'antibiotique se situe dans le domaine V, près du site de la peptidyltransferase, celui-ci bloque la sortie du peptide sans affecter l'activité de la peptidyltransferase (**Habich et al., 2006**) et provoque une dissociation prématurée du peptidyl ARNt du ribosome (**Menninger, 1995**). L'avantage d'utilisation l'ARNr comme cible est que tous les ARN ribosomaux sont codés en plusieurs copies dans la plupart des espèces bactériennes (**Klappenbach et al., 2001**). La résistance aux macrolides par mutation de l'ARNr 23S, par exemple, n'est répandue que chez des espèces comme *Helicobacter pylori* ou *Mycobacterium* qui ne possèdent qu'un ou deux opérons pour l'ARN ribosomal (**Vester et Douthait, 2001**).

L'ensemble des mécanismes d'action des antibiotiques, sont présentée dans la figure suivante :

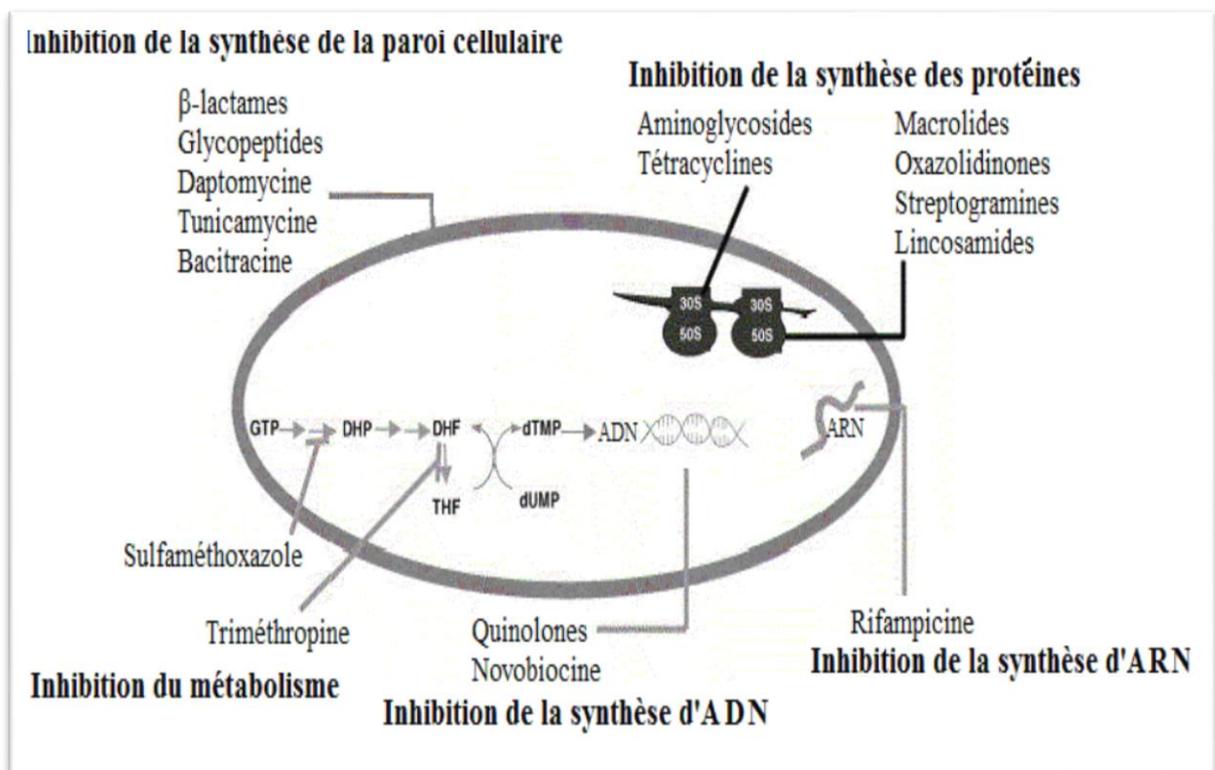


Figure 02 : Mode d'action des antibiotiques (**Singh et Barrett, 2006**)
 DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate

II- La résistance bactérienne

La découverte, la commercialisation et l'administration des antibiotiques pour traiter les infections, a révolutionné la médecine moderne et changé le paradigme thérapeutique. En effet, le traitement aux antibiotiques est devenu l'une des étapes médicales nécessaires pour réaliser les approches médicales complexes, comme les interventions chirurgicales. Malheureusement, L'utilisation de ces médicaments s'est accompagnée avec l'apparition des souches résistantes, et l'augmentation marquée de cette résistance menace cet accomplissement thérapeutique (**Munita et Arias, 2016**). L'OMS a nommé ce phénomène comme l'une des trois menaces les plus importantes de la santé publique du 21^{ème} siècle (**World Health Organization, 2014**), et les chercheurs avertissent maintenant d'un retour à l'ère pré-antibiotique (**Davis et Davies, 2010**).

II.1- Définition de la résistance aux antibiotiques

De façon classique, la résistance aux antibiotiques a été définie d'un point de vue opérationnel, qui classe les bactéries comme résistantes ou sensibles en se basant sur la possibilité de traiter les infections qu'elles produisent. En clinique, une bactérie résistante est celle qui peut échapper au traitement, ce qui peut se manifester par un échec thérapeutique, et inversement, une bactérie est dite sensible, lorsque le traitement a une forte probabilité de succès (**Martinez, 2014**). Sur le plan bactériologique, et en se basant sur les concentrations d'antibiotique minimales inhibitrices de la croissance microbienne (CMI), une bactérie est considérée comme résistante, lorsque la (CMI) requise pour son inhibition est plus élevée que celle qui inhibe le développement des autres souches de la même espèce (**CASFM, 2018**).

II.2- Historique

La résistance aux antibiotiques n'est pas nouvelle. En effet, depuis l'introduction des premiers antimicrobiens efficaces en 1937, à savoir les sulfamides, le développement de mécanismes spécifiques de résistance ont tourmenté leur usage thérapeutique (**Davies et Davies, 2010**). Ainsi, la résistance aux sulfamides a été observée chez *Streptococcus pyogenes* dans les hôpitaux militaires vers la fin des années 1930 (**Levy, 1982**). Ensuite, Alexander Fleming a sélectionné et décrit des mutants résistants à la pénicilline peu de temps après avoir découvert l'antibiotique. Aujourd'hui, certaines bactéries, se caractérisent non seulement par une résistance unique, mais aussi, par une résistance à plusieurs antibiotiques (multirésistance) (**Levy et Marshall., 2004**).

II.3- Les modes de résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne, est en fait d'origine génétique, et elle est liée à la présence ou l'absence de gènes de résistance dans la bactérie. Ces éléments peuvent être soit, présents naturellement dans l'organisme (résistance naturelle), ou bien, acquis à travers différents mécanismes (résistance acquise) **(Patrick et Patrice, 1987)**.

II.3.1- La résistance naturelle (intrinsèque)

La résistance intrinsèque, fait référence à l'existence de gènes dans le chromosome bactérien qui permettent à la bactérie d'exprimer un phénotype résistant à certains antibiotiques **(Davies et Davies, 2010)**. Ce caractère est donc inné, permanent, et partagé par l'ensemble des bactéries de la même espèce. Du point de vue clinique, une espèce bactérienne est considérée comme intrinsèquement résistante à un antibiotique donné si la CMI de toutes les souches est supérieure à un seuil précédemment défini **(Martinez, 2014)**. Ce type de résistance existait avant l'utilisation des antibiotiques **(Martinez, 2014)**; la pénicilline bactérienne, par exemple, a été découverte bien avant l'introduction de la pénicilline en thérapie **(Abraham et Chain, 1940)**. Elle est habituellement, attribuée à une perméabilité réduite de l'antibiotique, ou à l'absence de sa cible dans la bactérie **(Martinez, 2014)**. Ce dernier cas, peut être illustré par les bactéries du genre *Mycoplasma* sp, qui sont naturellement résistantes aux betalactamines du fait qu'elles sont dépourvues du peptidoglycane **(Normak et Normak, 2002)**. Par ailleurs, la résistance des entérobactéries et du *Pseudomonas* sp aux macrolides, ou des bactéries à Gram négatif à la vancomycine est naturelle, grâce à l'effet barrière exercé par leur membrane externe sur ces composés. La résistance naturelle, est aussi présente chez les micro-organismes producteurs d'antibiotiques comme *Streptomyces* sp, et elle leur permet de coexister avec les molécules qu'elles produisent **(Perry et al., 2016)**.

II.3.2- La résistance acquise

Grace à la plasticité du génome bactérien, les bactéries peuvent acquérir une résistance à un antibiotique auquel elles étaient préalablement sensibles, d'où le nom de « résistance acquise ». Cette dernière, est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée, autrement dit, elle ne définit que les mutants présentant une sensibilité réduite à un antibiotique donné, par rapport à la souche parentale **(Martinez, 2014)**. Le développement de cette résistance peut être le résultat de mutations des gènes chromosomiques (résistance mutationnelle), ou bien due à l'acquisition de gènes de résistance externes issus,

probablement, d'organismes naturellement résistants présents dans l'environnement (**Munita et Arias, 2016**).

II.3.2.1- La résistance mutationnelle

Dans ce cas, un ensemble de cellules bactérienne dérivées d'une population sensible, développent des mutations dans les gènes qui affectent l'activité du médicament, afin de maintenir leur survie en présence de cette molécule. Une fois qu'un mutant émerge, l'antibiotique élimine la population sensible, et les bactéries résistantes prédominent (**Munita et Arias, 2016**). Ce phénomène est en fait, conditionné par l'usage de l'antibiotique. Ce dernier, n'est, cependant, pas un agent mutagène, mais il contribue plutôt, à la sélection des mutants résistants au sein de la population bactérienne. Les mutations conduisant à cette résistance se produisent généralement dans trois types de gènes : ceux qui codent pour la cible de l'antibiotique (diminution de l'affinité), ceux qui codent pour les transporteurs de ces molécules (diminution de la diffusion de l'antibiotique), et en fin, les gènes qui codent pour les régulateurs qui répriment l'expression des transporteurs ou des éléments qui éliminent l'antibiotique (pompes à efflux) (**Martinez, 2014**). La résistance aux fluoroquinolones, par exemple, implique ce type de mécanisme. En effet, ces antibiotiques, tuent les bactéries en altérant la réplication de l'ADN à travers l'inhibition de deux enzymes cruciales, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Le développement de mutations chromosomiques dans les gènes codant pour les sous-unités de ces enzymes (gyrA-gyrB et parC-parE pour l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, respectivement) est le mécanisme le plus fréquent de résistance acquise à ces composés (**Hooper, 2002**).

II.3.2.2- La résistance acquise par transfert horizontal des gènes (THG)

L'acquisition du matériel génétique étranger via le THG, est l'un des moteurs les plus importants de l'évolution bactérienne, et il est fréquemment responsable du développement de la résistance aux antibiotiques (**Munita et Arias, 2016**). En effet, ce phénomène, met les gènes de résistance à la disposition d'une plus grande partie de la communauté bactérienne dans un environnement particulier, souvent au-delà des frontières d'espèces (il peut d'effectuer même entre des espèces phylogénétiquement éloignées) (**Martinez, 2011**).

La bactérie peut acquérir le matériel génétique par le biais de trois processus : La transformation, la transduction et la conjugaison (**Levy et Marshall, 2004**). La transformation, est la capacité d'une bactérie à capturer et internaliser un ADN nue, présent dans son environnement, celui-ci, peut être un plasmide ou un fragment d'ADN

chromosomique, souvent libéré lors de la lyse des cellules, ou par sécrétion active. Ce mécanisme, nécessite, cependant, à ce que la bactérie soit dans une situation physiologique particulière appelée « compétence » (**Chen et Dubnau, 2004**). Il est, par conséquent, considéré, comme le seul mécanisme de THG qui est intrinsèque aux bactéries et entièrement contrôlé par celles-ci. Plusieurs pathogènes connus en clinique, sont naturellement compétents, à l'instar de : *Neisseria* sp, *Acinetobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus* sp et *Streptococcus* sp (**Johnston et al., 2014; Traglia et al., 2014**)

La transduction, est la transportation du matériel génétique à travers les bactériophages. Ce mécanisme se produit lorsqu'un phage se réplique au sein de l'organisme donneur et, durant le processus d'encapsidation, il incorpore accidentellement des fragments d'ADN bactérien dans sa capsid. Celui-ci, est ensuite libéré dans l'environnement, où il transmet cet ADN en infectant un nouvel hôte (**Norman et al., 2009**). Il semble que, de tels événements sont fréquents chez *Staphylococcus aureus* (**Skurray et Firth, 1997**).

En fin, plusieurs éléments dispersifs sont capables d'être transférés par conjugaison. Cette dernière constitue une méthode efficace qui nécessite un contact physique entre deux cellules, suivie par l'établissement d'un pont, permettant le passage du plasmide, d'une cellule donatrice à une cellule réceptrice (**Sørensen et al., 2005**). Connaissant l'immense diversité des procaryotes, l'exigence de compatibilité pour le contact cellulaire, semble être une étape limitative pour ce processus. Cependant, des preuves considérables, se sont accumulées au fil des années sur la conjugaison entre des procaryotes ayant des distances taxonomiques (**Musovic et al., 2006**).

L'omniprésence des plasmides et des bactériophages, ainsi que la large distribution de la transformation naturelles, signifie que ces anciens agents de THG fonctionnent dans une vaste gamme d'environnements et d'écosystèmes, autrement dit, le transfert de gènes se fera avec les mêmes mécanismes dans le milieu clinique, dans l'hôte humain, et dans tous les habitats naturels (**Lerminiaux et Cameron, 2018**). Toutefois, les exigences spécifiques de chacun des trois mécanismes, suggèrent, qu'ils se produisent avec des probabilités différentes, dans divers habitats (**Norman et al., 2009**).

Les mécanismes de THG, impliquent généralement des éléments génétiques mobiles (EGM), dont les plus importants sont les plasmides et les transposons. Les plasmides sont des éléments d'ADN extrachromosomiques, capables de se répliquer indépendamment du chromosome bactérien et ils se distinguent par leur origine de répllication. Ce sont des

éléments mobiles (EGM), et peuvent donc se transférer horizontalement entre les bactéries. Plusieurs plasmides peuvent exister au sein d'une seule bactérie où leurs gènes s'ajoutent à la génétique de l'organisme (**Alekshun et Levy, 2007**). Ils possèdent différents types de gènes, mais ils sont connus aussi comme porteurs majeurs de gènes de résistance comme ceux qui codent pour la résistance aux betalactamines présents chez les entérobactéries (**Weingarten et al., 2018**). Ils confèrent ainsi un vrai arsenal d'armes, de résistance aux antibiotiques chez certaines bactéries. Par exemple, les souches de *Shigella* portants des plasmides ont été facilement sélectionné et propagé pendant une période d'utilisation considérable des sulfamides au Japon après la deuxième guerre mondiale (**Watanabe, 1963**).

Les transposons sont aussi des EGM, capables de se déplacer entre un chromosome et un plasmide ou encore entre deux plasmides, en faisant intervenir une enzyme appelée « transposase », dont le gène est porté par le transposant lui-même (**Paul, 1997; Mazel, 2006**). En se transposant ces éléments peuvent servir de véhicule pour plusieurs gènes de résistance. Par exemple, le gène de résistance à la tétracycline *tet(M)*, est généralement situé sur le transposon Tn916 (**Clewell et Gawron-Burke, 1986**), et il a été trouvé dans les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, les bactéries aérobies et anaérobies, ainsi que dans toutes les niches biologiques environnementales (**Roberts, 1996**).

Au cours des années 1980, les chercheurs ont décrits de nouveaux éléments d'ADN, les intégrons, dans lesquels, les gènes de résistance existent sous la forme de cassettes mobiles qui sont réarrangées par une sorte de génie génétique naturel, et forment des opérons fortement exprimés (**Paul, 1997**). En effet, ces cassettes sont excisées ou intégrées, à un site spécifique situé entre deux régions conservées, grâce un système de recombinaison spécialisé, assuré par une intégrase (**Stokes et Hall, 1989**). Ces éléments, constituent donc, un système original de capture de gènes capable de promouvoir efficacement la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (**Marie-Cécile et Denis, 2000**).

Les intégrons, peuvent être insérées dans des transposons composites, qui à leur rôle peuvent s'intégrer dans un élément dispersif comme un plasmide conjugatif. Ce dernier, devient ainsi un vaisseau pour la transportation de l'information génétique. Par conséquent, ces éléments devraient être considérés, plutôt, comme des mosaïques complexes, transmettant des gènes fonctionnels (**Norman et al., 2009**).

Le nombre de gènes de résistance acquis par les agents pathogènes humains, est très faible en comparaison avec la grande variabilité des gènes de résistance présents dans les

écosystèmes, cela signifie que l'acquisition de la résistance peut être influencée par un certain nombre de facteurs. Le premier, concerne la connectivité écologique; un gène de résistance peut être transféré s'il y'a un contact entre le donneur et le receveur (ou son ADN), bien que, dans le cas des bactéries pathogènes, ces dernières n'ont pas besoin de coexister avec le donneur car le transfert peut être assuré par une chaîne de micro-organismes. Le second facteur, est celui de l'effet fondateur. En effet, une fois qu'un déterminant de résistance est disséminé, il est peu probable qu'un autre, conférant un phénotype similaire soit acquis ; il n'y a pas une pression sélective pour le remplacement du déterminant déjà présent dans les populations bactériennes. Cela, explique probablement, la faible variabilité des gènes de résistance chez les pathogènes humains par rapport à ceux trouvés dans l'environnement naturel. Une fois que le gène est acquis, la bactérie doit être capable de supporter les coûts de remise en forme exigé par cet élément, afin de pouvoir le fixer (Martinez, 2012 ; 2014).

La figure suivante, illustre les mécanismes permettant aux bactéries d'acquérir des gènes de résistance :

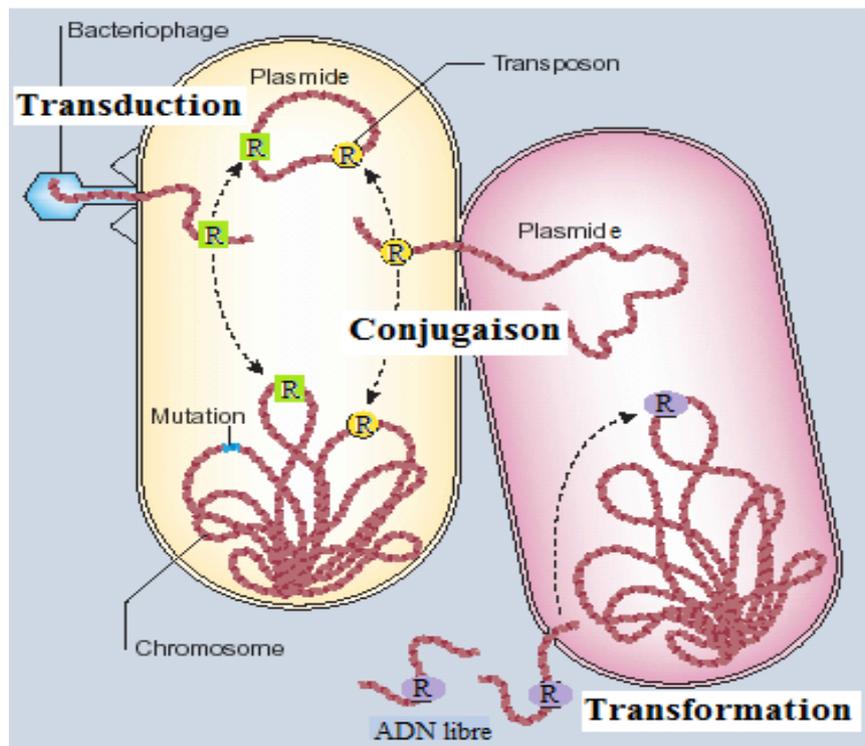


Figure 03 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004)

II.4- Les mécanismes de la résistance bactérienne

Les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies, pour lutter contre l'action des antibiotiques. Certaines stratégies ciblent directement les antibiotiques, tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances (Levy et Marshall, 2004).

La résistance à une classe d'antibiotique peut s'effectuer par le biais de multiples voies biochimiques, et une cellule bactérienne est capable d'utiliser un ensemble de mécanismes de résistance pour survivre à l'effet d'un antibiotique. C'est le cas de la résistance aux fluoroquinolones qui peut se produire par trois voies: mutation dans les gènes codant pour la cible de l'antibiotique (comme décrit précédemment), surexpression des pompes à efflux qui éjecte l'antibiotique de la cellule, et la protection de la cible par une protéine (Qnr). Ces trois voies peuvent, en fait, coexister dans la même bactérie à un moment donné, ce qui lui permet, de produire un effet additif et, souvent d'augmenter le niveau de résistance. Cependant, les espèces bactériennes semblent avoir développé une préférence pour certains mécanismes de résistance par rapport à d'autres. Par exemple, la résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif, est la production des β -lactamases, tandis que chez les bactéries à Gram positif, la résistance à ces composés se produit, principalement, par la modification de leur cible, les protéines liant la pénicilline (PLP). Cela, s'explique probablement, par les différences majeures dans l'enveloppe cellulaire, entre ces bactéries (Munita et Arias, 2016).

Selon la voie biochimique impliquée, les mécanismes de base de la résistance aux antibiotiques, peuvent être classés comme suit :

II.4.1- Modification de l'antibiotique

L'une des stratégies bactériennes les plus efficaces pour faire face à la présence de l'antibiotique est, la production d'enzymes qui inactivent l'antibiotique en lui greffant des fragments chimiques spécifiques, ou celles qui dégradent la molécule d'antibiotique elle-même, et dans les deux cas, le but est de le rendre incapable d'interagir avec sa cible (Munita et Arias, 2016).

II.4.1.1- Dégradation de l'antibiotique

Généralement, la résistance aux β -lactamines se fait par leur destruction à travers l'action des β -lactamases. Ces enzymes détruisent la liaison amide du cycle β -lactame rendant ainsi, l'antibiotique inefficace (Munita et Arias, 2016). Le premier cas de résistance aux

β -lactamines, par la production de pénicillinase a été décrit en 1940, avant que la pénicilline soit commercialisée (Abraham et Chain, 1940). Après l'introduction et la large utilisation de cet antibiotique en thérapie, les cas d'infections par *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline ont augmenté terriblement, en raison de la transmission facile du plasmide codant pour la pénicillinase entre les souches de cette espèce (Bush, 2013). Pour remédier à ce problème, de nouveaux composés β -lactame à spectre plus large et moins sensibles aux pénicillinases (comme l'ampicilline), ont été fabriqués. Cependant, au cours des années 1960, un nouveau plasmide codant pour une β -lactamase nommée TEM-1 (en référence au patient dans lequel elle a été trouvée « Temoneira ») capable d'hydrolyser l'ampicilline, a été retrouvé chez les bactéries à Gram négatif (Paterson et Bonomo, 2005). Dès lors, le développement de nouvelles générations de β -lactamines a été systématiquement suivi par l'apparition rapide d'enzymes capables de détruire tout nouveau composé antimicrobien, qui arrive au marché. Aujourd'hui, plus de 1000 β -lactamases sont identifiées (Munita et Arias, 2016).

En général, ces enzymes sont séparées en deux groupes : **β -lactamases à sérine**; qui exercent leur action grâce au résidu de sérine présent dans leur site actif, et les **métallo- β -lactamases**, qui nécessitent, l'intervention d'un cofacteur métallique, comme le Zn^{2+} . Certaines de ces enzymes, comme, CTX-M et TEM-3, sont qualifiées de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), car elles confèrent simultanément, la résistance aux pénicillines, céphalosporines de troisième génération, ainsi qu'à l'aztréoname. D'autres, comme, KPC, IMP, VIM et NDM, sont appelées **carbapénèmases**, et elles permettent de résister à différentes classes de carbapénèmes (Munita et Arias, 2016 ; Alexshun et Levy, 2007).

Les gènes codant pour les β -lactamases sont, généralement, nommés *bla*, suivi par le nom spécifique de l'enzyme (exemple, *bla_{KPC}*). Ils peuvent être trouvés dans le chromosome, ou bien, localisés dans les éléments mobiles (EGM) en tant qu'une partie accessoire du génome. Ces gènes peuvent également faire partie des intégrons, une situation qui facilite ainsi, leur dissémination (Munita et Arias, 2016).

II.4.1.2- Modification enzymatique de la structure de l'antibiotique

La plupart des antibiotiques affectés par ces modifications enzymatiques exercent leur mécanisme d'action en inhibant la synthèse protéique au niveau des ribosomes (Wilson, 2014). Les réactions biochimiques les plus fréquentes, catalysées par ces enzymes sont : l'acétylation, phosphorylation et nucléotidylation. Celles-ci, ont toutes pour but, la réduction de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, et cela se traduit en pratique, par l'augmentation

des CMI. L'un des meilleurs exemples de ce mécanisme est la présence, d'enzymes modificatrices d'aminosides (EMA), qui modifient de manière covalente le groupement hydroxyle ou amine de ces antibiotiques. Selon leur fonction biochimique, on distingue : les acétyltransférases (AAC), les phosphotransférases (APH) et les adényltransférases (ANT). Ces enzymes sont distribués de façon hétérogène entre les espèces bactériennes, et elles diffèrent dans le type d'aminosides qu'elles affectent (**Munita et Arias, 2016**). Par exemple, les acétyltransférases (AAC (6')-I) sont, principalement, trouvés dans les isolats cliniques appartenant aux *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp, et *Acinetobacter* sp et elles affectent la plupart des aminosides y compris l'amikacine et la gentamicine (**Ramirez et Tolmasky, 2010**). Certaines de ces enzymes se caractérisent par une double fonction biochimique, comme le cas de, AAC (6') APH (2'') qui se trouve principalement, chez les bactéries à Gram positif sur le transposon Tn4001, et qui leur permet de résister à tous les aminosides (sauf la streptomycine) (**Hollenbeck et Rice, 2012**). Les gènes codant pour ces enzymes sont habituellement, localisés dans des éléments mobiles (EGM), mais ils ont été trouvés aussi, dans le chromosome chez certaines espèces bactériennes, comme le cas des acétyltransférases chez *Providencia stuartii*, *Enterococcus faecium* et *Serratia marcescens* (**Ramirez et Tolmasky, 2010**).

II.4.2- Diminution de la pénétration et de l'efflux d'antibiotiques

II.4.2.1- Diminution de perméabilité

Plusieurs antibiotiques ont des cibles intracellulaires ou, dans le cas des bactéries à Gram négatif, les cibles sont situées dans la membrane cytoplasmique (membrane interne). Pour parvenir à résister à ces molécules, les bactéries ont développé des mécanismes pour empêcher l'antibiotique d'atteindre sa cible, en diminuant son absorption. Ces mécanismes sont plus répandus chez les bactéries à Gram négatif. En effet, la membrane externe agit comme la première ligne de défense contre la pénétration des composés toxiques (**Munita et Arias, 2016**). Les molécules hydrophiles telles que les β -lactamines, tétracycline, et certaines fluoroquinolones sont particulièrement affectées par les changements de perméabilité de la membrane externe car elles utilisent souvent des canaux de diffusion appelée « porines » pour traverser la barrière (**Pagès et al., 2008**). Cette résistance est, en fait, assurée grâce à des processus d'altération effectué par les bactéries sur ces porines, comme, la modification de type de porines exprimées, le changement du niveau de leur expression, ou l'altération de leur fonction (**Nikaido, 2003**). Par exemple, dans un isolat clinique de *K. pneumoniae*, il a été trouvé que celle-ci, change l'expression de la porine OmpK35 par OmpK36 (porine de taille

plus petite) après le traitement antibiotique (Doménech-Sánchez *et al.*, 2003 ; Hasdemir *et al.*, 2004). De tels mécanismes, entraînent souvent une résistance de faible niveau, et ils sont généralement associés avec d'autres mécanismes comme les pompes à efflux (Nikaido, 2003).

II.4.2.2- Les Pompes à efflux

La production de machineries bactériennes complexes capables d'éjecter un composé toxique hors de la cellule est une forme de résistance. La description d'un système d'efflux capable de pomper la tétracycline hors du cytoplasme d'*Escherichia coli*, date du début des années 1980, et il fait l'un des premiers à être décrits (McMurry *et al.*, 1980). Dès lors, de nombreuses classes de pompes à efflux ont été caractérisées chez les pathogènes à Gram négatif et à Gram positif (Munita et Arias, 2016). Certains systèmes ont des substrats bien spécifiques (pompes Tet), d'autres agissent avec une spécificité plus large, comme ceux qui se trouvent chez les bactéries multiresistantes (Pool, 2005). L'exemple le plus classique de ces pompes, est celui de la résistance à la tétracycline, dans lequel, les pompes à efflux (Tet), éjecte ces molécules en utilisant l'échange de proton comme source d'énergie (Levy et McMurry, 1978). Les gènes codants pour ces pompes peuvent être localisés dans des éléments mobiles (comme celui de la tet), ou sur le chromosome, (ce qui explique la résistance intrinsèque d'*Enterococcus faecalis* à la streptogamine A) (Singh *et al.*, 2002). La figure suivante, montre la capacité de la bactérie à modifier l'antibiotique ou à diminuer sa pénétration, afin de résister à son effet:

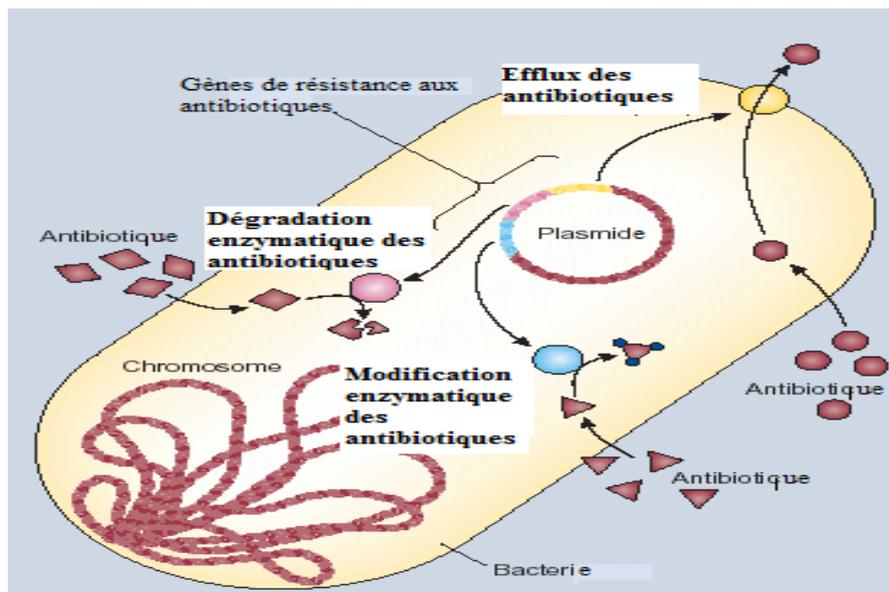


Figure 04 : L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme mécanismes de résistance (Levy et Marshall, 2004)

II.4.3- Changements dans la cible de l'antibiotique

Cette stratégie de résistance consiste à éviter l'action de l'antibiotique en interférant avec leurs cibles. Pour y arriver, les bactéries impliquent différentes tactiques incluant, la protection et la modification de la cible pour réduire son affinité avec l'antibiotique (Munita et Arias, 2016).

II.4.3.1- Protection de la cible

Bien que, certains gènes codants pour les protéines de protection de la cible d'antibiotique, ont été trouvés dans le chromosome bactérien, la plupart des éléments impliquant ce mécanisme chez les pathogènes connus en clinique, sont portés par les EGM (Munita et Arias, 2016). L'exemple illustrant ce mécanisme est celui de la résistance aux quinolones grâce à la protéine Qnr, qui est un déterminant à médiation plasmatique, fréquemment, trouvé dans les isolats cliniques, comme *K. pneumoniae* (Martinez-Martinez et al., 1998). La Qnr, est une protéine à répétitions pentapéptidiques, et elle agit comme un homologue d'ADN qui entre en compétition pour le site de fixation d'ADN sur la gyrase et la topoisomérase IV. Il a été suggéré que la réduction des interactions de l'ADN avec la gyrase, diminue les opportunités de la quinolone pour qu'elle forme et stabilise le complexe ADN clivé-gyrase-quinolone, qui est létale pour la bactérie (Rodríguez-Martínez et al., 2011).

II.4.3.2- Modification de la cible

A- Mutation de la cible

L'exemple classique de ce mécanisme est celui de la résistance à la rifampicine (dérivé de la rifamycine). La rifampicine bloque la transcription bactérienne en inhibant l'ARN polymérase ADN dépendante (Munita et Arias, 2016). Le site de liaison de cet antibiotique est une structure hautement conservé, situé dans la sous-unité β de l'ARN polymérase et codé par le gène *rpoB*, Après la liaison, la molécule d'antibiotique interrompt la transcription en bloquant directement le chemin de l'ARN naissant (Campbell et al., 2001). La résistance à la rifampicine se produit par des mutations ponctuelles en une seule étape entraînant des substitutions d'acide aminé dans le gène *rpoB* (Munita et Arias, 2016). Il faut noter que ces mutations permettent, la diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, mais simultanément, elles épargnent l'activité catalytique de la polymérase, permettant ainsi à la transcription de continuer (Floss et Yu, 2005).

B- Modification enzymatique de la cible

L'exemple qui décrit cette résistance est la méthylation du ribosome, catalysée par une enzyme codé par le gène *erm* qui confère une résistance aux macrolides. Ces enzymes sont capables de mono ou diméthyle un résidu adénine en position A 2058 du domaine V de l'ARNr 23s, de la sous-unité ribosomale 50s. En raison de ce changement biochimique, la liaison de l'antibiotique avec sa cible est altérée et puisque, les sites de liaison des macrolides, lincosamides et les streptogamines B, se chevauchent sur l'ARNr 23s, l'expression des gènes *erm* confère une résistance croisée à tous les membres du groupe MLS_B (Leclercq, 2002; Weisblum, 1995). Plus de 30 gènes *erm* ont été décrits, et plusieurs d'entre eux sont dans des EGM (Munita et Arias, 2016).

C- Remplacement complet ou contournement de la cible

Cette stratégie permet aux bactéries de développer de nouvelles cibles qui accomplissent des fonctions biochimiques similaires à la cible originale, mais qui ne sont pas inhibées par l'antibiotique. C'est le cas de la résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus* due à l'acquisition des PLP (protéine liant la pénicilline) exogènes (PLP2a). L'autre moyen, consiste à contourner la voie métabolique inhibée par l'antibiotique, en surproduisant la cible de celui-ci, comme dans le cas de la résistance à la triméthoprim-sulfaméthoxazole (TMP-SMX) (Munita et Arias, 2016).

Pour finir, certaines recherches réalisées sur la résistance intrinsèque chez une espèce donnée, ont révélé que, d'autres éléments que ceux mentionnés ci-dessus, peuvent être impliqués (Fajardo *et al.*, 2008 ; Alvarez-Oretega *et al.*, 2010 ; Fernandez *et al.*, 2013). Cela indique, que la résistance aux antibiotiques n'est pas la conséquence de l'action de quelques éléments spécifiques, mais d'une physiologie bactérienne dans son ensemble (Martinez, 2014).

II.5- Les origines et l'évolution de la résistance

Il existe, en réalité, des preuves irréfutables, indiquant que les bactéries environnementales sont l'origine des gènes de résistance (Davies et Davies, 2010). En effet, il est bien connu que, la plupart des composés antimicrobiens sont des molécules produites naturellement, par des micro-organismes environnementaux. Par conséquent, ces organismes, abritent des déterminants génétiques qui leur permettent de résister aux molécules qu'elles produisent, comme le cas des *Streptomyces*, qui sont connues, depuis longtemps, pour la

production d'une variété de β -lactamases, et qui peuvent, ainsi, être la source de certaines formes de résistance clinique aux β -lactamines (**Forsman et al., 1990 ; Ogawara et al., 1999**). Cependant, les connaissances actuelles sur ces gènes chez les pathogènes, indiquent que la gamme de micro-organismes fournissant ces éléments, est beaucoup plus large. C'est le cas, par exemple, du gène de résistance aux quinolones Qnr A issu de *Shewanella algae* (**Poirel et al., 2005**) et la famille des β -lactamases CTX-M qui est originaire de *Kluyvera* (**Carton et al., 2012**), et ni l'un ni l'autre de ces micro-organismes est producteur d'antibiotique (**Martinez, 2014**). Dans ces microorganismes, ces gènes sont impliqués dans différentes fonctions autre que la résistance, tel est le cas, pour les pompes à efflux qui interviennent dans la signalisation intercellulaire, la communication avec les plantes et la virulence (**Martinez et al., 2009**).

Des études en métagénomiques ont montré que les gènes de résistances sont omniprésents dans plusieurs types d'environnements microbiens (**D'Costa et al., 2006 ; Sommer et al., 2009**), et étant donné que, les microbiotes de différents compartiments écologiques peuvent facilement échanger leur gènes (via le THG), il est donc, désormais, claire que l'environnement est une source vaste de gènes de résistance qui sont devenus accessibles aux membres du milieu microbien à travers les mécanismes de THG (**Aminov, 2011 ; Perry et al., 2016**). D'un point de vue évolutif, le phénomène de transfert horizontal (THG), s'est produit tout au long de l'histoire évolutionnaire. Cependant, ce qui s'est passé durant l'évolution des bactéries pendant plusieurs milliards d'années (avant l'ère d'antibiotique), ne peut être comparé au développement de la résistance au cours de ce dernier siècle (**Davies et Davies, 2010**). Cela, indique que l'usage des antibiotiques en thérapie, a eu un impact sur le développement de la résistance (**Martinez, 2014**). En effet, certaines études ont démontré que les antibiotiques et, spécialement, à des concentrations sub-inhibitrices, peuvent faciliter les processus de développement de la résistance par différents phénomènes, comme, l'induction de mutations ou la stimulation du THG (**Davies et Davies, 2010**). Par exemple, les quinolones sont connues depuis des années, pour leur effet mutagène chez les bactéries. Ces antibiotiques exercent leur action en inhibant l'ADN gyrase, ce qui provoque le blocage de la fourche de réplication, produisant un ADN simple brin qui conduit à l'induction du système SOS (**Ysern et al., 1990; Gocke, 1991**). De nombreuses recherches, ont révélé que, les concentrations sub-inhibitrices de quinolones, augmentent, comme prévu, la fréquence de mutants résistants chez certaines bactéries (l'augmentation des taux de mutations augmente la probabilité de l'émergence d'une résistance). Ainsi, chez *Streptococcus pneumoniae*, l'exposition à la ciprofloxacine, augmente, cinq fois plus, la

fréquence de mutants résistants à la rifampicine (**Henderson-Begg et al., 2006**). Par ailleurs, l'induction du SOS par les antibiotiques, peut être aussi impliquée dans la mobilisation de plusieurs éléments mobiles. Par exemple, Beaber *et al.*, a montré que le STX, un élément intégratif conjugatif (ICE), codant la résistance au chloramphénicol, sulfaméthoxazole, triméthoprim et streptomycine chez *Vibrio cholerae*, été transféré et intégré plus efficacement, lorsque le donneur est exposé à des concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine. Cela, a été expliqué par le fait que le SOS induit, été responsable d'une surexpression d'activateurs transcriptionnels requis pour l'excision et le transfert (**Beaber et al., 2004**).

Le développement de la résistance est aussi affecté par les pratiques de l'Homme. En effet, les antibiotiques ne sont pas utilisés, seulement en thérapie, mais aussi dans d'autres domaines comme, l'agriculture et l'élevage, cela, entraîne ainsi, l'augmentation des quantités de ces substances dans les habitats naturels et favorise donc, la dissémination de la résistance dans l'environnement (**Martinez, 2008**). Par exemple, il a été révélé que la contamination des eaux fluviales par les quinolones, enrichie les plasmides portants les gènes *qnr* présents dans les bactéries d'origine hydrique, ce qui peut constituer une première étape dans le transfert du gène vers les pathogènes (**Cattoir et al., 2008**). De plus, les bactéries pathogènes issues de l'environnement clinique, constitue un autre type de pollution qui peut aussi, participer dans l'extension de la résistance (**Martinez, 2008**).

Une fois que le gène de résistance est introduit dans le nouvel hôte, sa fonction se limite uniquement dans la résistance aux antibiotiques et perd son contexte biochimique et génétique qu'il avait dans sa souche originale (**Baquero et al., 2009**). De plus, ce gène peut encore évoluer sous l'effet de différentes forces sélectives des antibiotiques (**Martinez, 2014**). Cela, peut être illustré, par l'apparition des autres familles de β -lactamases après avoir utilisé de nouvelles β -lactamines et d'inhibiteurs de β -lactamases (**Novais et al., 2010**).

II.6- Les bactéries multirésistantes

Le traitement des infections bactériennes est compromis dans le monde entier par l'émergence de bactéries résistantes à de multiples antibiotiques (**Alekshun et Levy, 2007**). En effet, plusieurs bactéries pathogènes impliquées dans les maladies épidémiques sont devenues désormais, multirésistantes (MDR), héritage des derrières décennies d'utilisation et de mauvaise utilisation d'agents antimicrobiens (**Levy et Marshall, 2004**).

La résistance à plusieurs antibiotiques a été détectée la première fois chez les bactéries entériques à savoir *Shigella* sp, *Salmonella* sp au cours du dernier demi-siècle (**Watanabe, 1963 ; Levy, 2001**). Actuellement, plusieurs souches multiresistantes sont connus, comme : *Mycobacterium tuberculosis* (souches extrêmement résistantes [XDR]), les entérocoques résistante à la vancomycine (ERV), *Klebsiella pneumonia* avec une BLSE, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), SARM résistant à la vancomycine, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Davies et Davies, 2010**). Ces souches sont, en fait, apparues sous l'effet des pressions sélectives exercés, régulièrement, par les différents antibiotiques utilisés au fil des années, et qui ont entraîné des micro-organismes porteurs de types supplémentaires de mécanismes de résistance conduisant à une multirésistance, à l'instar des, nouvelles protéines de liaison à la pénicilline, des mécanismes enzymatiques de modification d'antibiotiques, et une expression améliorée pour les pompes à efflux (**Alekshun et Levy, 2007**).

La multirésistance peut être attribuée à des mutations chromosomiques (**Novais et al., 2010**), mais le plus souvent, elle est associée aux éléments extra chromosomiques acquis à partir d'autre bactéries. Cependant les mécanismes intrinsèques qui ne sont pas couramment codé par les éléments mobiles, tel que les pompes à efflux qui expulsent plusieurs antibiotiques, sont désormais reconnus, comme des contributeurs majeurs de la multirésistance (**Alekshun et Levy, 2007**). Les bactéries multiresistantes persistent et se propagent dans le monde entier, entraînant, ainsi, des problèmes dans les traitements cliniques et des crises de santé publiques (**Alekshun et Levy, 2007**).

Afin de combattre ces bactéries, les chercheurs ont eu recours à l'inhibition de certains mécanismes de résistance, comme les β -lactamases, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, en combinaison avec les β -lactamines (**Docquier et Mangani, 2017**). L'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam, sont les trois inhibiteurs classiques de β -lactamases (BLI), disponibles au marché. Cependant, après leur commercialisation, des isolats cliniques montrant une résistance à ces combinaisons (β -lactame / BLI) ont émergé dans le milieu clinique, ce qui a conduit à la découverte de nouvelles combinaisons plus efficaces, durant cette dernière décennie, comme: La combinaison **Ceftolozane / tazobactam** approuvée en 2015 en Europe, les combinaisons **Ceftazidime / avibactame**, **Céfépime / zidebactam** approuvées en 2016, et celle du **méropénem** avec le **vaborbactam** approuvée en 2017 aux USA (**Docquier et Mangani, 2017**).

Il semble important de signaler que ces combinaisons permettent, uniquement, de réduire la résistance aux β -lactamines. Or, comme il été montré ci-dessus, les mécanismes de résistance sont très diversifiés et le problème de multirésistance ne peut être résolu par l'inhibition d'un seul mécanisme. Par conséquent, d'autres solutions ont été proposées, pour combattre ce phénomène, parmi lesquelles, ont trouve, l'exploitation des produits naturels, comme les huiles essentielles de plantes, et qui fera l'objet de la suit de ce travail.

Chapitre 02
Les huiles essentielles (HEs)

Certaines plantes, sont connues pour la production de plusieurs métabolites secondaires dotés d'une grande diversité biologique et structurale, qui leur confèrent différentes propriétés dont, la protection contre les microorganismes pathogènes (**Gibbons, 2008**). Par conséquent, ces plantes, constituent une source unique et renouvelable pour la recherche de nouveaux composés antibactériens, afin de combattre la résistance aux antibiotiques. L'un des métabolites les plus exploités dans ces recherches, est appelé « **huile essentielle** » (**Chouhan et al., 2017**).

1- Généralités et définition

les huiles essentielles (HEs) sont des mélanges complexes de composés naturels, volatiles et aromatiques, synthétisés par les plantes comme métabolites secondaires, et isolées de celles-ci par distillation ou par une méthode mécanique sans chauffage (**Kalemba et Kunicka, 2003; Ugarte et al., 2019**). Elles sont contenues dans différentes parties de la plante comme, les fleurs (rose), feuilles (citronnelle), écorces (cannelier), racine (iris), fruit (vanillier), bulbes (ail), rhizome (gingembre), graine (muscade) (**Serrato-Valenti et al., 1997 ; Parthasarathy et al., 2008**).

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes comme, antimicrobiennes, insecticides et aussi contre les herbivores en réduisant leur appétit pour ces plantes. En revanche, elles peuvent également, attirer certains insectes pour favoriser la dispersion des pollens et des graines (**Bakkali et al., 2008**).

Grace à ces différentes propriétés biologiques naturelles, et à la diversité moléculaires de ses composants, les huiles essentielles, sont devenues une matière première de valeur très estimable, utilisée dans plusieurs domaines comme :

- **En cosmétologie** : les HEs ou certains de leurs composés, sont utilisés dans les parfums et les produits de maquillage. Par exemple, la d-limonène, l'acétate de géranyl ou le d-carvone, sont employés dans les savons, les crèmes, les détergents (**Bakkali et al., 2008**).

- **En industrie alimentaire** : les HEs sont utilisées comme aromes et aussi comme conservateurs alimentaire (**Hyldgaard et al., 2012**). Cependant, l'obstacle de cette utilisation est que l'inhibition de la croissance microbienne dans les aliments requière des concentrations élevées d'HE, et une forte concentration entraîne des effets organoleptiques indésirables ce qui limite leur incorporation dans les systèmes de conservation des aliments (**Burt, 2004**). Certaines études ont montré, qu'une large gamme d'agents antimicrobiens dérivés des

HEs a le potentiel d'être utilisée dans les systèmes d'emballages antimicrobiens actifs des produits alimentaires (**Kuorwel et al., 2011**).

- **En agriculture** : les pesticides naturels basés notamment sur les huiles essentielles représentent une alternative pour la protection des cultures contre les insectes et les champignons (**Isman, 2000 ; Dayan et al., 2009**).

- **En domaine médical et pharmaceutique** : La citronnelle a été largement utilisée à des fins médicinales, en particuliers sous forme de thé et dans les industries pharmaceutiques (**Martinazzo et al., 2010**). Cependant, l'utilisation pharmaceutique des HEs, est conditionnée par l'agence européenne des médicaments (EMA) et l'agence américaines de produits alimentaires et médicamenteux (FDA), qui exigent la contribution de tous les composants d'un médicament dans son efficacité (**Wagnes et Ulrich-Merzenich, 2009 ; FDA, 2010 ; EMA, 2015**). Or, dans le cas des HEs, la complexité de leur composition chimique, rend difficile la détermination de l'efficacité antimicrobienne de chaque composé, ainsi que son profile pharmacodynamique et pharmacocinétique (**Radulovic et al., 2013**).

Certains huiles essentielles ou leurs composants sont classées comme sains par la FDA et approuvées par la commission européenne (**2012**), pour leurs utilisations comme arômes alimentaires à des concentrations limitées. Ces huiles pourraient donc être sans danger à de petites doses pour l'usage thérapeutique. Cependant, considérant le principal mode d'action des HEs concernant les dommages de la membrane cellulaire, il est peu probable qu'elles soient sélectivement toxiques aux cellules procaryotes. Par conséquent, leur application thérapeutique peut être limitée par rapport aux antibiotiques, qui sont, en revanche, toxiques de manière sélective (**Owen et Laird, 2018**). En effet, de nombreuses recherches ont montré une toxicité des HEs contre les cellules eucaryotes, y compris les champignons (**Gakuubi et al., 2017; Noreikaite et al., 2017**), les larves (**Benelli et al., 2017a ;2017b**) et les mollusques (**Dias et al., 2013; Benelli et al., 2015**). D'autres études *in vivo* sur les rongeurs ont rapporté aussi que, plusieurs composants d'HEs comme, l'estragole, l'eugénol, le trans-anéthol, la pulgeone et la berbérine, sont génotoxiques, cancérigènes ou hépatotoxiques (**Kristanc et Kreft, 2016a ; 2016b**).

Chez les humains, une cytotoxicité sur des lignées cellulaires a été signalée à plusieurs occasions (**Rashid et al., 2013 ; Amaral et al., 2015**). Toutefois, peu de rapports *in vivo* sur la toxicité des HEs ingérés, apparaissent dans la littérature, et ils concernent principalement des cas d'ingestion accidentelle. Ces rapports, impliquent souvent de grandes quantités d'HE et ne

sont donc pas nécessairement représentatifs de la toxicité à des doses thérapeutiques potentielles (**Hammer et al., 2006**). L'effet indésirable le plus courant des HEs utilisées en aromathérapie était, la dermatite, mais des réactions sévères comme l'insuffisance rénale, détresse respiratoire, convulsions, ataxie et coma, ont été également signalées (**Owen et Laird, 2018**). Un rapport de décès a été décrit chez un homme de 80 ans, suite à l'administration orale et topique d'HE de gaulthérie (**Posadzki et al., 2012**).

Ces données n'élucident pas la fréquence des effets indésirables liés à l'administration de l'HE, et d'autres recherches *in vivo* sont donc nécessaires pour déterminer leur innocuité chez l'homme. En outre, les données de toxicité de certaines HEs ne peuvent être extrapolées sur toutes les huiles, ni sur les différentes variétés d'une huile, ce qui rend la standardisation des HEs, nécessaire pour une utilisation thérapeutique potentielle (**Owen et Laird, 2018**).

2- Historique

L'homme se sert des vertus thérapeutiques des plantes pour son bien-être, depuis la nuit des temps. Celui-ci, sélectionnait, de façon empirique, les plantes bénéfiques, pendant des siècles, accumulant ainsi des connaissances qu'il a transmises oralement aux descendants. Ce savoir ancestral, a été ensuite manuscrit dans des écrits nommés pharmacopées, et c'est aux civilisations du Proche-Orient antique qu'on doit les documents les plus anciens rapportant les bienfaits curatifs de centaines de plantes (**Mazars, 2002**). La Grèce antique, par exemple, détient les célèbres « *Corpus Hippocraticum* » écrit par les disciples d'Hippocrate après sa mort vers l'an 377 av J-C, et « *De Materia Medica* » écrit au premier siècle ap. J-C par Dioscoride. Ces deux textes sont consacrés en grande partie aux plantes médicinales (**Pikoulis et al., 2008 ; Quetin-Leclercq, 2002**). Les Chinois, les Indiens, les Romains et les Arabes se servaient également de l'herboristerie, dans leurs principes philosophiques, traditions et les pratiques de leur culture (**Sakkas et Papadopoulou, 2016**).

Concernant les HEs, seule l'huile de térébenthine, a été mentionnée par les historiens Grecs et Romains (**Guenther, 1948**). Les Egyptiens de l'époque pharaonique se servaient de vertus antimicrobiennes des essences des plantes en les utilisant dans leurs techniques d'embaumement. Cependant, ces essences n'étaient probablement pas extraites par distillation mais en imbibant les plantes aromatiques dans de la graisse animale ou en les trempant dans des huiles végétales comme l'huile d'olive ou de sésame (**England, 1993**). La distillation en tant qu'une méthode de production de HE, a été utilisée pour la première fois dans l'East (l'Inde et Perse) il y a plus de 2000 ans (**Guenther, 1948**), mais, le procédé de distillation

utilisé de nos jours fut mis au point et perfectionné par Avicenne, vers l'an 1000, qui extrait la première huile essentielle pure, à partir de *Rosa centifolia* (**Lardry, 2007**).

La première revue d'utilisation des huiles essentielles pour des raisons thérapeutiques a été retrouvée dans l'Ebers papyrus. Ce document cite en détail plus de 800 remèdes et traitements par les HEs et montre que la « myrrhe » est un ingrédient important, souvent mélangé avec du miel et d'autres herbes, en raison de sa capacité à inhiber la croissance bactérienne (**Bassolé et Juliani, 2012**). Au début du 13^{ème} siècle, les huiles essentielles ont été fabriquées dans les pharmacies et leurs effets pharmacologiques ont été décrits dans les pharmacopées (**Bauer et al., 2001**), mais leur utilisation ne s'est pas propagée en Europe jusqu'au 16^{ème} siècle (**Crosthwaite, 1998**), et c'est d'ailleurs à cette époque, que ce terme « huile essentielle » leur a été attribué par Paracelsus Von Hohenheim, qui a fait référence à l'élément efficace d'une drogue par le nom « Quinta essentia » (**Guenther, 1950**).

La première mesure expérimentale de l'activité bactéricide des HEs a été réalisée par DE LA CROIX en 1881 (**Boyle, 1955**). Cependant, depuis cette époque, l'utilisation des HEs en médecine est devenue, graduellement, secondaire par rapport au domaine alimentaire (**Guenther, 1948**), et ce n'est qu'en 2006, que la FDA a approuvé la commercialisation du premier produit botanique, un extrait de feuille de thé vert de Chine en tant que médicament sur ordonnance pour le traitement des verrues génitales et périnatales externes, sous le nom de « veregen » (**Chen et al., 2008**).

3- Caractéristiques des huiles essentielles

3.1- Propriétés physiques

Les huiles essentielles sont volatiles et deviennent liquides à température ambiante, elles peuvent être incolores ou avoir des couleurs différentes allant du jaune pâle au vert émeraude, et du bleu au rouge brunâtre foncé (**Balz, 1999 ; Aljaafari et al., 2019**). De plus, les HEs sont moins denses que l'eau, à l'exception des sassafras et des essences de clou de girofle (**Arriaza, 2010**). En fin, ces produits peuvent être liposolubles ou solubles dans l'alcool et les solvants organiques, mais elles sont très peu solubles dans l'eau (**Arriaza, 2010 ; Jilani et Dicko, 2012**).

3.2- Composition chimique

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (**Kalemba et Kunicka, 2003; Burt, 2004**). L'étude de la composition chimique est effectuée, généralement, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (**Bakkali et al., 2008, Khoddami et al., 2018**), mais, la résonance magnétique nucléaire (RMN) peut être également utilisée (**Tomi et Casanova, 2006**).

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composés à des concentrations assez différentes. Elles sont caractérisées par deux ou trois composants majoritaires ayant des taux élevés (20 à 70%) par rapport aux autres, qui sont sous forme de traces (minoritaires). Généralement, ces composants majoritaires déterminent les propriétés biologiques d'une huile essentielle. Ils peuvent varier même entre les huiles essentielles extraites de la même espèce de plante, ce qui constitue un critère de classification de ces huiles en une sous-catégorie appelée « chémotype » (**Kalemba et Kunicka, 2003; Bakkali et al., 2008**). Par exemple, des chémotypes de linalool, d'eugénol, de méthyle chavicol ou néral, ont été décrits dans les HEs issues de différents cultivars d'*Ocimum basilicum* (**Dudai et al., 2017**). Des exemples de HEs, avec leur composant majoritaire sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau 03 : Composants majoritaires de certaines huiles essentielles

Composés	Exemple d'huile essentielle	Référence
Menthone	<i>Mentha piperita</i> (21.8%)	Vivian Tullio et al., 2019
Carvone	<i>Anethum graveolens</i> (graine) (58%)	Shaaban et al., 2012
1,8 cinéole	<i>Thymus mastichina</i> (74.2 %)	Maria Vieira et al., 2017
	<i>Rosmarinus officinalis</i> (33.88 %)	Chraibi, et al., 2020
Cryptone	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (7.59 %)	Knezevic et al., 2015
Géraniol	<i>Thymus pulegioides</i> (66.59 %)	Miladinović et al., 2013
Carvacrol	<i>Origanum compactum</i> (30 %)	Shaaban et al., 2012
Cinnamaldehyde	Cannellier du genre <i>Cinnamomum</i>	Jess Vergis et al., 2015
Eugénol	<i>Cinnamomum tamala</i>	Heer et al., 2017

Les constituants d'HEs, appartiennent de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés des origines biosynthétiques distinctes (**Croteau et al., 2000; Betts, 2001 ; Pichersky et al., 2006**):

- Le groupe des terpènes et des terpénoïdes (plus fréquents).
- Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (moins fréquents).

3.2.1- Les terpènes et les terpénoïdes

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures très varié au niveau fonctionnel et structural. Ils sont formés à partir de la combinaison de plusieurs unités à cinq carbones (C₅) appelé « isoprène » (C₅H₈). La biosynthèse des terpènes se fait dans le cytoplasme, et elle consiste d'abord à la synthèse du précurseur, isopentylpyrophosphate (IPP), par la voie de l'acide mévalonique, qui débute à partir de l'acetyl-CoA. Puis grâce à des réactions enzymatiques, les IPPs sont additionnés de manière répétitive pour former le prényldiphosphate, précurseur des différentes classes de terpènes. Le prényldiphosphate allylique subit des réarrangements par des synthétases spécifiques, pour former le squelette du terpène, et enfin, des modifications enzymatiques secondaires (réactions redox) du squelette, permettent d'attribuer les propriétés fonctionnelles aux différents terpènes. Les monoterpènes (C₁₀) et les sesquiterpènes (C₁₅) sont les principaux terpènes présents dans les HEs, mais des chaînes plus longues comme, les diterpènes (C₂₀) et les triterpènes (C₃₀) etc., peuvent aussi exister (**Bakkali et al., 2008 ; Chouhan et al., 2017**).

Des modifications biochimiques des terpènes par des enzymes qui ajoutent des molécules d'oxygène et déplacent ou éliminent des groupements méthyle, entraînent la formation des terpénoïdes (**Caballero et Trugo, 2003**), et selon la fonction biochimique formée, on distingue (**Bakkali et al., 2008**): Alcool (Linalol), aldéhyde (citronnellal), cétone (carvone), ether-oxyde (1,8 cinéole), phénol (carvacrol, thymol), ...etc.

3.2.2- Les composés aromatiques (phénylpropènes)

Chez les plantes, la synthèse des phénylpropènes se produit à partir de l'acide aminé phénylalanine. Ce dernier est synthétisé par la voie de l'acide shikimique (**Maeda et Dudareva, 2012**), et il constitue à son rôle, un précurseur à partir duquel dérive une sous-famille parmi les divers groupes de composés organiques, appelés phénylpropanoïdes. Une proportion relativement faible d'huiles essentielles est composée de phénylpropènes, et les

plus étudiés sont le safrole, l'eugénol, l'isoeugénol, la vanilline et le cinnamaldéhyde (Chouhan *et al.*, 2017).

Les HEs peuvent contenir aussi un certain nombre de produits de dégradation différents, provenant d'acides gras insaturés, lactones, glycosides et composés contenant du soufre et l'azote (Caballero *et al.*, 2003). L'isothiocyanate d'allyle et l'allicine sont deux exemples de composés contenant du soufre et l'azote, et qui sont connus par une activité antibactérienne (Hyldgaard *et al.*, 2012)

Certains composants d'HEs connus, ainsi que leur structure, sont illustrés dans la figure suivante:

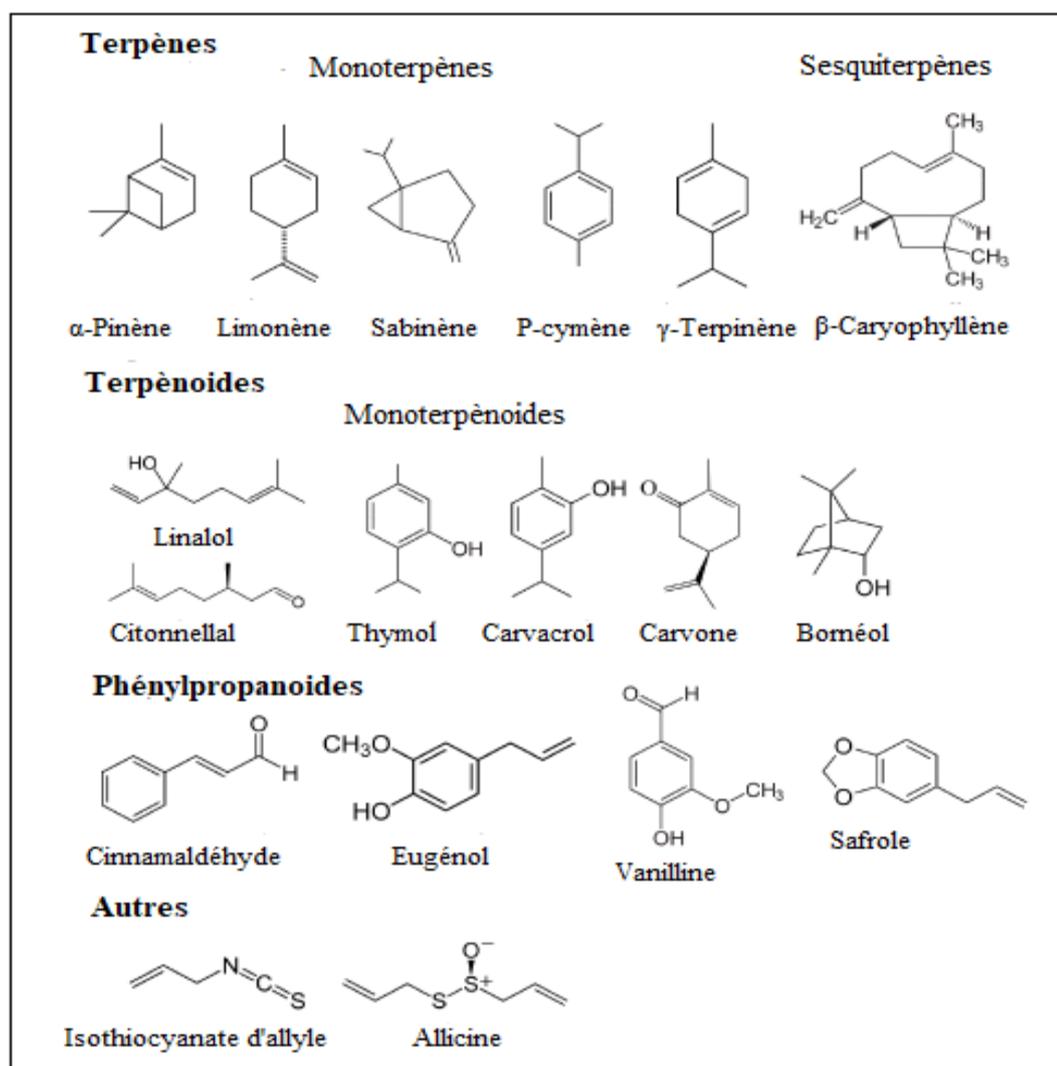


Figure 05 : Structures chimiques de certains composants d'huile essentielles (Hyldgaard *et al.*, 2012)

4- Techniques d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues à partir de matières premières végétales par plusieurs méthodes (Dick et Starmans, 1996; Wang et Weller, 2006). Le choix de la technique d'extraction dépend du matériel botanique utilisé, l'état et la forme du matériel. La méthode d'extraction est l'un des principaux facteurs qui déterminent la qualité de l'huile essentielle, car, une procédure d'extraction inappropriée, peut endommager ou altérer l'action de la signature chimique de l'huile (Phakawat et Benjakul, 2014).

Ces méthodes peuvent être classées en deux catégories: Méthodes conventionnelles (classiques) et méthodes innovantes (avancées) (El Asbahani *et al.*, 2015)

4.1- Méthodes conventionnelles (classiques)

4.1.1- L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur

Les HEs sont généralement obtenus par hydrodistillation ou entraînement à la vapeur, dont le principe est schématisé dans la (Figure 06). Ces deux procédés se basent sur la technique de **distillation**, qui a été développée pour la première fois au Moyen Âge par les Arabes (Chouhan *et al.*, 2017). A l'échelle du laboratoire, la méthode classique s'effectue grâce à un appareil de distillation, Clevenger, découvert en 1928, et qui a été, ensuite, perfectionné par Jakub Deryng en 1951 (Deryng, 1951).

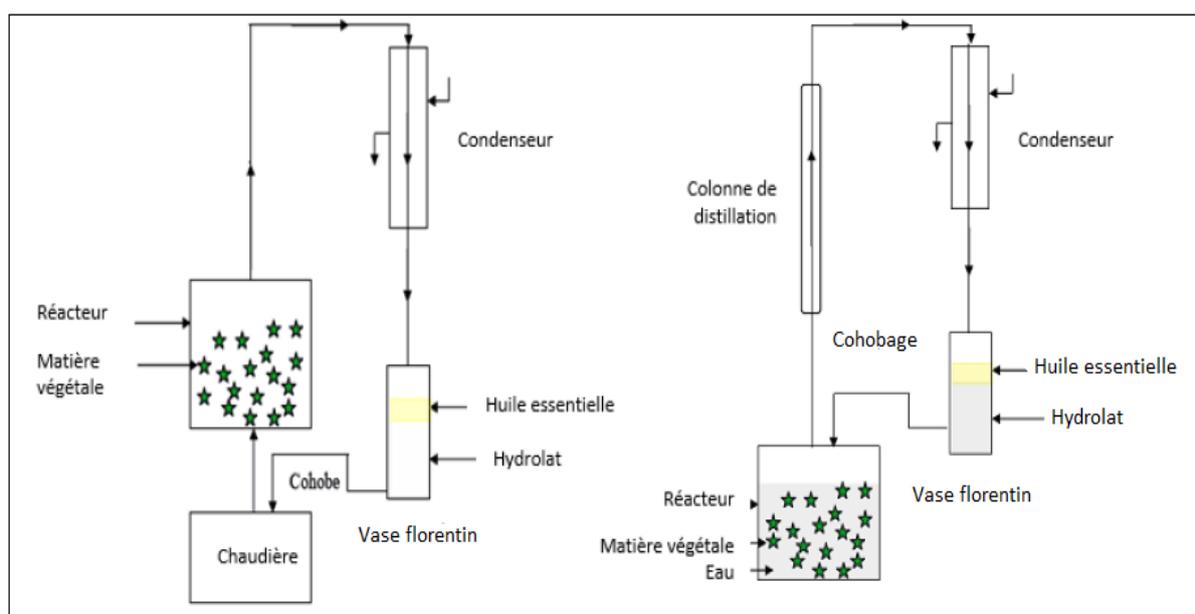


Figure 06 : Principe schématisé de l'extraction à l'entraînement à la vapeur (à gauche) et de l'hydrodistillation (à droite) (Boukhatem *et al.*, 2019).

L'hydrodistillation est la méthode la plus anciennement utilisée. Elle consiste à l'immersion complète de la matière végétale dans l'eau, et le tout est porté à ébullition, généralement, à pression atmosphérique (**El Asbahani et al., 2015**). La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes, qui seront entraînées par la vapeur d'eau, puis condensé (**Bruneton., 1999**). L'eau étant, non miscible avec la majorité des molécules d'HEs, ces dernières sont donc, facilement séparées de l'eau par une simple décantation, après condensation (**El Asbahani et al., 2015**). Cette méthode protège les huiles extraites avec un certain degré, puisque, l'eau environnante agit comme une barrière empêchant leur sur-chauffage (**Phakawat et Benjakul, 2014**). De plus, elle permet le recyclage des condensats grâce à un système de cohobage. Cependant, elle présente tout de même des inconvénients comme : la longue durée d'extraction (3h à 6h), l'altération de certains terpènes à cause de leur contact prolongé avec l'eau bouillie, et la perte de certaines molécules polaires dans l'eau (**El Asbahani et al., 2015**).

L'entraînement à la vapeur est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HEs. A la différence de l'hydrodistillation, ce procédé ne met pas en contact direct l'eau et la matrice végétale à traiter (**Masango, 2005**). La vapeur d'eau est, dans ce cas, générée par une chaudière et traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant son passage, les cellules végétales éclatent et libèrent l'huile essentielle qui se vaporise et se véhicule avec la vapeur d'eau, puis se condense dans le réfrigérant serpentin. Le mélange « huile + eau », est enfin, séparé dans un essencier en une phase aqueuse et une phase organique, grâce à la différence de densité de ces deux liquides (**Raaman, 2006; Da Silva, 2010**). L'absence du contact direct entre l'eau et le végétale, ainsi qu'avec les composés aromatiques, et la réduction de la durée d'extraction, minimisent les altérations chimiques de certains molécules qui peuvent nuire à la qualité de l'huile essentielle (**El Asbahani et al., 2015**).

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Dans ce cas, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant (par le haut de la matière végétale). Cette méthode se caractérise par un temps de traitement plus court et d'un rendement en huile plus élevé avec moins de vapeur utilisée (**Phakawat et Benjakul, 2014; El Asbahani et al., 2015**).

4.1.2- Extraction par solvant

L'extraction des HEs par cette méthode, consiste à placer la matière végétale avec un solvant volatil dans un extracteur, et grâce à des lavages successifs, le solvant se charge en molécules aromatiques (**Hesham et al., 2016**). Le mélange obtenue est ensuite, chauffé afin

d'éliminer le solvant, et d'obtenir ainsi un produit concentré appelé « concrète » (une combinaison de cire, de parfum et d'HE). Ce concentré, est ensuite mélangé avec de l'alcool pur, et distillé à basse température. L'alcool absorbe le parfum et, après son évaporation, la concrète est glacée, puis, filtrée pour éliminer les cires. Le liquide aromatique obtenue, est appelé « absolue » (**Phakawat et Benjakul, 2014**). Cette technique se caractérise par un rendement plus important par rapport à la distillation, est elle se fait à des températures très faibles, permettant d'éviter certaines types d'altérations chimiques. Elle est par conséquent, utilisée pour les matières florales fragiles, qui ne tolèrent pas la chaleur de la distillation, et qui sont délicates pour produire de grandes quantités d'huile (**Hesham et al., 2016**). Cependant, les solvants impliqués, peuvent entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer (**Faborode et Favier, 1996**). De plus, la durée de ce processus est relativement longue, ce qui rend les huiles plus chères que les autres méthodes (**Li et al. 2009**). Les solvants les plus utilisés, actuellement, sont l'hexane, cyclohexane et l'éthanol.

4.1.3- Expression à froid

C'est une méthode traditionnelle pour extraire les HEs à partir de zeste d'agrumes. Elle est basée sur la rupture mécanique des parois des sacs oléifères présents dans l'écorce des fruits, en appliquant une pression à froid. L'huile contenue dans ces sacs est ainsi libérée sous forme d'émulsion aqueuse, puis, récupéré par centrifugation (**Ferhat et al., 2007**). Dans ce cas, le produit obtenu est appelé « essence végétale » de zeste d'agrumes, qui est très utilisée dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire (**Hesham et al., 2016**).

4.2- Méthodes innovantes

Les nouvelles techniques d'extraction développées durant ces dernières années, ont permis, l'obtention d'HEs de bonne qualité, dans un temps réduit, et avec moins d'énergie consommée, en comparaison aux méthodes classiques (**Hesham et al., 2016**).

4.2.1- Extraction par fluide à l'état supercritique

L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique, dite SFE, provient de l'utilisation de solvants dans leur état supercritique, qui est atteint en augmentant la température et la pression au-delà d'un certain point, dit point critique. Le solvant se retrouve ainsi, dans un état intermédiaire à la phase liquide et gazeuse (fusion des phases), où il se

caractérisée par : une densité proche de celle des liquides, une viscosité faible et une diffusivité élevée, ainsi qu'un pouvoir de solvatation accru (Leszczynska, 2007). Le dioxyde de carbone (CO₂), est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des HEs, car, il présente de nombreux avantages, incluant, la facilité de son obtention (faible température et pression critiques), et sa disponibilité à haute pureté et à faible prix. De plus, le CO₂ est non toxique, ininflammable, inerte, et il peut être éliminé aisément de l'extrait. La limite principale de ce solvant est son manque de polarité pour l'extraction des composants polaires, et le seul obstacle du développement de cette méthode est le coût élevé des équipements, de leurs installations et de leurs opérations de maintenance (El Asbahani *et al.*, 2015 ; Hesham *et al.*, 2016).

4.2.2- L'extraction assistée par chauffage micro-ondes (MAE)

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques qui occupent une bande de fréquence allant de 300 MHz à 30 GHz, et une longueur d'onde de 1mm à 1m. Généralement, la fréquence utilisée est de 2450 MHz, qui correspond à une longueur de 12.2 cm. L'usage des micro-ondes a évolué avec le développement du concept d'extraction verte et la nécessité de nouvelles méthodes économes en énergie (El Asbahani *et al.*, 2015). Actuellement, l'extraction assistée par micro-ondes regroupe différents procédés comme : l'extraction par micro-ondes sans solvants (SFME) (Lucchesi *et al.*, 2004), la distillation à vapeur par micro-ondes (Sahraoui *et al.*, 2008), et l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAHD) (Golmakani et Rezaei, 2008), qui est illustré dans la figure suivante :

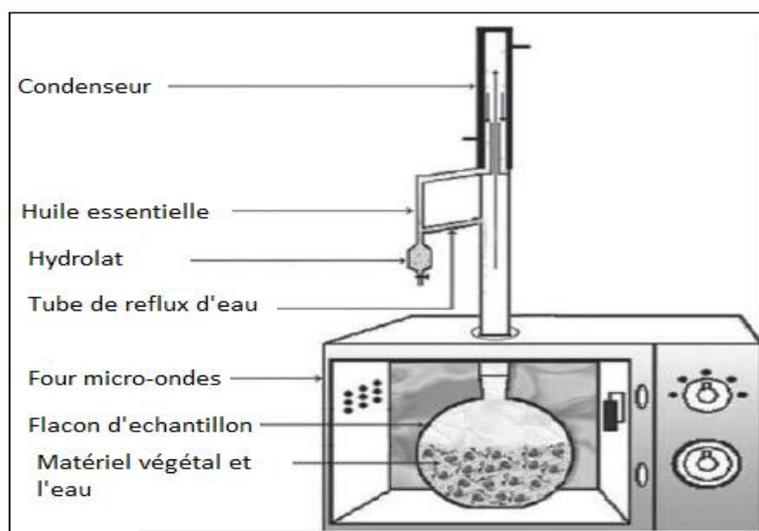


Figure 07 : Hydrodistillation assistée par micro-ondes (Hesham *et al.*, 2016)

L'utilisation des micro-ondes présente l'avantage de réduire considérablement la durée d'extraction et d'incrémenter le rendement en HE, toutes en économisant de l'énergie (El Asbahani *et al.*, 2015).

4.2.3- L'extraction assistée par ultrasons (UAE)

Cette technique a été développée en 1950 à l'échelle du laboratoire. Elle consiste à immerger le matériel végétal dans l'eau ou dans un autre solvant, en le soumettant, simultanément, à des ondes ultrasoniques. Ces dernières ont une fréquence de 20 KHz à 1 MHz, et elles induisent une vibration mécanique des parois et des membranes de cellules végétales, permettant ainsi, la libération rapide de gouttelettes d'HE (El Asbahani *et al.*, 2015). Le mécanisme d'extraction implique deux phénomènes : la diffusion à travers la paroi cellulaire et le lavage du contenu cellulaire une fois que les parois sont cassées (Vinatoru, 2001). Après extraction, le solvant est éliminé sous vide (Kamran Khan *et al.*, 2010). Cette technique a été utilisée pour l'extraction de plusieurs HEs, particulièrement, à partir des graines (Karim Assami, 2012 ; Sereshti *et al.*, 2012). L'UAE améliore l'efficacité et le taux d'extraction, réduit la température d'extraction et augmente les plages de sélection des solvants (Romanik *et al.*, 2007). De plus, l'équipement utilisé est relativement simple est moins coûteux par rapport au MAE (El Asbahani *et al.*, 2015).

5- Les activités biologiques des huiles essentielles

La diversité moléculaire des huiles essentielles leur confère des propriétés biologiques très variés (Sakkas et Papadoupoulou, 2016). Plusieurs huiles sont connues pour leurs propriétés antifongiques, antivirales, antioxydantes, antibiofilms, anti-inflammatoire, anticancéreuse et antibactériennes (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Les propriétés antioxydantes des HEs sont largement étudiées (Raskovic *et al.*, 2014; Bag et Chattopadhyay, 2015; Chraïbi *et al.*, 2020). Le stress oxydatif, qui survient lors du déséquilibre entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies, telles que l'Alzheimer, l'artériosclérose et le cancer. Une façon de prévenir ce stress, est de chercher un apport supplémentaire de composés antioxydants, comme les Hes (Ugarte *et al.*, 2019). L'activité antivirale de l'HE d'eucalyptus, d'arbre de thé, du thym et de certains composants (Thymol, 1,8 cineole) a été observé, *in vitro*, contre le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) (Astani *et al.*, 2009). De plus, Battistini *et al.*, (2019) a montré *in vivo*, l'activité antivirale de l'HE de *Citrus limon*, et *Rosmarinus*

officinalis chémotype 1.8 cinéole contre le VHA (virus Hépatite A) (transmi par les aliments frais), sur des fruits de baies, cela, pourrait fournir ainsi, une solution, pour limiter la contamination par les produits frais. Concernant l'activité antifongique, l'HE de «Menthe de Pancalier», s'est montrée active, contre des levures (*Conidia albicans*) et des dermatophytes (*Trichophyton mentagrophytes*) (Tullio *et al.*, 2019). Par ailleurs, cette HE, inactive, également, *Saccharomyces cerevisiae*, l'une des espèces responsable de détérioration de jus de fruits (Almeida *et al.*, 2019).

La capacité des HEs à empêcher la formation de biofilm a été démontrée dans plusieurs études. Ainsi, les HEs de *T. mastichina*, *D. viscosa*, *M. pulegium* et *R. officinalis* étaient assez efficaces pour entraver la formation des biofilms (Vieira *et al.*, 2017). Par ailleurs, Cabarkapa *et al.*, (2019) a révélé que l'HE d'*Origanum heracleoticum*, d'*Origanum vulgare*, de *Thymus vulgaris* et de *Thymus serpyllum* et leurs composants (carvacrol et thymol), sont capables de prévenir, ou au moins d'interférer avec la formation de biofilm et aussi, éradiquer les biofilms préformés.

Les microorganismes pathogènes, les composés irritants ou les tissus endommagés induisent une réponse inflammatoire aiguë qui peut persister pendant une courte période, ce qui est bénéfique pour l'hôte. Par contre, si le stimulus persiste, l'inflammation devient chronique, ce qui prédispose les hôtes à différentes maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurologiques et les troubles métaboliques (Ugarte *et al.*, 2019). Les HEs peuvent être utiles pour réduire l'inflammation en régulant négativement la production de facteurs modulateurs de l'inflammation (facteur de nécrose tumorale (TNF), interleukines (IL), de thromboxane et de leukotriène (Andrade et Sousa, 2013).

Dans une étude réalisée par Usjak *et al.*, (2017), il a été révélé que, l'HE *Heracleum pyrenaicum* inhibe la croissance des cellules malignes, tout en épargnant les cellules normales. Ce qui montre la capacité des HEs à prévenir l'apparition de cancer.

L'activité antibactérienne sera détaillée dans le chapitre suivant.

Chapitre 03
Activité antibactérienne des HEs et
Leurs effets synergiques

I- Activité antibactérienne des HEs seules

I.1- L'activité antibactérienne des HEs et leurs composants

Depuis la première mise en évidence de l'action des HEs contre les bactéries, par Delacroix en 1881, de nombreuses études ont été réalisées sur cette activité, et plusieurs huiles ont été définies comme antimicrobiennes (**Brut, 2004; Bakkali et al., 2008**). Toutes les huiles essentielles testées jusqu'à présent, possèdent une certaine activité antimicrobienne. Cette dernière, varie d'une huile à l'autre et d'une souche testée à l'autre, mais elle est toujours dépendante de la dose (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Plusieurs HEs montrent un spectre d'action très étendu. Cela a été constaté depuis longtemps (**Dorman et Deans 2000, Oussalah et al., 2007**), et confirmé par des études plus récentes. Par exemple, l'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha piperita*), de coriandre (*Coriandrum sativum*) et de l'anis (*Pimpinella anisum*) ont été actives contre des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*) (**Bazargani et Rohloff 2016**). De plus, Khoddami et al. (2018), a révélé, grâce à la méthode de diffusion sur gélose, que l'HE de *Semenovia suffruticosa* avait une très bonne activité contre différentes souches dont, *B. subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *A. baumannii*. En fin, l'HE de cannelle, de clou de girofle, d'eucalyptus, d'origan, de thym et de romarin, ont démontré, également, une activité contre, *E. coli*, *S. aureus*, *Trueperella pyogenes* et *Fusobacterium necrophorum* (**Braga Paiano et al., 2019**). Ces exemples, démontrent bien, la bonne activité antibactérienne des HEs, qui s'étale sur un grand nombre de genres bactériens, ce qui leur permettrait ainsi, d'avoir une large gamme d'application comme agents antibactériens (**Owen et Laird, 2018**).

L'activité antibactérienne des HEs est strictement liée à leur composition chimique (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Dans de nombreux cas, cette activité résulte de l'interaction complexe entre les différentes classes de composants présents dans l'huile essentielle (**Burt, 2004; Bassolé et Juliani, 2012**). Cependant, quelques études ont montré qu'un certain nombre de ces composés, présentent des propriétés antimicrobiennes significatives lorsqu'ils sont testés séparément (**Bajpai et al., 2012; Hammer et Heel, 2012; Aelenei et al., 2018**), et de même que les HEs, plusieurs de ces composants individuels, inhibent une large gamme de bactéries (**Owen et Laird, 2018**). Par exemple, le carvacrol, l'eugénol, linalol et le thymol ont inhibé *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Brochothrix thermosphacta* à des CMI variant entre 0.025 et 0.15% (V/V) (**Mith et al., 2014**). Par ailleurs,

Wongkattiya *et al.* (2019) a démontré que le cuminaldéhyde, le composé principal de l'HE de *Cuminum cyminum*, exerçait une bonne activité antibactérienne contre, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella Typhi*, avec des zones d'inhibition arrivant jusqu'à 28 mm. En revanche, les antibiotiques conventionnels ont souvent un spectre d'action étroit ; les glycopeptides, par exemple, n'inhibent que les bactéries à Gram positif (Finch *et al.*, 2012). Généralement, la présence de l'un ou plusieurs de ces composants en quantité majoritaire dans une HE, reflète assez bien les propriétés biologiques de celle-ci (Bakkali *et al.*, 2008). Ainsi, l'activité élevée du genre *thymus* ou *origanum* est attribué à la présence de composés phénoliques comme le thymol et le carvacrol (Lambert *et al.*, 2001; Hazzit *et al.*, 2009 ; Sokovic *et al.*, 2009), et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la « Menthe de Pancalier », peut être principalement liée à sa richesse en menthol et / ou à la menthone (Samber *et al.*, 2015).

Toutes les recherches réalisées sur l'activité des HEs, ont pour but de trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes qui pourront être exploitées dans différents domaines. Dans le domaine médical, par exemple, l'huile essentielle de *thymus vulgaris* a montré une activité contre des souches de *Streptococcus pyogenes*, isolées de la gorge des patients atteints d'une pharyngite bactérienne aiguë et d'une inflammation de la gorge (Fani et Kohanteb, 2017). De plus, Oliveira *et al.* (2019), a révélé les bons effets antimicrobiens de l'HE de *Cymbopogon citratus* à la fois *in vivo* et *in vitro* contre des souches du genre *Staphylococcus spp*, suggérant ainsi la possibilité de l'exploitée pour traiter les infections nosocomiales.

L'huile essentielle de basilic peut être utilisée dans le domaine alimentaire. Elle contient principalement du **linalol** et du **méthylchavicol** qui sont les responsables de son activité antimicrobienne (Suppakul, 2004). Ainsi, Suppakul *et al.* (2006, 2008) a rapporté que le **linalol** incorporé dans un film LDPE (polyéthylène à basse densité) présentait une activité inhibitrice contre la croissance de *S. aureus*, *Listeria innocua* et *E. coli* sur les milieux de culture et à la surface du fromage cheddar. Lee *et al.* (2020) a traité la bactérie lactique *Leuconostoc citreum* (connue comme responsable de la détérioration des aliments et des boissons (Laguerre *et al.*, 2012 ; Bucka-Kolendo et Sokolowska, 2017) avec 24 huiles essentielles, et ils ont montré que le thym et l'origan présentent une activité élevée *in vitro* et *in vivo* sur le jus de tomate.

I.2- Mécanismes d'action des huiles essentielles

Bien que les propriétés antibactériennes des HEs et leur composants ont été examinées depuis longtemps (Koedam, 1977a,b; Shelef, 1983; Nychas, 1995), le mécanisme d'action n'a pas été étudié en grand détail (Lambert *et al.*, 2001). Connaissant, les différents groupes de composants contenus dans les HEs, il est peu probable que leur activité soit attribuable à un seul mécanisme spécifique, mais, il existe plutôt plusieurs modes de ciblage de la cellule bactérienne (Sakkas et Papadopoulou, 2016). En effet, les HEs et leurs principaux constituants inhibent les bactéries via une gamme de mécanismes tels que : la perturbation de la paroi (Helander *et al.*, 1998); déstabilisation de la membrane plasmique (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1994), endommagement des protéines membranaires (Juven *et al.*, 1994 ; Ultee *et al.*, 1999), fuite de constituants intracellulaires tels que les métabolites et les ions (Lambert *et al.*, 2001), coagulation du contenu cellulaire (Gustafson *et al.*, 1998), et l'épuisement de la force proton-motrice (Ultee et Smid, 2001). Ces mécanismes ne sont pas tous des cibles distinctes ; certains résultent du ciblage d'un autre (Brut, 2004).

Les modes d'action, les plus fréquemment rapportés sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Mécanismes d'actions antibactériens des HEs et leurs composants
(Langeveld *et al.*, 2013)

L'HE ou composé	Mode d'action	Références
L'huile d'origan	Réduction de l'activité de la lipase et coagulase, inhibition enzymatique	Carneiro de Barros <i>et al.</i> , 2009
Carvacrol	Perturbation membranaire, inhibition de l'ATPase, fluidisation de la membrane lipidique, fuite d'ions cellulaire, réduction de la force proton-motrice	Di Pasqua <i>et al.</i> , 2007; Gill et Holley, 2006a, b; Ultee <i>et al.</i> , 2002
Thymol	Perturbation de la membrane avec des cibles intracellulaires potentielles, Perturbation de la voie métabolique du citrate	Di Pasqua <i>et al.</i> , 2007, 2010; Trombetta <i>et al.</i> , 2005
P-Cymène	Perturbation de la membrane	Ultee <i>et al.</i> , 2002
Cinnamaldehyde	Perturbation de la membrane en inhibant l'activité ATPase	Gill et Holley, 2004, Gill et Holley, 2006 a, b.
Acide cinnamique	Perturbation de la membrane	Hemaiswarya et Doble, 2010; Chen <i>et al.</i> , 2011

Eugenol	Perturbation de la membrane par, inhibition de l'activité ATPase, bloqueur de la pompe d'efflux, réduction de plusieurs facteurs de virulence à des concentrations sous-inhibitrices	Bolla <i>et al.</i>, 2011; Di Pasqua <i>et al.</i>, 2007; Gill et Holley, 2006 a, b; Hemaiswarya et Doble, 2009; Qiu <i>et al.</i>, 2010
Arbre à thé Melaleuca	Inhibition des métabolismes localisés sur la membrane conduisant à l'inhibition de la respiration et une augmentation de la perméabilité membranaire	Cox <i>et al.</i>, 2001
γ-terpinene	Déstabilisation de la membrane	Oyedemi <i>et al.</i>, 2009

L'hydrophobicité des huiles essentielles et de leurs composants est l'une des caractéristiques les plus importantes. Elle leur permet, en fait, de se répartir avec les lipides présents dans la membrane cellulaire des bactéries, provoquant ainsi la perturbation de ces structures et l'augmentation de leur perméabilité. La fuite des ions et des autres constituants cellulaires, peut, donc, se produire, et la poursuite de ce phénomène conduit à la mort de la cellule (**Burt, 2004 ; Devi *et al.*, 2010**).

Les composants d'HEs paraissent, aussi, capables d'agir sur les protéines membranaires (**Knobloch *et al.*, 1989**). En effet, certaines enzymes comme les ATPases, sont connues comme étant ancrées dans la membrane plasmique. Deux mécanismes possibles ont été suggérés, par lesquels, les hydrocarbures cycliques pourraient affecter ces molécules ; ainsi ces composants, peuvent soit s'accumuler dans la bicouche lipidique et déformer les interactions lipide-protéines, soit, interagir directement avec la partie hydrophobe des ces protéines (**Juven *et al.*, 1994; Sikkema *et al.*, 1995**). Cette dernière possibilité, a été affirmée par une étude examinant les interactions entre les composants d'HEs et des protéines du lait (**Pol *et al.*, 2001**).

Outre leur activité directe sur la membrane plasmique, les constituants d'HEs, peuvent avoir divers effets sur le métabolisme cellulaire. Par exemple, la voie du citrate et les enzymes associées à la synthèse d'ATP ont été inhibés chez *S. typhimurium* traitée avec le thymol (**Di Pasqua *et al.*, 2010**). Ultee *et al.* (2002) ont révélé que le taux de synthèse d'ATP a été réduit chez *Bacillus cereus* exposé au carvacrol. En effet, celui-ci déstabilise la membrane et agit, aussi, comme un échangeur de proton grâce à son groupement hydroxyle, réduisant ainsi le gradient de pH à travers la membrane. L'effondrement de la force proton-motrice, épuise, donc, la production d'ATP et conduit, finalement à la mort cellulaire.

L'inhibition de l'activité des enzymes, constitue aussi une cible pour les HEs. L'huile de cannelle, par exemple, inhibe les décarboxylases d'acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* grâce au groupement carbonyle présent dans le cinnamaldéhyde, qui est le composant majeur de cette HE (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995**), et plus récemment, Wang *et al.* (**2016**), a révélé que ce composé, diminue aussi, l'activité de la β -galactosidase par une inhibition compétitive à travers un processus multiphasique.

Il existe certaines preuves dans la littérature publiée, indiquant que, les HEs et leurs composants peuvent atténuer les mécanismes de virulence et les mécanismes de résistance chez les bactéries, ce qui peut être bénéfique dans le traitement d'infections. Ainsi, l'huile de périlla (*Perilla frutescens*), le thymol et l'eugénol réduisent la production des entérotoxines staphylococciques A et B, de la toxine 1 du syndrome de choc toxique et de l' α -hémolysine chez *S. aureus* (**Qiu et al., 2010, 2011**), et le cinnamaldéhyde réduit l'hémolyse et l'adhérence de *S. aureus* au latex (**Ferro et al. 2016**). Une étude récente a démontré que, l'HE d'*Eucalyptus grandis*, avait un effet inhibiteur sur les pompes à efflux de bactéries pathogènes du tractus respiratoire (**Soyingbe et al., 2015**). Ces pompes peuvent être inhibées lors de la déstabilisation de la membrane et l'inhibition des voies métaboliques (**Gibbons, 2008**).

Selon Friedman *et al.* (**2004**), en fonction du temps nécessaire pour produire une action significative, les huiles essentielles peuvent être divisées en deux types: celles ayant des composés à action lente et d'autres ayant des composés à action rapide. Le carvacrol, le cinnamaldéhyde et le géraniol, sont des exemples de composés à action rapide, ils inactivent des organismes comme *E. coli* et *Salmonella spp* en cinq minutes. Tandis que les composés agissant lentement, nécessitent 30 à 60 minutes pour donner une action efficace.

I.3- Facteurs influençant l'activité antibactérienne des HEs

Comme il été précédemment signalé, les facteurs déterminant l'activité des HEs sont la composition, les groupements fonctionnels présents dans les composants actifs, et leurs interactions (**Dormans et Deans, 2000**). La qualité et la quantité des constituants d'une huile essentielle ne dépend pas seulement de l'espèce de la plante mais aussi de plusieurs autre éléments incluant, la provenance de la plante, la partie utilisée de la plante, le stade de développement, les conditions de culture et de récolte de la plante, ainsi que la méthode d'extraction de l'HE (**Stassi et al., 1996; Elgayyar et al., 2001 ; Masotti et al., 2003**). Par conséquent, les résultats obtenues dans les études réalisées sur l'activité des HEs, diffèrent largement et sont très difficile à comparer (**Sakkas et Papadopoulou, 2016**).

Il a été rapporté que les HEs contenant les composés **phénols** ou **aldéhydes** (tels que le carvacrol, le cinnamaldéhyde, l'eugénol, etc.) en tant que principaux composants, démontrent l'activité antibactérienne la plus élevée, suivi par celles qui contiennent les **alcoolstérpéniques**. D'autres huiles contenant les **cétones** ou les **esters** (comme la β -myrcène, α -thujone ou l'acétate de géranyle) avaient une activité beaucoup plus faible. Tandis que les huiles volatiles riches en **terpènes hydrocarbonés** sont généralement inactives (**Bassolé et al., 2010; Miladinović et al., 2012; Sakkas et papadopoulou, 2016; Braga Paiano et al., 2019**).

La structure chimique des composants individuels des HEs affecte précisément leur mécanisme d'action et donc l'activité de l'huile qu'elle les contienne. Ainsi, l'activité élevée des phénols est liée à la présence d'un groupement hydroxyle acide dont l'importance a été confirmée en comparant le carvacrol au p-cymène. De plus, le rôle de la délocalisation électronique (résonance) du noyau phénolique, a été démontré par le manque d'activité du menthol comparé au carvacrol (**Dormans et Deans, 2000; Ultée et al., 2002**). En ce qui concerne les composants non phénoliques des HEs, il semble que le type du groupement alkyle, influence l'activité (alcényle > alkyle). Par exemple, le limonène (1-méthyl-4-(1-méthyléthényl)-cyclohexène) est plus actif que le p-cymène (**Dormans et Deans, 2000**).

I.4- Sensibilité des bactéries aux huiles essentielles

De nombreuses études examinant l'action des HEs contre les bactéries, conviennent que, généralement, les bactéries à gram négatif sont moins sensibles aux HEs et leurs composants, que les bactéries à gram positif (**Mayaud et al., 2008; Ait-Ouazzou et al. 2011 ; Fadli et al., 2012a**). Cela, peut être attribué au fait que les bactéries à gram négatif ont une membrane externe rigide, riche en lipopolysaccharide (LPS) et plus complexe, qui agit comme une barrière limitant la diffusion de composés hydrophobes vers la cellule. Cette membrane est, par contre, absente chez les bactéries à gram positif, qui sont, plutôt, entourées d'une paroi épaisse de peptidoglycane pas assez dense pour résister aux petites molécules antimicrobiennes. Ces dernières accèdent donc, plus facilement, à la membrane cellulaire (**Hyldgaard et al., 2012 ; Nazzaro et al. 2013**). De plus, ces bactéries peuvent faciliter l'infiltration des composés hydrophobes des HEs en raison des extrémités lipophiles des acides lipotéichoïques présents dans leur paroi (**Cox et al., 2001**).

En revanche, plusieurs études ont trouvé que les bactéries à gram négatif peuvent avoir une sensibilité égale ou supérieure à celle des bactéries à gram positif, aux HEs (**Dorman et**

Deans 2000 ; Chaftar et al., 2015 ; Van de Vel et al., 2017). *Aeromonas hydrophila* (gram négatif), par exemple, semble être l'une des espèces les plus sensibles (**Deans et Ritchie, 1987; Stecchini et al., 1993; Wan et al., 1998**). Fisher et Phillips (2008), ont suggéré que la membrane externe ne cause qu'un retardement dans l'action des HEs, et donc les bactéries à gram négatif peuvent être aussi sensibles à ces huiles pendant une période de temps plus longue. De plus, il a été postulé que les composants individuels des HEs présentent différents degrés d'activité contre ces deux groupes de bactéries (**Dorman et Deans 2000**), et connaissant, l'immense variabilité de la composition chimique entre les HEs, il est donc possible de conclure que, la sensibilité des bactéries aux HEs, dépend, tout d'abord, des propriétés de l'huile essentielle et de la bactérie elle-même (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Une question importante concernant l'utilisation des HEs comme nouveaux médicaments est de savoir si la résistance bactérienne, comparable à la résistance induite aux antibiotiques, pourrait survenir lorsque ces composés sont utilisés à grande échelle (**Langeveld et al., 2013**). Certaines bactéries ont une tolérance intrinsèque aux composants d'HEs ; *Pseudomonas spp.*, était résistante à l'huile d'arbre de thé et ses principaux composants grâce à l'expression de la pompe à efflux MexAB-oprM (**Papadopoulos et al., 2008**). Cependant, la capacité des bactéries à acquérir une résistance aux HEs, n'a pas été largement étudiée (**Langeveld et al., 2013**). Certaines études ont révélé que la fréquence de mutants résistants aux HEs, est très faible, voire nulle, par rapport à la résistance développée aux antibiotiques (**Luz et al., 2012 ; Gomes Neto et al., 2012**). Cela, pourrait être dû à la multitude et la diversification des modes d'action des HEs, sur la bactérie (présence de plusieurs composants attaquant différentes cibles bactériennes) (**Becerril et al., 2012**). De plus, les propriétés anti-oxydantes des HEs, peuvent apaiser le stress oxydatif, protégeant ainsi, les cellules des dommages d'ADN, ce qui, réduirait le taux de mutagenèse et donc l'émergence des résistances (**Berdejo et al., 2019**). Enfin, étant donné que, la déstabilisation de la membrane est le mode d'action le plus répandu pour les HEs, il peut être, simplement, difficile pour une bactérie, de développer un mécanisme de résistance pour protéger une cible aussi large, sachant que le changement de la composition et/ou des structures de la membrane, ne sont, probablement, pas bénéfiques pour la viabilité des bactéries (**Langeveld et al., 2013**), bien que, ce phénomène a été observé chez certaines bactéries exposées au carvacrol. En effet celles-ci, ont changé la composition des acides gras de leur membrane, afin, de maintenir sa structure optimale et de s'adapter ainsi, à l'effet déstabilisateur de ce composé (**Di Pasqua et al., 2006, 2007**).

Malgré que plusieurs études ont écarté l'induction d'une résistance stable par l'application des HEs et leurs composants (Apolonio *et al.*, 2014 ; Tavares *et al.*, 2015 ; Leite de Souza, 2016), une étude récente a démontré l'émergence de souches hyper-résistantes d'*E. coli* MG1655, après un traitement avec le carvacrol, le citral et l'oxyde de limonène (Chueca *et al.*, 2018), et en suivant le même protocole, Berdejo *et al.*, a démontré que le traitement de *S. aureus* avec des concentrations sub-létales de ces trois composés, engendre l'émergence de nouvelles souches caractérisées, non seulement, par des CMI élevées, mais, aussi par une résistance croisée envers ces composants. De plus, ces souches ont montré aussi une tolérance plus élevée pour les traitements thermiques. Par conséquent, les répercussions de l'apparition de telles souches et les stratégies à offrir pour éviter leur émergence, justifient des études plus approfondies (Berdejo *et al.*, 2019).

I.5- Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne des HEs

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, les méthodes conventionnelles utilisées pour les antibiotiques, sont généralement appliquées. Il s'agit notamment, de la méthode de **diffusion sur gélose** (disque en papier ou puits), et la méthode de **dilution** (dilution en bouillon ou en gélose). Cependant, l'étude de cette activité chez les HEs est plus difficile, en raison de leur volatilité, l'insolubilité dans l'eau et leur complexité. Par conséquent, ces propriétés spécifiques des HEs, exigent certaines modifications dans ces deux méthodes, qui ont été développés pour des antimicrobiens solubles dans l'eau (Kalemba *et Kunicka*, 2003).

Les microorganismes testés sont généralement, dérivés des collections de cultures pures reconnues internationalement (Miladinović *et al.*, 2013), mais ils peuvent aussi être des isolats provenant de différents environnements (clinique, alimentaire...) (Bag *et Chattopadhyay*, 2015, Lahmar *et al.*, 2016). Les cultures de croissance microbiennes sont menées dans un bouillon, sous des conditions physiques optimales pour des espèces individuelles. Ces microorganismes doivent atteindre une phase de croissance appropriée, et le nombre de cellules dans les inoculum doit être standardisé selon les normes de CLSI pour le test (généralement, il est de 10^6 à 10^8 CFU / ml). La croissance peut être évaluée visuellement ou instrumentalement (turbidimétrie) (Kalemba *et Kunicka*, 2003). Les expériences sont toujours répétées plusieurs fois (trois fois en général). Les cultures contenant les HEs sont accompagnées par des cultures de témoins négatifs, où les huiles sont remplacées par l'eau ou le solvant. Des témoins positifs conçus avec l'ajout d'antibiotique

standard, sont également utilisées, pour évaluer la sensibilité des souches testées. Le temps d'incubation est entre 18 à 24 h pour les bactéries (**Chebaibi et al., 2015; El Atki, et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Katarzyna et al., 2020**).

I.5.1- Méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme)

Cette méthode est la technique la plus répandue pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Elle est reconnue comme étant précise et fiable, malgré qu'elle produit des résultats semi-quantitatifs, ou parfois, uniquement qualitatifs (**Janssen et al., 1987**), et pas toujours répétable (**Kalodera et al., 1997**). Néanmoins, elle permet d'estimer le degré d'inhibition de la croissance microbienne de manière simple. Dans ce procédé, des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre généralement, sont remplies avec 10 à 20 ml de bouillon d'agar, puis inoculées avec des microorganismes. Deux modes d'incorporation de l'huile essentielle, sont possibles : sur un disque en papier (**Ouedrhiri et al., 2017; El Atki, et al., 2019**) ou dans des puits réalisés dans la gélose (**Bag et Chattopadhyay, 2015**).

Les HEs sont rarement testées à l'état pure, généralement, elles sont solubilisées dans un solvant (comme le sulfoxyde de diméthyle (DMSO), afin d'améliorer leur diffusion (**Chebaibi et al., 2015**). Les disques en papier sont imprégnés par un volume précis de la solution d'HE, puis, déposés sur les boîtes (**Braga Paiano et al., 2019**). Ces dernières, sont laissées pour un certain moment, afin de permettre à tous les composants d'HE de se diffuser dans le milieu, puis elles sont incubées (**Chebaibi et al., 2015; Bag et Chattopadhyay, 2015**). Enfin, l'efficacité de l'huile essentielle est démontrée par la taille de la zone d'inhibition autour du disque ou du puits, et elle est généralement, exprimée selon le diamètre de cette zone (en mm ou cm), incluant ou non celui du disque ou du puits. Les résultats peuvent être présentés comme 0, +, ++, etc. (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Le diamètre du disque en papier de Whatman ou du puits, la quantité de HE, ainsi que le type du solvant utilisé, sont les paramètres les plus importants pour chaque variations de cette méthode (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Il est important de noter que, ce procédé est considéré comme inapproprié pour les HEs, car en plus de la faible diffusion de leurs composants dans la gélose, ces derniers peuvent s'évaporer lors de l'incubation (**Kubo et al., 1995**). Cependant, cette technique est encore très utilisée car elle est facile à réaliser et ne nécessite que de petites quantités d'HE. Elle peut être recommandée comme une méthode de présélection pour

plusieurs HEs, dont les plus actives sont sélectionnées pour une analyse plus approfondie (Bag et Chattopadhyay, 2015).

1.5.2- Méthode de dilution

Le test de microdilution en bouillon est devenu très répandu dans ces derniers temps. Dans cette méthode, les cultures microbiennes sont réalisées dans des plaques de microtitration (Lahmar *et al.*, 2016; El Atki, *et al.*, 2019). L'effet inhibiteur des HEs, est ensuite, mesuré par turbidimétrie ou par une méthode de comptage (Kalemba et Kunicka, 2003). Ce procédé nous permet de déterminer deux paramètres fondamentaux concernant l'activité des antimicrobiens et la sensibilité des microorganismes : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

Pour déterminer la CMI avec cette méthode, l'huile essentielle est d'abord diluée, puis ces dilutions sont ajoutées à des milieux contenant la culture microbienne. Après incubation, le tube ou le puits ayant la plus faible concentration d'huile essentielle montrant une inhibition de croissance, correspond à la CMI (% V/V) (EUCAST, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003; CLSI, 2009). La lecture peut s'effectuer en utilisant un indicateur coloré comme le 2,3,5-diphényltétrazolium chloride (TTC) qui révèle la présence de bactéries vivantes par l'apparition d'une coloration rouge (Eloff, 1998). Ces observations peuvent être confirmées, ensuite, par une analyse spectrophotométrique, qui permet de déterminer la cinétique de croissance bactérienne dans les conditions optimales et en présence de l'huile essentielle (Katarzyna *et al.*, 2020).

La **concentration minimale bactéricide (CMB)** a été définie comme la concentration d'huile la plus faible tuant 99,9% des cellules bactériennes de l'inoculum bactérien initial (Skandamis *et al.*, 2001). Pour la déterminer, une quantité de suspension bactérienne est prélevée à partir des tubes ou puits montrant l'absence de croissance, puis étalée sur un milieu solide. Enfin, après l'incubation des boîtes ensemencées, la CMB (% V/V) est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactéries (Chebaibi *et al.*, 2015)

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à quatre (≤ 4) cette dernière est qualifiée de substance bactéricide, en revanche, si ce rapport est supérieur à quatre (> 4), elle est dite bactériostatique (Éberlin, 1994 ; Traoré *et al.*, 2012).

Le problème lié au manque de diffusion des composants d'HEs, rencontré dans la méthode de diffusion, rend la technique de dilution comme une méthode de choix pour l'évaluation de l'activité des HEs (**Miladinović et al., 2012**).

I.5.3- Méthode de microatmosphère (non conventionnelle)

Contrairement aux autres techniques, basée sur le contact direct de l'huile essentielle avec le microorganisme, la méthode de micro-atmosphère repose sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de la fraction volatile de huile, à une température d'incubation donnée, sur la croissance microbienne (**Laghchimi et al., 2014**). Elle est généralement utilisée pour définir l'activité des HEs qui sont employées comme conservateurs atmosphériques. Dans ce cas, un disque en papier imbibé d'huile essentielle est attaché au couvercle d'une boîte de Petri contenant une gélose solidifiée, ensemencé par la suspension microbienne. Immédiatement, la boîte est inversée et scellée par du parafilm, puis incubée (**Bouguerra et al., 2014 ; Laghchimi et al., 2014**). Les résultats sont présentés comme le diamètre de la zone d'inhibition (**Bouguerra et al., 2014**), ou comme une quantité minimale inhibitrice de l'HE (QMI) qui inhibe totalement la croissance du microorganisme (c'est-à-dire ne provoque aucune croissance bactérienne détectable) par rapport au témoin (**Patricia Lopez et al., 2007**). Un appareil expérimental utilisé dans cette méthode, a été construit par Lee *et al.* (**2018**). Celui-ci est constitué d'un récipient scellé avec un puits supérieur pour le milieu de culture et un puits inférieur contenant l'huile essentielle. Après le dépôt et l'ensemencement du milieu de culture, des disques de papier stérilisés sont placés dans le puits inférieur. Puis les composants supérieur et inférieur de l'appareil sont rapidement assemblés et scellés à l'aide de parafilm pour éviter la perte de l'huile essentielle par évaporation, avant l'incubation (**Cho et al., 2019**).

La méthode utilisée pour le test, est aussi un facteur crucial affectant l'activité de l'huile essentielle. Ainsi, Les agents dispersants et émulsifiants utilisés dans certaines méthodes peuvent, parfois, affaiblir l'effet de l'huile essentielle (**Carson et Riley, 1995**). De plus, les paramètres expérimentaux adoptés pour le test comme, la température d'incubation et le pH, jouent un rôle dans l'estimation de cette activité. Le cinnamaldéhyde par exemple, s'est montré plus actif à 20°C qu'à 30°C (**Moleyar et al., 1992**), et le thymol est plus efficace à un pH de 5.5 qu'à 6.5 (**Juven et al., 1994**). Par conséquent, tous ces éléments doivent être pris en compte durant l'analyse (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Certains chercheurs ont appliqué deux méthodes différentes pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs, généralement, il

s'agit de la méthode de diffusion et celle de dilution. Les substances actives contre les microorganismes ont démontré une grande zone d'inhibition et une valeur faible de CMI. Une corrélation assez bonne a été rapportée entre les résultats produits par ces deux méthodes (**Bag et Chattopadhyay, 2015 ; Ouedrhiri et al., 2017**).

II- Les combinaisons d'HEs dans la lutte contre la résistance bactérienne

Bien que l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été analysée et rapporté par plusieurs études indiquées précédemment, les traitements avec les HEs seules, nécessitent généralement, une concentration élevée d'huile essentielle et une longue durée d'exposition pour éliminer les bactéries cibles (**Tae Jin Cho et al., 2020**). Par conséquent, l'utilisation de ces HEs n'a pas résolue le problème de résistance bactérienne, et les antibiotiques perdent de plus en plus leur efficacité contre les bactéries (**Yap et al., 2014**).

En 2011, la recherche académique et l'industrie ont collaboré pour établir une liste des approches prioritaires pour résoudre cette crise de résistance bactérienne. Le développement d'alternatives aux antibiotiques et la découverte ou la production des adjuvants font partie des stratégies potentielles proposées (**Bush et al., 2011**). L'une des possibilités est de combiner les antibiotiques avec d'autres médicaments non antibiotique (**Ejim et al., 2011**). Une autre possibilité consiste à combiner les antibiotiques avec des adjuvants ou antimicrobiens sélectionnés à partir des composants bioactifs naturels (**Bush et al., 2011**). En effet, un aperçu sur les effets synergiques entre les métabolites de plantes et les antibiotiques a été fourni par Hemaiswarya et al., (2008) et selon eux, ces métabolites pourrait servir d'adjuvants d'antibiotiques prometteurs. Les huiles essentielles (HEs) et leurs composants font partie du groupe de composés qui sont censés avoir de tels effets, selon des études in vitro (**Langeveld et al., 2013**).

Dans une combinaison, l'interaction entre les agents antimicrobiens peut aboutir à trois résultats différents, synergie, addition ou antagonisme. La synergie est obtenue lorsque le mélange des deux composés antimicrobiens produit une activité antibactérienne supérieure à la somme de l'activité des composants individuels. Un effet additif se produit lorsque la combinaison des antimicrobiens donne un effet égal à la somme des composés individuels. Un effet antagoniste est obtenue lorsque les deux composés ont un effet combiné inférieure à la somme des deux effets individuels (**Davidson et Parish, 1989; Burt, 2004**).

En général, les combinaisons de médicaments se sont avérées avoir une caractéristique essentielle dans le traitement antimicrobien, en raison d'un certain nombre de considérations importantes, à savoir, l'augmentation de l'activité grâce à l'utilisation de composés à activité synergique, la capacité de contrecarrer la résistance aux médicaments, la diminution des doses requises, ce qui réduit à la fois, les coûts et les effets secondaires indésirables ou toxiques, l'augmentation du spectre d'activité (**Bag et Chattopadhyay, 2015**), et la transformation d'une action bactériostatique en action bactéricide (**Chebaibi et al., 2015**).

La combinaison des HEs avec les antibiotiques, est une nouvelle méthode proposée pour tuer les bactéries résistantes, via le renforcement de l'activité antimicrobienne (**Yap et al., 2014**). En effet, les combinaisons, qu'il s'agisse de huiles essentielles simples ou de mélanges de composants principaux purifiés, permettraient l'exposition de la bactérie à de nombreux composés chimiques, qui exercent différents mécanismes d'action antibactériens, simultanément, sur plusieurs cibles de la bactérie. Cela, conduiraient probablement, d'une part, à une meilleure activité, et d'autre part, à la diminution du risque de développement d'une résistance adaptative à ces combinaisons; une résistance à plusieurs mécanismes d'action antibactériens simultanés, est moins probable par rapport à la monothérapie (**Rhather et al., 2013; Shi et al., 2017**). De plus, certaines études ont rapporté un effet des HEs dans la resensibilisation aux antibiotiques chez les souches résistantes (**Fadli et al., 2011; Kon et Rai, 2012; Becerril et al., 2012**), ce qui peut être utile pour le contrôle des bactéries multirésistantes (**Owen et Laird, 2018**). En fin, l'avantage de l'utilisation des HEs dans ces combinaisons à la place des autres adjuvants, est que les HEs sont des produits naturels, renouvelables, relativement peu coûteux, et largement acceptées en raison de leurs applications traditionnelles, et leur meilleure biodégradabilité (**Yap et al., 2014**)

A travers ces avantages, la thérapie combinée impliquant les HEs et les antibiotiques, fleurit actuellement, et représente un domaine potentiel pour de futures investigations, dans le but de comprendre tous les paramètres nécessaires pour développer une nouvelle génération de médicaments qui permettront de lutter contre la résistance aux antibiotiques (**Yap et al., 2014**). La partie suivante, consolide et décrit, ainsi, les effets synergiques entre les HEs et les antibiotiques, observés dans des études récentes, tout en présentant les modes d'action possibles, et la capacité des HEs à modifier le potentiel de résistance chez les bactéries.

II.1- Définition et preuves sur l'existence des effets synergiques

Le terme synergie est dérivé du grec *syn-ergos*, «travailler ensemble». Les synergies ont été décrites dans de nombreux contextes et situations de la vie, y compris la mécanique, les systèmes techniques, la vie sociale humaine et bien d'autres. Dans tous les cas, la synergie décrit le fait qu'un système, c'est-à-dire la combinaison et l'interaction de deux ou plusieurs agents ou forces, produit un effet supérieur à la somme de leurs effets individuels. Cette définition implique qu'il existe trois manières possibles qui peuvent résulter d'une telle «interaction d'agents ou de forces»: ces forces pourraient simplement s'additionner, sans s'influencer mutuellement (pas d'interaction), leur combinaison pourrait produire un résultat plus important que prévu (synergie), ou la combinaison pourrait conduire à un résultat inférieur à la somme des effets individuels (antagonisme) (Hans, 2012).

Les interactions d'agents biologiquement actifs constituent un aspect important de la pharmacologie et de la biomédecine. Dans ce contexte, l'interaction décrit l'activité biologique qui résulte de la présence de plusieurs médicaments en même temps. De telles situations se produisent dans de nombreux cas cliniques (Hans, 2012):

- Les combinaisons de médicaments cytotoxiques dans le traitement du cancer et des infections nécessitent des doses plus faibles de chaque médicament pour obtenir de meilleurs effets thérapeutiques avec moins de toxicité pour les effets secondaires.
- Les combinaisons d'antibiotiques produisent également une meilleure efficacité avec moins d'effets secondaires et un développement réduit de résistance.
- De nombreuses situations cliniques graves nécessitent l'administration de plusieurs médicaments, simplement, en raison de multiples indications thérapeutiques. Bien que dans un tel cas les combinaisons de médicaments ne sont pas formulées pour rechercher des synergies, les interactions de ces médicaments doivent être évaluées.
- L'effet d'un médicament peut être augmenté par un autre médicament qui ne produit pas un tel effet par lui-même.

Qu'il s'agisse d'un mélange complexe ou d'une combinaison de médicaments utilisée, l'interaction biologique de toutes les substances actives doit être connue. La synergie peut être observée dans des systèmes simples ; deux médicaments qui n'agissent que sur une seule protéine cible, peuvent produire un effet synergique. Comme elle peut exister aussi dans des

environnements complexes, tels que les patients traités avec plusieurs médicaments (**Hans, 2012**).

Les interactions synergiques apparaissent aussi dans la phytothérapie chinoise traditionnelle, qui suppose que la synergie existe et elle constitue une partie intrinsèque dans leur concept ou philosophie de thérapie. Ainsi, les combinaisons d'herbes sont faisables, et elles sont conçues soit selon des formules historiques qui ont été développées en se basant sur des observations empiriques, soit, en réalisant un assemblage d'herbes qui sera destiné pour un patient bien précis (**Williamson, 2001**). Cette approche est connue pour être utilisée pour le traitement de l'eczéma, par exemple (**Sheehan et Atherton 1992**). L'utilisation d'associations médicamenteuses n'est pas, seulement, limitée aux produits à base de plantes, par exemple la chimiothérapie anticancéreuse, le traitement du VIH et de l'hypertension, emploient couramment des combinaisons médicamenteuses constituées de deux ou plusieurs substances individuelles (**Williamson, 2001**).

Dans tous ces exemples cités et dans ceux que nous décrirons plus loin, la compréhension générale et commune de la synergie, est qu'il s'agit d'un effet produit par une combinaison de substances plus important que celui attendu si on considère les contributions individuelles. Cela peut s'appliquer soit pour un effet thérapeutique accru, soit pour réduire le profil d'effets secondaires ou, de préférence (et logiquement), pour les deux. Dans les mélanges à base de plantes, cette interaction peut être très difficile à décrire avec précision car il existe des constituants sur lesquels nous en savons très peu, du point de vue qualitatif (chimiquement, pharmacologiquement) et quantitatif (**Williamson, 2001**). De plus, peu de choses sont connues sur les mécanismes qui régissent les interactions entre les agents combinés, ainsi que leur mode d'actions sur les cibles. Par conséquent, il reste encore des efforts à fournir pour la compréhension de tels détails afin d'exploiter plus aisément les interactions synergiques et créer ainsi des combinaisons efficaces et utiles dans différents domaines (**Wanger et Ulrich-Merzenich, 2009 ; Hyldgaard et al., 2012**).

II.2- La « synergie » ; une stratégie naturelle pour combattre les infections

La rareté des maladies infectieuses chez les plantes sauvages constitue en elle-même une preuve sur l'efficacité des mécanismes de défenses qu'elles développent. En fait, il est bien connu que ces organismes produisent une grande variété de molécules antimicrobiennes, cependant, il faut noter que ces molécules présentent une activité faible par rapport aux antibiotiques produits par les microorganismes. Par conséquent, il semble évident que les

plantes adoptent une stratégie différente qui est basé sur la **synergie** entre ces molécules, plutôt que la production de puissants antibiotiques pour combattre les pathogènes. L'exemple fournie pour démontrer cette stratégie, est l'observation de l'action combiné entre deux composés produits par les plantes de baies ; la berbérine et la 5'-méthoxyhydnocarpine (5'-MHC). La berbérine est un alcaloïde hydrophobe qui a pour cible cellulaire l'ADN (**Hemaiswarya et al., 2008**), mais qui est inefficace comme antibactérien à lui seul car il est facilement rejeté par les pompes à efflux des bactéries résistantes (**Stermitz et al., 2000**). Pour compenser cette faible activité, les plantes de baies (*Berberis* sp) synthétisent la 5'MHC qui, en bloquant les pompes bactériennes, potentialise les effets de la berbérine. Cette combinaison agit donc comme un puissant antibactérien (**Lewis et Ausubel, 2006**). En se basant sur cette observation, Ball *et al.* (**2006**) ont rapporté qu'on liant de manière covalente la berbérine avec l'INF₅₅ (un inhibiteur de pompes à efflux), on obtient un antibiotique hautement efficace qui s'accumule facilement dans les bactéries.

Pour conclure, on peut dire que l'observation d'un tel phénomène dans la nature, peut fournir une compréhension plus approfondie sur la synergie, en tant qu'une méthodologie, qui pourrais être adoptée pour la conception et le développement de nouveaux agents antibactériens hautement efficaces (**Hemaiswarya et al., 2008**).

II.3- Méthode d'étude des interactions entre les agents antimicrobiens

L'évaluation de l'interaction entre les agents antibactériens est basée sur l'utilisation des techniques de macro-ou micro-dilution. La méthode d'**échiquier** (damier) et le test **time-kill**, sont les procédures les plus utilisées. Ces méthodes ont été préalablement développées pour la détection de la synergie entre les médicaments, et il n'existe donc pas de méthode standardisée développée, spécialement, pour évaluer l'interaction entre les HEs ou leurs composants (**White et al., 1996; Mackay et al., 2000; Tallarida, 2001**).

II.3.1- Méthode d'échiquier (damier)

La technique *in vitro* la plus utilisé pour étudier les interactions entre les antimicrobiens, est la méthode d'échiquier (ou la microdilution en milieu liquide), ainsi appelée, car, les concentrations de l'agent antibactérien (A) sont disposées horizontalement (le long de l'axe x) et l'autre agent (B) verticalement (le long de l'axe y), en dilutions croissantes dans une plaque de microtitration (micropuits). Ces dilutions testés, sont basées sur les CMI des substances,

généralement, elles vont de deux fois la CMI, jusqu'à plusieurs dilutions en dessous de la CMI (Langeveld *et al.*, 2013; Owen *et al.*, 2017).

Dans cette technique, les dilutions de la phase de croissance logarithmique de la culture bactérienne sont préparées, standardisés (inoculum à 10^6 UFC/ml), puis, distribués dans une microplaque à 96 puits, contenant des concentrations variables des deux agents antimicrobiens (avec 2 puits réservés pour les témoins) (Miladinovic *et al.*, 2013; Ouedrhiri *et al.*, 2017; El Atki *et al.*, 2019). La microplaque est ensuite, scellée et incubée (de 18 à 24 h à 37°C). Après cette étape, parfois, une deuxième incubation est menée pendant 2 h à 37°C, après l'ajout d'un indicateur coloré (résazurine, TTC...etc) dans chaque puits (Ouedrhiri *et al.*, 2017). Les expériences sont réalisées généralement en triple (Bag et Chattopadhyay, 2015 ; Chraibi *et al.*, 2020). Les interactions antibactériennes peuvent être déterminées à partir, des combinaisons inhibitrices observées, après l'incubation (Owen *et al.*, 2017).

Les résultats de la méthode d'échiquier peuvent être interprétés par le traçage d'un graphique, dit isobologramme, ou, en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnelle (FICI) (Langeveld *et al.*, 2013). Ce dernier, est calculé en utilisant la formule suivante (Doernet Carroll, 2014) :

$$\text{FICI} = \text{FICA} + \text{FICB}$$

$$\text{FICA} = \frac{\text{CMI de l'agent A en combinaison}}{\text{CMI de l'agent A seul}}$$

$$\text{FICB} = \frac{\text{CMI de l'agent B en combinaison}}{\text{CMI de l'agent B seul}}$$

Les interactions entre les agents combinés sont déterminées en comparant le FICI à des limites fixes. La plupart des auteurs utilisent celles suggérées par Odds (2003) :

- Un effet synergique lorsque $\text{FICI} < 0.5$
- Un effet additif (ou indifférence) lorsque $0.5 \leq \text{FICI} \leq 4$
- Un effet antagoniste lorsque $\text{FICI} > 4$

Ces limites ont été introduites pour rendre les interprétations plus conservatrices par rapport aux limites théoriques de $\text{FICI} < 1$: synergie, $\text{FICI} = 1$: additivité et $\text{FICI} > 1$: antagonisme, pour éviter les faux rapports de synergie ou d'antagonisme. En effet, la méthode d'échiquier est

sujette à de considérables erreurs de reproductibilité, car les CMI testées sont très variables, et cette variation dans un seul résultat, place la CMI dans une gamme de trois dilutions avec un mode de ± 1 dilution. Afin de démontrer cela, Odds (2003) a cité l'étude de Rand *et al.* (1993), dans laquelle 25% de l'ensemble des réplicas testés était discordants.

Plusieurs études interprètent les résultats de l'échiquier, par la représentation des combinaisons dans un diagramme cartésien, en appliquant la méthode de l'isobole (Rosato *et al.*, 2010; Miladinovic *et al.*, 2013; Knezevic *et al.*, 2015; Tullio *et al.*, 2019). L'isobologramme, est une procédure graphique introduite et développée par Loewe (Loewe, 1927, 1928), qui repose sur la relation dose-effet de chaque agent (seul) afin de dériver l'ensemble des combinaisons de doses qui sont censées produire un niveau d'effet spécifié (Tallarida, 2012). Dans ce graphique, les CMI des agents individuels sont tracés sur les axes x et y, et jointes pour créer une ligne droite connue sous le nom de ligne d'additivité. Les concentrations de combinaisons inhibitrices sont également tracées. Si une synergie est présente, cela créera une courbe qui apparaît concave par rapport à la ligne d'additivité (C'est-à-dire que l'effet spécifié, été atteint avec des doses inférieures à celles de la ligne). En revanche dans un cas d'antagonisme, la courbe apparaîtra convexe par rapport à la ligne. Une ligne droite est observée si aucune interaction (indifférence) ou une additivité existe (Rrather *et al.*, 2013). Cela est schématisé dans la figure suivante :

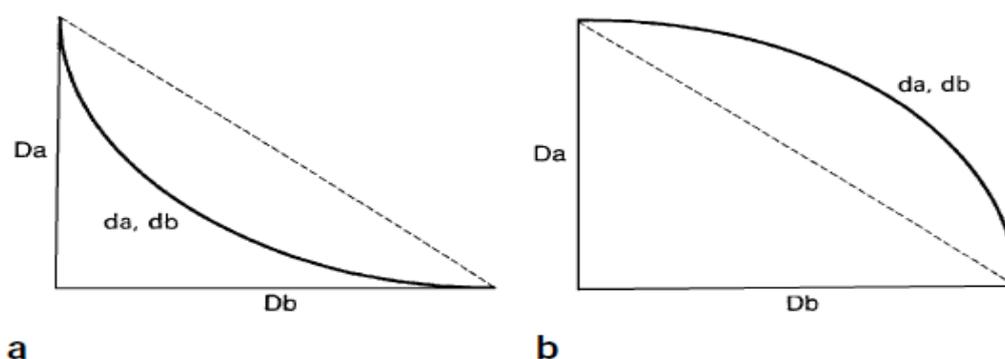


Figure 08 : La méthode isobole pour identifier la synergie : **(a)**: Effet synergique: l'isobole «concave». **(b)**: Effet antagoniste: l'isobole «convexe». **Da** et **Db** sont les doses individuelles des deux agents antimicrobiens A et B; **da** et **db** sont les doses de A et B en combinaison. La ligne droite en pointillé est la ligne d'additivité, et montre l'absence d'interaction entre A et B ; c'est-à-dire que toutes les doses combinées qui se trouvent sur la ligne (ou proche de ligne) sont additives, et aucune interaction n'est présente entre les agents (Williamson, 2001).

L'effet d'addition est souvent considéré comme une indifférence car il n'y a aucune interaction entre les agents antimicrobiens (**White *et al.*, 1996 ; Tallarida, 2012**).

Bien que l'isobologramme et le FICI sont des méthodes basées sur la relation dose-effet et non pas sur l'exploration des mécanismes intimes de l'interaction, ces procédures restent intéressantes, car, elles nous permettent de prédire le sort d'une combinaison et de détecter celles qui pourront être exploitées pour de futures investigations plus approfondies (**Tallarida, 2012 ; Vakil et Trappe, 2019**).

La méthode d'échiquier permet de quantifier l'interaction de deux composés antibactériens A et B en réalisant l'association d'une gamme de concentrations des deux composés (**Vaubourdolle, 2007**), mais ces mesures sont généralement effectuées à un moment donné et ne donnent, donc pas une vue dynamique de l'interaction antimicrobienne (**Pillai *et al.*, 2005**).

II.3.2- Méthode du Time-kill

La méthode la plus appropriée pour déterminer l'effet bactéricide et obtenir des informations sur l'interaction dynamique entre les agents antimicrobiens et la souche microbienne, est le test **time-kill** ou **l'effet temporel** (**Chouhan *et al.*, 2017**). En effet, contrairement à la méthode d'échiquier, le test time-kill mesure les interactions entre les agents combinés à plusieurs moments et détermine les effets bactéricides, ce qui peut être plus pertinent du point de vue clinique, que la mesure de l'inhibition à un seul moment (**Owen et Laird, 2018**).

Le test time-kill consiste à mesurer le nombre de bactéries vivantes présentes dans le milieu liquide en présence d'une combinaison particulière d'antimicrobiens, à différents moments (intervalles de temps réguliers) (**Langeveld *et al.*, 2013**). Pour réaliser ce test, on utilise généralement, quatre tubes de test (**Bag et Chattopadhyay, 2015 ; Knezevic *et al.*, 2015**). Le premier tube ne contenait que la suspension bactérienne standardisée (Il va servir de témoin de la croissance). Le deuxième et le troisième tube contient des bactéries et une concentration sub-inhibitrice des deux agents A et B, respectivement. Le quatrième tube contient des bactéries, et la combinaison des deux agents à des concentrations sub-inhibitrices (**Bag et Chattopadhyay, 2015 ; Knezevic *et al.*, 2015**). Ces tubes sont ensuite, incubés, et après chaque période régulière (0, 3, 6, 9, 12, 15 et 24h) d'incubation, une quantité d'échantillon est prélevée de chaque tube, diluée, puis ces dilutions sont ensemencées sur un

milieu gélosé (Muller-Hinton). Les boîtes sont incubées, puis les colonies bactériennes sont comptées. Les résultats obtenus sont moyennés, exprimés sous forme de logarithmes (\log_{10} UFC/ml) et représentés en fonction du temps dans des courbes time-Kill. Les expériences sont effectuées au moins deux fois (**Bag et Chattopadhyay, 2015; Knezevic et al., 2015**). L'interaction entre les deux agents est considérée comme synergique, si le nombre de colonies bactériennes après l'incubation de 24h, est réduit de plus de $2 \log_{10}$ par rapport à l'agent le plus actif testé seul (**Doern et caroll, 2014**), alors que l'antagonisme est défini comme une augmentation de $2 \log_{10}$ ou plus, du nombre de colonies par rapport à l'agent le plus actif testé seul (**Van Vuuren et Viljoen, 2011**).

En raison du fait que les colonies microbiennes doivent être comptées à de nombreux moments dans le temps, cette méthode demande beaucoup de travail et limite, donc, le nombre de concentrations et de combinaisons qui peuvent être testées (**White et al., 1996; Allahverdiyev et al., 2011**). De plus, considérant que les interactions varient en fonction des paires de doses (**Yadav et al., 2015**), cela ne fournit pas une vision sur les interactions aussi complète que la méthode d'échiquier (**Leite et al., 2015**). Par conséquent, ce test est généralement utilisé pour confirmer les effets synergiques observés dans la méthode d'échiquier (**Bag et Chattopadhyay, 2015; Knezevic et al., 2015**), et il est souvent considéré comme un « étalon-or » pour le test de synergie, en raison, de sa plus grande sensibilité et reproductibilité, par rapport aux autres méthodes (**Van Vuuren et Viljoen 2011**).

Malgré que ces méthodes sont largement utilisées pour l'étude des combinaisons, il faut signaler qu'il n'y a pas de moyen standard pour évaluer et quantifier les effets synergiques des combinaisons, ce qui empêche la possibilité de comparer entre différents rapports (**Bassolé et Juliani, 2012**). De plus, le manque de cohérence dans les méthodes et les critères d'interprétation, rend difficile de tirer des conclusions sur l'efficacité des combinaisons étudiées (**Owen et Laird, 2018**).

II.4- Les effets synergiques des HEs contre les pathogènes et les bactéries multirésistantes

II.4.1- Synergie entre les composants des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne d'une huile essentielle donnée peut dépendre seulement d'un ou deux des principaux composants qu'elle contient. Cependant, de plus en plus de preuves indiquent que l'activité inhérente des huiles essentielles ne peut pas reposer exclusivement sur le rapport avec lequel ces principaux composants actifs sont présent, mais aussi sur les

interactions de ces composés avec les composants minoritaires de l'huile (**Hyldgaard et al., 2012**). En effet, certaines études ont conclu que les HEs entières (brutes), ont une activité supérieure que les mélanges de leurs principaux composants, suggérant ainsi que les composants minoritaires d'HE sont critiques pour l'activité et peuvent avoir des effets synergiques et potentialisant (**Burt, 2004**).

Il semble important de signaler qu'il a été trouvé que les combinaisons contenant des monoterpènes phénoliques et des phénylpropanoïdes sont très actives. Par exemple, **Bassolé et al. (2010)** a démontré que, la combinaison d'eugénol avec le linalol ou le menthol a présenté l'effet synergique le plus élevé, et que les combinaisons, carvacrol/ linalool, eugenol/linalool, et eugenol/menthol étaient efficaces contre *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes* et *Escherichia coli* respectivement. Par conséquent, la plupart des études sont focalisées sur l'interaction des monoterpènes phénoliques (thymol, carvacrol) et des phénylpropanoïdes (eugénol) avec d'autres groupes de composants, tandis que les composés hydrocarbonés sont moins utilisés (**Bassolé et Juliani, 2012**).

La combinaison du cinnamaldéhyde avec le carvacrol ou le thymol produit dans la plupart des cas un effet synergique contre *E. coli* et *S. typhimurium* (**Pei et al., 2009; Zhou et al., 2007**). De plus, il a été trouvé aussi, que la combinaison de ces trois composants, exerçait des effets synergiques sur l'inhibition de la β -galactosidase. Cette dernière peut être ainsi, considérée comme une nouvelle perspectives sur les cibles intracellulaire à exploiter pour l'inhibition des bactéries (**Wang et al., 2016**).

Concernant, les autres monoterpènes, on peut citer l'exemple de la combinaison du limonène avec le 1,8-cineole (monoterpène éther-oxyde), qui a montré un effet synergique contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* (**Van Vuuren et Viljoen, 2007**).

Certaines études ont révélé aussi la présence de ces effets entre un composant individuel d'HE et une autre huile entière. Ainsi, **Chraibi et al. (2020)**, a démontré que, la combinaison de l'HE de *Rosmarinus officinalis* avec du carvacrol, possède une activité synergique contre *Bacillus subtilis* (FICI de 0.36), qui a été accompagnée par une réduction de leur CMIs individuelles (4 fois et 83 fois pour l'HE et le carvacrol, respectivement). Cette synergie observée peut être attribuée à l'interaction du carvacrol avec les monoterpènes hydrocarbonés (l' α -pinène, le myrcène et le camphène) de l'HE de *R. officinalis* (**De Azeredo et al., 2011**)

II.4.2- Synergie entre différentes huiles essentielles

Il a été rapporté que la combinaison de certaines huiles particulières produisait des effets synergiques qui peuvent provenir soit de activité combinée de deux constituants principaux des HEs, ou de l'interaction entre plusieurs composants (**Chouhan et al., 2017**).

En utilisant la méthode d'échiquier, Bag et Chattopadhyaya, (**2015**), ont montré que la combinaison d'huile essentielle de graines de coriandre et du cumin produit un effet synergique contre *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli* avec des FICI allant de 0.25 à 0.5. Ces effets ont été, confirmés par le test time-kill, qui a révélé la réduction de la population bactérienne avec un facteur de 100 ($> 2 \log_{10}$) dans 24h, en comparaison avec l'activité de ces HEs seules. L'analyse chimique de ces huiles a indiqué que le linalol de l'HE de coriandre et l'acide p-coumarique de l'HE de cumin pourraient être les composants responsables de cet effet synergique. Par ailleurs, les combinaisons des huiles essentielles de *Dittrichi aviscosa* / *Calamintha nepeta* et *Eucalyptusglobulus* / *Thymus mastichina* ont montré des effets synergiques contre *S. aureus* ATCC 25923, avec des FICI de 0.313 et de 0.5 respectivement (**Vieira et al., 2017**).

Dans une étude réalisée sur des pathogènes d'origine alimentaire, il été rapporté que la combinaison de l'HE de cannelle avec celle du cumin produit un effet synergique (FICI= 0.28) contre *E.coli*, avec une diminution de leur CMI d'environ 4 fois et 30 fois respectivement, et que les combinaisons d'HEs de thym/cumin, ail/baie et thym/romarin, produisent les mêmes effets contre des souches de *Salmonella* sp, avec des FICI allant de 0.15 à 0.28. La synergie observée dans la combinaison d'huile du thym et du cumin peut être attribuée à l'interaction du p-cymene du cumin et le thymol du thym. Par ailleurs, malgré que l'huile essentielle de romarin seule a montré une faible activité, il semble que l'eucalyptol et le camphre qu'elle contienne, ont renforcé l'effet antibactérien du thymol dans la combinaison thym/romarin (**Garcia-Diez et al., 2016**).

Les effets synergiques ont été aussi observés dans des combinaisons d'huiles essentielles sous leur forme gazeuse. Par exemple, Cho et al. (**2019**) a montré que les combinaisons : origan / thym thymol, cannelle / origan et cannelle/thym thymol, sous la forme gazeuse, produisent une activité synergique avec des FICI variant de 0.375 à 0.5, contre des souches de *L. monocytogenes*. De plus, Les CMI individuelles de ces HEs, ont a été réduites après combinaison, de 4 fois à 8 fois. Ces résultats fournissent ainsi, des informations utiles pour le

développement des antimicrobiens impliquant des gaz d'HEs, pour lutter contre les pathogènes (Cho *et al.*, 2019).

II.4.3- Synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques

De nombreuses études ont rapporté l'existence des associations positives entre les huiles essentielles et les antibiotiques conventionnels. Les combinaisons synergiques d'HE-antibiotique sont importantes car elles pourraient être utilisées pour augmenter la sensibilité aux antibiotiques, ce qui permettrait à ces antibiotiques actuels d'être réappliqués contre les bactéries résistantes. De plus la multitude des modes d'action de ces combinaisons, peut aussi réduire le taux d'émergence de résistance (Van Vuuren et Viljoen, 2011).

Dans deux études de Miladinovic *et al.* (2013, 2014), les interactions de l'huile essentielle de *Thymus pulegioides* et de HE de *Peucedanum officinale* avec trois antibiotiques standards (tétracycline, streptomycine et chloramphénicol) ont été testés sur cinq souches. Les résultats ont révélé que la combinaison d'huile de *Thymus pulegioides* et le chloramphénicol, montre de très forts effets synergiques (FICI allant de 0.21 à 0.43) contre quatre souches à gram négatif, avec la réduction des CMI de l'antibiotique. Par ailleurs, malgré que l'huile de *Peucedanum officinale* exerçait une faible activité lorsqu'elle est testée seule, celle-ci a montré une forte activité synergique en combinaison avec le chloramphénicol, contre trois souches à gram négatif, avec la diminution des CMI de ces antibiotiques. L'analyse chimique de ces deux huiles a rapporté que les composés oxygénés (géraniol) de l'HE de *Thymus pulegioides* et les monoterpènes hydrocarbonés (α -phellandrene) de l'HE de *Peucedanum officinale* peuvent être à l'origine de ces effets synergiques. De plus, cette synergie observée exclusivement lorsque ces HEs sont combinées avec le chloramphénicol, a été expliquée par le fait que cet antibiotique est rarement utilisé comme agent thérapeutique contre les bactéries à gram négatif. Enfin, de telles combinaisons peuvent fournir une solution pour le traitement des bactéries à gram négatif, qui est devenue très difficile de nos jours.

Knezevic *et al.* (2015) ont révélé que l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*, montre une activité synergique avec la ciprofloxacine, ainsi qu'avec la polymexine B contre deux souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées de plaies (Aba 4914 et Aba 5055) (FICI représenté graphiquement, sous forme d'isobogramme). De plus, le test time-kill a révélé que la combinaison synergique d'HE d'*Eucalyptus camaldulensis*/polymexine B réduit rapidement le nombre de bactéries sous le seuil de détection (c'est-à-dire après seulement 6 h d'incubation). Cet effet synergique a été, partiellement attribué aux terpènes polaires et au

spathulenol (alcool sesquiterpénique) qui composent cette HE. Dans une autre étude réalisée sur des bactéries multirésistantes (*A. baumannii* et *E.coli* (BLSE)) et trois souches SARM, isolées de différents patients, il a été rapporté que trois HEs de plantes endémiques du Nord-africain (*Pituranthos chloranthus*, *Teucrium ramosissimum* et *Pistacia lentiscus*) montrent des effets synergiques avec certains antibiotiques standards. En effet, la combinaison de chacune de ces HE avec l'ofloxacine ou la novobiocine a démontré une activité synergique contre *E. coli* (BLSE) en réduisant significativement les CMI des antibiotiques ($P < 0.01$), et la combinaison *P. chloranthus*/amoxicilline exerce le même effet sur cette souche en réduisant 4 fois la CMI de l'amoxicilline. Ces effets ont été plus prononcés contre les souches SARM, où ces huiles ont toutes agité en synergie avec la plupart des antibiotiques testés (Amoxicilline, tétracycline, pipéracilline, oxacilline) en réduisant leur CMI, ce qui a induit ainsi, la resensibilisation des souches à ces antibiotiques ; la SARM 138 par exemple, été résistante à la pipéracilline et l'oxacilline, mais leur combinaison avec ces HEs a réduit leur CMI de 4 à 8 fois. En revanche, ces combinaisons avaient moins d'effet sur *A. baumannii*, mis à part l'amélioration de l'activité de l'ofloxacine (réduction de la CMI de 4 à 8 fois). Le test time-Kill a révélé que ces combinaisons HE/antibiotique ont réduit la population bactérienne d'*E. coli* et celle de SARM 753 jusqu'à moins de $4 \log_{10}$ UFC/g après 10 h d'incubation (Lahmar *et al.*, 2016). En fin, Plus récemment, El Atki *et al.* (2019), a démontré que l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*), aussi, exerce des effets synergiques avec l'ampicilline ou le chloramphénicol, contre une souche multirésistante de *S. aureus* (FICI= 0.38 et 0.5 respectivement), et le même effet a été observé sur *E. coli* par la combinaison HE/chloramphénicol (FICI= 0.5), avec des réductions dans les CMI. A travers ces études, on peut dire que, malgré que le degré d'activité de ces combinaisons varie entre les bactéries testées, ces huiles semblent très intéressantes, non seulement par leurs effets synergiques, mais aussi, par leur capacité à diminuer les CMI des antibiotiques et de resensibiliser ainsi les souches vis-à-vis des antibiotiques auxquels elles étaient résistantes. Cependant, pour une meilleure exploitation de ces HEs en thérapie, une investigation plus approfondie sur leurs mécanismes d'action et d'interaction, est encore nécessaire (Knezevic *et al.*, 2015; Lahmar *et al.*, 2016 ; El Atki *et al.*, 2019).

Selon Kwiatkowski *et al.* (2018), la combinaison de l'HE de menthe et la gentamicine montre un effet synergiques sur des isolats de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE et de NDM-1 (FICI= 0.1- 0.2), et l'HE de carvi combinée avec cet antibiotique, exerce le même effet contre d'autres souches de *K. pneumoniae* résistantes à la gentamicine et productrices de

BLSE (FICI= 0.2- 0.3). Par ailleurs, dans une étude plus ancienne, la gentamicine a démontré aussi un effet synergique en combinaison avec l'HE d'*Aniba rosaeodora* ou celle de *Pelargonium graveolens*, contre plusieurs souches bactériennes différentes, en particulier, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (FICI = 0.11). La CMI de la gentamicine a diminué dans ce cas, de 4 à 0,24 µg/ml (Rosato *et al.*, 2010). D'après ces résultats, on peut conclure que, ces HEs doivent faire l'objet de futures investigations pour développer des combinaisons spécifiques (gentamicine/HE) afin de réduire la résistance bactérienne à cet antibiotique et permettre ainsi de le réutiliser en thérapie, de manière plus large. En effet, il est vrai que l'injection intraveineuse des HEs n'est pas acceptable. Cependant, la gentamicine peut être aussi administrée par voie intramusculaire comme les médicaments contenant des composants insolubles (comme les HEs). Dans ce contexte, la possibilité d'une administration intramusculaire d'une combinaison d'HE/gentamicine, semble plus prometteuse pour l'éradication des souches de *K. pneumoniae*, par exemple, qui est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter de nos jours (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Dans une autre étude réalisée par Aelenei *et al.* (2018), l'huile essentielle de coriandre a montré de bons effets synergiques avec certains antibiotiques conventionnels, contre des bactéries à gram positif et des bactéries à gram négatif. En effet, cette HE agit en synergie (FICI<0.5) avec l'amoxicilline et la gentamicine contre des souches de SARM, ainsi qu'avec l'oxacilline et la tétracycline contre *S. aureus* ATCC 33591, en réduisant les CMIs de ces antibiotiques 8 et 16 fois. Tandis que, la souche *S. aureus* ATCC 43300 est devenue très sensible à la tétracycline en présence de l'HE (diminution de 50 fois de sa CMI). Concernant les bactéries à gram négatif, le meilleur effet synergique a été observé par la combinaison HE/gentamicine sur *P. aeruginosa*, suivi de celui des combinaisons HE/erythromycine et HE/tétracycline contre *E. coli* ATCC 25922. Les FICI de toutes ces combinaisons ont été représentés graphiquement par des isobogrammes. Enfin, il faut signaler que les CMIs d'HE essentielles rapportées, dans cette étude (5.44 µg/ml), sont significativement inférieures aux concentrations considérées comme cytotoxiques pour les cellules humaines (Souza *et al.* 2016; Elgndi *et al.* 2017). Par conséquent, l'HE de coriandre, peut être ajoutée à la liste des HEs prometteuses pour le traitement des infections (Aelenei *et al.*, 2018).

II.4.4- Synergie entre les constituants individuels des HEs et les antibiotiques

Les composants isolés des HEs ont également été analysés pour les interactions synergiques avec les antibiotiques (Owen et Laird, 2018). Par exemple, la combinaison de

chacun des trois composés, thymol, carvacrol et cinnamaldéhyde avec l'ampicilline, pénicilline, tétracycline, erythromycine, bacitracine ou novobiocine, produit des effets synergiques contre des souches multirésistantes d'*E. coli* et *S. typhimurium* en réduisant de 4 à 8 fois les CMI de ces antibiotiques. L'effet synergique a été aussi observé contre des souches de SARM, lorsque l'un de ces composés été combiné avec l'ampicilline, la pénicilline ou la bacitracine (**Palaniappan et Holley, 2010**).

Liu *et al.* (2015), ont rapporté que la combinaison de la streptomycine avec le thymol ou le cinnamaldéhyde, exerce un effet synergique sur *L. monocytogenes*, et que la combinaison de cet antibiotique avec l'eugénol, produit le même effet contre *S. typhimurium*. Plus récemment, il a été révélé que le thymol agit aussi en synergie avec la gentamicine (FICI= 0.5) contre des souches de *Streptococcus suis*, avec une réduction quadruple dans les CMIs de ces deux agents combinés (**de Aguiar et al., 2019**). Il est vrai que les bactéries testées dans ces deux études, ne sont pas considérées comme multirésistantes. Cependant, l'utilisation de ces combinaisons dans ce cas, permettrait plutôt de diminuer le taux d'émergence de résistance chez ces souches, contre certains antibiotiques, grâce à la multitude des modes d'action de ces combinaisons (**Van Vuuren et viljoen, 2011**).

Selon Aelenei *et al.* (2018), les combinaisons binaires contenant du linalol avec l'oxacilline, l'amoxicilline, la gentamicine, la ciprofloxacine ou la tétracycline, démontrent des effets synergiques contre *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228 avec une réduction allant de 4 à 25 fois dans les CMIs des antibiotiques, ainsi que sur deux souches de SARM avec une diminution des CMIs de 4 à 32 fois. Les mêmes effets ont été observés par la combinaison linalol/tétracycline, contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922, avec la réduction des CMI de la tétracycline 8 fois et 250 fois, respectivement. Dans une autre étude réalisée par Kwiatkowski *et al.* (2019), il été rapporté que la combinaison du menthone avec la mupirocine montre un effet synergique sur des souches de *S. aureus* sensibles à la mupirocine (SARM^{MupS}) avec un FICI= 0.38, en réduisant 4fois la CMI de l'antibiotique, et la combinaison 1,8-cineole/mupirocine montre un effet synergique, à la fois, sur les souches sensibles et les souches résistantes à la mupirocine (SARM^{MupRL}) (FICI=0.44 et 0.28 respectivement), avec la diminution des CMI de la mupirocine 4fois et 31fois pour ces deux souches respectivement. Ces rapports démontrent que même les combinaisons antibiotique/composant d'HEs, exercent de fortes activités synergiques sur les bactéries et peuvent aussi augmenter la sensibilité des souches hautement résistantes. De plus, les interactions entre l'antibiotique et un composant individuel d'HE, semblent plus facile à

élucider par rapport à une HE entière. Par conséquent, ces combinaisons fournissent une autre solution pour lutter contre les bactéries multirésistantes (**Aelenei et al., 2018** ; **Kwiatkowski et al., 2019**)

À la connaissance des auteurs, aucune étude *in vivo* n'a été publiée sur l'utilisation des HEs et leurs composants pour améliorer l'efficacité des antibiotiques comme thérapie antibactérienne. Cependant, quelques études sur l'utilisation des HEs dans le soin des plaies donnent une indication sur le potentiel de la thérapie combinée. Par exemple, il a été démontré qu'un mélange d'HEs contenant principalement, l'huile d'eucalyptus, utilisé pour le traitement des ulcères nécrotiques cancéreux chez des patients sous antibiotiques, a conduit à une réduction de l'inflammation et des mauvaises odeurs, et dans certains cas à la réduction complète des ulcères (**Warnke et al., 2006**). Bien que les modes d'administration du mélange d'HE et de l'antibiotique soient différents, une interaction entre ces deux substances au site d'infection ne peut être exclue (**Langeveld et al., 2013**). Les études *in vivo* sont cruciales pour évaluer le potentiel de cette stratégie comme moyen de traiter les infections par les bactéries résistantes, cependant, avant de les effectuer, d'autres investigations *in vitro* sont encore nécessaires pour une meilleure compréhension des modes d'action et de la toxicité des combinaisons antibiotique/HE (**Owen et Laird, 2018**). L'ensemble des combinaisons HE/antibiotique et composant d'HE/antibiotiques, rapportées ici, sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 05: Combinaisons synergiques, antibiotique/HE et antibiotique/composant d'HEs, avec les réductions des CMI_A d'antibiotique qui en résulte.

Combinaisons	Souches	FICI	Réduction de la CMI _A	Méthode	Références
<i>Thymus pulegioides</i> Chloramphénicol	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.21	10 fois	l'échiquier (FICI et isobologramme)	Miladinovic et al., 2013
	<i>K. pneumonia</i> ATCC 700603	0.32	10 fois		
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	0.43	10 fois		
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.32	3 fois		
<i>Peucedanum officinale</i> Chloramphénicol	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.32	>10 fois	l'échiquier (FICI)	Miladinovic et al., 2014
	<i>K. pneumonia</i> ATCC 700603	0.21	>10 fois		
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.32	>10 fois		

<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Ciprofloxacin (CI) ou Polymexine B (PB)	<i>A. baumannii</i> 4914 <i>A. baumannii</i> 5055	-	4 fois (CI) 2 fois (PB)	L'échiquier (isobogramme) Test Time-Kill	Knezevic et al., 2015
<i>Pituranthos chloranthus</i> Amoxicilline	<i>E.coli</i> (BLSE) SARM 753	-	4 fois >15 fois	L'échiquier Test Time-Kill	Lahmar et al., 2016
<i>Pituranthos chloranthus</i> Pipéracilline	SARM 760 SARM 138	-	10 fois 4 fois		
<i>Pituranthos chloranthus</i> Oxacilline	SARM 138 SARM 753	-	8 fois 8 fois		
<i>Pituranthos chloranthus</i> Novobiocine	<i>E.coli</i> (BLSE)	-	16 fois		
<i>Pituranthos chloranthus</i> Ofloxacin	<i>E.coli</i> (BLSE) SARM 760 <i>A. baumannii</i>	-	8 fois 32 fois 4 fois		
<i>Teucrium ramosissimum</i> Ofloxacin	<i>E.coli</i> (BLSE) SARM 760 <i>A. baumannii</i>	-	8 fois 32 fois 8 fois		
<i>Teucrium ramosissimum</i> Amoxicilline (AM) ou Tétracycline (Tet)	SARM 753	-	15 fois (AM) 8 fois (Tet)		
<i>Teucrium ramosissimum</i> Pipéracilline (Pi) ou Oxacilline (Ox)	SARM 138 SARM 753 SARM 760	-	4fois (Pi/Ox) 8fois (Pi/Ox) 16 fois (Ox) 4 fois (Pi)		
<i>Pistacia lentiscus</i> Ofloxacin	<i>E.coli</i> (BLSE) SARM 760 <i>A. baumannii</i>	-	8 fois 8 fois 4 fois		
<i>Pistacia lentiscus</i> Novobiocine	<i>E.coli</i> (BLSE)	-	8 fois		
<i>Pistacia lentiscus</i> Pipéracilline	SARM 138	-	8 fois		
<i>Pistacia lentiscus</i> Amoxicilline (AM) Ou Oxacilline (Ox)	SARM 753 SARM 760	-	4 fois (AM) 8 fois (Ox) 8 fois (AM) 2 fois (Ox)		
Menthe poivrée Gentamicine	<i>k. pneumoniae</i> 5404 (BLSE) (NDM-1) <i>k. pneumoniae</i> 10245 (BLSE) (NDM-1)	0.1 0.2	De 3.1 à 0.2 (mg/L)	L'échiquier (FICI)	Kwiatkowski et al., 2018

Carvi Gentamicine	<i>k. pneumonia</i> 35214 (BLSE)	0.2	De 585.9 à 6.1 (mg/L)		
	<i>k. pneumonia</i> 2725 (BLSE)	0.3	De 293 à 1.5 (mg/L)		
<i>Aniba rosaedora</i> Gentamicine	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0.11	De 4 à 0,24 (µg/ml)	L'échiquier (FICI et isobologramme)	Rosato et al., 2010
<i>Pelargonium graveolens</i> Gentamicine		0.11			
Coriandre Amoxicilline	SARM	-	8 fois	L'échiquier (isobologramme)	Aelenei et al., 2018
Coriandre Oxacilline	<i>S. aureus</i> ATCC 33591	-	16 fois		
Coriandre Gentamicine	SARM	-	8 fois		
	<i>S. aureus</i> ATCC 33591	-	4fois		
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	50 fois		
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	-	62 fois		
Coriandre Tétracycline	<i>S. aureus</i> ATCC 33591	-	16 fois		
	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	-	50 fois		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	8 fois		
Coriandre Erythromycine	<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	16 fois		
<i>Cinnamomum cassia</i> Chloramphénicol	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.5	De 0.31 à 0.08 (µg/ml)	L'échiquier (FICI)	El Atki et al., 2019
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.5			
<i>Cinnamomum cassia</i> Ampicilline	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	0.38	De 0.16 à 0.04 (µg/ml)		
Thymol/Ampicilline	<i>S. typhimurium</i>	0.12	-	L'échiquier (FICI)	Palaniappan et Holley, 2010
	<i>E.coli</i>	0.12	-		
	SARM	0.12	-		
Thymol/Pénicilline	<i>S. typhimurium</i>	0.13	-		
	<i>E.coli</i>	0.20	-		
	SARM	0.18	-		

Thymol /Tétracycline	<i>S. typhimurium</i>	0.1	-		
	<i>E.coli</i>	0.15	-		
Thymol/Streptomycine	<i>L. monocytogenes</i>	0.31	-	L'échiquier (FICI)	Liu et al., 2015
Thymol/Gentamicine	<i>Streptococcus suis</i>	0.5	4 fois	L'échiquier (FICI)	De Aguiar et al., 2019
Carvacrol/Tétracycline	<i>S. typhimurium</i>	0.18	-	L'échiquier (FICI)	Palaniappan et Holley, 2010
	<i>E.coli</i>	0.15	-		
Carvacrol/Ampicilline	<i>S. typhimurium</i>	0.25	-		
	<i>E.coli</i>	0.25	-		
	SARM	0.15	-		
Carvacrol/Bacitracine	<i>S. typhimurium</i>	0.25	-		
	<i>E.coli</i>	0.25	-		
	SARM	0.25	-		
Cinnamaldéhyde/ Novobiocine	<i>S. typhimurium</i>	0.24	-		
	<i>E.coli</i>	0.24	-		
Cinnamaldéhyde/ Erythromycine	<i>S. typhimurium</i>	0.24	-		
	<i>E.coli</i>	0.24	-		
Cinnamaldéhyde/ Ampicilline	<i>S. typhimurium</i>	0.25	-		
	<i>E.coli</i>	0.37	-		
	SARM	0.25	-		
Cinnamaldéhyde/ Streptomycine	<i>L. monocytogenes</i>	0.37	-	L'échiquier (FICI)	Liu et al., 2015
Eugénol/Streptomycine	<i>S. typhimurium</i>	0.37	-		
Linalol/Oxacilline /Amoxicilline /Gentamicine /Ciprofloxacine /Tétracycline	SARM	-	De 4 à 32fois	L'échiquier (isobologramme)	Aelenei et al. 2018
	<i>S. aureus</i>	-	De 4 à 25fois		
	ATCC 6583	-			
	<i>S. epidermidis</i>	-			
	ATCC 12228				
Linalol/Tétracycline	<i>P. aeruginosa</i>	-	8 fois		
	ATCC 27853				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	250 fois		
Menthone/Mupirocine	SARM ^{MupS}	0.38	4 fois	L'échiquier (FICI)	Kwiatkowski et al., 2019
1,8 cineole/Mupirocine	SARM ^{MupS}	0.44	4fois		
	SARM ^{MupRL}	0.28	31 fois		

CMI_A : CMI de l'antibiotique ; (-) : non rapporté.

II.5- Mode d'action des effets synergiques

Le site et le mode d'action de chaque constituant d'huile essentielle, les mécanismes aboutissant à une synergie ou à un antagonisme avec d'autres antimicrobiens, sont des paramètres très importants, qu'ils faudrait bien maîtriser, pour mieux exploiter les combinaisons synergiques dans la lutte contre les microorganismes (**Hyldgaard et al., 2012**).

Il existe très peu de rapports sur les mécanismes d'action des combinaisons d'HEs ou leurs composants purifiés sur les microorganismes (**Bassolé et Juliani, 2012**). De plus, Étant donné que le mécanisme d'action des HEs n'est pas encore complètement compris, la détermination de leur mécanisme d'interaction avec les antibiotiques reste une tâche complexe (**Owen et Laird, 2018**). Par conséquent, Les modes d'action synergiques entre les HEs et les antibiotiques ne sont pas bien élucidés, non plus. Cependant, il existe certains mécanismes théoriques, généralement acceptés, qui aboutissent à une interaction synergique entre les antimicrobiens (**Bassolé et Juliani, 2012**) :

II.5.1- Action simultanée sur plusieurs voies ou cibles

Dans ce cas, l'effet synergique peut être induit par des modes d'action différents des agents antimicrobiens combinés, en attaquant deux sites différents sur ou dans la cellule, qui dépendent indirectement l'un de l'autre (**Hyldgaard et al., 2012**). Les effets synergiques multi-cibles signifient que les constituants uniques d'un seul antimicrobien ou d'une combinaison de plusieurs antimicrobiens affectent, non seulement, une seule cible, mais plusieurs cibles et coopèrent donc, de manière synergique. Ces cibles peuvent être : des enzymes, des substrats, des métabolites et des protéines, des récepteurs, des canaux ioniques, des ribosomes, de l'ADN/ARN (**wagner et Merzenich, 2009**). Il semble que ce mécanisme est le plus fréquent et le plus productif pour les effets synergiques des HEs, étant donné que celles-ci sont connues pour la multitude de leurs cibles (**Langeveld et al., 2013**).

Selon Chraïbi *et al.* (2020), l'effet synergique observée entre l'HE de *Rosmarinus officinalis* et le carvacrol, est attribué aux principaux monoterpènes hydrocarbonés (l' α -pinène, le myrcène et le camphène) qui constituent cette HE, et qui interagissent avec la membrane cellulaire, facilitant ainsi, la pénétration du carvacrol (**De Azeredo et al., 2011**). Ce mécanisme a été également attribué pour l'effet synergique des combinaisons, eugénol/carvacrol et eugénol/thymol, où, il a été suggéré que le carvacrol et le thymol

désintégrant la membrane externe de *E. coli*, et permettait ainsi à l'eugénol de pénétrer facilement au cytoplasme et d'interagir avec différentes protéines (Pei *et al.*, 2009).

Ce mode d'action peut apparaître aussi dans les combinaisons HE/antibiotique, où les HEs agissent de manière non spécifique sur l'enveloppe cellulaire, et les antibiotiques ont une cible spécifique (synthèse protéique, réplication), ce qui peut améliorer l'effet inhibiteur (meilleure pénétration de l'antibiotique) (Langeveld *et al.*, 2013). Ainsi, Knezevic *et al.* (2015) ont émis l'hypothèse que l'effet synergique qui résulte de la combinaison d'HE d'*Eucalyptus camaldulensis*, et la ciprofloxacine, est lié à l'action de l'HE qui endommage principalement l'enveloppe bactérienne et permet donc, à la ciprofloxacine d'accéder vers la cellule et d'agir sur l'ADN gyrase pour inhiber la réplication de l'ADN. Cependant, il faut signaler que, certaines études ont rapporté aussi, la présence d'effets synergiques entre des HEs et des antibiotiques, qui agissent tous les deux sur la membrane cellulaire. Par exemple, l'HE d'origan été synergique avec la pénicilline contre *E. coli* (Gallucci *et al.*, 2006), et la polymyxine B exerçait une synergie avec l'HE d'*E. camaldulensis*, en agissant tous les deux, avec un mode d'action similaire sur la membrane d'*A. baumannii* (Knezevic *et al.*, 2015).

Ce mécanisme d'action simultané contre la membrane cellulaire, a été aussi observé dans des combinaisons de différentes HEs et il peut être très bien illustré par l'étude de Fei *et al.* (2011), grâce aux images fournies par le **microscope électronique à balayage** (MEB). Les micrographies électroniques des cellules microbiennes non traitées (témoin) et traitées à la fois par une combinaison d'HEs sont présentées dans les figures suivantes :

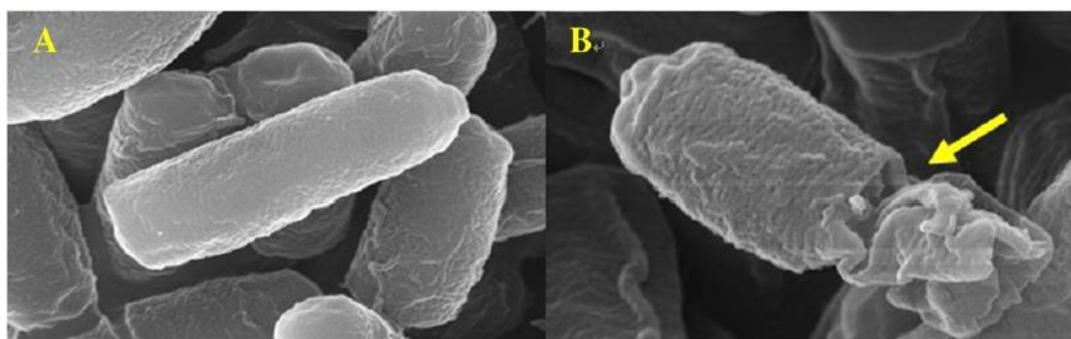


Figure 09: Micrographies électroniques à balayage de cellules d'*E. coli* non traitées (A) ($G \times 3000$) et des cellules traitées avec la combinaison d'HE d'origan/basilic (B) ($G \times 20000$) (Fei *et al.*, 2011).

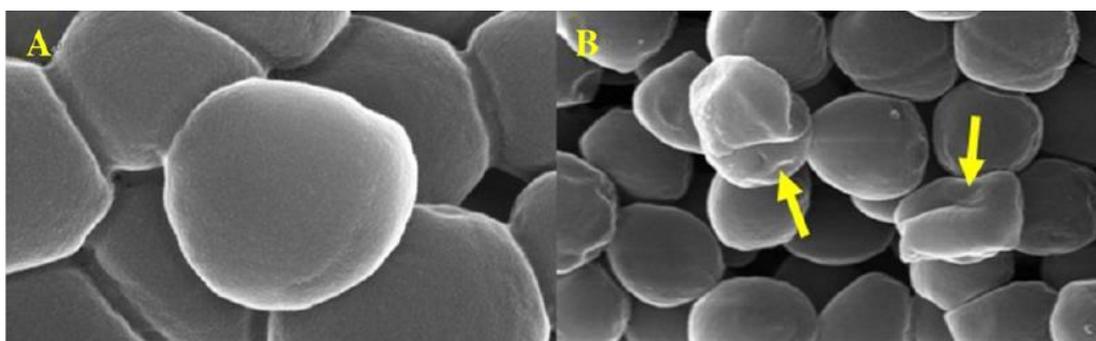


Figure 10: Micrographies électroniques à balayage de cellules *S. aureus* non traitées (A) (G×100000) et des cellules traitées avec la combinaison d'HE de basilic/bergamote (B) (G× 50 000) (Fei *et al.*, 2011).

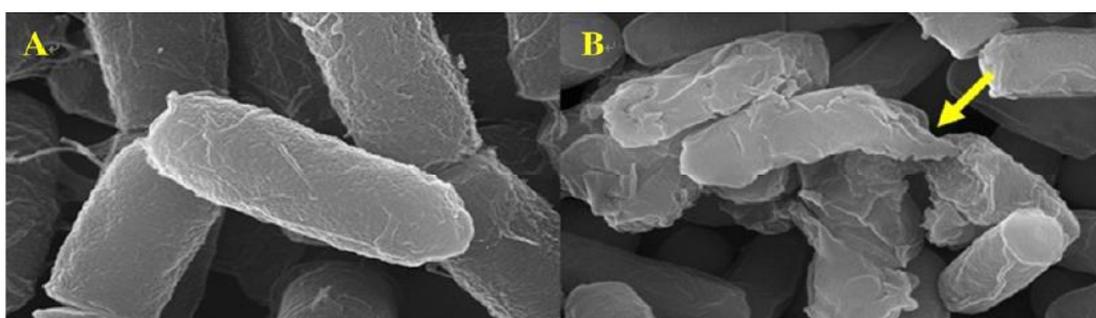


Figure 11 : Micrographies électroniques à balayage de cellules de *B. subtilis* non traitées (A) (G×30000) et de cellules traitées avec les combinaisons d'huile d'origan/bergamote (B) (G × 50 000) (Fei *et al.*, 2011).

Les cellules non traitées (les figures A) n'avaient aucun changement de la structure typique des souches bactériennes ; une paroi strié pour *E. coli* (Fig.1A) et *B. subtilis* (Fig. 3A), et une paroi lisse pour *S. aureus* (Fig. 2A). En revanche, après le traitement des souches avec les combinaisons d'HEs, des changements défavorables sont apparus sur la morphologie des membranes cellulaires ; déformation des parois cellulaire, accompagné par la rupture et la lyse des membranes des trois souches *E. coli* (Fig.1B), *S. aureus* (Fig. 2B), *B. subtilis* (Fig. 3B). De plus, une augmentation dans la perméabilisation des cellules a été observée, grâce à la mesure de l'absorbance du surnageant des souches à 260 nm, après traitement avec les combinaisons des HEs, et il été révélé que la libération des constituants cytoplasmiques augmente avec l'augmentation des concentrations des HEs par rapport aux souches non traités. Une perte importante de constituants cellulaires signifie que des dommages irréversibles aux membranes cytoplasmiques se sont produits, ce qui détruit l'intégrité de la membrane cellulaire, entraînant la mort des micro-organismes (Fei *et al.*, 2011).

II.5.2- Effets pharmacocinétiques ou physicochimiques

C'est le cas d'une solubilité améliorée par l'addition d'un autre composé. Ce mode d'action synergique, peut être trouvé chez les composés phytochimiques phénoliques qui ne possèdent pas eux-mêmes d'effets pharmacologiques, mais qui peuvent augmenter la solubilité et/ou le taux de résorption (pénétration) des principaux constituants actifs de l'extrait (ou HE) et améliorer ainsi sa biodisponibilité dans une sorte d'effet pharmacocinétique, qui conduit simultanément à une efficacité plus élevée de l'extrait, qu'un constituant isolé de celui-ci (Wagner et Merzanich, 2009; Langeveld *et al.*, 2013). L'exemple illustratif de ce mécanisme, est celui de l'amélioration de la sensibilité au carvacrol chez *Bacillus cereus* par la présence du p-cymène. En effet, il semble que le p-cymène, qui est un très faible antibactérien lorsqu'il est seul, s'accumule dans les membranes bactériennes et déforme leur structure physico-chimique, ce qui permet, probablement, au carvacrol d'être transporté plus facilement dans la cellule (Ultee *et al.*, 2002). Par comparaison à ce mode d'action, plus récemment, il a été suggéré que l'effet synergique de la combinaison d'HE *Lavandula dentata* / *Origanum majorana*, peut être attribué à la β -pinène (de *L. dentata*) qui entraîne l'augmentation de l'absorption du (-) - terpinène-4-ol et le trans-4-thujanol (de *O. majorana*) (Ouedrhiri *et al.*, 2017).

II.5.3- Inhibition des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries

Une troisième possibilité pour l'effet synergique est connue depuis de nombreuses années, et qui survienne lorsque les antibiotiques sont associés à des agents capables d'inhiber les mécanismes de résistance bactérienne (Wagner et Merzenich 2009). L'exemple le plus connu d'une telle combinaison est l'utilisation de la pénicilline, avec de l'acide clavulanique qui inhibe avec succès les pénicillinases (Lee *et al.*, 2003).

Il existe certaines preuves indiquant que, les composants d'HEs peuvent interagir de manière synergique avec les antibiotiques en interférant avec les mécanismes de résistance aux antibiotiques, particulièrement, l'inhibition des pompes à efflux. Le blocage de ces pompes, pourrait restaurer l'activité de l'antibiotique en augmentant son accumulation dans la cellule (resensibilisation de la bactérie grâce au traitement combiné) (Langeveld *et al.*, 2013; Owen et Laird, 2018). Ainsi, Kovac *et al.*, (2015), ont montré que l'(-)- α -pinène, inhibait les pompes Δ cmeB et Δ Cj1687, chez *Campylobacter jejuni*, ce qui diminue la CMI de la ciprofloxacine et l'érythromycine avec un facteur allant de 2 à plus de 512 fois. De même,

l'HE de *Chenodium ambrosioides*, a réduit 2 fois la CMI de la tétracycline chez *S. aureus*, en inhibant la pompe Tet(K) (Limaverde *et al.*, 2017).

Un autre effet des HEs sur la résistance, est celui de l'élimination des plasmides. En effet, Schelz *et al.* (2006) ont conclu que l'HE de la menthe poivrée (*Mentha piperita*) inhibait la réplication du plasmide F'lac dans *E. coli*, qui code pour les protéines de conjugaison bactérienne, tandis que le principal composant de cette HE (le menthol), éliminait le plasmide. Il est vrai que le plasmide analysé dans cette étude ne confère pas une résistance, mais si l'inhibition des plasmides conférant une résistance est possible par les HEs, cela pourrait être utilisé comme stratégie pour augmenter la sensibilité aux antibiotiques et réduire la dissémination des gènes de résistance. Cependant, il n'y a que très peu de rapports qui montrent cet effet, et des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre ce mécanisme et l'exploiter ainsi, dans la lutte contre la résistance (Owen et Laird, 2018).

Pour conclure, le schéma suivant donne des exemples de la façon dont les HEs sont censées interagir pour aboutir à une synergie avec les antibiotiques :

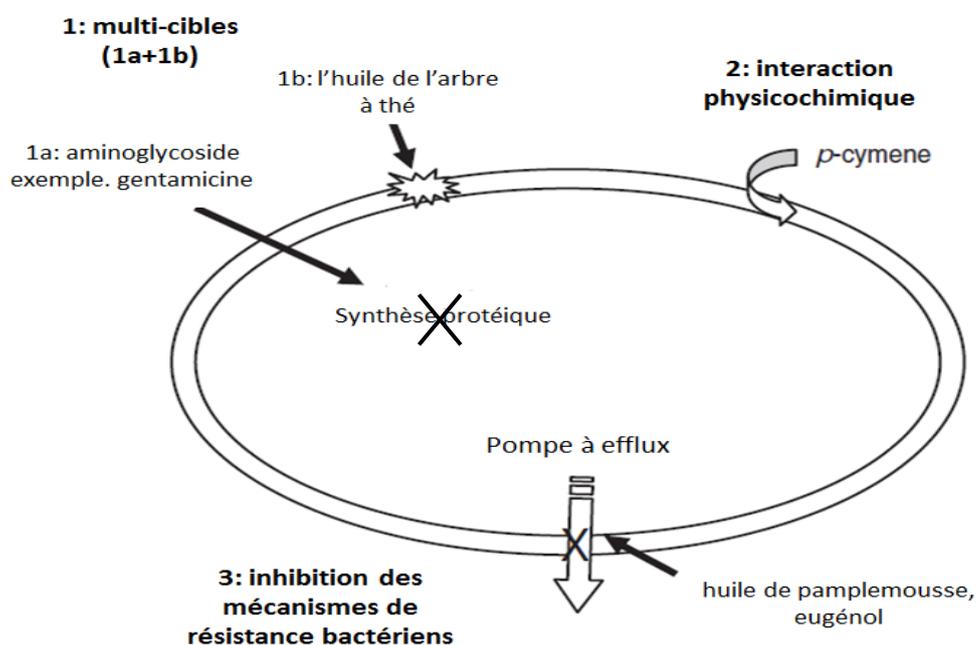


Figure 12 : Mécanismes pouvant contribuer à une synergie entre les HEs et antibiotiques (Hemaiswarya *et al.*, 2008) avec des exemples (Langeveld *et al.*, 2013).

Conclusion

Conclusion

Le rythme alarmant avec lequel la résistance bactérienne augmente, est observé dans le taux élevé de morbidité et de mortalité. Ce phénomène est l'un des plus grands défis auxquels sont confrontés les cliniciens et les chercheurs. L'inefficacité des traitements médicaux existant, a conduit à la recherche de nouveaux médicaments efficaces pour résoudre ce problème. Les HEs possèdent d'importantes propriétés biologiques, notamment, l'activité antimicrobienne, qui leurs permettent d'être utilisée dans différents domaines, comme l'industrie agro-alimentaire, les cosmétiques et les médicaments. De plus, malgré que la compréhension de leur mode d'action soit limitée, l'efficacité prometteuse de ces HEs et de leurs composants, sur les bactéries pathogènes et multirésistantes a été rapportée dans plusieurs revues, fournissant ainsi, une solution potentielle pour lutter contre la résistance aux antibiotiques. De plus, Tel que discuté dans cette revue, il y'a plein de possibilités pour que les HEs soit utilisées en combinaison avec d'autre HEs ou avec des antibiotiques conventionnels, comme nouvelles modalités de traitement des bactéries multirésistantes. En effet, cette stratégie permettrait aux antibiotiques d'être réappliqués sur les bactéries résistantes et de diminuer le taux d'émergence de résistance, en réduisant la dose efficace requise dans les traitements. Cependant, il reste encore beaucoup de travaux à faire pour bien comprendre certains paramètres, notamment, la stabilité des combinaisons, leurs modes d'action, la sélectivité, la dose optimale et leurs effets indésirables en tant que traitement. Ces lacunes doivent être donc, prises en compte avant d'appliquer les HEs pour l'usage clinique. En outre, les méthodes utilisées pour l'évaluation des interactions des HEs avec les autres antimicrobiens, différent largement, rendant ainsi, la comparaison des résultats très difficile. Par conséquent, plus de recherches sont nécessaires pour, l'élaboration de nouvelles méthodes normalisées pour une mieux comprendre les associations des HEs avec les autres antimicrobiens, avant de les développées dans des nouvelles formules antibactériennes.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abraham, E.P et E. Chain. (1940).** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev. Infect. Dis.* 10: 677-678.
- **Aelenei, P., Rimbu, C. M., Guguianu, E., Dimitriu, G., Aprotosoai, A. C., Brebu, M., Horhoge, C. E. et Miron, A. (2018).** Coriander essential oil and linalool - interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology.* 68(2): 1-25.
- **Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Loran, S., Rota, C. et Pagan, R. (2011).**The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 12:320-329.
- **Alekshun Michael N. et Levy, S.B. (2007).** Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell.*45: 5072-5129.
- **Aljaafari Mariam, Maryam Sultan Alhosani, Aisha Abushelaibi, Kok-Song Lai et Swee-Hua Erin Lim. (2019).** Essential Oils: Partnering with Antibiotics, Essential Oils - Oils of Nature, Hany A. El-Shemy, IntechOpen.
- **Allahverdiyev, A.M., Kon, K.V., Abamor, E.S., Bagirova, M et Rafailovich, M. (2011).** Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 9:1035-1052
- **Allen, N.E. et Nicas, T.I. (2003).** Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 511-532.
- **Almeida Da Cruz, E.T., de Souza, G.T., de Sousa Guedes, J.P., Barbosa, I.M., de Sousa, C.P., Castellano, L.R.C., Magnani, M et de Souza, E.L. (2019).** *Mentha piperita* L. essential oil inactivates spoilage yeasts in fruit juices through the perturbation of different physiological functions in yeast cells. *Food Microbiol.* 82 : 20-29.
- **Alvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Hancock, R.E. et Martinez JL. (2011).**The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactams. *Virulence,* 2:144 -146.
- **Amaral, R.G., Fonseca, C.S., Silva, T.K., Andrade, L.N., Franc, M.E., Barbosa-Filho, J.M., Sousa, D.P., Moraes, M.O., Pessoa, C.O., Carvalho, A.A. et Sara, M.T. (2015).** Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. *J Pharm Pharmacol.* 67:1100-1106.

Références bibliographiques

- **Aminov, R.I. (2011).** Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2, n° 158.
- **Anderson, V.E., Zaniewski, R.P., Kaczmarek, F.S., Gootz, T.D. et Osheroff. N. (1999).** Quinolones inhibit DNA religation mediated by *Staphylococcus aureus* topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 274: 35927-35932.
- **Andrade, L.N et De Sousa, D.P. (2013).** A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules.* 18: 1227-1254.
- **Apolonio, J., Faleiro, M.L., Miguel, M.G. et Neto, L. (2014).** No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. *FEMS Microbiol. Lett.* 354: 92-101.
- **Arriaza P. (2010).** Topic 7 essential oil. In: Industrial Utilization of Medicinal and Aromatic Plants [Internet]. Madrid, Spain: OpenCourseWare of the Polytechnic University of Madrid.
- **Astani, A., Jürgen, R. et Paul, S. (2009).** Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. *Phytother. Res.* 24: 673-679.
- **Bag, A. et Chattopadhyay, RR. (2015).** Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLoS One*, 10(7): e0131321.
- **Bajpai, V.K., Baek, K.-H. et Baek, S.C. (2012).** Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Res. Int.*45: 722-734.
- **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. et Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2): 446-475.
- **Ball, A.R., Casadei, G., Samosorn, S., Bremner, J.B., Ausubel, F.M et Moy, T.I. (2006).** Conjugating berberine to a multidrug resistance pump inhibitor creates an effective antimicrobial. *ACS Chem. Biol.* 1: 594-600.
- **Balz, R. (1999).** The power of essential oils, 1st ed. Lotus press: twin lakes, WI, USA. Pp 27-80.
- **Baquero, F., Alvarez-Ortega, C et Martinez, J. L. (2009).** Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ. Microbiol. Rep.* 1: 469-476.
- **Bassolé, I.H.N et Juliani, H.R. (2012).** Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules.*, 17: 3989-4006

Références bibliographiques

- **Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C et Dicko, M.H. (2010).** Composition and antimicrobial activities of Lippia multi- flora Moldenke, *Mentha piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*. 15: 7825-7839.
- **Battistini Roberta., Irene Rossini., Carlo Ercolini., Maria Gorla., Maria Rita Callipo., Cristiana Maurella., Enrico Pavoni et Laura Serracca. (2019).** Antiviral Activity of Essential Oils Against Hepatitis A Virus in SoftFruits. *Food and Environmental Virology*.
- **Bauer, K., Garbe, D et Surburg, H. (2001).** Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293.
- **Bazargani, M.M et Rohloff, J. (2016).** Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms. *Food Control*. 61:156-164
- **Beaber, J.W., Hochhut, B. et Waldor, M.K (2004).** SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427: 72-74.
- **Becerril, R., Nerin, C. et Gomez-Lus, R. (2012).** Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Food borne Pathogens Dis*, 9:699-705.
- **Benelli, G., Bedini, S., Flamini, G., Cosci, F., Cioni, PL., Amira, S., Benchikh, F., Laouer, H., Di Giuseppe, G et Conti, B. (2015).** Mediterranean essential oils as effective weapons against the West Nile vector *Culex pipiens* and the Echinostoma intermediate host *Physella acuta*: what happens around? An acute toxicity survey on non-target mayflies. *Parasitol Res*. 114: 1011-1021.
- **Benelli, G., Govindarajan, M., Rajeswary, M., Senthilmurugan, S., Vijayan, P., Alharbi, NS., Kadaikunnan, S et Khaled JM. (2017b).** Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including Zika virus vectors: the promising potential of (4E,6Z)-allo-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate. *Parasitol Res*. 116: 1175-1188.
- **Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Nicoletti, M., Senthil-Nathan, S., Mehlhorn, H et Maggi F. (2017a).** Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector

Références bibliographiques

- Culex quinquefasciatus*: synergistic and antagonistic effects. *Parasitol Int.* 66 : 166-171.
- **Bentley, R et Bennett, J. W. (2003).** Advances in applied microbiology, (eds Laskin A. I., Bennett J. W. & Gadd G. M.). *Academic Press*, Cambridge, MA, USA, 52: 303-313.
 - **Berdejo, D., Chueca, B., Pagán, E., Renzoni, A., Kelley, W.L., Pagán, R. et Garcia-Gonzalo, D. (2019).** Sub-Inhibitory Doses of Individual Constituents of Essential Oils Can Select for *Staphylococcus aureus* Resistant Mutants. *Molecules*, 24, n° 170.
 - **Betts, T.J. (2001).** Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr. A* 936: 33-46.
 - **Bolla J-M, Alibert-Franco S, Handzlik J, Chevalier, J., Mahamoud, A., Boyer, G., Kieć-Kononowicz, K. et Pagès, J-M. (2011).** Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant gram-negative bacteria. *FEBS Lett*, 585:1682-1690.
 - **Boonyanugomol, W., Krairiwattana, K., Rukseree, K., Boonsam, K. et Narachai, P. (2017).** In vitro synergistic antibacterial activity of the essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Infect. Public health.* 10: 586-592.
 - **Bouguerra, A., Himed, L. et Barkat, M. (2014).** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces *Citrus reticulata*. *Nutr.Santé.*3(1) : 32-39.
 - **Boukhatem, M.N., Ferhat, A. et Kameli, A. (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. *Agrobiologia*, 9(2): 1653-1659.
 - **Boyle, W. (1955).** Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfum. Essent. Oil Rev.*66: 25-28.
 - **Braga Paiano Renan, Jeannine Bonilla, Ricardo Luiz Moro de Sousa, Andrea Micke Moreno et Pietro Sampaio Baruselli. (2019).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils against pathogens often related to cattle endometritis. *J Infect Dev Ctries*, 14(2): 177-183.
 - **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris

Références bibliographiques

- **Bucka-Kolendo, J. et Sokołowska, B. (2017).**Lactic acid bacteria stress response to preservation processes in the beverage and juice industry. *Acta Biochim. Pol.* 64: 459-464.
- **Burt, S. (2004).** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- **Bush K. (2013).** Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci.*1277: 84-90.
- **Bush, K., Patrice, C., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G.A., Roy, K et al, (2011).** Tackling antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 894-896.
- **Caballero, B., Trugo, L.C et Finglas, P.M. (2003).** Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands.
- **Čabarkapa Ivana., Radmilo Čolović., Olivera Đuragić., Sanja Popović., Bojana Kokić., Dubravka Milanov et Lato Pezo. (2019).** Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis, *Biofouling*, 35(3): 361-375.
- **Campbell, EA., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A et Darst, SA. (2001).** Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.* 104: 901-912.
- **Canton, R., Gonzalez-Alba, JM et Galan, JC. (2012).** CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* 3, n° 110.
- **Carneiro de Barros, J., Lucia da Conceicao, M., Gomes Neto, N.J., Edwards, M., Ercolini, D. et Mauriello, G. (2009).** Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT - Food Sci Technol*, 42:1139-1143.
- **Carson, C.F et Riley, T.V. (1995).** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 264-269.
- **Cattoir, V., Poirel, L., Aubert, C., Soussy, C. J. et Nordmann, P. (2008).** Unexpected Occurrence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 14(2): 231-237.
- **Chافتar, N., Girardot, M., Labanowski, J., Ghrairi, T., Hani, K., Frere, J. et Imbert, C. (2015).** Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19

Références bibliographiques

- essential oils. In: Donelli G, editor. Advances in microbiology, infectious diseases and public health. Vol 901. Cham (Switzerland): Springer; p. 1-15.
- **Chaib, F., Allali, H., Bennaceur, M et Flamini, G. (2017).** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from the Aerial Parts of *Asteriscus graveolens* (Forssk.) Less. and *Pulicaria incisa* (Lam.) DC.: Two Asteraceae herbs Growing Wild in the hoggar. *Chem. Biodivers.* 14, e1700092.
 - **Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M. et Ed-Dra, A. (2015).** Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytotherapie.* 14(6) : 355-362.
 - **Chen, I. et Dubnau D. (2004).** DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 241-249.
 - **Chen, S.T., Dou, J., Temple, R., Agarwal, R., Wu, K.-M et Walker, S. (2008).** New therapies from old medicines. *Nature Biotechnology.* 26: 1077-1083.
 - **Chen, Y., Huang, S., Sun, F., Chiang, Y., Chiang, C., Tsai, C. et Weng, C. (2011).** Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Pharm Sci*, 43:188-194.
 - **Chibane, B., L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J. et Oulahal, N. (2019).** Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *J. Sci. Food Agric.* 99: 1457-1474.
 - **Cho Y., Kim, H., Beuchatc, L.R. et Ryua, J-H. (2019).** Synergistic activities of gaseous oregano and thyme thymol essential oils against *Listeria monocytogenes* on surfaces of a laboratory medium and radish sprouts. *Food Microbiology.* 86, n°103357.
 - **Chouhan, S., Sharma, K. et Guleria, S. (2017).** Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines.* 4, n°58.
 - **Chraibi, M., Farah, A., Elamin, O., Iraqui, HM et Fikri-Benbrahim, K. (2020).** Characterization, antioxidant, antimycobacterial, antimicrobial effects of Moroccan rosemary essential oil, and its synergistic antimicrobial potential with carvacrol. *J Adv Pharm Technol Res.* 11: 25-29.
 - **Chueca, B., Renzoni, A., Berdejo, D., Pagan, R. et Kelley, W.L. (2018).** Garcia-Gonzalo, D. Whole-genome sequencing and genetic analysis reveal novel stress responses to individual constituents of essential oils in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02538.

Références bibliographiques

- **Clewell, D.B. et Gawron-Burke, C. (1986).** Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. 40: 635-659.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard-8th Edition; CLSI Document M07-A8; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.
- **Cohen Y. et Jacquot C. (2008).** Pharmacologie (6ème edn). « Abrégés ». *Masson*, Paris. 487p.
- **Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM).** In : CASFM/ EUCAST: Société Française de Microbiologie. Ed; 2018.vol. 2.
- **Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson, J.E., Warmington, J.R. et Grant, W.S. (2001).** Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*, 6:87-91.
- **Crosthwaite, D. (1998).** UK trade within the flavour and fragrance industry. International Federation of Essential Oils and Aroma Trades—21st International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT, London, pp. 6 -12.
- **Croteau, R., Kutchan, T.M. et Lewis, N.G. (2000).** Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- **D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W. et Wright, G.D. (2006).** Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311:374-7.
- **Da silva, F. (2010).** Utilisation des huiles essentielles en infectiologie ORL. Thèse de doctorat en Pharmacie .Université Henri Poincaré - Nancy p17,10,p18
- **Davidson, P.M. et Parish, M.E. (1989).** Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* 43: 148-155.
- **Davies Julian et Davies Dorothy (2010).** Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74: 417-433.
- **Dayan F., Cantrell C.L., et Duke S.O. (2009).** Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12): 4022-4034.
- **de Aguiar, F.C., Solarte, A.L., Tarradas, C., Gomez-Gascon, L., Astorga, R., Maldonado, A. et Huerta, B. (2019).** Combined effect of conventional antimicrobials with essential oils and their main components against resistant *Streptococcus suis* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 68: 562-572.

Références bibliographiques

- **De Azeredo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G., de Oliveira, M.E.G et De Souza, E.L. (2011).** Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Res. Int.* 44: 1541-1548
- **Deans, S.G et Ritchie, G., (1987).** Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5: 165- 180.
- **Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B et Mazza, G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*74: 101-109.
- **Deryng, J. (1951).** Nowy aparat do oznaczanie olejków w materiale roślinnym. *Acta Pol. Pharm.* 8 :121-136.
- **Devi, P.K., Arif Nisha, S., Sakthivel, R. et Karutha Pandian, S. (2010).** Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.*130: 107-115.
- **Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N et Mnif, W. (2016).** Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines.* 3, 25.
- **Di Pasqua R, Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D. et Mauriello, G. (2010).** Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sub lethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10: 1040-1049.
- **Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. et Mauriello, G. (2007).** Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 55: 4863-4870.
- **Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., et Mauriello, G. (2006).** Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2745-2749.
- **Dias, CN., Rodrigues, KA., Carvalho, FA., Carneiro, SM., Maia, JG., Andrade, EH et Moraes DF. (2013).** Molluscicidal and leishmanicidal activity of the leaf essential oil of *Syzygium cumini* (L.) SKEELS from Brazil. *Chem Biodivers.* 10: 1133-1141.

Références bibliographiques

- **Dick, A.J., Starmans, H.H.N. (1996).** Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends Food Sci. Technol.*: 191-197.
- **Docquiera Jean-Denis et Stefano Mangani. (2017).**An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resistance Updates*, 36: 13-29.
- **Doern, CD et Carroll, KC. (2014).** When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol.* 52:4124-4128.
- **Doménech-Sánchez A., Martínez-Martínez L., Hernández-Allés S., del Carmen Conejo M., Pascual A., Tomás JM., Albertí S et Benedí VJ. (2003).** Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3332-3335.
- **Dormans, H.J.D et Deans, S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.
- **Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J et Zhao, X. (2008).** Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 385-392.
- **Dudai, N., Li, G., Shachter, A., Belanger, F. et Chaimovitch, D. (2017).** Heredity of phenylpropenes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) chemotypes and their distribution within an F2 population. *Plant Breed.*, 00:1-7.
- **Éberlin, T. (1994).** Les antibiotiques Classification, mode d'action, utilisation thérapeutique. Nathan, Paris, 88 p.
- **Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain, J., Coombes, B.K., Tyers, M., Brown, E.D. et Wright, G.D. (2011).** Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature Chem Biol.* 7:348-50.
- **El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E.H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R et Elaissari, A. (2015).** Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm.* 483:220-243.
- **El Atki, Y., Aouam, I., El Kamari, F., Tarog, A., Nayme, K., Timinouni, M., Lyoussi, B. et Abdellaoui, A. (2019).** Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *J Adv Pharm Technol Res.* 10:63-67.
- **Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A et Mount, J.R. (2001).** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64 (7): 1019- 1024
- **Elgndi, M.A., Filip, S., Pavlić, B., Vladić, J., Stanojković, T., Žižak, Ž. et Zeković, Z. (2017).** Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of

Références bibliographiques

- Satureja montana L., Coriandrum sativum L. and Ocimum basilicum L. obtained by supercritical fluid extraction. *J Supercrit Fluids*, 128:128-137.
- **Eloff, JN. (1998).** A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*. 64: 711-3
 - **England, A. (1993).** Aromatherapy and Massage for Mother and Baby. Vermilion, London.
 - **European Commission. (2012).** Commission implementing regulation (EU) No 872/2012. Brussels, Belgium: European Commission.
 - **European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2000).** Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents, in Eucast definitive document E.Def 1.2, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)*. Basel (SW). vol. 6, pp. 503-508
 - **European Medicines Agency [EMA]. (2015).** Guideline on clinical development of fixed combination medicinal products. London (UK): European Medicines Agency.
 - **Faborode, M.O et Favier, J.F. (1996).** Identification and significance of the oil-point in seed-oil expression. *J. Agric. Eng. Res.* 65: 335-345.
 - **Fadli, M., Chevalier, J., Saad, A, Mezrioui, N-E., Hassani, L. et Pages, J-M. (2011).** Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 38:325-330.
 - **Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.E., Pages, J.M. et Hassani, L. (2012a).** Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*. 19:464-471.
 - **Fajardo A, Martinez-Martin N, Mercadillo M, Galan JC, Ghysels B, Matthijs, S., Pierre, C., Lutz, W., Burkhard, T., Fernando, B. et Martínez JL. (2008).** The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*, 3(2): e1619.
 - **Fani, M. et Kohanteb, J. (2017).** In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens. *J. Evid. Based Complem. Altern. Med.* 22: 660-666.

Références bibliographiques

- **Fei, Lv., Hao Liang., Yuan, Q. et Li, C. (2011).** In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*. 44: 3057-3064.
- **Ferhat, M.A., Meklati, B.Y. et Chemat, F. (2007).** Comparison of different isolation methods of essential oil from citrus fruits: cold pressing: hydrodistillation and microwave dry distillation. *Flavour Fragr. J.* 22: 494-504.
- **Fernandez L, Alvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Kocincova, D., Lam, JS, Martínez JL. et Robert, E.W.H. (2013).** Characterization of the polymyxin B resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:110-119.
- **Ferro, T.A.F., Ara ujo, J.M.M., dos Santos Pinto, B.L., dos Santos, J.S., Souza, E.B., da Silva, B.L.R., Colares, V.L.P., Novais, T.M.G. et al., (2016).** Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Front Microbiol.* 7: 2052.
- **Finch, R., Davey, P., Wilcox, M.H. et Irving, W. (2012).** Antimicrobial chemotherapy. 2nd ed. Oxford (UK): Oxford University Press.
- **Fisher, K. et Phillips, C. (2008).** Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci Technol.* 19:156-164.
- **Floss, HG et Yu, TW. (2005).** Rifamycin: mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem Rev.* 105: 621-632.
- **Food and Drug Administration [FDA]. (2010).** Guidance for industry: co-development of two or more unmarketed investigational drugs for use in combination. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration.
- **Forsman, M., Ha'ggstro'm, B., Lindgren, L. et Jaurin, B. (1990).** Molecular analysis of β -lactamases from four species of *Streptomyces*: comparison of amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Microbiology*, 136: 589-598.
- **Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E et Mandrell, R.E. (2004).** Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 52:6042-6048.
- **Gakuubi, MM., Maina, AW et Wagacha, JM. (2017).** Antifungal activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh against selected *Fusarium* spp. *Int J Microbiol.* 8761610.

Références bibliographiques

- **Gallucci, N., Casero, C., Oliva, M., Zygadlo, J.A., Demo, M. et Córdoba, P.D. (2006).** Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Molec Med Chem* 10:30-2.
- **García-Díez, J., Alheiro, J., Pinto, A.L., Falco, V., Fraqueza, M.J. et Patarata, L. (2016).** Synergistic Activity of Essential Oils from Herbs and Spices Used on Meat Products against Food Borne Pathogens. *Natural Product Communications*. 12(2): 281-286.
- **Ghuysen, J.M. (1994).** Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol*. 2: 372- 380.
- **Gibbons, S. (2008).** Phytochemicals for bacterial resistance - strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med* 74:594-602.
- **Gill AO et Holley RA. (2004).** Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5750-5755.
- **Gill, A.O. et Holley, R.A. (2006a).** Disruption of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *L. sakei* cellular membranes by plant essential oils aromatics. *Int J Food Microbiol*, 108:1-9.
- **Gill, A.O. et Holley, R.A. (2006b).** Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol*, 3:170-174.
- **Gocke, E. (1991).** Mechanism of quinolone mutagenicity in bacteria. *Mutat Res*, 248: 135-143.
- **Golmakani, M.-T. et Rezaei, K. (2008).** Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem*. 109: 925-930.
- **Gomes Neto NJ, Luz ID, Tavares AG, Honório VG., Magnani, M et Leite de Souza, E. (2012).** *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its majority compound 1,8-cineole at sublethal amounts induce no direct and cross protection in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. *Foodborne Pathogens Dis*, 9:1-6.
- **Goss, W., Deitz, W. et Cook, T. (1965).** Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol*. 89: 1068-1074.

Références bibliographiques

- **Guenther, E. (1950).** The Essential Oils; van Nostrand Co., Inc.: New York, NY, USA.
- **Guenther, E., (1948).** The Essential Oils. D. Van Nostrand, New York.
- **Guinoiseau, E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Université de Corse. Français.
- **Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G et Warmington, J.R. (1998).** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 26(3):194-198.
- **Habich Dieter, Franz von Nussbaum, Michael Brands, Berthold Hinzen et Stefan Weigand. (2006).** Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry-Exodus or Revival. *Angewandte chemie.*45: 5072-5129.
- **Hammer, K.A et Heel, K.A. (2012).**Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *Int J Antimicrob Agents.* 40: 239-245.
- **Hammer, KA., Carson, CF., Riley, TV et Nielsen JB. (2006).** A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol.* 44: 616-625.
- **Hansen, L. H., Mauvais, P. et Douthwaite, S. (1999).** *Mol. Microbiol.* 31: 623-631.
- **Hans-Georg, B. (2012).** Drug Synergy-Mechanisms and Methods of Analysis, Toxicity and Drug Testing, Prof. Bill Acree (Ed.), ISBN: 978-953-51-0004-1.
- **Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P. et Pagès J-M. (2004).** Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol* 42:2701-2706.
- **Hazzit, M., Baaliouamer, A., Verissimo, A.R., Falerio, M.L. et Miguel, M.G. (2009).** Chemical composition and biological activities of Algerian thymus oils. *Food Chem.*116, 714-721.
- **Heer, A., Guleria, S et Razdan, V.K. (2017).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities and characterization of bioactive compounds from essential oil of *Cinnamomum tamala* grown in north-western Himalaya. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 26: 191-198.

Références bibliographiques

- **Helander, IM., Alakomi, HL., Latva, KK., Mattila, ST., Pol, I., Smid EJ et Wright, VA. (1998).** Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem.* 46(9):3590-3595.
- **Hemaiswarya, S. et Doble, M. (2010).** Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria. *J Med Microbiol*, 59: 1469-1476.
- **Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K et Doble, M. (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639-652.
- **Henderson-Begg, S.K, Livermore, D.M. et Hall, L.M. (2006).** Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemoth*, 57: 849-854.
- **Hesham, H.A.R., Abdurahman, H.N. et Rosli, M.Y. (2016).** Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian journal of basic and applied sciences*, 10(16): 117-127.
- **Hollenbeck, BL. et Rice, LB. (2012).** Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 3:421- 433.
- **Holtje, J.V. (1998).** Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 181-203.
- **Hooper, D.C. (2002).** Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis.* 2:530-538.
- **Hyldgaard M., Mygind, T. et Meyer, R.L. (2012).** Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *front microbiol.* 3: 1-24.
- **Isman, M.B. (2000).** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8): 603-608.
- **Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C et Baerheim Svendsen, A. (1987).** Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med.* 53: 395-398.
- **Jess Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R.K et Kumar, A. (2015).** Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55: 1320-1323.
- **Jilani, A., Dicko, A. (2012).** The therapeutic benefits of essential oils. In: Nutrition, Well-Being and Health [Internet]. Croatia: InTech; Available from:

Références bibliographiques

https://www.researchgate.net/publication/221925405_The_Therapeutic_Benefits_of_Essential_Oils.

- **Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. et Claverys, J.-P. (2014).** Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 181-196.
- **Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. et Weisslowicz, H. (1994).** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626- 631.
- **Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W. et Walsh, C. (2005).** Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem. Rev.* 105: 425-448.
- **Kalemba, D. et Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- **Kalodera, Z., Pepeljak, S., Blazevic, N et Petrak, T. (1997).** Chemical composition and antimicrobial activity of *Tanacetum parthenium* essential oil. *Pharmazie*, 52: 885-886.
- **Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L et Vergnes, M.F. (2008).** Étude de six huiles essentielles: Composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6: 160-164.
- **Kampranis, S et Maxwell, A. (1998).** The DNA gyrase-quinolone complex, ATP hydrolysis, and the mechanism of DNA cleavage. *J. Biol. Chem.* 173: 22615-22626.
- **Kamran Khan, M., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O. et Chemat, F. (2009).** Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. 119: 851-858.
- **Karim Assami, D.P. (2012).** Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 62: 99-105.
- **Katarzyna, L., Majcher, M., Czaczyk, W.J.K. et Komosa, M. (2020).** Comparative Evaluation of *Piper nigrum*, *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus* and *Juniperus communis* L. Essential Oils of Different Origin as Functional Antimicrobials in Foods. *Foods*.9: 141.
- **Khoddami, M., Hosseini, M.S. et Hassanshahian, M. (2018).** Antibacterial Activity of *Semenoviasuffruticosa* (Essential Oil) Against Pathogenic Bacteria and Determination of Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography-

Références bibliographiques

- Mass Spectrometry Analysis in Four Regions of Kerman. *Journal of Dietary Supplements*: 1-11.
- **Klappenbach, JA., Saxman, PR., Cole, JR et Schmidt, TM. (2001).** rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* 29 : 181-184.
 - **Knezevic, P., Verica, A., Natasa, S., Emilija, S., Aleksandra, P et NedaMimica-D. (2015).** Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*.178: 125-136.
 - **Knobloch, K., Pauli, A. et Iberl, B. (1989).** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res.* 1(3):119-28
 - **Koedam, A. (1977a).** Antimikrobielle Wirksamkeit ätherischer Öle: Eine Literaturarbeit 1960-1976—Fortsetzung und Schluss. *Riechstoffe, Aromen, Kosmetica*, 27 (2): 36- 41.
 - **Koedam, A. (1977b).** Antimikrobielle Wirksamkeit ätherischer Öle: Eine Literaturarbeit 1960-1976—Teil I. *Riechstoffe, Aromen, Kosmetica*, 27 (1): 8- 11.
 - **Kon KV et Rai M.K. (2012).** Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:775-790.
 - **Kovac J., Simunovic K., Wu Z., Klancnik A., Bucar F., Zhang Q et Mozina SS. (2015).** Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)- α -pinene in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*. 14:e0122871.
 - **Kristanc, L. et Kreft, S. (2016a).** European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part I: plants with carcinogenic, teratogenic and endocrine-disrupting effects. *Food Chem Toxicol.* 10:150-164.
 - **Kristanc, L. et Kreft, S. (2016b).** European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part II: plants with hepato, neuro, nephro and immunotoxic effects. *Food Chem Toxicol.* 92 : 38-49.
 - **Kuorwel K. Kuorwel, Marlene J. Cran, Kees Sonneveld, Joseph Miltz, et Stephen W. Bigger, (2011).** Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. *Journal of Food Science.* 76.n° 9
 - **Kubo, A., Lunde, C.S et Kubo, I. J. Agric. (1995).** Antimicrobial Activity of the Olive Oil Flavor Compounds. *Food Chem.* 43(6):1629-1633.
 - **Küçükbay F. Zahra et Küçükbay H. (2017).** Chemical Structures and Classification of Antimicrobial Drugs. *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery*,6: 214-281.

Références bibliographiques

- Kwiatkowski, P., Pruss, A., Wojciuk, B., Dolegowska, B., Wajs-Bonikowska, A., Sienkiewicz, M., Mezynska, M. et Łopusiewicz, L. (2019). The Influence of Essential Oil Compounds on Antibacterial Activity of Mupirocin-Susceptible and Induced Low-Level Mupirocin-Resistant MRSA Strains. *Molecules*.24:3105
- Kwiatkowski, P., Pruss, A., Grygorcewicz, B., Wojciuk, B., Dolegowska, B., Giedrys-Kalemba, S., Kochan, E. et Sienkiewicz, M. (2018). Preliminary study on the Antibacterial Activity of Essential oil Alone and in Combination with Gentamicin Against Extended- Spectrum β -Lactamase-Producing and New Delhi Metallo- β -Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Microbial Drug Resistance*, 00: 1-8.
- Labischinski, H. (1992). Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Med. Microbiol. Immunol.* 181: 241- 265.
- Laghchimi1, A., Znini, M., Majidi, L., Renucci, F., El Harrak, A. et Costa, J. (2014). Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme (Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential oil on mycelial growth of fungi responsible for the rot of apple). *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (6) : 1770-1780
- Laguerre, S., Amari, M., Vuillemin, M., Robert, H., Loux, V., Klopp, C et Moulis, C. (2012). Genome sequences of three *Leuconostoc citreum* strains, LBAE C10, LBAE C11, and LBAE E16, isolated from wheat sourdoughs. *J. Bacteriol.* 194: 1610-1611.
- Lahmar, A., Bedoui, A., Mokdad-Bzeouich, I., Dhaouifi, Z., Kalboussi, Z., Cheraif, I., Ghedira, K. et Chekir-Ghedira, L. (2016). Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microbial Pathogenesis*: 1-10.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J et Nychas, GJ. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 91(3):453-62.
- Langeveld, W.T., Veldhuizen, E.J et Burt, S.A. (2013). Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Crit. Rev. Microbiol.* 40: 76-94.

Références bibliographiques

- **Lardry, J.M. (2007).** Les huiles essentielles : introduction à l'aromathérapie. *Kinésithérapie la Revue* 61: 14-17.
- **Laurent, P., Jose-Manuel, Rodriguez-Martinez., Hedi, M., Alain, L. et Patrice, N. (2005).** Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother.* 49 : 3523-3525.
- **Leclercq R. (2002).** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 34: 482-492.
- **Lee, G., Kim, Y., Kim, H., Beuchat, L.R. et Ryu, J. (2018).** Antimicrobial activities of gaseous essential oils against *Listeria monocytogenes* on a laboratory medium and radish sprouts. *Int. J. Food Microbiol.* 265: 49-54.
- **Lee, N., Yuen, K.Y et Kumana, C.R. (2003).** Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs.* 63:1511-1524.
- **Lee, S., Kim, H., Beuchat, L.R., Kim, Y. et Ryu, J. (2020).** Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. *Food Microbiol.* 90: 103489
- **Leite de Souza, E. (2016).** The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 56: 1-12.
- **Leite, G.C., Neto, L.V., Gaudereto, J.J., de Maio Carrilho, C.M., Rossi, F., Levin, A.S., et Costa, S. (2015).** Effect of antibiotics combination and comparison of methods for detection of synergism in multiresistant Gram-negative bacteria. *J Infect Dis Ther.* 25:1-9.
- **Lerminiaux, N.A et Cameron, A.DS. (2018).** Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology,* 65(1): 1- 25.
- **Leszczynska, D. (2007).** Management de l'innovation dans l'industrie aromatique: Cas des PME de la région de Grasse. Editions l'Harmattan, Paris, France.
- **Levy, S.B et Marshall, B. (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: 122-129.
- **Levy, S.B. (1982).** Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. *Lancet.* 2: 83-88.
- **Lewis, K. (2000).** *Microbiol. Mol. Biol. Rev,* 64: 503-524.

Références bibliographiques

- **Lewis, K. et Ausubel, F.M. (2006).** Prospects for plant derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* 24: 1504-1507.
- **Li, X.M., Tian, S.L., Pang, ZC., Shi, JY., Feng ZS et Zhang YM. (2009).** Extraction of *Cuminumcyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steamdistillation. *Food Chem.* 115: 1114-1119.
- **Limaverde, P.W., Campina, F.F., da Cunha, F.A., Crispim, F.D., Figueredo, F.G., Lima, L.F., Oliveira-Tintino, C.D.D.M., de Matos, Y.M., Morais-Braga, M.F.B. et Menezes IR. (2017).** Inhibition of the Tet K efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food Chem Toxicol.* 109:957-961.
- **Liu, Q., Niu, H., Zhang, W., Mu, H., Sun, C. et Duan, J. (2015).** Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 60:421–430.
- **Loewe, S. (1927).** Die Mischiarnei. *Klin Wochenschr.* 6:1077-1085.
- **Loewe, S. (1928).** Die quantitativen probleme der pharmakologie. *Ergebn Physiol.* 27:47-187.
- **Lucchesi, ME., Chemat et Smadja J. (2004).** Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J Chromatogr .A*1043: 323-327.
- **Luz, I.S., Neto, N.J.G., Tavares, A.G., Nunes, P.C., Magnani, M. et Leite de Souza, E. (2012).** Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Appl Environ Microbiol.* 78:5021-5024.
- **Mackay, M.L., Milne, I.M et Gould, I.M. (2000).** Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 15 : 125-129.
- **Maeda, H. et Natalia, D. (2012).** The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:73-105.
- **Marie-Cécile Ploy et François Denis. (2000).** Les intégrons : un système original de capture de gènes chez les bactéries. *médecine/science.* 16: 255-259.
- **Martinazzo, A.P., Melo, E.C., Correa, P.C. et Santos, R.H.S. (2010).** Mathematical modeling and qualitative parameters of the drying of lemongrass leaves [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf]. *Rev. Bras. Plantas Med.* 12: 488-498.

Références bibliographiques

- **Martinez JL., Sanchez MB., Martinez-Solano L., Hernandez A., Garmendia L., Fajardo A et Alvarez-Ortega, C. (2009).** Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, 33(2): 430-449.
- **Martinez JL. (2008).** Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science*, 321(5887): 365-367.
- **Martinez JL. (2012).** Bottlenecks in the transfer ability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2, n° 265.
- **Martinez, JL. (2014).** General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today.Technol.* 30, n°20.
- **Martinez-Martinez L, Pascual A. et Jacoby GA. (1998).** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351:797-799.
- **Masango, P. (2005).** Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J Cleaner Prod.* 13 :833-839.
- **Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J.M. et Viano, J. (2003).** Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7115-7121.
- **Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A. et Aubert, G. (2008).** Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett Appl Microbiol.* 47:167-173.
- **Mazars, G. (2002).** Pharmacopées du Proche-Orient Antique, dans : Fleurentin J., Pelt J.-M., Mazars G. (éds), *Des sources du savoir aux médicaments du futur.* IRD, Paris.
- **McMurry, LM., Petrucci, RE et Jr, Levy S.B. (1980).** Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77: 3974-3977.
- **Menninger, J. R. (1995).** Mechanism of inhibition of protein synthesis by macrolide and lincosamide antibiotics. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 6: 229-250.
- **Miladinović, D.L., Budimir, S.I., Ljiljana, C.M., Branislava D.K., Vojislav M. Č., Vesna, P.S-J. et Olga, G.C. (2013).** Antibacterial Activity of *Thymus pulegioides* Essential Oil and its Synergistic Potential with Antibiotics: A Chemometric Approach. *RPMPEssential Oils III and Phytopharmacology*, 38: 102-136.
- **Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Kocić, B.D., Miladinović, L.C. et Marković, M.S. (2014).** In vitro interactions of *Peucedanum officinale* essential oil with antibiotics. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters.*

Références bibliographiques

- **Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Mihajilov-Krstev, T.M., Nikolić, N.D., Miladinović, L.C. et Cvetković, O.G. (2012).** Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Anal Bioanal Chem.* 403:1007-1018
- **Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G. et Clinquart, A. (2014).** Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci Nutr.* 2:403-416.
- **Mizuuchi, K., Fisher, L.M., O’Dea, M. et Gellert, M. (1980).** DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77: 1847-1851
- **Mohr, K.I. (2016).** History of Antibiotics Research. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 398: 237-272.
- **Moleyar, V et Narasimham P. (1992).** Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 337-342.
- **Morrison, A., Higgins, N. P. et Cozzarelli, N. R. (1980).** Interaction between DNA gyrase and its cleavage site on DNA. *J. Biol. Chem.* 255: 2211-2219.
- **Munita JM et Arias CA. (2016).** Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectrum* 4(2): VMBF-0016-2015.
- **Musovic, S., Oregaard, G., Kroer, N. et Sorensen, S. J. (2006).** Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among Gram-positive and gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6687- 6692.
- **Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. et De Feo, V. (2013).** Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* 6:1451-1474.
- **Newman, D.J., Cragg, G.M et Snader, K.M. (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037.
- **Nicolaou, K.C et Rigol, S. (2017).** A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*, p. 1-32.
- **Nikaido H. (2003).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:593-656.
- **Noreikaite, A., Ayupova, R., Satbayeva, E., Seitaliyeva, A., Amirkulova, M., Pichkhadze, G., Datkhayev, U et Stankevicius, E. (2017).** General toxicity and

Références bibliographiques

- antifungal activity of a new dental gel with essential oil from *Abies sibirica* L. *Med Sci Monit.* 23: 521-527.
- **Normak, H.B et Normak, S. (2002).** Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252: 91-106.
 - **Norman, A., Hansen, L.H. et Sørensen, S.J. (2009).** Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Phil. Trans. R. Soc. B.364 (1525):* 2275-2289.
 - **Novais, A., Comas, I., Baquero, F., Canton, R., Coque, T.M., Moya, A., Fernando G-C. et Juan-Carlos, G. (2010).** Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *PLoS Pathog.* 6(1): e1000735.
 - **Nychas, G.J.E. (1995).** Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation.* Blackie Academic and Professional, London, pp. 58- 89.
 - **Odds, F.C. (2003).** Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 1.
 - **Ogawara, H., Kawamura, N., Kudo, T., Suzuki, K.-I. et Nakase, T. (1999).** Distribution of β -lactamases in actinomycetes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:3014-3017.
 - **Oliveira, J.B., Teixeira, M.A., de Paiva, L.F., de Oliveira, R.F., dos Anjos Mendonca, A.R. et de Brito, M.J.A. (2019).** *Microbial Drug Resistance.* Vol 00, n°(00).
 - **O'Neill, J. (2014).** Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations (The Review on Antimicrobial Resistance, London, United Kingdom).
 - **Ouedrhiri, W., Balouiri, M., El Houssaine H., Sandrine, M. et Hassane G. (2017).** Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. *International Journal of Food Properties,* 20(12): 3149-3158.
 - **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L et Lacroix, M. (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control,* 18: 414-420.

Références bibliographiques

- **Owen, L. et Laird, K. (2018).** Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. *Crit Rev Microbiol.* 44(4): 414-435.
- **Owen, L., Grootveld, M., Arroo, R., Ruiz-Rodado, V., Price, P et Laird, K. (2017).** A multifactorial comparison of ternary combinations of essential oils in topical preparations to current antibiotic prescription therapies for the control of acne vulgaris-associated bacteria. *Phytother Res.* 31:410-417.
- **Oyedemi, S.O, Okoh, AI, Mabinya, L.V., Pirochenva, G. et Afolayan, A.J. (2009).** The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, alpha-terpineol and gamma-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African J Biotechnol*, 8:1280-1286.
- **Pagès, JM., James, CE et Winterhalter, M. (2008).** The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 6: 893-903.
- **Palaniappan K et Holley RA. (2010).** Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol.* 140:164-168.
- **Papadopoulos, C.J., Carson, C.F, Chang, B.J et Riley T.V. (2008).** Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1, 8-cineole, and alpha-terpineol. *Appl Environ Microbiol.* 74:1932-1935.
- **Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., et Zachariah, T. J. (2008).** Chemistry of spices. Édition CABI, Londres, Royaume-Uni.
- **Paterson DL et Bonomo RA. (2005).** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18: 657-686.
- **Patricia, L.P., Saä Nchez, C., Batlle, R.N. et Neriän, C. (2007).** Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4348-4356
- **Patrick Trieu-Cuot et Patrice Courvalin. (1987).** Résistance aux antibiotiques : modèle privilégié d'étude de la circulation génétique. *médecine/science.* 3: 82-90.
- **Paul H. Roy. (1997).** Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. *médecine/science.* 13: 927-933.

Références bibliographiques

- **Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P et Xu, J. (2009).** Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *J. Food Sci.*74: 379-383.
- **Perry Julie, Nicholas Waglehner et Gerard Wright. (2016).**The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6: a025197.
- **Phakawat, T. et Benjakul, S. (2014).** Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science.*79, n° 7.
- **Pichersky, E., Noel, J.P. et Dudareva, N. (2006).**Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311: 808-811.
- **Pikoulis, E., Msaouel, P., Avgerinos, E.D., Anagnostopoulou, S. et Tsigris, C. (2008).** Evolution of medical education in ancient Greece. *Chinese Medical Journal.* 121: 2202-2206.
- **Pillai, S.K., Moellering, R.C. et Eliopoulos, G.M. (2005).** Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. Antibiotics in laboratory medicine. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins: 365-440.
- **Pol, I.E., Mastwijk, H.C., Slump, R.A., Popa, M.E et Smid, E.J. (2001).** Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection*, 64 (7): 1012- 1018.
- **Poole, K. (2005).** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.*56: 20-51.
- **Posadzki, P., Alotaibi, A. et Ernst, E. (2012).** Adverse effects of aromatherapy: a systematic review of case reports and case series. *Int J Risk Saf Med.* 24: 147-161.
- **Prescott, L.M., Harley, J.P et Klein, D.A. (1995).** Microbiologie. *De Boeck ed.* p 1014
- **Qiu, J., Zhang, X., Luo, M., Li, H., Dong, J., Wang, J.,Leng, B., Wang, X., Feng, H., Ren, W. et Deng, X. (2011).** Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 6, e16160.
- **Qiu, J., Feng, H., Lu, J., Xiang, H., Wang, D., Dong, J., Wang, J., Wang, X., Liu, J., et Deng, X. (2010).** Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 76:5846-5851.
- **Quetin-Leclercq, J. (2002).** Le voyage insolite de la plante au médicament. *Journal de Pharmacie de Belgique.*57 : 11-20.

Références bibliographiques

- **Raaman, N. (2006).** Phytochemical techniques. New India Publishing, New Delhi, Inde.
- **Rachel F. Eyler et Kristina Shvets. (2019).** Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clin J Am Soc Nephrol.* 14(7): 1080-1090.
- **Radulovic, N.S., Blagojevic, PD, Stojanovic-Radic, ZZ. et Stojanovic, NM. 2013.** Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem.* 20: 932-952.
- **Ramirez, M.S. et Tolmasky, M.E. (2010).** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 13:151-171.
- **Rand KH., Houck HJ., Brown P et Bennett D. (1993).** Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:613-615.
- **Rashid, S., Rather, M.A., Shah, W.A. et Bhat, B.A. (2013).** Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food Chem.* 138:693-700.
- **Rašković Aleksandar., Isidora Milanović., Nebojša Pavlović1., Tatjana Čebović., Saša Vukmirović et Momir Mikov. (2014).** Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 14, n° 225.
- **Rhather, M.A., Bhat, B.A et Qurishi, M.A. (2013).** Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: is the “one drug fit all” model breaking down?. *Phytomedicine.* 21:1-14.
- **Roberts, M.C. (1996).** Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 1-24.
- **Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L. et Pascual A. (2011).** Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother.* 17:149-12.
- **Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A. et Kaminski, M. (2007).** Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70: 253-261.

Références bibliographiques

- **Sahraoui, N., Vian, M.A., Bornard, I., Boutekedjiret, C. et Chemat, F. (2008).** Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils: comparison with conventional steam distillation. *J. Chromatogr. A* 1210: 229- 233.
- **Sakkas, H. et Papadopoulou, C. (2016).** Antimicrobial activity of Basil, Oregano and Thyme essential oils. *J. Microbiol. Biotechnol*, 27(3): 429-438.
- **Samber, N., Khan, A., Varma, A. et Manzoor, N. (2015).** Synergistic anti-candidal activity and mode of action of Mentha piperita essential oil and its major components. *Pharm. Biol.* 53: 1496-1504.
- **Schelz, A., Molnar, J et Hohmann, J. (2006).** Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.* 77:279-285.
- **Sereshti, H., Rohanifar, A., Bakhtiari, S. et Samadi, S. (2012).** Bifunctional ultrasound assisted extraction and determination of Elettaria cardamomum Maton essential oil. *J. Chromatogr. A* 1238: 46-53.
- **Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L et Ciarallo, G. (1997).** Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany.* 79: 329-336.
- **Shaaban, H.A.H., El-Ghorab, A.H et Takayuki, S. (2012).** Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J. Essent. Oil Res.* 24 : 203-212.
- **Sheehan, M.P. et Atherton, D.J. (1992).** A controlled trial of traditional Chinese plants in widespread non-exudative atopic eczema. *Br. J. Dermatol.* 126: 179-184.
- **Sheldrick, G.M., Jones, P.G., Kennard, O., Williams, D.H. et G. A. Smith. (1978).** Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature*, 271: 223-225.
- **Shelef, L.A. (1983).** Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6:29- 44.
- **Shi, C., Zhang, X., Zhao, X., Meng, R., Liu, Z., Chen, X et Na Guo. (2017).** Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Food Control.* 71:10-6
- **Sikkema, J., De Bont, J.A.M. et Poolman, B. (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (11): 8022-8028.

Références bibliographiques

- **Singh, KV., Weinstock, GM et Murray, BE. (2002).** An Enterococcus faecalis ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 1845-18450.
- **Singh, S.B et Barrett, J.F. (2006).** Empirical antibacterial drug discovery - foundation in natural products. *Biochem Pharmacol.* 71: 1006-1015.
- **Singleton, P. (2005).** Bactériologie pour la Médecine, la Biologie et les Biotechnologies (6ème édn). (Traduit de l'anglais par Jean Dusart), Dunod, Paris.
- **Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., et Nychas, G.J.E. (2001).** Inhibition of oregano essential oil and EDTA on E. coli O157: H7. *Ital J Food Sci*, 13: 65-75.
- **Skurray, R. A. et Firth, N. (1997).** Molecular evolution of multiply-antibiotic-resistant staphylococci, p. 167-191. In D. J. Chadwick (ed.), Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. Wiley, Chichester, United Kingdom.
- **Snyder, M et K. Drlica. (1979).** DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J. Mol. Biol.* 131: 287-302.
- **Soilleux M. (2008).** Antibiotiques poly DCEM 1 [En ligne]. Disponible sur <http://andre.ar.free.fr/antibiotiques.pdf>.
- **Soković, M.D., Vukojević, J., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vajs, V. et van Griensven, L.J.L.D. (2009).** Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14: 238-249.
- **Sommer, M.O., Dantas, G. et Church, G.M. (2009).** Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, 325(5944):1128-1131.
- **Sørensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. et Wuertz, S. (2005).** Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 700-710.
- **Souza, C.M., Pereira Junior, S.A., Moraes, T. da S., Damasceno, J.L., Amorim Mendes, S., Dias, H.J., Stefani, R., Tavares, D.C et al., (2016).** Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. *Med Mycol*, 54:515-523.
- **Soyingbe, O.S., Myeni, C.B., Osunsanmi, F.O., Lawal, O.A. et Opoku, A.R. (2015).** Antimicrobial and efflux pumps inhibitory activities of *Eucalyptus grandis* essential oil against respiratory tract infectious bacteria. *Journal of medicinal plant research*, 9(10): 343-348.

Références bibliographiques

- **Stassi, V., Verykokidou, E., Loukis, A., Harvala, C et Philianos, S. (1996).**The Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Four Juniperus Species Growing Wild in Greece. *Flavour Fragr. J*, 11: 71.
- **Stecchini, M.L., Sarais, I et Giavedoni, P. (1993).**Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection* 56 (5): 406- 409.
- **Stefanakis, M.K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H.E et Makridis, P. (2014).** Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*. 34: 539-546.
- **Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L.A. et Lewis, K. (2000).** Synergy in a medicinal plant. Antimicrobial action of berberine potentiated by 5-methoxy hydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 1433-1437.
- **Stokes, HW. et Hall, RM. (1989).** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*. 3 : 1669-1683.
- **Suppakul, P. (2004).** Study of antimicrobial polymeric packaging films containing basil extracts [PhD dissertation]. Melbourne, Australia: Victoria University. 259 p.
- **Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K et Bigger, SW. (2006).** Characterization of antimicrobial films containing basil extracts. *Packag Technol Sci* , 19(5):259-268.
- **Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, SW et Miltz, J. (2008).** Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT—Food Sci Technol* 41(5):779-788.
- **Tae Jin Cho., Sun Min Park., Hary Yu., Go Hun Seo., Hye Won Kim., Sun Ae Kim et Min Suk Rhee. (2020).** Recent Advances in the Application of Antibacterial Complexes Using Essential Oils. *Molecules*. 25, 1752.
- **Tallarida, R.J. (2001).** Drug synergism: Its detection and applications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298: 865-872.
- **Tallarida, R.J. (2012).** Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. *Genes Cancer*, 2 (11): 1003-1008.
- **Tavares, A.G., Monte, D.F., Albuquerque Ados, R., Sampaio, F.C., Magnani, M., Siqueira Junior, J.P. et Souza, E.L. (2015).** Habituation of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* to *Origanum vulgare* L. essential oil does not induce direct-

Références bibliographiques

- tolerance and cross-tolerance to salts and organic acids. *Braz. J. Microbiol.* 46: 835-840.
- **Taylor S.D. et Palmer M. (2016).** The action mechanism of daptomycin. *Bioorg. Med. Chem*, 24: 6235-6268.
 - **Tipper, D.J et Strominger, J.L. (1965).** Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl Acad.Sci. USA* **54**: 1133-1141
 - **Tomi F et Casanova J. (2006).** 13C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from *Labiatae* - a review. *Acta Hortic.* 723: 185-192.
 - **Traglia, G.M., Chua, K., Centrón, D., Tolmasky, M.E. et Ramírez, M.S. (2014).** Whole-genome sequence analysis of the naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Genome Biol. Evol.* 6: 2235-2239.
 - **Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I. et Coulibaly, A. (2012).** Recherche des activités antifongiques et antibactériennes des feuilles d'Annona senegalensis Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied biosciences*, 58 : 4234-4242.
 - **Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro MG., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. et Bisignano, G. (2005).** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:2474-2478.
 - **Tulkens P. et Van Bambeke F. (2008).** Antibiotiques, antifongiques. Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse. Université catholique de Louvain.
 - **Tullio, V., Janira, R., Daniela, S. et Narcisa, M. (2019).** Evaluation of the Antifungal Activity of Mentha x piperita (Lamiaceae) of Pancalieri (Turin, Italy) Essential Oil and Its Synergistic Interaction with Azoles. *Molecules.* 24, n° 3148.
 - **Ugarte-Valdivieso, M., Carolina, G-L., Julio, P-D et Ángel, G. (2019).** Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. *Nutrients.* 11, n° 2786
 - **Ultee A., M. H. J. Bennik et R. Moezelaar. (2002).** The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *APPL. Environ. Microbiol* Apr.68 (4): 1561-1568.
 - **Ultee, A et Smid, E.J. (2001).** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol.* 64(3):373-8.

Références bibliographiques

- **Ultee, A., Kets, E.P.W. et Smid, E.J. (1999).** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10): 4606- 4610.
- **UNEP-WCMC United nation environment programme - World conservation monitoring center (2002).** *Biodiversity data sourcebook*, Cambridge, England.
- **Ušjak, L., Petrović, S., Drobac, M., Soković, M., Stanojković, T., Ćirić, A et Niketić, M. (2017).** Edible wild plant *heracleum pyrenaicum* subsp. *orsinii* as a potential new source of bioactive essential oils. *J. Food Sci. Technol.* 5: 2193-2202.
- **Vakil, V. et Trappe, W. (2019).** Drug Combinations: Mathematical Modeling and Networking Methods. *Pharmaceutics*. 11, n° 208.
- **Van de Vel, E., Sampers, I. et Raes, K. (2017).** A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 30:1-22.
- **Van den Bogaard, A.E et Stobberingh, E.E. (2000).** Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14: 327-335.
- **Van Vuuren, S et Viljoen A. (2011).** Plant-based antimicrobial studies-methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med.* 77:1168-1182.
- **Van Vuuren, S.F. et Viljoen, A.M. (2007).** Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr. J.* 22: 540-544.
- **Vaubourdolle, M. (2007).** Infectiologie. 3e édition. Wolters Kluwer SA. France. 1037p.
- **Vester, B et Douthwaite, S. (2001).** Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1-12.
- **Vieira, M., Lucinda J.B., Rosario, M.M., Silvia, A., Antonio P.S., Teixeira, Angelo M., Paulo, M.DC et Anabela, D.F.B. (2017).** Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* LABILL. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *Chem. Biodiversity.* 14, e1700006
- **Vinatoru, M. (2001).** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8: 303-313.

Références bibliographiques

- **Wagner, H. et G. Ulrich-Merzenich. (2009).** Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16:97-110
- **Wagner, H et Ulrich-Merzenich, G. (2009).** Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16: 97-110.
- **Waksman, S.A. (1947).** What is an antibiotic or an antibiotic substance?.*Mycologia*, 39:565-569.
- **Wan, J., Wilcock, A. et Coventry, M.J. (1998).** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 84:152-158.
- **Wang, L et Weller, C.L. (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 300-312.
- **Wang, L-H., Wang, M-S., Zeng, X-A., Gong, D-M. et Huang, Y-B. (2016).** An *in vitro* investigation of the inhibitory mechanism of β -galactosidase by cinnamaldehyde alone and in combination with carvacrol and thymol. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*.
- **Warnke, P.H, Sherry, E., Russo, P.A.J, Açil, Y., Wiltfang, J., Sivananthan, S., Sprengel, M., Roldàn, J.C., Schubert, S., Bredee, J.P. et Springer, I.N.G. (2006).** Antibacterial essential oils in malodorous cancer patients: clinical observations in 30 patients. *Phytomedicine*, 13:463-7.
- **Watanabe, T. (1963).** Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 27: 87-115.
- **Weingarten, R.A., Johnson, R.C., Conlan, S., Ramsburg, A.M., Dekker, J.P., Lau, A.F., Khil, P., Odom, R.T et al., (2018).** Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance. *MBio* 9, e02011-17.
- **Weisblum B. (1995).** Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 577-585.
- **Wendakoon, C.N. et Sakaguchi, M. (1995).**Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58 (3): 280- 283.
- **White, R.L., Burgess, D.S., Manduru, M et Bosso, J.A. (1996).** Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob. Agents Chemother.*,40:1914-1918.

Références bibliographiques

- **Williamson, E. M. (2001).** Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. 8(5): 401-409
- **Wilson DN. (2014).** Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 12: 35-48.
- **Wongkattiya, N., Phanchana, S., Ian Hamilton, F et Donruedee, S. (2019).** Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from *Cuminum cyminum* L. collected in Thailand. *J Complement Integr Med*. 16 (4): 1-6.
- **World Health Organization. (2017).** A Global Health Guardian: Climate Change, Air Pollution and Antimicrobial. *Geneva, Switzerland: World Health Organization*.
- **Yaday, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T et Tang, J. (2015).** Searching for drug synergy in complex dose-response landscapes using an interaction potency model. *Comput Struct Biotechnol J*. 13:504-513.
- **Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D et Ouar Korich, M.N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb n°91*.
- **Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping H.C et Lim S.H.E. (2014).** Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8: 6-14.
- **Ysern, P., Clerch, B., Castano, M., Gibert, I., Barbe, J. et Llagostera, M. (1990).** Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis*, 5: 63-66.
- **Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J. et Yan, W. (2007).** The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food-borne pathogen *Salmonella typhimurium*. *J. Food Saf*. 27: 124-133.