

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 de cycle Master

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème :



Suppression de la résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* multirésistantes : activité antibactérienne seule et en combinaison synergique avec les antibiotiques des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Origanum compactum*.

Réalisé par :

- **ADILA Aldjia**
- **ADJAZ Siham**
- **AIT KACI Dalia**

Encadré par :

Mr. LEFSIH Khalef

Membres du jury :

Promoteur : Mr. LEFSIH Khalef. MCA. UMMTO.
Président : Mme TALMAT Noura. MCA. UMMTO.
Examineur : Mr. TITOUCHE Yacine. MCA. UMMTO.

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

Avant toute chose, **nous rendons grâce à Allah Le Tout-Puissant**, pour nous avoir guidés, soutenus et accordé la patience et la force nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à **Monsieur Lefsih Khalef**, notre encadrant, pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique, ses conseils avisés et son accompagnement bienveillant tout au long de ce projet. Sa confiance et ses orientations ont été d'une grande importance pour la réalisation de ce mémoire.

Nos sincères remerciements vont également au **Dr Zerrar**, médecin microbiologiste, pour nous avoir donné l'opportunité de réaliser notre stage pratique de fin d'études au sein de son **laboratoire d'analyses médicales**. Ce cadre professionnel enrichissant nous a permis d'acquérir des compétences précieuses et une expérience concrète dans le domaine de la microbiologie.

Nous remercions chaleureusement **Lila et Kahina**, de l'équipe de la paillasse de bactériologie, pour leur accueil, leur disponibilité et leur aide précieuse au quotidien. Leur savoir-faire et leur soutien ont grandement facilité notre apprentissage en laboratoire.

Nos remerciements s'adressent également à **toute l'équipe du laboratoire**, pour leur esprit de collaboration et leur bienveillance, ainsi qu'aux **doctorants du laboratoire d'écologie, biotechnologie et santé** de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour leur soutien moral, éducatif et matériel.

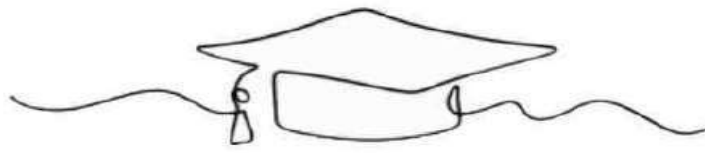
Nous exprimons aussi notre gratitude à la **présidente du jury Mme Talmat Noura** et à l'**examinateur Mr Titouche yacine** de ce mémoire, pour avoir accepté d'évaluer notre travail et pour leurs remarques constructives, qui ne manqueront pas d'enrichir notre réflexion scientifique.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, **nous vous disons merci du fond du cœur**.

Adila Alajia

Adjar Siham

Ait Kaci Dalila



Dédicaces

Avant toute chose, je dédie ce travail à **Allah**, le Tout-Puissant, source de paix, de sagesse et de patience. C'est par Sa grâce que chaque étape de ce parcours a pu être franchie, et je Lui rends toute louange.

À mes parents bien-aimés, Mokrane et Malika,

Il n'existe pas de mots assez forts pour exprimer toute ma gratitude. Merci pour votre amour inconditionnel, vos sacrifices immenses, votre patience infinie et votre soutien indéfectible. Vous avez toujours cru en moi, même dans mes moments de doute. Vous avez fait de moi la femme que je suis aujourd'hui, vous m'avez accompagné dans chacun de mes pas, vous m'avez guidé pour avoir ce que vous n'avez pas eu, la vie n'a pas toujours été rose mais vous l'avez peinte avec vos sacrifices, vos sourires et votre tendresse. Ce travail, c'est avant tout le vôtre. Que Dieu vous protège et vous comble de Ses bienfaits.

À mon frère Rayane,

Merci d'être toujours là, avec ta bienveillance, ton écoute, ton humour et ta joie de vivre. Tu es bien plus qu'un frère, tu es une source d'équilibre et d'inspiration, ton arrivée dans ma vie l'a rendu meilleure, dieu m'a offert le pilier sur lequel je peux compter. Tu es une source de sérénité de confiance et de joie, je suis fière de l'homme que tu deviens.

Je te dédie mon humble réussite, je partage avec toi ma joie comme j'ai partagé avec toi mon enfance mes hauts mes bas et comme je partagerai avec toi toute ma vie avec la grâce de dieu.

À toute ma famille, en particulier ma tante Sadia, mes cousins et le petit Islam

Pour leur amour, leurs encouragements et leurs prières discrètes mais puissantes. Merci d'avoir été là, de près ou de loin.

Aux plus belles personnes que dieu m'a offert : Amira, Tinhinane, Mélissa et Samy,

Merci pour votre présence sincère, votre patience et tous ces instants partagés entre stress, rires et espoir. Vous m'avez vu dans tous mes états vous étiez témoins de mes joies, mes doutes, mes larmes parfois. Merci pour vos mots réconfortants, votre écoute sans jugement et pour tout ce que vous avez fait pour moi durant toutes ces années. Vous avez su rendre ce parcours plus doux, joyeux, et profondément inoubliable.

À Dalia et Siham,

Merci pour votre sérieux, votre engagement, votre patience et surtout votre belle énergie. Ensemble, nous avons traversé les hauts et les bas de ce projet avec solidarité et complicité, mon parcours universitaire n'aurait pas été le même sans votre présence. Ce travail est aussi le fruit de notre belle collaboration, et je suis reconnaissante de vous avoir eues à mes côtés.

Enfin, à tous ceux qui ont participé à ce travail de près ou de loin,

Merci du fond du cœur



Alajia (Djicji)



Dédicaces

Je tiens à dédier ce travail de fin d'études à mon père et à ma mère, qui ont toujours cru en moi et m'ont accompagné avec patience et bienveillance tout au long de mon parcours. Je remercie du fond du coeur ma mère, qui a su être présente à chaque étape de ma vie, me soutenir dans les moments de doute, m'encourager lorsque j'en avais le plus besoin et m'offrir une éducation exemplaire, fondée sur des valeurs de respect, de persévérance et d'honnêteté. Elle ne m'a jamais laissée perdre confiance en moi, elle n'a jamais douté de mes capacités et m'a toujours poussée à donner le meilleur de moi-même pour atteindre l'excellence. Sa présence à mes côtés et ses sacrifices au quotidien ont été une véritable source de force et d'inspiration.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à ma grand-mère, qui a toujours été et reste à mes côtés, m'accompagnant avec amour et sagesse à chaque étape de ma vie et de mon parcours universitaire. Son affection, ses prières et son soutien inconditionnel ont grandement contribué à ce que je puisse atteindre cet objectif.

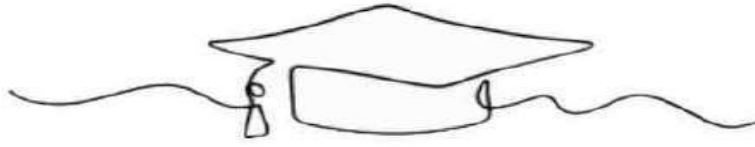
Je remercie aussi ma soeur Ryma ainsi que mes frères Ishak et Anis, pour leur présence constante dans ma vie et tout au long de ce parcours. Leur soutien, leur affection et leurs encouragements m'ont beaucoup apporté et ont été pour moi un véritable réconfort.

Sans oublier mes binômes de travail, Dalia et Djidji, avec qui j'ai partagé non seulement ce mémoire mais aussi de très bons moments. Leur implication, leur soutien et leur amitié ont grandement contribué à la réussite de ce projet et ont rendu cette expérience encore plus enrichissante et agréable.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement toute mes proches pour leurs amours, ses encouragements et sa présence, qui m'ont permis d'avancer sereinement et de mener à bien ce travail.

Siham





Dédicaces

A mon cher père

Aït Kaci Mahmoud,

Tu es un exemple de droiture, de force silencieuse et de sagesse. Ton regard plein de fierté m'a toujours donné le courage d'avancer, même lorsque les épreuves semblaient insurmontables. Tu ne dis pas toujours beaucoup, mais ton soutien se lit dans tes gestes, ta présence et ta patience. Tu as travaillé, sacrifié et donné sans jamais compter, pour que je puisse étudier, rêver et réussir. Ce mémoire est un modeste hommage à tous tes efforts, une humble réponse à toute cette énergie que tu as investie pour mon avenir.

Puisse Allah t'accorder la santé, la sérénité et une longue vie paisible à nos côtés.

A ma chère mère

Amrouche Naïma (Fatiha),

Tu es le cœur battant de ma vie, ma première source de courage et de tendresse. Ton amour inconditionnel, ta patience inégalée et tes prières silencieuses ont été ma plus grande force dans les moments d'incertitude. Chaque mot réconfortant, chaque regard rassurant, chaque geste attentionné m'a portée plus loin. Tu as su, sans jamais faillir, sécher mes larmes, apaiser mes doutes et me redonner confiance quand je vacillais. Ce travail est aussi le tien, car derrière chacune de mes réussites se cache ta présence constante, ton écoute et ton incroyable dévouement.

Que Dieu te protège et te récompense pour tout ce que tu es et tout ce que tu fais en silence, par amour.

À mes sœurs adorées

Dona et Dina,

Votre affection, vos encouragements et votre confiance m'ont toujours accompagnée. Merci pour vos sourires, votre écoute et votre tendresse, qui m'ont donné la force de continuer. Je vous aime profondément.

Enfin, mais non des moindres

je me dédie aussi ce travail,

Pour la persévérance, le dévouement et la résilience que j'ai su cultiver. Je reconnais le chemin parcouru, les efforts fournis et les épreuves surmontées. Chaque étape, chaque difficulté m'a rapprochée un peu plus de mes objectifs. À moi-même, bravo pour n'avoir jamais abandonné.

À la mémoire de ma grand-mère maternelle,

qui m'a élevée avec amour durant mon enfance. Tu restes à jamais dans mon cœur.

Allah yerhemha.

*À toutes les personnes qui ont été à mes côtés dans les moments les plus difficiles,
Celles qui m'ont offert leur soutien, leur présence ou simplement un regard
rassurant quand j'en avais besoin,
Merci d'avoir été là, même en silence.*

Dasia



Liste des abréviations

AAC : acétyltransférases

ABC : famille des cassettes de liaison à l'ATP

ADN : acide désoxyribonucléique

AGEs : aminoglycoside-modifying enzymes

AMEs : enzymes modifiant les aminosides

ANT : adényltransférases

APH : phosphotransférases

ARN : acide ribonucléique

ATB : antibiotiques

BGN : bacille à Gram négatif

BLSE / SBL : β -lactamases à spectre étendu

BMR : bactéries multi résistantes

CASFM : comité antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentration minimale inhibitrice

DMSO : diméthyl sulfoxyde

ECBU : examen cytbactériologique des urines

ECBP : examen cytbactériologique de pus

FIC : indices de concentration inhibitrice fractionnaire

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GN : gélose nutritive

GSC : gélose au sang cuit

GSF : gélose au sang frais

GS-MC : chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse

HE : huiles essentielles

HEBBD : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie

I : intermédiaire

IPP : isopentyl pyrophosphate

LPS : lipopolysaccharides

MAE / MW-SDE : extraction assistée par micro-ondes

MAbs : anticorps monoclonaux

MATE : famille d'extrusion des médicaments et composés toxiques

MDR : Multidrug-resistant

MDRE : entérocoques multirésistants

MFS : superfamille facilitatrice majeure

MH : Mueller Hinton

MW-SDE : extraction assistée par micro-ondes

NP : nanoparticules

OMS : Organisation mondiale de la santé

PABA : acide para-aminobenzoïque

PAMs : peptides antimicrobiens

PDR : pandrug-resistant

PLP : protéines de liaison à la pénicilline

QSI : inhibiteurs de la communication quorum

QS : quorum sensing

R : résistant

RND : famille résistance-nodulation-division

RMN : résonance magnétique nucléaire

S : sensible

SARM / MRSA : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

SFE : extraction par fluide supercritique

SFME : extraction sans solvant par micro-ondes

SMR : famille de petite résistance aux médicaments

THG : transfert horizontal de gènes

UAE : extraction assistée par ultrasons

UPBM : Union des professeurs de physiologie biochimie microbiologie

VRE : entérocoques résistants à la vancomycine

XDR : Extensively drug-resistant

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Degrés de la résistance bactérienne aux antibiotiques	21
Tableau 3.1 : Composants majoritaires de certaines huiles essentielles.....	45
Tableau 4.1 : Généralités sur les huiles essentielles utilisées	51
Tableau 4.2: Principaux milieux de cultureensemencés.	55
Tableau 4.3 : Liste des antibiotiques associés à une résistance chez Escherichia Coli	60
Tableau 4.4: Liste des antibiotiques associés à une résistance chez Staphylococcus aureus ...	61
Tableau 4.5 : sensibilité et résistance bactérienne aux huiles essentielles (Ponce et al., 2003)	64
Tableau 4.6 : Récapitulatif des antibiotiques testés selon les souches bactériennes et les huiles essentiellés.....	65
Tableau 5.1 : résultats de l'examen cyto bactériologique des urines	68
Tableau 5.2 : résultats de l'examen cyto bactériologique du pus	69
Tableau 5.3 : caractères cultureux d'Escherichia coli sur la gélose nutritive.	69
Tableau 5.4 : tableau récapitulatif des réactions biochimiques de l'api 20E	75
Tableau 5.5 : tableau récapitulatif des réactions biochimiques de l'api STAPH	77
Tableau 5.6 : Profil de sensibilité aux antibiotiques d'Escherichia coli.....	79
Tableau 5.7 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de Staphylococcus aureus	79
Tableau 5.8 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Origanum compactum (10 µl/disque) contre Escherichia coli, testée par la méthode de diffusion sur disque ; zones d'inhibition exprimées en mm (diamètre du disque (6mm) inclus).	81
Tableau 5.9 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Origanum compactum (10 µl/disque) contre Staphylococcus aureus, testée par la méthode de diffusion sur disque ; zones d'inhibition exprimées en mm (diamètre du disque (6mm) inclus).	81
Tableau 5.10 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Thymus vulgaris (10 µl/disque) contre Escherichia coli, testée par la méthode de diffusion sur disque ; zones d'inhibition exprimées en mm (diamètre du disque (6mm) inclus).	84
Tableau 5.11 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Thymus vulgaris (10 µl/disque) contre Staphylococcus aureus, testée par la méthode de diffusion sur disque ; zones d'inhibition exprimées en mm (diamètre du disque (6mm) inclus).	85
Tableau 5.12: Résumé des résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle d'Origanum compactum et les antibiotiques testés contre Escherichia coli et staphylococcus aureus	87

Tableau 5.13 : Résultats de l'interaction de l'huile d'Origanum compactum et antibiotiques (NA et CIP) ainsi que les valeurs de l'addition ATB+HE pour Escherichia coli	88
Tableau 5.14 : Résultats de l'interaction de l'huile d'Origanum compactum et antibiotiques (E et OF) ainsi que les valeurs de l'addition ATB+HE pour Staphylococcus aureus.....	89
Tableau 5.15 : Résumé des résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle de Thymus vulgaris et les antibiotiques testés contre Escherichia coli et staphylococcus aureus.....	92
Tableau 5.16 : Résultats de l'interaction de l'huile de Thymus vulgaris et antibiotiques (NA, SXT, AMC) ainsi que les valeurs de l'addition ATB+HE pour Escherichia coli	92
Tableau 5.17 : Résultats de l'interaction de l'huile de Thymus vulgaris et antibiotiques (E, OF, PT) ainsi que les valeurs de l'addition ATB+HE pour Staphylococcus aureus.....	93

Liste des Figures

Figure 1.1 : Modes d'action des antibiotiques sur la cellule bactérienne (Davies et Mazel, 1997).	06
Figure 2.1 : Les mécanismes de transfert génétique chez les bactéries. Inspirée de Whittle et al, (2002).	10
Figure 2.2 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram	20
Figure 3.1: Structures chimiques des terpènes et terpénoides (Hyldgaard et al., 2012)	33
Figure 3.2 : Structures chimiques des prophénylphénol (Hyldgaard et al., 2012).	34
Figure 3.3 : Schéma et principe d'hydrodistillation	36
Figure 3.4: Distillation d'eau et de vapeur (Akdağ & Öztürk, 2019).	37
Figure 3.5 : Extraction par fluide supercritique.	38
Figure 3.6 : Extraction assistée par ultrasons (UAE) (Sahoo et Banik, 2023).	39
Figure 3.7: Extraction assistée par ultrasons.	40
Figure 3.8 : Méthode de microatmosphère (Bousbia, 2004)	46
Figure 3.9 : Technique d'aromatogramme (Zaiki, 1988).	47
Figure 3.10: Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (Chen et al. 2022).	48
Figure 3.11 : Méthode de dilution sur agar (Guerrero Correa et al., 2020).	49
Figure 4.1 : Galeries biochimiques API 20E et API STAPH (photo original)	58
Figure 4.2 : Test de l'antibiogramme	60
Figure 4.3 : préparation d'une série de dilutions d'HE de l'ordre d'un demi.....	62
Figure 4.4 : Méthode de diffusion en puits sur gélose pour l'activité synergique (Rolta et al., 2018)	66

Figure 5.1 : Aspect macroscopique de l'urines (Photo originale)	67
Figure 5.2 : Observation microscopique de l'échantillon d'urine G ×40	67
Figure 5.3 : Observation microscopique de l'échantillon de pus G ×40	69
Figure 5.4 : observation des colonies d'Escherichia coli sur gélose nutritive	70
Figure 5.5 : observation des colonies Escherichia coli sur milieu ChromAgar	70
Figure 5.6 : Aspect des colonies de S. aureus sur milieu Chapman	71
Figure 5.7 : Aspect des colonies de S. aureus sur gélose au sang cuit	71
Figure 5.8 : résultats de la coloration de Gram : (A) Cocci en amas à Gram positif (violet) ; (B) Bacilles à Gram négatif (rose)	72
Figure 5.9 : résultats des tests d'oxydase et catalase pour Staphylococcus aureus et Escherichia coli.	73
Figure 5.10 : Résultats du test de coagulase (+).....	73
Figure 5.11 : identification de Escherichia coli par système api 20E	74
Figure 5.12: Identification bactérienne par api 20e à l'aide du logiciel UBPM le Lab.....	76
Figure 5.13 : Résultats des tests biochimiques galerie api STAPH	76
Figure 5.14 : Identification bactérienne par api STAPH à l'aide du logiciel UBPM le Lab	77
Figure 5.15 : Résultats de l'antibiogramme d'E. coli (Photo originale)	78
Figure 5.16 : résultats de l'antibiogramme de S. aureus (Photo originale)	79
Figure 5.17 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Origanum compactum contre Escherichia coli.....	80
Figure 5.18 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Origanum compactum contre Staphylococcus aureus	81
Figure 5.19 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Thymus vulgaris contre Escherichia coli.....	83
Figure 5.20 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Thymus vulgaris contre Staphylococcus aureus	84
Figure 5.21 : résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle d'origanum compactum et les antibiotiques testés contre Staphylococcus aureus.....	87
Figure 5.22 : résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle d'Origanum compactum et les antibiotiques testés contre Escherichia coli	87
Figure 5.23 : résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle de Thymus vulgaris et les antibiotiques testés contre Staphylococcus aureus	91
Figure 5.24 : résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle de Thymus vulgaris et les antibiotiques testés contre Escherichia coli	91

<i>Remerciements.</i>	I
<i>Dédicaces.</i>	II
<i>Liste des abréviations</i>	V
<i>Introduction générale</i>	01

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Les antibiotiques

1.1. Généralités sur les antibiotiques	03
1.2. Définition des antibiotiques	03
1.3. Classification des Antibiotiques	03
1.3.1. Selon l'origine	03
1.3.2. Selon la structure chimique.....	04
1.3.3. Classification selon le mode d'action	04
1.3.4. Spectre d'Activité	06
1.3.5. Classification selon l'effet antibactérien.....	06

Chapitre 2 : La résistance aux antibiotiques

2.1. Introduction.....	08
2.2. Définition	08
2.3. Origines de la résistance aux antibiotiques	09
2.4. Causes de la résistance bactérienne aux antibiotiques	11
2.5. Types de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	12
2.5.1. Résistance naturelle	12
2.5.2. Résistance acquise	12
2.5.3. Résistance adaptative	14
2.5.4. La résistance croisée	14
2.5.5. La Co-résistance	14

2.6. Mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	14
2.6.1. Modification de l'antibiotique.....	14
2.6.2. Dégradation de l'antibiotique	15
2.6.3. Modification enzymatique de la structure de l'antibiotique.....	15
2.6.4. Diminution de la pénétration et de l'efflux d'antibiotiques	16
2.6.5. Changements dans la cible de l'antibiotique	18
2.7. Les degrés de résistance	20
2.8. Conséquences de la résistance aux antibiotiques	21
2.9. Les stratégies alternatives pour la lutte contre les bactéries multirésistantes.....	22
2.9.1. Phagothérapie	22
2.9.2. Anticorps.....	23
2.9.3. Peptides antimicrobiens	24
2.9.4. Bactériocines	25
2.9.5. Nanoparticules	26
2.9.6. Inhibiteurs de détection du quorum sensing (QSI)	26
2.9.7. Les huiles essentielles	27

Chapitre 3 : Les huiles essentielles

3.1. Introduction	29
3.2. Historique des huiles essentielles.....	29
3.3. Définition	30
3.4. Caractéristiques des huiles essentielles	30
3.4.1. Propriétés physiques.....	30
3.4.2. Composition chimique	32
3.5. Critères de qualité des huiles essentielles.....	34
3.6. Toxicité des huiles essentielles.....	35
3.7. Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	35

3.7.1. Extraction par distillation et ses variantes.....	35
3.7.2. Extraction par solvant organique	37
3.7.3. Expression à froid	37
3.7.4. Extraction par fluide supercritique (SFE)	38
3.7.5. Extraction assistée par micro-ondes Les micro-ondes, ondes électromagnétiques dont	39
3.7.6. Extraction assistée par ultrasons	39
3.8. Activité antifongique	40
3.8.1. Activité anti-inflammatoire.....	41
3.8.2. Activité antioxydante.....	41
3.8.3. Activité antivirale et autres	41
3.8.4. Activité antibactérienne des HEs	41
3.8.5. Action sur la membrane cellulaire bactérienne	42
3.8.6. Action sur la morphologie cellulaire	43
3.8.7. Action sur les acides gras membranaires	43
3.8.8. Action sur les protéines	43
3.8.9. Action contre l'ATP bactérien	44
3.8.10. Altération du matériel génétique.....	44
3.9. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	45
3.9.1. Techniques en milieu solide	46
3.9.2. Techniques en milieu liquides	47
3.10. Toxicité et effets indésirables	49

Partie expérimentale

Chapitre 4 : Matériel et méthodes

4.1. Cadre de l'étude et objectif général	51
4.2. Matériel biologique	51
4.3. Prélèvement, transport et de conservation des échantillons biologiques	52

4.3.1. Prélèvements	52
4.3.2 Transport et conservation :	52
4.4. Examen cyto bactériologique des urines	53
4.4.1. Examen macroscopique des urines	53
4.4.2. Examen microscopique des urines	53
4.4.3. Culture bactériologique de l'urine	53
4.5. Examen cyto bactériologique du pus (ECBP)	54
4.5.1. Observation macroscopique.....	54
4.5.2. Examen microscopique à l'état frais.....	54
4.5.3. Culture.....	54
4.6. Identification des souches bactériennes	55
4.6.1. Observation des cultures et différenciation des colonies	55
4.6.2. Test de l'oxydase	56
4.6.3. Test de catalase	56
4.6.4. Test de coagulase	56
4.7. Identification biochimique	57
4.7.1. Galerie Api 20E	57
4.7.2. Galerie Api STAPH.....	57
4.8. Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)	58
4.8.1. La méthode de diffusion sur gélose : principe et mise en œuvre.....	58
4.8.2. Étapes de la méthode de Kirby-Bauer	59
4.8.3. Test de sensibilité aux huiles essentielles et synergie avec les antibiotiques.....	61
4.8.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la technique d'aromatogramme.....	63
4.8.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	64
4.8.6. Détermination des types d'interactions entre les huiles essentielles et les antibiotiques (tests de synergie)	65

Chapitre 5 : Résultats et discussion

5.1 Résultats de l'examen cytobactériologique des urines.....	67
5.1.1 Examen macroscopique des urines	67
5.1.2 Examen microscopique des urines	67
5.2 Résultats de l'examen cytologique du pus	68
5.2.1 Examen macroscopique	68
5.2.2 Examen microscopique	68
5.2.3 Résultats de la culture bactériologique de l'urine	68
5.3 Résultat d'Identification de la souche bactérienne	70
5.3.1 Identification sur milieu ChromAgar.....	70
5.4 Résultats de la culture bactériologique de pus	71
5.4.1 Milieu de Chapman.....	71
5.4.2 Gélose au Sang Cuit (GSC)	71
5.4.3 Gélose au sang frais	72
5.4.4 Gélose Hektoen	72
5.4.5 Gélose Sabouraud	72
5.5 Coloration de Gram	72
5.6 Test d'oxydase et de catalase	72
5.7 Test de coagulase	73
5.8 Résultats d'identification biochimique.....	74
5.8.1 Galerie Api 20E.....	74
5.8.2 Galerie api STAPH	76
5.9 Résultat de l'antibiogramme	78
5.9.1 Escherichia coli	78
5.9.2 Staphylococcus aureus	79
5.10 Résultats des tests de sensibilité aux huiles essentielles.....	80

5.10.1 Résultats des tests de sensibilité à l'huile d'origan	80
5.10.2 Résultats des tests de sensibilité à l'huile de thym à thymol	83
5.11 Résultats des tests de synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques	86
5.11.1 Résultats de l'interaction de l'huile d'origan avec les antibiotiques.....	86
5.11.2 Résultats de l'interaction de l'huile de thym à thymol avec les antibiotiques	91
<i>Conclusion et perspectives</i>	95
<i>Bibliographie</i>	96

Annexes

Résumé.

Introduction générale

La découverte de la pénicilline, qui remonte à près de 90 ans, a transformé radicalement le traitement des pathologies bactériennes. Depuis cette période, une multitude d'autres antibiotiques ont été identifiés à partir de bactéries et de champignons, ou élaborés par synthèse chimique, se transformant ainsi en alternatives chimiothérapeutiques performantes **(Cheesman et al. 2017)**. Ils ont habilement supprimé une vaste gamme d'agents infectieux, diminuant de manière significative le taux de mortalité associé à des maladies comme la tuberculose, la syphilis et les infections postopératoires. Ces médicaments ont rendu les procédures médicales autrefois périlleuses, comme les opérations complexes ou les greffes, plus sécurisées, affirmant leur importance primordiale dans la médecine contemporaine **(Cook et al., 2022)**.

La résistance aux antibiotiques, également appelée résistance antimicrobienne, est un phénomène aussi ancien que l'avènement des antibiotiques eux-mêmes **(Burt, 2016)**. Ce phénomène, qui se produit dans le monde entier, jette une ombre sur les miracles médicaux modernes **(Lahmar et al. 2017)**. Les antibiotiques, issus de substances naturelles produites par des champignons ou certaines bactéries, ont initialement été utilisés pour combattre les infections bactériennes. Cependant, les bactéries ne sont pas passives face à ces menaces : celles qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont simultanément développé des mécanismes de protection pour survivre **(Lahmar et al. 2017)**.

L'émergence de souches bactériennes résistantes a sérieusement limité notre capacité à traiter les maladies bactériennes, posant un défi majeur pour la santé publique **(Cheesman et al. 2017)**. Le développement et la propagation de la résistance aux antibiotiques actuellement disponibles sont devenus une préoccupation mondiale. Ce problème a été particulièrement mis en lumière ces dernières années avec l'augmentation des infections causées par des souches multirésistantes. L'utilisation inappropriée et la surprescription d'antibiotiques dans la thérapie médicale humaine sont considérées comme les principales causes de l'essor de cette résistance. La montée de la résistance aux microbes et les effets indésirables fréquents liés aux antimicrobiens de synthèse incitent les chercheurs à explorer des solutions naturelles substitutives pour la guérison de diverses maladies infectieuses. Parmi les agents alternatifs étudiés pour compléter les antibiotiques conventionnels et les antimicrobiens de synthèse, on trouve des composés actifs d'origine végétale **(Lahmar et al. 2017)**.

Il est probable que les plantes médicinales traditionnelles apporteront d'autres antibiotiques inédits dans le futur. Toutefois, l'association d'extraits de plantes avec des antibiotiques traditionnels pourrait présenter de meilleures perspectives pour proposer rapidement des

alternatives de traitement accessibles. Effectivement, certaines thérapies antibiotiques combinées sont déjà accessibles dans la pratique clinique. Cette recherche examine la littérature actuelle sur les traitements antibiotiques combinés afin de souligner leur potentiel et guider les recherches à venir (**Cheesman et al. 2017**).

Cette recherche s'inscrit dans une perspective innovante visant à identifier des alternatives naturelles face à la problématique croissante de la résistance aux antibiotiques, en évaluant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*) et d'origan (*Origanum compactum*) sur des souches multirésistantes d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. Elle examine également leur potentiel synergique avec des antibiotiques conventionnels, ouvrant la voie à de nouvelles approches thérapeutiques prometteuses.

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Les antibiotiques

1.1. Généralités sur les antibiotiques

Les antibiotiques constituent l'une des avancées médicales majeures du XX^e siècle, ayant permis de traiter efficacement les infections bactériennes. Toutefois, leur usage abusif a entraîné l'apparition de résistances, compromettant leur efficacité (**Ventola, 2015**). Bien que Fleming soit célèbre pour la découverte de la pénicilline en 1928, le concept d'antibiose avait été introduit plus tôt, en 1889, par Jean-Paul Vuillemin. De plus, plusieurs chercheurs, tels que Pasteur, Joubert et Duchesne, avaient déjà observé des propriétés antibactériennes avant lui. Des avancées notables ont également marqué cette période, notamment le Salvarsan® d'Ehrlich (1910), les sulfamides de Domagk (1930) et la gramicidine de Dubos (1939). La production à grande échelle de la pénicilline fut rendue possible grâce aux travaux de Chain et Florey, avec l'appui des États-Unis durant la Seconde Guerre mondiale. En reconnaissance de cette contribution, Fleming, Florey et Chain furent récompensés par le prix Nobel en 1945 (**Lucie Mangine, 2016**).

1.2. Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules d'origine naturelle ou synthétique, conçues pour inhiber sélectivement la croissance bactérienne (bactériostatique) ou détruire les bactéries (bactéricide), sans affecter significativement les cellules humaines (**Silver, 2011**). Leur sélectivité repose sur des cibles biologiques absentes chez l'hôte, comme la paroi cellulaire bactérienne (**Murray et al., 2021**). Contrairement aux antiviraux ou antifongiques, ils sont inefficaces contre les virus ou les champignons (**Aminov, 2010**).

1.3. Classification des Antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon différents critères, notamment leur nature chimique, leur origine, leur spectre d'action et leur mécanisme d'action (**Kezzal, 1993**).

1.3.1. Selon l'origine

On distingue trois grandes catégories :

- **Antibiotiques naturels** : Produits par des micro-organismes comme *Penicillium notatum* (pénicilline) ou *Streptomyces griseus* (streptomycine), ces composés ont été les premiers utilisés en clinique (**Fleming, 1929 ; Waksman, 1944**).
- **Antibiotiques synthétiques** : Entièrement élaborés en laboratoire sans origine naturelle. La ciprofloxacine, une fluoroquinolone, en est un exemple typique (**Drlica et al., 1997**).

- **Antibiotiques semi-synthétiques** : Dérivés de molécules naturelles modifiées chimiquement pour améliorer leur efficacité ou élargir leur spectre. L'amoxicilline, dérivée de la pénicilline, illustre bien cette catégorie (**Silver, 2011**).

1.3.2. Selon la structure chimique

Cette classification distingue les familles d'antibiotiques selon leur noyau moléculaire, ce qui détermine leur activité et leur spectre (**LOUM, 2005**) :

- **β -lactamines** : Comprenant les pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames (**Bush & Bradford, 2016 ; Silver, 2011**).
- **Macrolides** : Agissant sur la sous-unité 50S du ribosome, l'érythromycine est un exemple majeur (**Kohanski et al., 2010**).
- **Quinolones** : Divisées en deux générations (ex. acide nalidixique et fluoroquinolones comme la levofloxacin) (**Yala et al., 2001**).
- **Aminosides** : Composés de sucres aminés (ex. streptomycine, gentamicine), ils inhibent la synthèse protéique (**Cohen & Jacquot, 2008**).
- **Tétracyclines** : Constituées de quatre cycles fusionnés, elles incluent la doxycycline, la minocycline, etc. (**Kezzal, 1993**).
- **Phénicolés** : Comme le chloramphénicol, ils comportent un noyau nitrobenzène (**Kezzal, 1993**).
- **Polypeptides** : Groupe hétérogène comprenant glycopeptides (vancomycine), lipopeptides (daptomycine), et autres, aux mécanismes d'action variés (**Yala & Merad, 2001**).
- **Sulfamides** : Possèdent un noyau para-aminobenzène avec des chaînes R1/R2 influençant leur pharmacocinétique (**Yala & Merad, 2001**).
- **Rifamycines** : Se caractérisent par un noyau macrocyclique aromatique, efficace contre certaines bactéries Gram+ (**Yala & Merad, 2001**).

1.3.3. Classification selon le mode d'action

Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire

Certains antibiotiques ciblent les étapes clés de la biosynthèse du peptidoglycane, un composant structural fondamental de la paroi bactérienne. L'altération de cette structure entraîne une perte d'intégrité cellulaire, suivie d'une lyse osmotique (voir figure 1.1).

- **Pénicillines et Céphalosporines** : Elles inhibent les protéines de liaison à la pénicilline (PLP), essentielles à la réticulation du peptidoglycane, empêchant ainsi la formation d'une paroi fonctionnelle (**Silver et al., 2011**).

- **Glycopeptides** : Ils se lient aux précurseurs D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane, bloquant leur incorporation dans la paroi et compromettant sa synthèse (**Kahne et al., 2005**).

Inhibition de la synthèse des protéines

Ces antibiotiques agissent au niveau des ribosomes bactériens, en ciblant soit la sous-unité 30S, soit la sous-unité 50S, ce qui empêche la traduction de l'ARNm en protéines vitales.

- **Aminosides** : Ils se fixent à la sous-unité 30S, provoquant une lecture erronée de l'ARNm et la synthèse de protéines défectueuses, entraînant des dommages cellulaires irréversibles (**Kotra et al., 2000**).
- **Macrolides** : En se liant à la sous-unité 50S, ils bloquent la translocation des peptides, stoppant ainsi la synthèse protéique (**Gaynor et al., 2003**).

Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

Ce mécanisme implique une interférence avec la réplication de l'ADN ou la transcription de l'ARN, bloquant la prolifération bactérienne (voir figure 1.1).

- **Quinolones** : Elles inhibent l'ADN gyrase chez les Gram négatives et la topoisomérase IV chez les Gram positives, enzymes indispensables à la réplication de l'ADN, causant des cassures et la mort cellulaire (**Drlica & Zhao, 1997**).
- **Rifamycines** : Ces antibiotiques bloquent l'ARN polymérase ADN-dépendante, empêchant ainsi la transcription (**Campbell et al., 2001**).
- **Métronidazole** : Sous conditions anaérobies, il est activé en radicaux libres qui endommagent l'ADN et les protéines bactériennes (**Löfmark et al., 2010**).

Inhibition des voies métaboliques

Certains antibiotiques interfèrent avec les voies métaboliques spécifiques aux bactéries, notamment la biosynthèse des folates, indispensables à la production d'acides nucléiques (voir figure 1.1).

- **Sulfamides**: Ils agissent comme analogues du PABA, inhibant la dihydroptéroate synthase, ce qui bloque la synthèse de l'acide folique (**Sköld, 2000**).
- **Triméthoprime** : Il inhibe la dihydrofolate réductase, étape clé en aval de la voie des folates, renforçant l'effet des sulfamides (**Huovinen, 2001**).

Altération de la membrane cellulaire

Certains antibiotiques compromettent directement la structure membranaire, entraînant une fuite du contenu cellulaire et une perte de viabilité (voir figure 1.1).

- **Polymyxines** : Elles se fixent aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram négatives, induisant une perméabilisation et une perte d'homéostasie cellulaire (Velkov et al., 2016).
- **Lipopeptides cycliques** : Ils s'insèrent dans la membrane des bactéries Gram positives, provoquant une dépolarisation membranaire et une fuite des ions essentiels (Silverman et al., 2001).

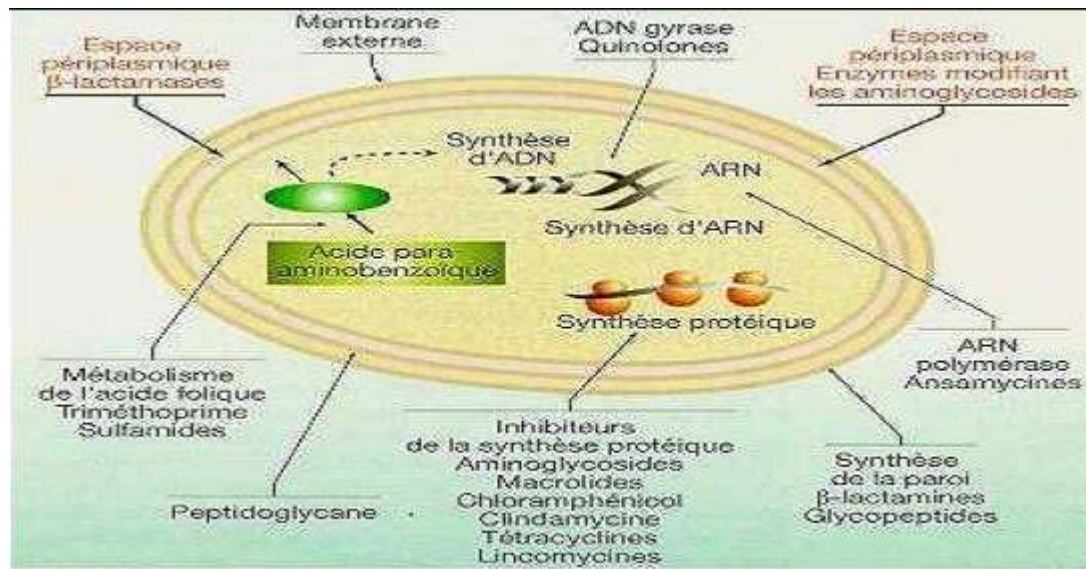


Figure 1.1 : Modes d'action des antibiotiques sur la cellule bactérienne (Davies et Mazel, 1997).

1.3.4. Spectre d'Activité

L'éventail des agents infectieux auxquels un antibiotique est efficace est connu sous le nom de spectre d'action. Le spectre est directement associé à la structure chimique de l'antibiotique ainsi qu'à sa cible microbienne (structure et fonction) (Bugnicour, 1995). On distingue des antibiotiques à large spectre d'activité tels que les aminosides, les tétracyclines et le chloramphénicol, ainsi que des antibiotiques à spectre restreint comme les macrolides (Singleton, 2005).

1.3.5. Classification selon l'effet antibactérien

Les antibiotiques peuvent être classés en fonction de leur effet sur les bactéries en deux grandes catégories : les bactéricides et les bactériostatiques.

Les antibiotiques bactéricides : induisent la mort bactérienne en perturbant des structures ou fonctions cellulaires essentielles, tels que les bêta-lactamines (pénicilline et céphalosporines) (Tipper et Strominger, 1965) et les aminoglycosides, à l'instar de la gentamicine.

La bactéricidie est définie comme la destruction d'une fraction importante de la population bactérienne, observable par une réduction du nombre de germes viables après incubation en

milieu de culture (**Soilleux, 2007**). Cette activité est évaluée à l'aide de la concentration minimale bactéricide (CMB), qui correspond à la plus faible concentration d'un antibiotique capable de tuer 99,9 % d'une population bactérienne donnée (**Pankey et Sabath, 2004**).

La détermination de la CMB repose sur le repiquage des échantillons issus des tubes ou puits sans croissance visible lors du test de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur un milieu dépourvu d'antibiotique. L'absence de colonies après incubation indique la concentration correspondant à la CMB (**Andrews, 2001**).

Les antibiotiques bactériostatiques : quant à eux, n'entraînent pas la mort des bactéries, mais inhibent leur croissance et leur multiplication, permettant au système immunitaire de l'hôte de les éliminer. C'est le cas des tétracyclines et des macrolides (comme l'érythromycine) (**Chopra et Roberts, 2001**). La bactériostase est ainsi définie comme l'inhibition de la prolifération bactérienne dans un milieu donné, comparée à une croissance normale en l'absence d'antibiotique (**Cohen et Jacquot, 2008**). Elle est évaluée à l'aide de la concentration minimale inhibitrice (CMI), soit la plus faible concentration d'un antibiotique empêchant toute croissance bactérienne visible dans des conditions normalisées (**CLSI, 2023**).

La CMI peut être déterminée par plusieurs méthodes, telle que la méthode de dilution en bouillon où des dilutions successives de l'antibiotique sont inoculées avec une suspension bactérienne. Après incubation, la CMI est la concentration la plus faible ne présentant aucune croissance visible (**Andrews, 2001**). Une autre méthode courante est l'Etest®, qui utilise une bande contenant un gradient d'antibiotique déposée sur une gélose. La CMI est lue au point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bande (**Balouiri et al., 2016**).

Relation entre CMI et CMB :

Chez les antibiotiques bactéricides, la CMB est généralement proche de la CMI (**Pankey et Sabath, 2004**). En revanche, pour les antibiotiques bactériostatiques, la CMB est souvent bien plus élevée que la CMI (**Chopra et Roberts, 2001**).

Chapitre 2 :

La résistance aux antibiotiques

2.1. Introduction

La résistance aux antibiotiques constitue un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Elle se définit par la capacité des bactéries à survivre et se multiplier malgré l'action d'antibiotiques auparavant efficaces, rendant les traitements classiques inefficaces et favorisant la dissémination des infections **(Davies et Davies, 2010)**. Ce phénomène, étudié depuis l'introduction des premiers antibiotiques, résulte d'une sélection naturelle rigoureuse permettant à certaines souches bactériennes de développer des mécanismes de résistance ciblés.

L'émergence rapide de bactéries multirésistantes a conduit à une recrudescence préoccupante d'infections difficiles à traiter, tant en milieu hospitalier que communautaire. Parmi les agents pathogènes les plus alarmants figurent des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus pneumoniae* **(Roberto et al., 2019)**, mais également des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* **(Levy et Marshall, 2004)**. Ces microorganismes sont d'autant plus préoccupants qu'ils résistent aux thérapies conventionnelles, augmentant ainsi les risques de complications sévères voire de mortalité **(Levy, 1982)**.

Face à cette crise sanitaire sans précédent, il est impératif de développer de nouvelles alternatives antimicrobiennes efficaces et d'explorer des stratégies thérapeutiques innovantes. Parallèlement, des mesures strictes de prévention et de contrôle des infections doivent être mises en œuvre afin de limiter la propagation des souches résistantes et préserver l'efficacité des antibiotiques disponibles **(Ebongue et al., 2015)**.

2.2. Définition

L'antibiorésistance désigne la capacité des bactéries à résister à l'action d'antibiotiques auparavant efficaces, ce qui leur permet de survivre et de se multiplier malgré le traitement. Lorsqu'une souche bactérienne présente une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, elle est qualifiée de bactérie multirésistante (BMR) **(Levy et Marshall, 2004)**. Des espèces telles qu'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* illustrent bien cette problématique, en raison des infections complexes qu'elles provoquent chez l'être humain et chez les animaux **(Roberto et al., 2019)**.

D'un point de vue clinique, une bactérie est dite résistante lorsqu'elle ne répond plus à un traitement antibiotique, entraînant un échec thérapeutique. En microbiologie, cette résistance est mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne. Une souche est considérée comme résistante lorsque la CMI dépasse la concentration normalement requise pour inhiber la majorité des souches de la même espèce (**CASFM, 2018**).

Cette problématique a été anticipée dès 1945 par Alexander Fleming, lors de son discours de réception du prix Nobel, où il alertait sur les conséquences d'un usage excessif et inapproprié des antibiotiques (**Fleming, 1945**). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) insiste aujourd'hui sur l'ampleur de cette menace, qui affecte non seulement les bactéries pathogènes, mais aussi les bactéries bénéfiques et commensales du microbiome (**OMS, 2021**). La résistance aux antimicrobiens complique le traitement de nombreuses infections, accroît le risque de complications sévères et favorise la propagation de pathogènes, compromettant ainsi l'efficacité des traitements actuels (**Terreni et al., 2021**).

2.3. Origines de la résistance aux antibiotiques

Les bactéries ont une grande capacité à s'adapter génétiquement pour faire face à des dangers dans leur environnement, comme les antibiotiques qui pourraient les menacer. Celles qui vivent près de micro-organismes produisant des substances antimicrobiennes ont développé des moyens de survivre à ces substances nocives, ce qui leur permet de se multiplier même en présence d'antibiotiques. Pour résister, les bactéries utilisent principalement deux stratégies qui est la mutation dans les gènes lie à la cible de l'antibiotique ainsi que l'acquisition d'ADN étranger codant pour des déterminants de résistance par transfert horizontal de gènes (THG). (**Munita & Arias, 2016**).

Les mutations menant à la résistance aux antibiotiques se produisent le plus souvent dans ces trois catégories de gènes : ceux qui codent les cibles de l'antibiotique, ceux qui codent leurs transporteurs, ainsi que ceux qui codent les régulateurs, lesquels répriment l'expression de certains transporteurs ou encore de certains éléments de décontamination des antibiotiques (essentiellement certaines enzymes modifiant les antibiotiques codées par le chromosome de même que quelques pompes d'efflux multidrogues). Plusieurs changements dans ces éléments contribuent à développer une certaine résistance aux antibiotiques. Néanmoins, ces mutations ne constituent pas toujours des gènes de résistance aux antibiotiques (bien que certaines protéines, telle la protéine de résistance multiple aux antibiotiques MarA, aient été clairement

décrites comme telles); de ce fait, classifier ces éléments comme gènes de résistance peut assurément mener à une évaluation incorrecte voire dangereuse du risque de dissémination de la résistance aux antibiotiques dans certaines analyses métagénomiques basées sur le séquençage de la prévalence de la résistance aux antibiotiques (Martínez, 2014).

L'acquisition de matériel génétique étranger par transfert horizontal de gènes (THG) constitue l'un des moteurs majeurs de l'évolution bactérienne. Une grande partie des antibiotiques utilisés en clinique dérivent de composés naturellement présents dans des environnements tels que le sol, où les bactéries ont depuis longtemps développé des mécanismes intrinsèques de résistance pour survivre à ces substances. Ce « résistome environnemental » représente une vaste réserve de gènes de résistance pouvant être transférés à des bactéries pathogènes d'importance clinique. Ce phénomène contribue de manière significative à la dissémination de la résistance à divers antibiotiques largement utilisés dans la pratique médicale.

Les bactéries obtiennent du matériel génétique externe à travers trois méthodes voire la figure ci-dessous

- La conjugaison ("sexe" bactérien)
- Transduction (médiée par des phages)
- Transformation (incorporation d'ADN nu) (Munita & Arias, 2016).

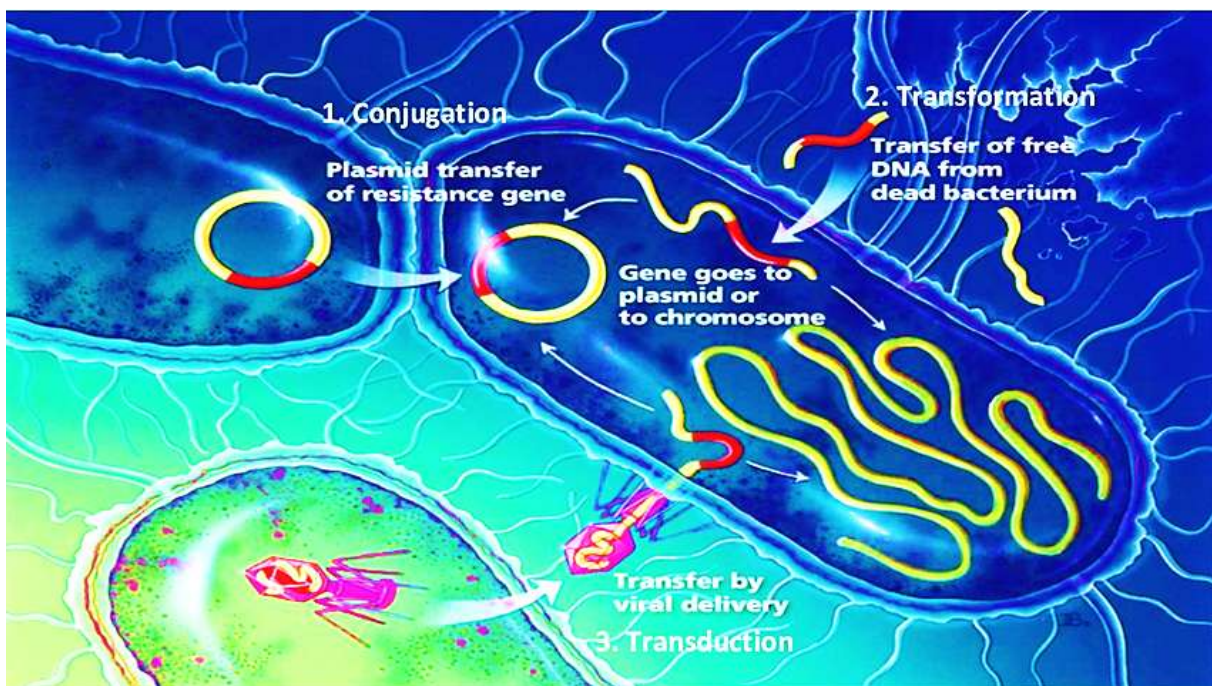


Figure 2.1 : Les mécanismes de transfert génétique chez les bactéries. Inspirée de Whittle et al, (2002).

2.4. Causes de la résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne est un phénomène complexe influencé par plusieurs facteurs. À la base, elle est liée à l'utilisation des antibiotiques, qui jouent un rôle essentiel dans le traitement des infections microbiennes et ont permis de grandes avancées médicales, notamment en rendant possibles des interventions comme la transplantation d'organes. Cependant, au fil du temps, les microbes ont développé des mécanismes de résistance face à ces traitements. Cette résistance s'explique en partie par une utilisation inadéquate des antibiotiques, que ce soit par un mauvais dosage ou une durée de traitement inappropriée. D'autres facteurs favorisent également son apparition, comme les séjours prolongés à l'hôpital, les maladies sous-jacentes, le non-respect des règles d'hygiène et le transfert de patients entre établissements de santé, qui facilitent la propagation des bactéries résistantes (**Bouyahya et al., 2017**).

L'utilisation d'un même antibiotique n'a pas toujours le même impact sur toutes les espèces bactériennes. Par exemple, certaines bactéries, comme les streptocoques du groupe A, ne développent pas forcément de résistance à la pénicilline. C'est ainsi la surutilisation de certains antibiotiques exerce une pression considérable sur l'écosystème bactérien, favorisant l'émergence de souches résistantes. Contrairement à d'autres médicaments, les antibiotiques n'affectent pas seulement le patient traité, mais aussi la population en général. À long terme, leur usage peut favoriser l'apparition d'une souche bactérienne résistante, qui pourra ensuite se propager à d'autres personnes (**Weiss, 2002**).

L'utilisation d'un même antibiotique n'a pas toujours le même effet sur toutes les espèces bactériennes. Par exemple, certaines bactéries, comme les streptocoques du groupe A, restent sensibles à la pénicilline et ne développent pas forcément de résistance. En revanche, la surconsommation de certains antibiotiques exerce une pression importante sur l'écosystème bactérien, favorisant l'émergence de souches résistantes. Contrairement à d'autres médicaments, les antibiotiques ne concernent pas seulement le patient qui les prend : leur utilisation a un impact collectif. À long terme, elle peut favoriser l'apparition de bactéries résistantes, qui risquent ensuite de se propager au sein de la population (**Weiss, 2002**).

2.5. Types de résistance bactérienne aux antibiotiques

L'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques entraîne des infections difficiles à guérir, constituant ainsi un enjeu de santé publique. Les infections nosocomiales, souvent dues à des bactéries résistantes, aggravent généralement le pronostic des patients et

prolongent leur hospitalisation et ils accroître les frais de traitement. On identifie deux formes de résistance bactérienne. La résistance naturelle ou innée et la résistance acquise (**Mehdi, 2008**).

2.5.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle, propre à une espèce bactérienne donnée, constitue un trait génétique stable qui délimite le spectre d'action de l'antibiotique et peut ainsi être utilisé comme outil d'identification (**Société Française de Microbiologie, 2019**). Elle se manifeste par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la valeur critique minimale de l'antibiotique concerné. Intégrée au patrimoine génétique normal de la bactérie, cette forme de résistance est chromosomique, permanente et transmise verticalement (**Yala et al., 2001 ; Yamashita et al., 2000**). Elle résulte principalement d'une inaccessibilité de la cible à l'antibiotique, d'une faible affinité entre la cible et la molécule, ou encore de l'absence de cette cible. La résistance naturelle est généralement identifiée dès les premières phases d'évaluation d'un antibiotique, contribuant ainsi à la définition de son spectre antibactérien. À titre d'exemple, les entérobactéries et *Pseudomonas* sont naturellement résistants aux macrolides, tout comme les bactéries à Gram négatif le sont à la vancomycine. Cette forme de résistance, bien qu'héritée lors de la division cellulaire, n'est en principe pas transmissible horizontalement entre différentes espèces bactériennes (**Yamashita et al., 2000**).

2.5.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent acquérir une résistance à un antibiotique au préalable actif, ce qui entraîne des modifications génétiques. Cette résistance est fréquemment instable (**Patrick, 2003**).

Ces modifications pourraient être attribués à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance par le biais de plasmides, de transposons ou d'intégrons (**Davies et Davies, 2010**). Par exemple, le gène *mecA* est responsable de la résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus* (SARM).

- **Mutation chromosomique spontanée** : Environ 10 à 20 % des bactéries développent une résistance aux antibiotiques via la mutation chromosomique spontanée. Les gènes de résistance se trouvent donc à l'intérieur du chromosome de la bactérie. Une mutation n'influe que sur un seul caractère et la résistance est généralement spécifique à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques partageant le même mode d'action

(TENOVER, 2006), elle se transmet uniquement de manière verticale (d'une bactérie à sa progéniture) et n'est pas transmise horizontalement (d'une bactérie à une autre) (Andrement et al., 1997).

Les bactéries sensibles peuvent acquérir des mutations dans des gènes affectant l'action des antibiotiques, leur conférant ainsi un avantage sélectif en présence de ces derniers (Munita & Arias, 2016). L'exposition à l'antibiotique, bien qu'elle ne soit pas mutagène en soi, exerce une pression de sélection qui favorise la survie et la prolifération des mutants résistants. Les mutations concernent principalement trois types de gènes : ceux codant pour la cible de l'antibiotique (réduction de l'affinité), ceux impliqués dans son transport (diminution de la perméabilité), et ceux régulant l'expression des pompes d'efflux (Martinez, 2014). Par exemple, la résistance aux fluoroquinolones résulte souvent de mutations dans les gènes de la gyrase de l'ADN et de la topoisomérase IV, cibles principales de ces antibiotiques (Hooper, 2002).

- **Acquisition de gènes de résistance :** Les résistances par acquisition d'ADN sont la conséquence d'un transfert horizontal y compris entre espèces éloignées phylogénétiquement. Les bactéries utilisent trois mécanismes principaux de transfert horizontal d'éléments génétiques entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces et de genres différents : la transformation, la transduction et la conjugaison (Doublet et al., 2012).

La résistance bactérienne par acquisition de matériel génétique exogène constitue le mécanisme le plus fréquemment observé en milieu clinique, aussi bien chez les bactéries à Gram positif que Gram négatif. Elle peut résulter d'un transfert direct de matériel chromosomique ou, plus fréquemment, d'échanges impliquant des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides (Carle, 2009). Contrairement aux mutations chromosomiques, les gènes de résistance portés par les plasmides peuvent être transmis à la fois verticalement, lors de la division cellulaire, et horizontalement, entre bactéries d'espèces identiques ou différentes (Mossialos et al., 2008).

Nombreux gènes de résistance, d'origine chromosomique, proviennent initialement de micro-organismes producteurs d'antibiotiques, pour lesquels ils assurent une immunité. Leur transfert devient particulièrement efficace lorsqu'ils sont intégrés à des éléments mobiles comme les plasmides, transposons, intégrons ou phages, facilitant ainsi leur dissémination rapide au sein des populations bactériennes (Stephanie.F., 2009).

La variabilité des gènes de résistance chez les agents pathogènes humains est plus faible que dans les environnements naturels, en raison de la connectivité écologique et de l'effet fondateur. Une fois un gène de résistance établi, il y a peu de pression sélective pour le remplacer, et les bactéries doivent supporter les coûts associés à l'intégration de ce gène (**Roberts, 1996 ; Weingarten et al., 2018**).

2.5.3. Résistance adaptative

Elle est caractérisée comme une résistance à un ou plusieurs antibiotiques, déclenchée par un signal environnemental spécifique. Cette forme de résistance semble résulter des changements de l'expression de gènes en réponse aux modifications environnementales. (**Sirot et al., 1987**).

2.5.4. La résistance croisée

La résistance croisée est un phénomène où une bactérie qui a acquis une résistance à un antibiotique spécifique d'une classe devient également résistante à d'autres antibiotiques de cette même classe. Même si elle n'a jamais été en contact avec ces molécules. C'est cette résistance croisée offre aux β -lactamases à spectre étendu (BLSE) présentes dans les bactéries Gram-négatives une résistance si vaste (β -lactamines et céphalosporines) qu'elles représentent un enjeu crucial pour la santé humaine (**Julie. B., 2014**).

2.5.5. La Co-résistance

On parle de Co-résistance quand plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, pouvant être dans certains cas stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun des mécanismes confère (par résistance croisée) la résistance à un groupe d'antibiotique conférant à la bactérie un large spectre de résistance (**Stephanie, 2009**).

2.6. Mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques

2.6.1. Modification de l'antibiotique

Les bactéries modifient les antibiotiques pour les rendre inefficaces. Elles utilisent des enzymes pour détruire les antibiotiques ou ajoutent des groupes chimiques, réduisant ainsi leur affinité pour leurs cibles (**Aghababa & Nadi, 2021**). L'ajout de ces groupements chimiques ou la dégradation des molécules d'antibiotiques les rend incapables d'interagir avec leurs cibles permettant ainsi leur inactivation (**Munita et Arias, 2016**) (figure 2.2).

Deux exemples illustrent ce mécanisme :

- Les bêta-lactamases : enzymes clivant le noyau beta-lactame de la famille des bêta-lactamines (pénicillines et céphalosporines), retrouvées notamment chez de nombreuses bactéries telle que *E. coli* (**Munita et Arias, 2016**).
- Les enzymes modifiant les aminosides (AMEs) : enzymes modifiant les aminosides en ajoutant des groupes chimiques, réduisant ainsi leur efficacité (**Benveniste & Davies, 1973**).

2.6.2. Dégradation de l'antibiotique

L'un des mécanismes importants de résistance aux β -lactamines est leur inactivation enzymatique par des β -lactamases. Ces enzymes coupent la liaison amide du cycle β -lactame, causant l'inefficacité de l'antibiotique. Le tout premier cas signalé de résistance de ce type fut rapporté en 1940, avant même toute commercialisation de la pénicilline, lors de la découverte de la pénicillinase (**Abraham & Chain, 1940**). Après l'introduction massive de la pénicilline, les infections à *Staphylococcus aureus* résistants se sont multipliées rapidement, surtout à cause de la transmission de plasmides codant la pénicillinase entre souches (**Bush, 2013**). Afin de contourner bien cette résistance, de nouvelles β -lactamines à très large spectre comme l'ampicilline ont été développées. Cependant, dans les années 1960, un plasmide neuf avec une β -lactamase TEM-1 (selon le nom du malade « Temoneira ») fut trouvé chez des bactéries Gram négatif, qui hydrolyse l'ampicilline (**Paterson & Bonomo, 2005**). Depuis, l'apparition de quelques générations de β -lactamines a constamment été suivie par l'émergence rapide de certaines β -lactamases capables de les inactiver.

Aujourd'hui, on recense largement plus de 1000 β -lactamases. Ces enzymes sont classées dans deux grandes familles : Les β -lactamases à sérine, dont plusieurs sites actifs contiennent un résidu de sérine, et les métallo- β -lactamases, lesquelles nécessitent toujours un ion métallique (souvent Zn^{2+}) pour leur activité catalytique.

2.6.3. Modification enzymatique de la structure de l'antibiotique

La modification enzymatique des antibiotiques est un processus où des enzymes bactériennes altèrent la structure chimique de l'antibiotique, empêchant ainsi son interaction avec sa cible. Les enzymes les plus couramment impliquées sont les aminoglycoside-modifying enzymes (AGEs) ou enzymes modifiant les aminoside (AMEs), et les enzymes de modification des macrolides.

La plupart des antibiotiques affectés par ce mécanisme exercent leur effet en inhibant la synthèse protéique au niveau des ribosomes (**Wilson, 2014**), diverses réactions biochimiques sont catalysées par ces enzymes telles que l'acétylation, la phosphorylation, et la nucléotidation dont le but est de réduire l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, qui se traduit par l'augmentation de la CMI (**Munita et Arias, 2016**).

Les aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) inactivent les aminoglycosides par acétylation, phosphorylation ou adénylation, empêchant leur liaison aux ribosomes bactériens (**Ramirez & Tolmasky, 2010**). Ces enzymes, codées par des gènes situés sur des plasmides ou transposons, se propagent facilement entre bactéries par transfert horizontal. On distingue trois classes principales : les acétyltransférases (AAC), les phosphotransférases (APH) et les adényltransférases (ANT), réparties parmi diverses espèces bactériennes et ciblant des aminoglycosides spécifiques. Par exemple, les AAC(6'), majoritairement présentes chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, inactivent l'amikacine et la gentamicine via l'acétylation du groupe amine en position 6' (**Ramirez & Tolmasky, 2010**).

De manière similaire, les estérases et phosphotransférases modifiant les macrolides réduisent leur affinité pour le ribosome. L'enzyme EreA, par exemple, hydrolyse l'ester macrolide, neutralisant l'antibiotique (**Roberts et al., 1999**). Les gènes codant ces enzymes sont fréquemment associés à des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons, intégrons) favorisant leur dissémination horizontale entre espèces bactériennes, aggravant ainsi la propagation de la résistance (**Partridge et al., 2018**) (figure 2.2).

2.6.4. Diminution de la pénétration et de l'efflux d'antibiotiques

A. Diminution de la perméabilité membranaire

La diminution de perméabilité est bien un mécanisme de résistance bactérienne dans lequel les bactéries réduisent l'entrée même des antibiotiques, les empêchant ainsi d'atteindre toutes leurs cibles intracellulaires. Ce phénomène est assez fréquent chez les bactéries à Gram négatif, dont la membrane externe agit comme une première barrière contre les composés toxiques (**Munita & Arias, 2016**).

Les antibiotiques hydrophiles, tels que et comme les β -lactamines, les tétracyclines, ainsi que certaines fluoroquinolones, pénètrent via des canaux protéiques nommés porines. En altérant ces porines (par une modification du type exprimé, une diminution de leur expression, ou une

altération de leur structure/fonction) les bactéries réduisent l'entrée de ces molécules (Nikaido, 2003 ; Pagès et al., 2008).

Par exemple, dans tout isolat clinique de *Klebsiella pneumoniae*, une substitution de la porine OmpK35 par OmpK36, de plus petite taille, a été observée après exposition à des antibiotiques, limitant ainsi leur diffusion (Doménech-Sánchez et al., 2003 ; Hasdemir et al., 2004).

Ce mécanisme peut conduire vers une certaine résistance de faible niveau, mais lorsqu'il est associé avec d'autres facteurs comme les pompes à efflux ou les enzymes dégradantes, il peut entraîner des niveaux élevés de résistance (Aghababa & Nadi, 2021) (figure 2.2).

B. Les pompes à efflux

Un processus largement répandu dans le monde vivant permet aux cellules de maintenir leur homéostasie en expulsant activement les agents nocifs vers l'extérieur. Ce mécanisme repose sur des systèmes d'efflux, également appelés « pompes », qui ont été mis en évidence dans les années 1980 par S. Levy chez des souches d'*Escherichia coli* résistantes à la tétracycline. Depuis, de nombreux autres transporteurs ont été identifiés chez diverses bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Poole, 2005).

Certains de ces systèmes d'efflux sont naturellement présents chez les bactéries, tandis que d'autres sont acquis par transfert de matériel génétique via des éléments mobiles. Leur diversité est remarquable : ils peuvent être constitués d'une à trois protéines, utiliser soit l'énergie issue du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique, soit l'hydrolyse de l'ATP. De plus, leur spécificité varie : certaines pompes n'exportent qu'un nombre restreint d'antibiotiques apparentés (comme la tétracycline), tandis que d'autres expulsent une large gamme de molécules de structures différentes (figure 2.2).

La surexpression d'un système d'efflux actif entraîne généralement une augmentation modérée de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques ciblés, pouvant être multipliée par 2 à 16. Les niveaux de résistance les plus élevés sont observés chez les bactéries les moins perméables aux antibiotiques, comme *Pseudomonas aeruginosa* (Ziha-Zarifi et al., 1999).

Les pompes à efflux sont classées en cinq grandes familles :

- La superfamille facilitatrice majeure (MFS),
- La famille de petite résistance aux médicaments (SMR),
- La famille résistance-nodulation-division (RND),

- La famille des cassettes de liaison à l'ATP (ABC),
- La famille d'extrusion des médicaments et composés toxiques (MATE).

Ces familles se distinguent par leur structure, leur source d'énergie, les substrats qu'elles expulsent et les types de bactéries concernées (Aghababa & Nadi, 202).

2.6.5. Changements dans la cible de l'antibiotique

Pour se défendre contre les antibiotiques, certaines bactéries adoptent une stratégie qui vise à perturber l'interaction entre le médicament et sa cible. Elles y parviennent en mettant en œuvre divers mécanismes, notamment en protégeant ou en modifiant la cible, ce qui diminue l'efficacité de l'antibiotique en réduisant son affinité pour celle-ci (Munita et Arias, 2016).

A. Protection de la cible

La protection de la cible est un mécanisme de résistance bactérienne représenté par la protéine Qnr, codée par un gène plasmidique conférant une résistance aux fluoroquinolones. Découverte dans *Klebsiella pneumoniae* (Martínez-Martínez, Pascual, & Jacoby, 1998), Qnr, une protéine à répétitions pentapeptidiques, imite l'ADN et entre en compétition avec celui-ci pour se lier à la gyrase et à la topoisomérase IV. Cela réduit l'action des quinolones, qui ne peuvent plus stabiliser le complexe létal ADN-enzyme (Rodríguez-Martínez et al., 2011). Plusieurs variantes du gène qnr ont été identifiées (qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, qnrVC), partageant toutes un mécanisme similaire. Bien que la résistance conférée soit modérée, elle favorise la sélection de mutations dans les cibles enzymatiques, conduisant à une résistance plus élevée (Aldred et al., 2014) (figure 2.2).

Un autre exemple notable concerne les gènes tet(M) et tet(O), initialement identifiés chez *Streptococcus spp* et *Campylobacter jejuni*, et largement répandus grâce à leur localisation sur des plasmides et transposons conjugatifs (Connell et al., 2003). Les protéines Tet(M) et Tet(O), membres de la famille des GTPases, imitent les facteurs d'élongation et interagissent avec le ribosome pour déloger la tétracycline de son site de liaison. TetM modifie directement la structure du ribosome, tandis que TetO entre en compétition pour le site ribosomal, empêchant la fixation de l'antibiotique et rétablissant la synthèse protéique (Dönhöfer et al., 2012).

B. Modification de la cible

- **Mutation de la cible** : Un exemple emblématique de ce mécanisme est la résistance à la rifampicine, un dérivé de la rifamycine. Cet antibiotique agit en inhibant l'ARN polymérase ADN dépendante, empêchant ainsi la transcription bactérienne (Munita et Arias, 2016). Son site de liaison est une région hautement conservée située dans la sous-unité β de l'ARN polymérase, codée par le gène *rpoB*. Une fois la rifampicine fixée, elle bloque directement la progression de l'ARN naissant, interrompant ainsi la transcription (Campbell et al., 2001).

Ces mutations réduisent l'affinité de l'antibiotique pour sa cible tout en préservant l'activité catalytique de l'ARN polymérase, permettant ainsi à la transcription de se poursuivre (Floss et Yu, 2005).

- **Modification enzymatique de la cible** : Un cas classique de ce type de défense est la méthylation ribosomique, amorcée via une protéine codée par le gène *erm*. Cette enzyme est capable de mono- ou diméthylater tout résidu d'adénine situé en position A2058 du domaine V de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome. Ce changement biochimique obstrue la liaison forte des antibiotiques à leur cible, changeant ainsi leur action.

Les macrolides, lincosamides et streptogramines B (groupe MLS_B) partagent certains sites de liaison qui se chevauchent sur l'ARNr 23S. Ainsi, l'expression des gènes *erm* induit une résistance croisée envers tous les antibiotiques de ce groupe.

Jusqu'à présent, on a identifié au moins 30 variants du gène *erm*, or beaucoup d'entre eux sont localisés sur des EGM. Cela facilite leur transmission entre les bactéries (Leclercq, 2002 ; Weisblum, 1995 ; Munita & Arias, 2016).

C. Remplacement complet ou contournement de la cible

Le remplacement ou le contournement de la cible de l'antibiotique est un processus par lequel les bactéries modifient la cible de l'antibiotique ou empruntent des voies métaboliques alternatives pour échapper à son action. Parmi les exemples figurent la modification des protéines ribosomales, l'altération des enzymes responsables de la synthèse de la paroi cellulaire et l'adoption de voies métaboliques alternatives.

- **Modification des protéines ribosomales** : Les antibiotiques comme les macrolides et les tétracyclines ciblent les ribosomes bactériens. Les bactéries peuvent développer une résistance en modifiant les protéines ribosomales, empêchant ainsi la liaison de

l'antibiotique. Par exemple, la méthylation de l'ARN ribosomal 23S par l'enzyme Erm confère une résistance aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines (MLS_B) (Leclercq, 2002).

- **Altération des enzymes de synthèse de la paroi cellulaire** Les antibiotiques bêta-lactamines exercent leur action en ciblant les protéines de liaison à la pénicilline (PLP), essentielles à la synthèse de la paroi cellulaire. La résistance peut émerger par la production de PLP modifiées, comme la PLP2a de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), qui présente une affinité réduite pour les bêta-lactamines, rendant ces antibiotiques inefficaces (Lim & Strynadka, 2002). Par ailleurs, certaines bactéries développent des mécanismes de contournement métabolique. Celles résistantes aux sulfamides peuvent utiliser des précurseurs exogènes d'acide folique pour échapper à l'inhibition de sa synthèse (Sköld, 2000), ou encore surproduire la cible de l'antibiotique, comme observé dans le cas de la résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole (TMP-SMX) (Munita & Arias, 2016).

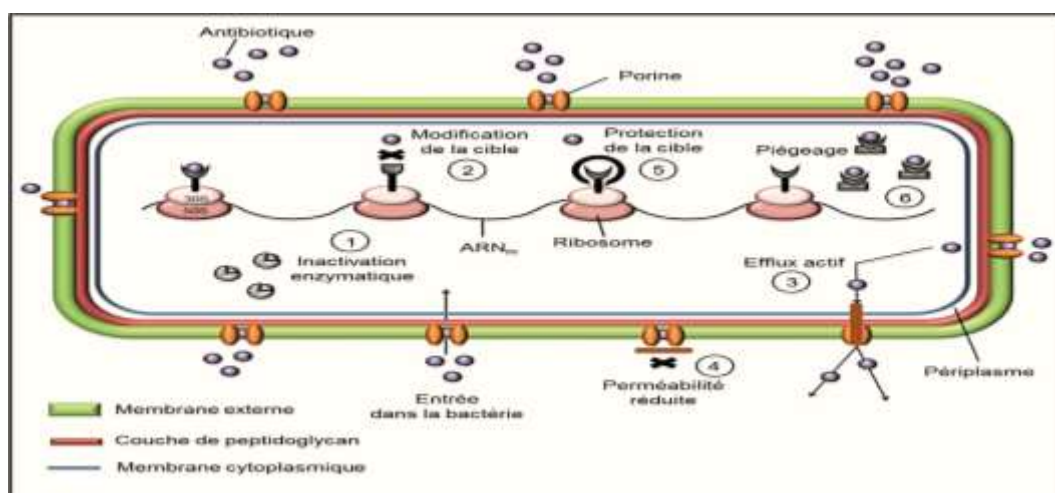


Figure 2.2 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative (Guardabassi et Courvalin., 2006). [1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique. ARNm : acide ribonucléique messager].

2.7. Les degrés de résistance

Les bactéries peuvent être classées selon leur degré de résistance (Tableau 1). Une bactérie est considérée comme multi-résistante (BMR) si elle est résistante à “au moins un antibiotique appartenant à trois classes différentes”. (INRS, s.d.) Par exemple, *E. coli* est résistante à l'amoxicilline (pénicilline), au co-trimoxazole (sulfamide) et à la ciprofloxacine (quinolone),

elle est donc dite BMR. Les degrés de résistance les plus élevés sont l'hyper-résistance et la pan-résistance, mais celles-ci sont encore rarement observées (**Magiorakos et al., 2012**) voir le tableau ci-dessous.

Tableau 2.1 : Degrés de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Degrés de résistance	Nombre de classes d'ATB usuellement utilisés pour une espèce à laquelle la bactérie est résistante
MDR "Multidrug-resistant" Multirésistant	Supérieur ou égale à 3 classes
XDR "Extensively drug-resistant" Ultra-résistant	Toutes les classes sauf 1 ou 2
PDR "pandrug-resistant" Pan-résistant	Toutes les classes

A noter que les BMR ne sont pas forcément plus virulentes que les bactéries dites « sauvages » (sans résistances acquises). Cependant, elles peuvent poser des problèmes thérapeutiques car les options de traitement disponibles sont souvent limitées à quelques substances, quelques voies d'administration (par exemple : uniquement par voie parentérale), et ont plus d'effets secondaires que les antibiotiques habituels.

2.8. Conséquences de la résistance aux antibiotiques

La résistance microbienne aux antibiotiques constitue une menace majeure pour la santé publique mondiale, avec des répercussions multiples et graves. Elle se traduit notamment par l'échec des traitements, prolongeant la durée des maladies et augmentant significativement le risque de mortalité, particulièrement chez les patients immunodéprimés (**Chinemerem Nwobodo et al., 2022 ; WHO, 2020**). Cette situation conduit également à des hospitalisations prolongées et à des coûts de santé accrus, du fait du recours à des antibiotiques de deuxième ou troisième ligne, souvent plus onéreux et parfois indisponibles dans les pays à faible revenu (**O'Neill J, 2016 ; World Bank, 2017**).

L'émergence de bactéries multirésistantes, comme les *entérobactéries* résistantes aux carbapénèmes ou le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), menace de rendre inefficaces les traitements actuels, faisant craindre un retour à l'ère pré-antibiotique (**CDC, 2019**). Cette situation compromet également les avancées de la médecine moderne,

notamment les interventions chirurgicales, les chimiothérapies et les transplantations, qui dépendent d'antibiotiques efficaces pour prévenir les infections (**Laxminarayan R., et al., 2013**).

Par ailleurs, l'utilisation excessive d'antibiotiques dans le secteur agricole contribue à la dissémination de bactéries résistantes dans la chaîne alimentaire, représentant ainsi un danger pour la sécurité alimentaire (**FAO, 2016**). L'inégale répartition de l'accès aux traitements accentue les disparités sanitaires, en particulier dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (**World Bank, 2017**).

Enfin, l'apparition de superbactéries telles que *Klebsiella pneumoniae* résistante aux carbapénèmes pourrait engendrer des pandémies comparables à la crise de la COVID-19, mais avec des options thérapeutiques limitées (**ECDC, 2021**). L'antibiorésistance est dès lors perçue comme une véritable crise mondiale, menaçant la médecine moderne, l'économie et la sécurité sanitaire. Une réponse coordonnée, incluant une surveillance accrue, une réduction de l'usage abusif des antibiotiques et le développement de nouveaux traitements, s'impose comme une nécessité urgente (**OMS, 2021 ; The Lancet, 2022**).

2.9. Les stratégies alternatives pour la lutte contre les bactéries multirésistantes

Selon l'Organisation mondiale de la santé, l'antibiorésistance constitue désormais l'une des menaces les plus significatives pour la santé à l'échelle mondiale. En réponse à cette crise sanitaire, la recherche s'oriente vers des alternatives naturelles, qui présentent l'avantage majeur de ne pas ou peu favoriser la résistance chez les bactéries pathogènes. Leur potentiel thérapeutique, qu'il soit utilisé seul ou en combinaison avec des antibiotiques traditionnels, ouvre des perspectives encourageantes pour contrer les mécanismes de résistance développés par les bactéries résistantes (**Cotter et al., 2013**).

Face à l'apparition de bactéries multi-résistantes (BMR), les chercheurs ont examiné différentes approches alternatives de contrôle telles que les bactériocines, les huiles essentielles (HE), les anticorps, les inhibiteurs de la communication quorum (QSI), la nanothérapie, les peptides antimicrobiens et la phagothérapie ont été mises en avant comme approches prometteuses.

2.9.1. Phagothérapie

Face à l'augmentation de la résistance bactérienne et à la rareté des nouveaux antibiotiques, la recherche de solutions thérapeutiques alternatives s'intensifie, et la phagothérapie apparaît

comme l'une des approches les plus prometteuses. Les bactériophages (ou phages), des virus capables d'infecter spécifiquement les bactéries, présentent un fort potentiel thérapeutique contre les pathogènes multirésistants (MDR), notamment grâce à leur spécificité d'action et leur capacité à provoquer la lyse cellulaire de l'hôte bactérien (**Dufour et Debarbieux, 2017**). Bien que cette thérapie ait été largement employée dans les années 1930, son utilisation a diminué avec l'essor des antibiotiques. En 2006, les phages ont obtenu le statut GRAS de la part de la FDA, bien que leur usage chez l'humain ne soit pas encore approuvé (**Cheng et al., 2017**).

Cependant, la recrudescence des pathogènes résistants et le ralentissement du développement d'antibiotiques ont ravivé l'intérêt pour la phagothérapie, plusieurs études démontrant son efficacité contre des agents pathogènes résistants (**Roberto et al., 2019**). À titre d'exemple, **Chadha et al. (2016)** ont mis en évidence l'efficacité d'un cocktail de phages encapsulé dans des liposomes pour traiter des infections causées par *Klebsiella pneumoniae*.

Rasool et al. (2016) ont bien mis en évidence l'activité lytique des phages contre le MRSA tant in vitro qu'in vivo, tandis que **Jennes et al. (2017)** ont réellement montré l'efficacité de la phagothérapie dans le traitement de la septicémie à *P. aeruginosa* résistante à la colistine chez un patient souffrant d'insuffisance rénale aiguë.

La phagothérapie des avantages comme des coûts réduits, une destruction bactérienne totale, une grande spécificité et la possibilité d'une dose unique. Elle peut toujours être utilisée seule ou combinée avec certains antibiotiques traditionnels pour améliorer leur efficacité (**Roberto et al., 2019**). Toutefois, des effets indésirables, notamment d'ordre immunologique, ont limité son utilisation. Dans le cas où ces effets peuvent être réduits, elle pourrait devenir une option encore plus prometteuse. Pour le moment, il vaut mieux éviter toute utilisation de phages entiers, car ils sont vite neutralisés par les bactéries résistantes ; il faut se concentrer sur la conception de quelques peptides dérivés des phages aptes à tuer les bactéries (**Lemaoui et al., 2017**).

2.9.2. Anticorps

Les anticorps constituent une alternative thérapeutique récente et prometteuse pour le traitement des maladies infectieuses, notamment celles causées par des agents pathogènes insensibles aux antibiotiques. Leur emploi représente une stratégie efficace contre certaines souches bactériennes multirésistantes (MDR), en raison de leur capacité à renforcer la

phagocytose et à activer le système du complément. Pour optimiser leur efficacité, l'utilisation combinée de différents isotypes, tels que les IgM, IgG et IgA, est recommandée. Cette approche a été validée par de nombreuses études, ce qui en fait une méthode reconnue dans le domaine (**Roberto et al., 2019**).

À titre d'exemple, **Rossmann et al. (2015)** ont démontré que l'IgGAM stimulait la destruction in vitro de nombreux isolats cliniques de *K. pneumoniae* grâce à l'amélioration de la phagocytose. **Giamarellos-Bourboulis et al. (2016)** ont prouvé aussi que l'IgGAM agissait comme adjuvant au traitement antimicrobien du choc septique induit par diverses bactéries gram-négatives MDR.

Les conjugués anticorps-antimicrobiens ont également bien montré toute leur efficacité contre toutes les souches MDR. **Lehar et al. (2015)** ont prouvé qu'un certain conjugué anticorps-antibiotique éliminait avec succès les *S. aureus* intracellulaires, surpassant ainsi toute la vancomycine dans le traitement de la bactériémie.

Les progrès dans la recherche et la biopharmaceutique ont permis le développement d'anticorps humanisés purifiés contre une variété d'agents pathogènes. Les anticorps monoclonaux sont presque toujours sûrs et peuvent compléter tous les traitements antibiotiques, toutefois l'identification des cibles moléculaires sur tous les agents pathogènes reste bien un défi (**Szijártó et al., 2015**).

2.9.3. Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAMs), produits naturellement par une grande diversité d'organismes, représentent une alternative thérapeutique prometteuse face à la montée de la résistance aux antibiotiques. Leur efficacité repose sur un large spectre d'activité, des propriétés bactéricides et une capacité à moduler la réponse immunitaire et l'inflammation. Leur mécanisme d'action implique des interactions électrostatiques et hydrophobes avec les membranes bactériennes, facilitant la destruction cellulaire. Certains PAMs possèdent également la capacité de pénétrer dans la cellule pour cibler des molécules intracellulaires essentielles, telles que les acides nucléiques ou des enzymes, perturbant ainsi les fonctions vitales bactériennes. Cette double action renforce leur potentiel en tant qu'agents thérapeutiques innovants (**Lemaoui et al., 2017**).

2.9.4. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par les ribosomes de nombreuses espèces bactériennes, et présentent une grande diversité de mécanismes d'action ainsi qu'un large spectre d'activité (**Snyder et al., 2014**). Celles produites par les bactéries lactiques, notamment, suscitent un vif intérêt en raison de leur non-toxicité et de leurs nombreuses applications industrielles, notamment dans l'agroalimentaire (**Kaur & Kaur, 2015**). Parmi elles, la nisine et les colicines sont particulièrement étudiées pour leur capacité à perturber l'intégrité des membranes bactériennes par la formation de pores, conduisant à la lyse cellulaire. Contrairement aux antibiotiques à large spectre, les bactériocines ciblent sélectivement certaines souches pathogènes tout en préservant le microbiote commensal, ce qui réduit les effets secondaires (**Cotter et al., 2013**).

Des études récentes ont mis en évidence leur efficacité contre plusieurs souches résistantes, telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA). **Okuda et al. (2013)** ont ainsi démontré l'action de trois bactériocines capables de déstabiliser les biofilms de MRSA via la formation de pores membranaires. Par ailleurs, la duracine 61A s'est révélée active contre *Clostridium difficile*, les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) et le MRSA, son efficacité étant amplifiée lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec la réutérine ou la vancomycine (**Vivas et al., 2019**). De même, **Phumisantiphong et al. (2017)** ont isolé une bactériocine d'*Enterococcus faecalis* démontrant une forte activité antibactérienne contre les VRE et les entérocoques multirésistants (MDRE).

Ces résultats soulignent le potentiel des bactériocines en tant qu'alternatives thérapeutiques prometteuses face à la résistance antimicrobienne, particulièrement en association avec des antibiotiques conventionnels. Grâce à leur stabilité, leur faible toxicité et leur résistance aux enzymes bactériennes, les bactériocines apparaissent comme des candidats thérapeutiques prometteurs, notamment lorsqu'elles sont produites par des espèces probiotiques comme *Lactobacillus* (**Cotter et al., 2013**). Néanmoins, leur usage clinique nécessite des recherches approfondies, notamment pour prévenir l'émergence de résistances et optimiser les voies d'administration. Des approches comme leur combinaison avec des antibiotiques ou leur application topique ou intranasale ont montré des résultats encourageants (**Vivas et al., 2019**).

2.9.5. Nanoparticules

Les nanomatériaux, dont la taille varie de 1 à 100 nm, possèdent des propriétés antibactériennes à large spectre. Les nanoparticules (NP) de ZnO inhibent *Staphylococcus aureus*, tandis que celles d'argent montrent une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**REHAB MA EL DESOUKEY et al., 2022 ; et Ramalingam et al., 2016**). Toutefois, leurs mécanismes exacts restent mal compris et leurs effets peuvent varier (**Rehab MA El-Desoukey et al., 2022**).

En microbiologie, les NP sont utilisées pour renforcer l'efficacité des antibiotiques face à la résistance bactérienne. Celles à base d'argent, d'oxyde de zinc, de cuivre et de fer présentent des activités antimicrobiennes contre divers pathogènes Gram-positifs et Gram-négatifs, tels que *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella spp* (**Franci et al., 2015 ; Marslin et al., 2015**). De plus, les NP contenant des fluoroquinolones, comme l'ofloxacine, améliorent la pénétration des antibiotiques, renforçant ainsi leur efficacité contre des souches résistantes, bien que cette approche reste principalement évaluée in vitro (**Lemaoui et al., 2017 ; Marslin et al., 2015**).

Par ailleurs, les Nanoparticules (NP) sont efficaces contre les biofilms bactériens, connus pour favoriser la résistance aux antibiotiques via des transferts de gènes et une matrice protectrice. Des revêtements nanostructurés, comme les polyuréthanes, inhibent l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms (*Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, etc.) (**Bharadwaj et al., 2022**).

2.9.6. Inhibiteurs de détection du quorum sensing (QSI)

Les inhibiteurs de détection du quorum sensing (QSI) représentent une approche émergente pour contrôler les agents pathogènes résistants aux médicaments (MDR). La détection dite du quorum sensing (QS) est un système de communication intercellulaire chez toutes les bactéries, leur permettant de mieux coordonner leur comportement en fonction de la densité cellulaire (**Brackman & Coenye, 2015**). À des concentrations assez hautes, ce système permet aux bactéries de modifier complètement leur profil de transcription, les rendant plus invasives en activant certains gènes associés à la tolérance aux antibiotiques et à la virulence (**Dickey et al., 2017**). Les QSI agissent en bloquant cette communication cellule-cellule, ralentissant de ce fait l'évolution de la maladie permettant au système immunitaire de mieux combattre l'infection, en réduisant la virulence sans tuer directement les bactéries (**Brackman & Coenye, 2015**).

Divers composés, comme les analogues de solonamide B et les peptides auto-inducteurs, ont été testés pour inhiber les systèmes QS comme AgrC et Pqs. Ils ont montré une réduction de la virulence sans effets néfastes significatifs sur les fonctions immunitaires (**Brackman & Coenye, 2015**). Par ailleurs, certains QSI issus de plantes ou de micro-organismes ont aussi montré des résultats prometteurs dans des modèles expérimentaux. Cependant, leur application en médecine clinique nécessite toujours des recherches supplémentaires, car ces composés pourraient interagir de façon défavorable avec certains facteurs de l'hôte (**Baldry et al., 2016**).

2.9.7. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des composés naturels dérivés de métabolites secondaires extraits de différentes parties des plantes, telles que les fleurs, les graines, les bourgeons, les brindilles, les feuilles, les écorces, les herbes et les racines. Elles jouent un rôle crucial dans la lutte contre les bactéries pathogènes qui présentent une résistance aux antibiotiques (**Bharawaj et al., 2022**). Elles sont produites par les plantes pour se protéger contre divers microorganismes pathogènes. En raison de leurs propriétés antimicrobiennes, elles ont été largement étudiées pour le traitement d'un large éventail d'infections microbiennes (**Alwan et al., 2016**). Elles peuvent inhiber les infections liées aux biofilms et renforcer l'efficacité des antibiotiques lorsqu'elles sont utilisées en combinaison (**Kot et al., 2018**). Bien que leur faible solubilité dans l'eau et leur volatilité limitent leur utilisation commerciale, des formulations en nanoémulsions et des vaporisateurs sont en cours de développement pour surmonter ces obstacles (**Ghaderi et al., 2017**).

Les HE présentent un large éventail d'actions inhibitrices contre divers pathogènes bactériens, en raison de leur capacité à pénétrer aisément dans la composante lipidique des membranes cellulaires bactériennes, ce qui entraîne la rupture de la structure de la paroi cellulaire. Cette altération de l'intégrité et du contenu cellulaire, résultant de l'interaction entre les huiles essentielles et les lipides, conduit à la mort cellulaire (**Bharawaj et al., 2022**).

Les éléments bioactifs présents dans différentes huiles essentielles jouent un rôle crucial et distinct. Par exemple, les huiles essentielles extraites de la cannelle et du poivre noir causent des dommages aux membranes cellulaires et inhibent la croissance d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* (**Bharawaj et al., 2022**).

Le développement d'une résistance aux HE pourrait s'avérer complexe, les HE n'ont pas été employées avec la même intensité que les antibiotiques, ce qui signifie qu'il n'existe pas, à

l'heure actuelle, de populations résistantes aux HE. Ainsi, afin de prévenir l'apparition de souches résistantes, l'utilisation optimale des HE dans la lutte contre les pathogènes multirésistants pourrait consister à les associer à d'autres agents antimicrobiens (**Roberto et al., 2019**).

L'association des HE avec des antibiotiques traditionnels présente des opportunités thérapeutiques particulièrement prometteuses. Le géranjol, principal constituant de l'huile essentielle de géranium, a prouvé sa capacité à accroître la perméabilité des membranes bactériennes, facilitant ainsi l'infiltration intracellulaire d'antibiotiques tels que la ciprofloxacine dans *Pseudomonas aeruginosa*. Par ailleurs, l'HE de tea tree a démontré son efficacité à inhiber les systèmes de pompes à efflux de *Staphylococcus epidermidis*, rétablissant ainsi sa sensibilité à la tétracycline. Des recherches in vitro ont révélé que l'association de l'huile essentielle de thym avec la vancomycine permettait de diminuer de 75 % la concentration minimale inhibitrice requise contre *Enterococcus faecium* résistant, illustrant le potentiel de ces combinaisons pour combattre les infections causées par des bactéries multirésistantes (**Hemaiswarya & Doble, 2013**).

Ces effets synergiques pourraient contribuer à réduire les doses d'antibiotiques administrées en milieu clinique, limitant ainsi les effets indésirables et la pression sélective qui favorise l'émergence de résistances.

Chapitre 3 :

Les huiles essentielles

3.1. Introduction

Ces dernières années, l'intérêt pour les composés naturels tels que les huiles essentielles (HE) s'est intensifié, en raison de leur efficacité thérapeutique, de leur richesse biochimique et de leur faible coût (**Barra, 2009**). Issues du métabolisme secondaire des plantes, les HE (ou huiles volatiles) regroupent les composés volatils responsables de l'identité chimique et fonctionnelle de la plante (**National Cancer Institute, 2012**). Stockées dans divers organes végétaux (fleurs, feuilles, racines, etc.), elles se présentent généralement sous forme liquide à température ambiante (**Barra, 2009**). Elles se caractérisent par une grande diversité d'activités biologiques, incluant des effets antibactériens, anti-inflammatoires, antioxydants, antiviraux, antifongiques, digestifs, sédatifs et parfois cytotoxiques (**Bakkali et al., 2008**). Ces propriétés sont liées à leur composition chimique complexe, riche en monoterpènes, sesquiterpènes, phénols, aldéhydes et esters (**Burt, 2004**).

Certaines HE, telles que celles d'origan espagnol, de thym (*Thymus vulgaris*), de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*), de sarriette (*Satureia montana*) et de girofle (*Eugenia caryophyllata*), présentent une activité antibactérienne marquée, tandis que d'autres comme celles de pin (*Pinus sylvestris*), de cajepout (*Melaleuca leucadendron*), d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), de lavande (*Lavandula officinalis*), de myrte (*Myrtus communis*) ou de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) montrent une efficacité plus modérée (**Kaloustian et al., 2008**). En outre, les HE apparaissent comme une alternative prometteuse contre les infections bactériennes associées aux biofilms et capsules, leur hydrophobicité leur permettant de perturber les structures protectrices bactériennes et d'augmenter la perméabilité cellulaire (**Jafri, Ansari, & Ahmad, 2019**).

3.2. Historique des huiles essentielles

Sur le plan historique, le terme « huile essentielle » fut introduit au XVI^e siècle par Paracelse von Hohenheim, qui désignait alors le principe actif d'un médicament sous l'appellation de « quinta essentia » (**Guenther & Althausen, 1949**). En 1937, le chimiste français Gattefossé, considéré comme le père de l'aromathérapie, publie *Aromatherapy, EOs, Plant Hormones* et y établit les premières corrélations entre structure chimique et activité biologique (**Gattefossé, 1937**). Le Dr. Valnet poursuit ces travaux en expérimentant les HE en chirurgie militaire, sur la base des recherches de Sévelinge, qui démontra dès 1929 leur pouvoir antibactérien en médecine vétérinaire (**Valnet et al., 1978**). Le premier congrès médical d'aromathérapie, tenu

à Paris en 1960 sous sa présidence, met l'accent sur les propriétés anti-infectieuses des HE. En 1973, Valnet introduit le concept d'« aromatogramme » (Valnet et al., 1978). Plus récemment, Pierre Franchomme enrichit le domaine avec la notion de chimiotype, tandis que l'utilisation de la chromatographie permet une caractérisation plus fine des composés et de leurs mécanismes d'action (Martins, 2020).

3.3. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des extraits végétaux concentrés, volatils et parfumés, composés principalement de terpènes et de leurs dérivés oxygénés. Elles sont obtenues à partir de plantes botaniquement définies, par des procédés tels que la distillation à vapeur, la distillation sèche ou d'autres méthodes mécaniques, sans chauffage, afin de préserver leur composition originale (Bonnaïfous, 2013). Volatiles, hydrophobes et non grasses, elles se dissolvent aisément dans les huiles végétales ou l'alcool (Kalemba et Kunicka, 2003).

Les HE peuvent être extraites de différentes parties de la plante (feuilles, fleurs, racines, écorce ou fruits) et sont stockées dans des structures spécialisées comme les trichomes glandulaires (Ugarte et al., 2019). Elles assurent des fonctions de défense, en protégeant les plantes contre les agents pathogènes et les herbivores, tout en attirant certains insectes pollinisateurs (Bakkali et al., 2008).

Grâce à leur composition chimique complexe, les HE trouvent des applications variées dans les domaines de la cosmétologie, de l'agroalimentaire, de l'agriculture, ainsi que dans les secteurs médical et pharmaceutique (Ugarte et al., 2019). Toutefois, en raison de cette complexité, leur usage thérapeutique demeure encadré, nécessitant davantage d'études pour évaluer leur innocuité et leur efficacité (Kalemba et Kunicka, 2003).

3.4. Caractéristiques des huiles essentielles

3.4.1. Propriétés physiques

De manière générale, les différentes propriétés et caractéristiques d'une huile essentielle peuvent être évaluées à l'aide de plusieurs indices, notamment le pouvoir rotatoire, la viscosité, la densité, la solubilité dans l'alcool, ainsi que les points d'ébullition et de congélation (Bruneton, 1999).

Les huiles essentielles se présentent généralement sous forme liquide à température ambiante, bien que certaines exceptions existent. Par exemple, l'huile essentielle de myrrhe est visqueuse, celle du bois de gaïac est pâteuse, tandis que celles de cèdre de Virginie (*Juniperus*

virginiana L.), d'anis, de fenouil, de menthe du Japon et parfois de rose (*Rosa x damascena* Mill.) peuvent être solides. L'huile essentielle de badiane (*Illicium verum* Hook. F.) peut quant à elle présenter un mélange de phases solide et liquide (Deschepper, 2017).

Ces huiles sont aromatiques, rarement colorées lorsqu'elles sont fraîches (Benkada, 1990), et leur densité est généralement inférieure à 1, avec une moyenne autour de 0,92 (Deschepper, 2017). Elles possèdent également un indice de réfraction élevé et, dans la majorité des cas, un pouvoir rotatoire. Volatiles, elles peuvent être entraînées par la vapeur d'eau, ce qui permet la diffusion de leur fragrance (Benkada, 1990).

Les HE possèdent une nature volatile, ce qui leur permet d'être facilement entraînées par la vapeur et de dégager des arômes puissants. Cette caractéristique les distingue des huiles végétales grasses, souvent qualifiées d'huiles « fixes ». Alors que ces dernières peuvent laisser des marques persistantes, les traces d'huiles essentielles ont tendance à s'estomper rapidement. La volatilité, qui dépend fortement de la composition chimique, fait que les monoterpènes, par exemple, sont beaucoup plus volatils que les sesquiterpènes (Deschepper, 2017).

Les essences sont principalement lipophiles, ce qui les rend généralement peu solubles dans l'eau. Cependant, certains de leurs composants, comme la verbénone du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), possèdent une certaine solubilité dans l'eau. D'autres composants, en revanche, sont très hydrosolubles et peuvent contribuer à la formation d'émulsions durant le processus de distillation. C'est le cas, par exemple, de l'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum verum* J.Presl). Leur solubilité est totale dans les huiles grasses, qui sont leurs solvants les plus efficaces, et elle est également très élevée dans les alcools à forte concentration et dans les solvants organiques (Deschepper, 2017).

Leurs couleurs varient, elles peuvent être incolores ou avoir des couleurs différentes allant du jaune pâle au vert émeraude, bleu au rouge brunâtre foncé selon l'huile (Bruneton, 1993), la plupart des huiles essentielles ont une couleur jaune presque imperceptible. Elles foncent au cours de leur vieillissement (oxydation). Dans certains cas extrêmes, les huiles essentielles vieilles et oxydées présentent un risque toxique important.

Les huiles essentielles sont très sensibles à l'oxydation et peuvent se polymériser, ce qui conduit à la formation de produits résineux. En raison de leur volatilité, elles perdent rapidement leurs propriétés lorsqu'elles sont exposées à la chaleur, à la lumière ou au soleil. Ce processus d'oxydation les amène à absorber de grandes quantités d'oxygène, entraînant des modifications de leur odeur, une augmentation de leur point d'ébullition et une diminution de

leur solubilité. Pour assurer leur conservation, il est conseillé de les stocker dans des flacons en verre coloré, bien scellés, à l'abri de l'air et de la lumière (Bruneton, 1999 ; Benkada, 1990).

3.4.2. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes et homogènes composés de nombreux constituants chimiques, généralement entre 20 et 60, dont deux ou trois composants majeurs représentent à eux seuls entre 20 à 70 % de la composition totale (Djilani et al., 2012 ; Khoddami et al., 2019). Ces principaux constituants sont responsables des propriétés biologiques des huiles et peuvent varier même au sein d'une même espèce végétale, donnant lieu à différents chémotypes (Kalemba et Kunicka, 2003). La composition chimique des huiles essentielles est influencée par plusieurs facteurs, notamment le stade de développement de la plante, la partie végétale utilisée, la période de récolte, ainsi que les conditions géographiques (Burt, 2004). L'analyse de ces compositions se fait principalement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), bien que la résonance magnétique nucléaire (RMN) puisse également être utilisée (Tomi et Casanova, 2006 ; Khoddami et al., 2018). Sur le plan biosynthétique, la majorité des composés retrouvés dans les huiles essentielles appartiennent à deux grandes familles : les terpènes et terpénoïdes, plus fréquents, et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, moins fréquents (Croteau et al., 2000 ; Kaloustian et al., 2012 ; Pichersky et al., 2006).

- **Les terpènes et les terpénoïdes :** Les terpènes constituent une vaste classe d'hydrocarbures dérivés de l'unité isoprénique (C_5H_8), à l'origine d'une grande diversité structurale et fonctionnelle (Bakkali et al., 2008 ; Chouhan et al., 2017). Ils remplissent diverses fonctions biologiques essentielles chez les plantes, notamment comme composés de défense, attractifs pour les pollinisateurs, ou encore comme constituants majeurs des huiles essentielles. La biosynthèse des terpènes s'effectue dans le cytoplasme via la voie du mévalonate, à partir de l'acétyl-CoA. Cette voie mène à la formation de l'isopentyl pyrophosphate (IPP), précurseur fondamental. L'assemblage séquentiel d'unités d'IPP génère le prényl diphosphate, à partir duquel les synthases terpènes construisent divers squelettes carbonés. Ces structures peuvent ensuite subir des modifications enzymatiques secondaires, telles que des réactions d'oxydoréduction, permettant de diversifier les composés obtenus et d'enrichir leurs propriétés bioactives (Caballero et Trugo, 2003).

Selon le nombre d'unités d'isoprène, les terpènes sont classés en plusieurs sous-catégories. Parmi ces groupes, les monoterpènes représentent la catégorie la plus

importante dans les huiles essentielles, avec plus de 900 molécules identifiées (Chouhan et al., 2017). Ces derniers se divisent en trois structures principales : acycliques, monocycliques et bicycliques. Ils peuvent constituer jusqu'à 90 % de la composition des HE.

On y retrouve plusieurs types de molécules fonctionnelles : Alcools (géraniol, citronellol, menthol, bornéol) ; Aldéhydes (citronnellal) ; Cétones (carvone, menthone, camphre) ; Esters (acétate de linalyle, acétate de menthyle) ; Éthers/oxydes (eucalyptol, oxyde de linalol) ; Phénols (thymol, carvacrol).

Les terpénoïdes, également appelés isoprénoïdes, correspondent à des terpènes ayant subi des modifications enzymatiques, telles que l'ajout d'atomes d'oxygène ou la suppression et le déplacement de groupes méthyle. Ces transformations leur confèrent des fonctions chimiques spécifiques et une grande diversité d'activités biologiques (Caballero et Trugo, 2003). Chez les plantes, les terpénoïdes sont classés parmi les métabolites secondaires. Ils participent activement aux mécanismes de défense contre les herbivores, contribuent à la résistance face aux agents pathogènes, et sont responsables de nombreuses propriétés olfactives et médicinales des extraits aromatiques.

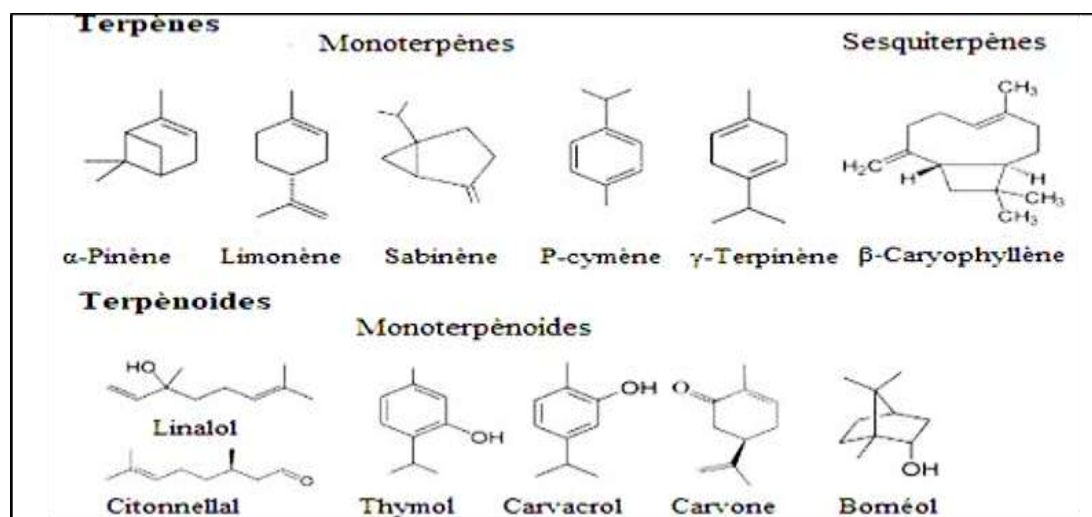


Figure 3.1: Structures chimiques des terpènes et terpénoïdes (Hyldgaard et al., 2012)

Phénylpropanoïdes : Les phénylpropanoïdes sont des composés issus de la phénylalanine, par la voie de l'acide shikimique (Maeda et Dudareva, 2012). Bien que présents en faible quantité dans les huiles essentielles (HE), des composés tels que le safrole, l'eugénol y jouent

un rôle organoleptique majeur, à l'image de l'eugénol dans l'odeur du clou de girofle (figure 3.2).

Les HE peuvent également contenir des produits de dégradation provenant d'acides gras insaturés, de lactones, de glycosides, ainsi que des composés soufrés et azotés (Hyldgaard et al., 2012). Moins fréquents que les dérivés terpéniques, les composés aromatiques tels que les phénols allyliques (Chouhan et al., 2017).

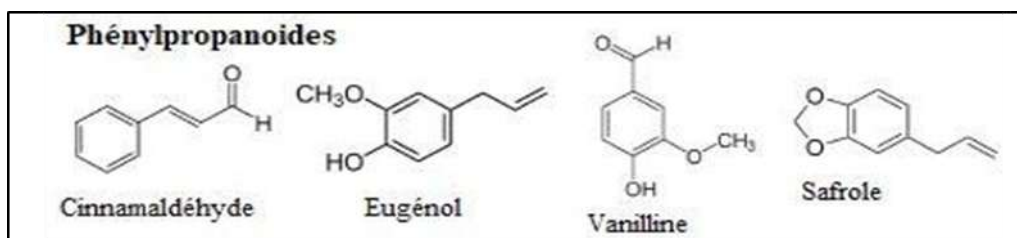


Figure 3.2 : Structures chimiques des phénylpropanoïdes (Hyldgaard et al., 2012).

3.5. Critères de qualité des huiles essentielles

Le label HEBBD (Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie) se distingue comme l'un des premiers labels de qualité pour les huiles essentielles, validé par l'Institut de Normalisation de l'Aromathérapie Scientifique. D'après Bonnafous (2013), ce label atteste de plusieurs critères essentiels :

- L'identification précise de l'espèce botanique (nom latin, genre, espèce, variété, chémotype).
- L'organe de la plante à partir duquel l'essence est extraite (diverses parties de la plante peuvent produire des huiles essentielles aux compositions distinctes).
- L'origine géographique de la plante.
- Le mode de culture (sauvage ou biologique) ainsi que le moment de la récolte (par exemple, le thym récolté en après-midi).
- L'analyse de l'huile essentielle réalisée selon des méthodes de référence.
- Le procédé de fabrication (distillation ou pression à froid ; l'huile doit être brute, vierge et non altérée).

La composition des HE peut fluctuer en fonction des phases de croissance et de floraison de la plante, la production étant généralement optimale durant la période de floraison (Jordán et al., 2006 ; Martins, 2020). De plus, la qualité des huiles essentielles est influencée par la

méthode d'extraction, ce qui affecte leur composition et leurs propriétés. Afin d'assurer leur authenticité et leur efficacité, des contrôles sont réalisés sur les caractéristiques organoleptiques, les mesures physiques et les analyses chimiques (**Bonnafous, 2013**).

3.6. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de molécules dont la structure et les propriétés chimiques engendrent des caractéristiques communes, telles que la lipophilie et un faible poids moléculaire, favorisant ainsi leur diffusion dans l'organisme. Bien que les recherches sur ces molécules soient limitées, il est essentiel de souligner leur potentiel toxique, notamment en ce qui concerne leur hépatotoxicité, neurotoxicité et toxicité cutanée récemment observées. Leur large éventail d'applications présente un risque significatif d'intoxication, qu'elle soit accidentelle ou due à une utilisation inappropriée. Les signes cliniques identifiés à partir des cas cliniques sont peu spécifiques à ces intoxications, rendant le diagnostic différentiel difficile pour les cliniciens. Le traitement demeure symptomatique, mais l'espoir existe qu'il devienne un jour plus ciblé et efficace. Il est crucial de rester vigilant et de remettre en question l'idée selon laquelle tout produit « naturel » est nécessairement bénéfique et exempt de toxicité (**Lucette, 2001**).

3.7. Techniques d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des HE est un processus délicat visant à préserver les composés volatils et sensibles des plantes. La volatilité naturelle des essences florales complique leur récolte, car les molécules odorantes se dissipent dès que la cuticule des poches épidermiques est rompue. Les HE extraites peuvent différer de celles produites naturellement, notamment à cause de la chaleur et des interactions avec l'eau lors de l'extraction. Seules celles obtenues par pression à froid sont considérées comme l'essence véritable de la plante (**Gipsy Dauge, 2024**).

Différentes techniques d'extraction sont possibles, le choix dépendant de la nature de la plante, des propriétés de l'essence, de son usage final et de son profil aromatique. Quelle que soit la méthode, l'extraction suit deux étapes : la libération des molécules aromatiques, puis leur isolement par distillation (**Lucchesi, 2005**).

3.7.1. Extraction par distillation et ses variantes

Le processus de distillation repose sur la capacité des huiles essentielles à devenir volatiles lorsqu'elles sont chauffées, permettant ainsi à l'huile d'être entraînée par la vapeur d'eau. Une fois la vapeur condensée, l'huile se sépare du distillat par un processus de décantation

(Boukhatem et al, 2019). On distingue principalement deux méthodes de distillation : l'hydrodistillation et la distillation à la vapeur d'eau.

- **Hydrodistillation** : Introduite par Garnier en 1891, elle repose sur le principe de la distillation hétérogène. Elle consiste à immerger la matière végétale dans de l'eau portée à ébullition, provoquant la rupture des cellules et la libération des composés aromatiques. Ces derniers sont ensuite entraînés par la vapeur, puis condensés et séparés par différence de densité (Bruneton, 1993) (figure 3.3). Toutefois, cette technique présente certaines limites : les organes fragiles comme les fleurs peuvent être altérés par la chaleur, et le contact direct avec l'eau peut induire des modifications chimiques des composés extraits. De plus, la durée et l'intensité du chauffage influencent négativement le rendement et la qualité de l'huile essentielle (Boukhatem et al., 2019).

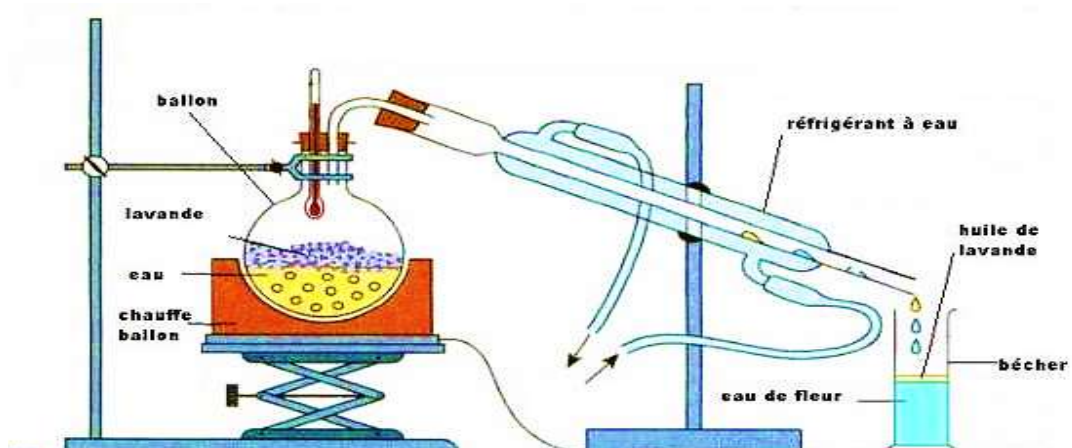


Figure 3.3 : Schéma et principe d'hydrodistillation

Distillation à la vapeur : Il s'agit d'une méthode de distillation par entraînement à la vapeur, distincte de l'hydrodistillation, dans laquelle la vapeur ne touche pas directement la matière végétale. La vapeur, produite par une chaudière et introduite sous une grille perforée, provoque la lyse cellulaire et la libération des composés volatils formant l'huile essentielle (Boukhatem et al., 2019). Ce mélange vapeur-huile est ensuite condensé et dirigé vers un essencier, où il est séparé en deux phases : l'hydrolat et l'huile essentielle, par différence de densité et de polarité. L'absence de contact direct avec l'eau liquide réduit les risques d'hydrolyse ou de dégradation thermique, assurant une meilleure qualité et pureté des extraits (Meyer-Warnod, 1984) .

Une variante, l'hydrodiffusion, consiste à injecter de la vapeur à basse pression de haut en bas à travers la plante. Cette technique, plus rapide et économe en énergie, permet un meilleur rendement et une composition chimique distincte des extraits (Boukhatem et al., 2019).

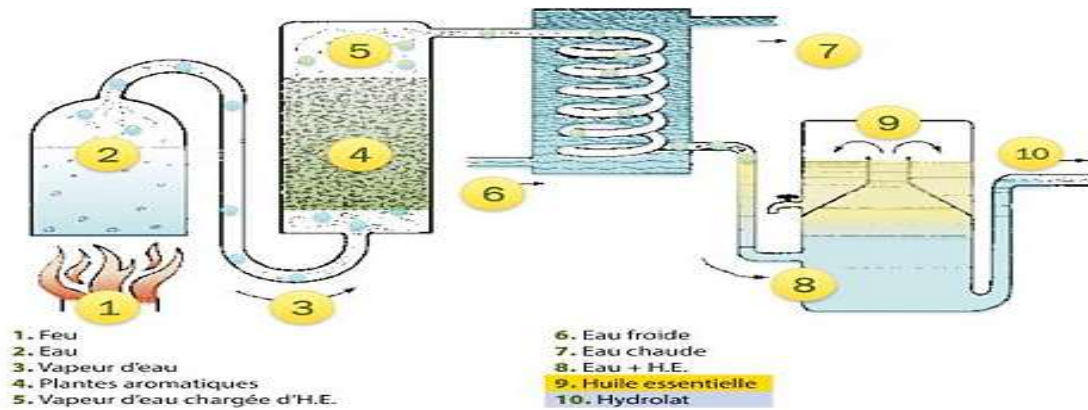


Figure 3.4: Distillation d'eau et de vapeur (Akdağ & Öztürk, 2019).

3.7.2. Extraction par solvant organique

L'extraction par solvant repose sur l'utilisation de solvants organiques, comme l'hexane, capables de dissoudre sélectivement les composés aromatiques des plantes (Mahmoudi et al., 2013). Le processus permet d'obtenir une « concrète », ensuite purifiée à l'alcool pour produire une « absolue » (Phakawat et Benjakul, 2014 ; Hesham et al., 2016). Réalisée à basse température, cette méthode préserve les composés thermosensibles et offre un bon rendement. Toutefois, elle présente des limites, notamment le risque de résidus de solvants, un coût élevé et un procédé long (Faborode et Favier, 1996 ; Li et al., 2009). Des techniques modernes, comme l'extraction assistée par micro-ondes, permettent d'en améliorer l'efficacité tout en réduisant l'usage de solvants (El Asbahani et al., 2015).

3.7.3. Expression à froid

Les huiles essentielles dérivées des fruits d'hespéridés, ou agrumes, sont considérées comme des produits délicats en raison de leur composition riche en terpènes et aldéhydes. C'est pour cette raison que l'expression "extraction à froid" est spécifiquement employée pour cette catégorie de matières premières. Cette technique repose sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères situés dans l'écorce des fruits, ainsi que sur la pression exercée par le contenu de ces sacs (Lucchesi, 2005). Ce procédé produit une essence plutôt qu'une huile essentielle, car aucun solvant ni vapeur n'est utilisé. L'essence est libérée par un courant d'eau, puis séparée par décantation (Bonnafous, 2013).

3.7.4. Extraction par fluide supercritique (SFE)

L'extraction par fluide supercritique (SFE) repose sur l'utilisation de solvants portés à un état supercritique, obtenu en dépassant un seuil critique de température et de pression. Dans cet état, le solvant présente des propriétés intermédiaires entre liquide et gaz, notamment une densité élevée, une faible viscosité, une diffusivité accrue et un fort pouvoir solvant. Le dioxyde de carbone (CO_2) est le solvant le plus utilisé pour ce type d'extraction en raison de ses conditions critiques modérées, de sa pureté, de son faible coût, ainsi que de sa non-toxicité, son inertie chimique et sa facilité d'élimination. Toutefois, sa faible polarité limite son efficacité pour l'extraction de composés polaires, et la méthode présente un coût élevé en termes d'équipement, d'installation et de maintenance (**Rassem et al., 2016**). Le procédé s'appuie sur la solubilité des composés dans le CO_2 et l'évolution de son état physique : le CO_2 est d'abord liquéfié, comprimé à la pression d'extraction, puis injecté dans l'extracteur contenant le végétal ; après extraction, il se détend en phase gazeuse et est dirigé vers un séparateur où sont isolés l'extract et le solvant (**Benayad, 2008**). Méthode qualifiée de « verte », la SFE requiert peu ou pas de solvants organiques, se montre plus rapide que les techniques classiques, et permet d'obtenir des huiles essentielles dont la composition chimique peut différer qualitativement et quantitativement de celles issues de l'hydrodistillation (**Boukhatem et al., 2019**) (figure 3.5).

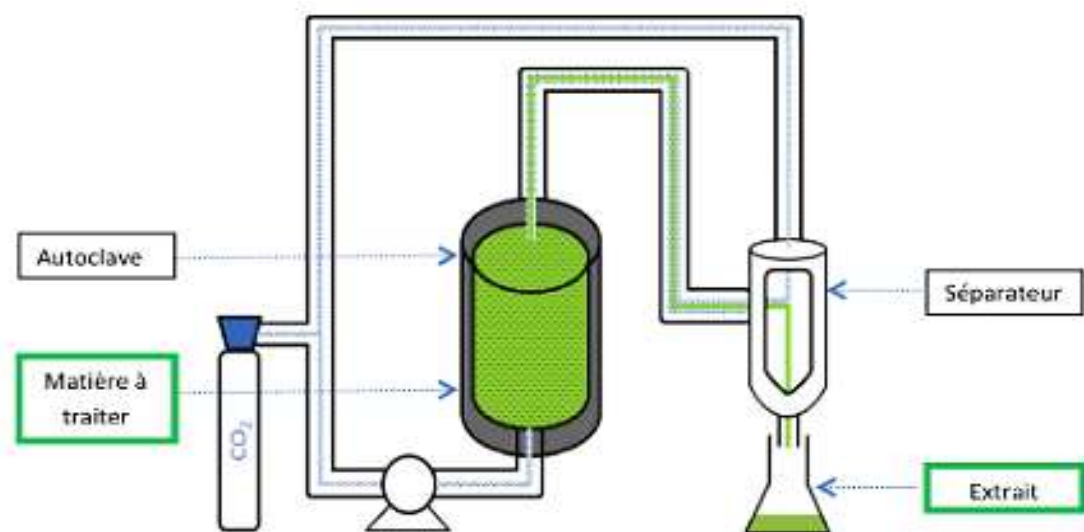


Figure 3.5 : Extraction par fluide supercritique.

3.7.5. Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes, ondes électromagnétiques dont les fréquences s'étendent de 300 MHz à 30 GHz (longueurs d'onde de 1 mm à 1 m), sont généralement utilisées à 2450 MHz pour les applications d'extraction (El Asbahani et al., 2015). Dans le contexte des procédés verts et à faible consommation énergétique, l'extraction assistée par micro-ondes s'est imposée comme une méthode efficace pour l'obtention des huiles essentielles, permettant une réduction significative du temps d'extraction et une amélioration des rendements, tout en consommant moins d'énergie (Benameur et al., 2015). Plusieurs variantes existent, notamment l'extraction sans solvant par micro-ondes (SFME), la distillation à la vapeur assistée par micro-ondes et l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (Lucchesi et al., 2004 ; Sahraoui et al., 2008). Parmi elles, la SFME se distingue par l'absence de solvant, réduisant ainsi l'impact environnemental tout en optimisant l'efficacité du procédé. Elle repose sur un chauffage direct du végétal dans un réacteur micro-ondes, provoquant l'éclatement des glandes oléifères et la libération des huiles essentielles. Comparée à l'hydrodistillation traditionnelle, la SFME est environ neuf fois plus rapide, moins énergivore, et génère moins d'émissions de CO₂. Les huiles obtenues présentent une proportion plus élevée de composés oxygénés et des profils olfactifs plus intenses, bien que leur teneur en monoterpènes soit moindre (Boukhatem et al., 2019) (figure 3.6).

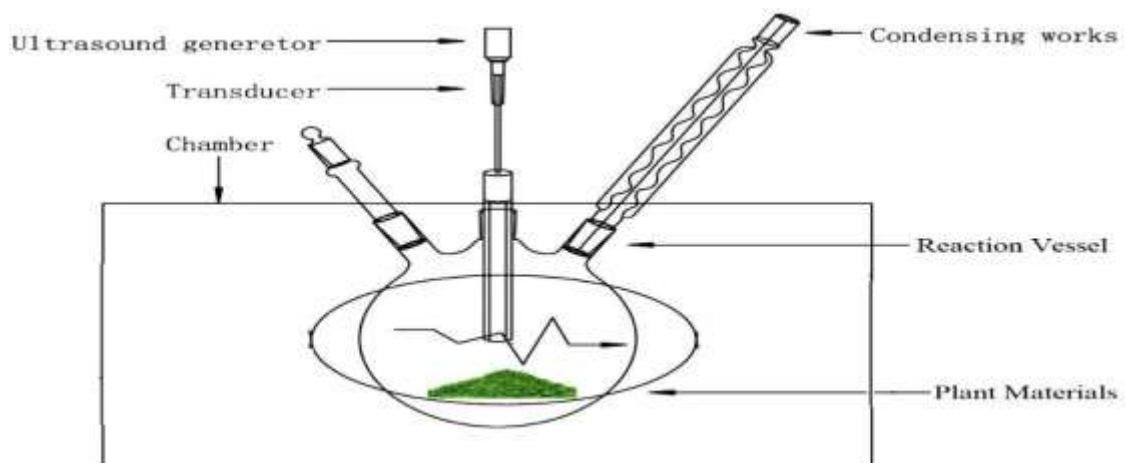


Figure 3.6 : Extraction assistée par ultrasons (UAE) (Sahoo et Banik, 2023).

3.7.6. Extraction assistée par ultrasons

Conçu dans les années 1950 pour des applications en laboratoire, l'extraction assistée par ultrasons (UAE) consiste à plonger des matériaux végétaux dans de l'eau ou un autre solvant, tout en appliquant des ondes ultrasonores à des fréquences variant de 20 kHz à 1 MHz. Ces

ondes génèrent des vibrations mécaniques au niveau des parois et membranes cellulaires, facilitant ainsi la libération rapide des gouttelettes d'huile essentielle. Le procédé repose sur deux phénomènes principaux : la diffusion à travers la paroi cellulaire et le lavage du contenu cellulaire une fois que la paroi est altérée. Après l'extraction, le solvant est évaporé sous vide. L'UAE est particulièrement efficace pour l'extraction des huiles essentielles de différentes sources, notamment les graines, en optimisant l'efficacité, en abaissant la température d'extraction et en offrant une plus grande variété de solvants. De plus, l'équipement nécessaire est relativement simple et moins coûteux que celui utilisé pour l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) (El Asbahani et al., 2015; Khan et al., 2010) (figure 3.7)

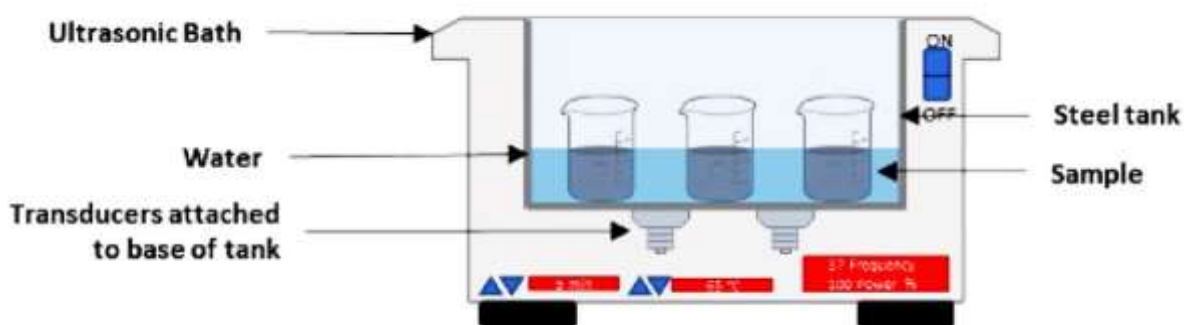


Figure 3.7: Extraction assistée par ultrasons.

Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) sont reconnues pour leurs diverses activités biologiques, notamment antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires et antioxydantes. Ces propriétés sont bien connues depuis l'Antiquité et sont liées à la composition chimique des HEs et aux effets synergiques entre leurs composants (tableau 3.3).

3.8. Activité antifongique

Les HEs ont montré des effets fongicides et fongistatiques contre divers champignons pathogènes. Ces effets sont dus à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique des cellules fongiques, suivie de leur rupture, entraînant ainsi la fuite du contenu cytoplasmique et la mort cellulaire (Cox et al., 2000 ; Giordani et Kaloustian, 2006). Par exemple, le carvacrol, composé majeur de *Thymus capitatus*, a montré un effet fongitoxique contre *Penicillium digitatum* (Arras et Usai, 2001).

3.8.1. Activité anti-inflammatoire

Les aldéhydes présents dans plusieurs HEs, comme celles de clou de girofle, sont bien connus pour leur capacité à combattre l'inflammation et calmer les douleurs, par exemple dans les douleurs dentaires (**Zahalika, 2010**).

3.8.2. Activité antioxydante

Les HEs présentent d'excellentes propriétés antioxydantes grâce à la présence de composés phénoliques tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol, qui sont parmi les molécules les plus actives dans cette fonction. Ces composés sont capables de protéger les cellules humaines contre le stress oxydatif, un phénomène dû à diverses agressions physiques et chimiques (**Gabriel et al., 2013**).

3.8.3. Activité antivirale et autres

Les HEs sont également efficaces contre certains virus et peuvent traiter des infections virales ainsi que des troubles respiratoires (**Banayad, 2008**). Leur action repose sur des mécanismes ciblés qui affectent la membrane cellulaire et l'expression génétique, permettant de lutter contre des pathologies diverses (**Valnet, 2005**).

3.8.4. Activité antibactérienne des HEs

Les huiles essentielles (HEs) possèdent une activité antimicrobienne reconnue contre un large éventail de micro-organismes, incluant bactéries, virus et champignons, ce qui les rend utiles dans divers domaines, notamment médicaux et phytosanitaires. Leur efficacité dépend principalement de leur composition chimique, en particulier de la nature de leurs composés volatils tels que les terpènes et les phénols (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Oussou et al., 2009**).

Leurs mécanismes d'action sont multiples et incluent des effets sur la perméabilité membranaire, l'acidification intracellulaire et la dégradation du matériel génétique, entraînant ainsi la mort bactérienne. Grâce à leur structure lipophile, les HEs pénètrent les membranes cellulaires, perturbant leur intégrité, inhibant la production d'énergie et de composants structuraux essentiels (**Valnet, 2005 ; Bouyahya et al., 2017**). Certaines HEs, comme celles de *Mentha piperita*, *Coriandrum sativum* et *Pimpinella anisum*, se sont révélées actives contre des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* et à Gram négatif comme *Escherichia coli* (**Bazargani et Rohloff, 2016**).

Cette activité antibactérienne varie selon les souches. Certaines HEs se sont montrées efficaces contre des bactéries multirésistantes, telles que les souches d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3e génération et les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) (Oussou, 2009). Cette efficacité est notamment attribuée à la présence de composés bioactifs tels que le carvacrol, l'eugénol et le thymol, qui perturbent la membrane cellulaire et inhibent la production d'ATP, indispensable à la survie bactérienne (Martins, 2020).

Par ailleurs, les HEs présentent des effets synergiques, issus de l'interaction entre leurs différents composants, renforçant ainsi leur action antimicrobienne. L'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* a ainsi démontré une activité prometteuse contre des souches hospitalières de *Staphylococcus* (Oliveira et al., 2019), et une efficacité notable contre des bactéries responsables de la détérioration des aliments, telles que *Leuconostoc citreum*, soulignant son potentiel dans l'industrie agroalimentaire (Suppakul et al., 2008 ; Lee et al., 2020).

3.8.5. Action sur la membrane cellulaire bactérienne

Les huiles essentielles interagissent avec la membrane des cellules bactériennes grâce à leur caractère lipophile, ce qui leur permet de traverser la bicouche phospholipidique. Cette interaction perturbe la structure de la membrane, entravant le transport des nutriments, dépolarisant les membranes mitochondriales et affectant le fonctionnement des canaux ioniques. La fluidité de la membrane est également altérée, entraînant des fuites de composants intracellulaires. Ces effets combinés provoquent la mort de la cellule, par apoptose ou nécrose (Hajlaoui et al., 2010).

Les huiles essentielles peuvent également inhiber la sécrétion de toxines. Par exemple, le carvacrol réduit la production de toxines diarrhéiques chez *Bacillus cereus*, tandis que l'origan inhibe les entérotoxines produites par *Staphylococcus aureus*. Par ailleurs, leurs effets varient selon le type de bactérie : les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles, en raison de la présence d'acide lipoteichoïque qui facilite la pénétration des huiles essentielles. En revanche, les bactéries à Gram négatif se montrent plus résistantes, car leur membrane externe, enrichie en lipopolysaccharides (LPS), freine la diffusion des composés hydrophobes (Martins, 2020).

3.8.6. Action sur la morphologie cellulaire

L'efficacité des huiles essentielles dépend aussi de la morphologie bactérienne : les bacilles, tels que *E. coli* et *S. typhimurium*, sont plus sensibles que les cocci, comme *M. luteus* et *S. aureus*. Après traitement à l'huile essentielle de menthe, des altérations cellulaires marquées ont été observées chez les bacilles, suggérant un détachement de l'exopolysaccharide ou une perturbation du peptidoglycane et de la membrane cytoplasmique (**Hajlaoui et al., 2010**).

Les monoterpènes lipophiles, tels que ceux présents dans l'huile d'arbre à thé, perturbent la membrane bactérienne en modifiant sa fluidité et inhibant certaines enzymes, provoquant une coagulation du cytoplasme (**Sikkema et al., 1995**). De même, l'huile d'origan (riche en carvacrol et thymol) induit des effondrements cellulaires et des perforations membranaires, similaires aux effets des peptides antimicrobiens. Le carvacrol pourrait également interférer avec les protéines de division cellulaire, comme l'ont montré des analyses sur *Salmonella* exposées au thymol (**Kwon et al., 2017**).

3.8.7. Action sur les acides gras membranaires

Les huiles essentielles modifient la composition en acides gras des membranes bactériennes en perturbant la biosynthèse lipidique, notamment celle des acides gras insaturés, essentiels à la fluidité membranaire. Même à faibles concentrations, des composés comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol réduisent les acides gras insaturés C18 au profit des acides gras saturés (C16, C18), altérant la structure membranaire. En augmentant la perméabilité, elles dispersent les enzymes désaturases sans activer la cis-trans isomérase, normalement induite en cas de stress. Il en résulte une accumulation d'isomères cis, une hausse des chaînes courtes et une rigidification de la membrane, conduisant à sa lyse (**Martins, 2020**).

3.8.8. Action sur les protéines

Les huiles essentielles peuvent également perturber les protéines bactériennes, en particulier celles impliquées dans la division cellulaire. Le thymol, par exemple, inhibe l'assemblage de FtsZ, une protéine clé dans le processus de division bactérienne. En présence de thymol, *Salmonella enterica* présente un profil protéomique modifié, avec une régulation à la hausse ou à la baisse de nombreuses protéines. La thioredoxine-1, essentielle chez *Escherichia coli*, n'est plus exprimée, tandis que des protéines chaperonnes sont surexprimées afin d'aider la bactérie à faire face aux conditions stressantes. Le thymol induit également une surexpression de certaines protéines membranaires, telles que TolC, impliquée dans la résistance bactérienne (**Martins, 2020**). Les HEs provoquent également l'acidification du cytoplasme, ce qui

entraîne la dénaturation des protéines et la coagulation du contenu cellulaire. Cela bloque la synthèse des structures cellulaires essentielles et la production d'énergie (Ultee et al., 2002 ; Carson et al., 2002).

3.8.9. Action contre l'ATP bactérien

Les huiles essentielles affectent la production d'ATP chez les bactéries en perturbant la membrane cellulaire et la glycolyse. Ce déséquilibre entre l'ATP à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule perturbe la croissance bactérienne. Des composés comme l'eugénol et le carvacrol inhibent la production d'ATP et peuvent également interférer avec l'activité de l'ATPase, probablement en modifiant la structure des protéines membranaires. Cela entraîne une baisse de l'énergie cellulaire, ce qui ralentit la croissance bactérienne (Imelouane et al., 2009).

3.8.10. Altération du matériel génétique

Certains composants des HEs sont capables de détruire le matériel génétique bactérien, causant ainsi l'arrêt de la réplication et la mort de la cellule (Lambert et al., 2001).

- **Inhibition des enzymes clé :** Le cinnamaldéhyde inhibe les décarboxylases d'acides aminés chez *Enterobacter aerogenes*, et diminue l'activité de la β -galactosidase par un mécanisme d'inhibition compétitive (Wendakoon et Sakaguchi, 1995 ; Wang et al., 2016).
- **Réduction de la virulence bactérienne :** Certaines HEs, comme celles de périlla, le thymol ou l'eugénol, réduisent la production de toxines staphylococciques (*S. aureus*) et inhibent l'adhérence cellulaire ou l'hémolyse (Qiu et al., 2010, 2011 ; Ferro et al., 2016). De plus, l'huile essentielle d'*Eucalyptus grandis* a montré une inhibition des pompes à efflux impliquées dans la résistance bactérienne (Soyingbe et al., 2015 ; Gibbons, 2008).
- **Action contre le quorum sensing :** Les huiles essentielles peuvent inhiber le QS en interférant avec les molécules de signalisation bactérienne. Cela pourrait jouer un rôle crucial dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques, en empêchant la formation de biofilms et en réduisant ainsi la capacité des bactéries à se protéger contre les traitements (Szabó et al., 2010; Trosko, 2016).
- **Vitesse d'action des composants :** Selon Friedman et al. (2004), les HEs peuvent être classées selon la rapidité de leur action. Les composés à action rapide, comme le carvacrol, le cinnamaldéhyde et le géraniol, peuvent inactiver des pathogènes comme

E. coli et *Salmonella* en cinq minutes, tandis que d'autres nécessitent jusqu'à 60 minutes.

Tableau 3.1 : Composants majoritaires de certaines huiles essentielles

Composé d'HE	Mode d'action	Références
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
<i>p</i>-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
γ-terpinene	Déstabilisation de la membrane	Oyedemi <i>et al.</i>, 2009

3.9. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité biologique est cruciale non seulement pour établir la sensibilité aux antibiotiques, mais également pour le criblage de nouveaux agents antimicrobiens (**ESCMID, 2000**). Les produits naturels, qu'ils soient des composés isolés ou des extraits de plantes standardisés, présentent des possibilités infinies pour le développement de nouveaux additifs et traitements médicaux, grâce à leur diversité chimique sans pareille (**Cos et al., 2006 ; Klancnik et al., 2010**). Actuellement, plusieurs techniques sont disponibles pour évaluer leur activité antimicrobienne. Étant donné que ces méthodes ne reposent pas toutes sur des

principes identiques, les résultats peuvent varier en fonction de la méthode employée, des micro-organismes testés, de la technique d'extraction utilisée, ainsi que du degré de solubilité de chaque composé examiné (Klancnik et al., 2010). Actuellement, l'activité antimicrobienne in vitro d'une substance peut être démontrée à l'aide de diverses techniques classiques, tant en milieu solide qu'en milieu liquide (Rhayour, 2002). Parmi les méthodes les plus fréquemment employées pour évaluer l'activité antimicrobienne des HES, on trouve la méthode de diffusion dans l'Agar et la méthode de dilution (Maleky, 2010).

3.9.1. Techniques en milieu solide

- **La méthode de Morel et Rochaix :** Cette technique consiste à mesurer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles en les dissolvant dans de l'alcool à diverses concentrations. Chaque concentration est ensuite intégrée dans un milieu gélosé, qui estensemencé et versé dans des boîtes de Pétri. L'alcool jouerait un rôle clé en facilitant la diffusion de l'essence dans le milieu (Beylier-Maurel, 1976).
- **La méthode de micro-atmosphère :** Il s'agit d'une approche d'investigation en phase vapeur. Elle s'articule autour de l'ensemencement d'une boîte de Pétri avec des germes de test, tandis que quelques gouttes d'huile essentielle sont appliquées sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée à l'envers, ce qui entraîne l'évaporation des substances volatiles. À l'issue de l'incubation, il est possible d'évaluer la croissance des germes ou leur inhibition (Beylier-Maurel, 1976) voir la figure ci-dessous.

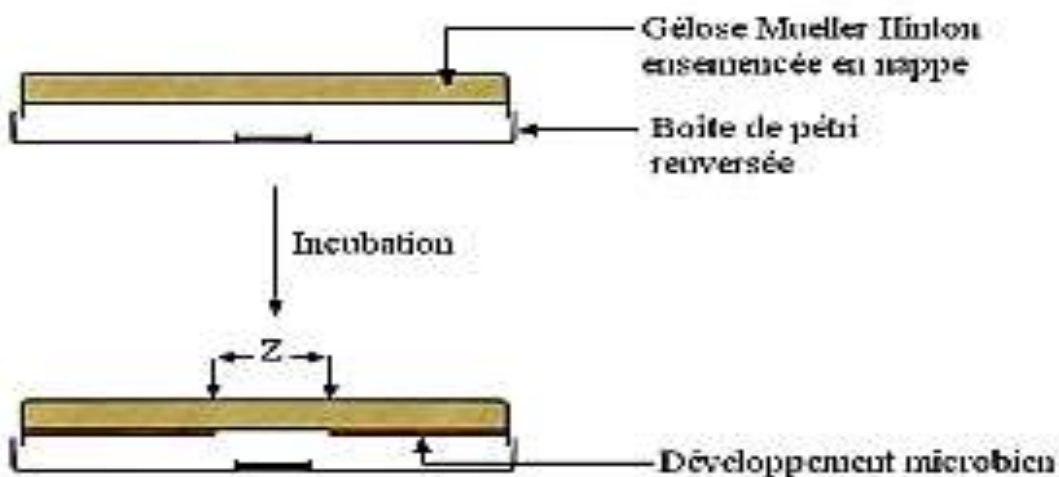


Figure 3.8 : Méthode de microatmosphère (Bousbia, 2004)

- **Test de diffusion sur disque en milieu gélosé (Aromatogramme) :** Développé par Schroeder et Messing en 1949 L'aromatogramme, méthode inspirée de l'antibiogramme utilisé en bactériologie médicale, permet d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles (HEs) sur diverses souches bactériennes (Mehani, 2015). Adaptée aux HEs par Cornet (1981) et validée par Bachiri et al. (2016), cette technique repose sur la diffusion de l'HE à partir de disques de papier déposés sur une gélose ensemencée. Après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures, l'activité antibactérienne est estimée par le diamètre des zones d'inhibition (Balouiri et al., 2016). Plus la zone claire est étendue, plus l'HE est active. Cette méthode fournit des résultats qualitatifs, utiles pour orienter les choix thérapeutiques. Toutefois, elle ne permet pas de différencier un effet bactériostatique d'un effet bactéricide (figure 3.9) (Martins, 2020).

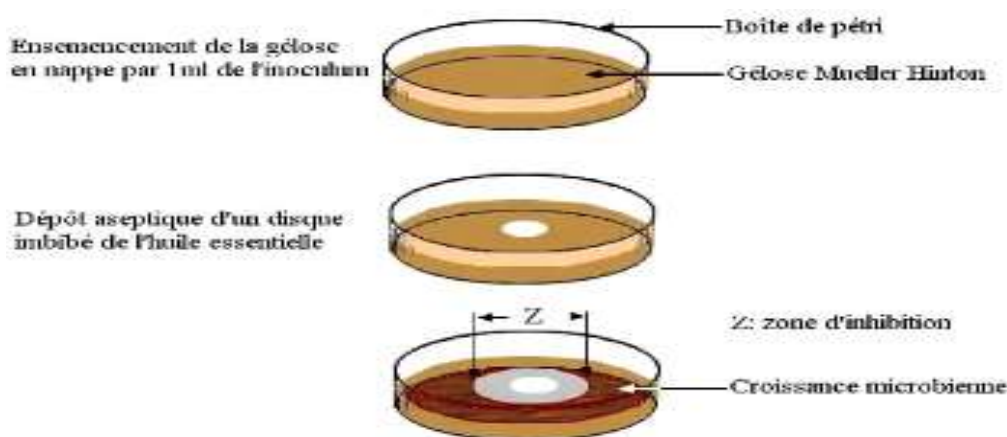


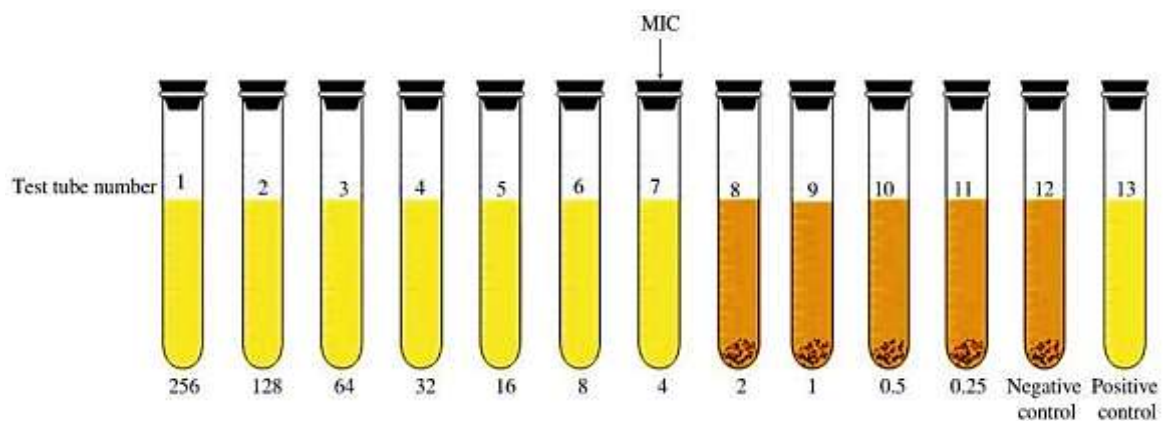
Figure 3.9 : Technique d'aromatogramme (Zaiki, 1988).

- **La méthode de diffusion en puits d'agar :** La technique de diffusion en puits d'agar, fréquemment utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne d'extraits végétaux ou microbiens, repose sur l'inoculation d'un milieu gélosé suivie de l'introduction de l'agent testé dans un puits créé aseptiquement. L'agent diffusant dans l'agar inhibe la croissance microbienne à proximité (Balouiri et al., 2016). Bien que similaire à la diffusion sur disque, cette dernière est limitée par la nature hydrophobe des HEs, qui empêche leur diffusion homogène. Ainsi, les tests en milieu liquide sont souvent privilégiés (Martins, 2020).

3.9.2. Techniques en milieu liquides

Des méthodes de dilution liquide sont utilisées pour déterminer les concentrations inhibitrices minimales (CMI) et les concentrations bactéricides minimales (CMB) des huiles essentielles.

- **Méthode de dilution du bouillon** : La méthode repose sur la préparation de dilutions de suspensions bactériennes dans un milieu de culture liquide, lesquelles sont ensuite dispensées dans une plaque de microtitration à 96 puits (technique de microdilution). Des huiles essentielles sont ajoutées aux puits afin de créer une gamme de concentrations croissantes. Après homogénéisation, la plaque est incubée dans des conditions adaptées au micro-organisme étudié, le plus souvent à 37°C pendant 24 heures. Afin de détecter la croissance bactérienne, l'ajout de colorants indicateurs permet d'observer un changement de couleur, facilitant ainsi la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Celle-ci correspond à la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible du micro-organisme, dans les conditions expérimentales définies. La CMI est généralement exprimée en $\mu\text{g/ml}$ ou mg/l . Une CMI inférieure à 0,50 mg/ml est généralement interprétée comme le signe d'une forte activité antimicrobienne. La concentration minimale bactéricide (CMB) permet, quant à elle, d'évaluer le pouvoir bactéricide de l'agent testé. Elle est définie comme la concentration minimale capable de tuer 99,9 % des cellules bactériennes initialement présentes. La détermination de la CMB est confirmée par repiquage du contenu des puits sans croissance apparente sur gélose, suivi d'une



incubation de 24 heures (Martins, 2020) (figure3.10).

Figure 3.10: Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (Chen et al., 2022).

- **Méthode de dilution sur gélose** : La méthode de dilution sur gélose consiste à incorporer des concentrations croissantes d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé, puis à y déposer un inoculum standardisé. Elle est particulièrement indiquée

lorsque le composé est testé sur plusieurs souches ou lorsque sa couleur interfère avec les lectures en milieu liquide. Préférée à la microdilution en bouillon dans ces cas, elle est aussi utilisée comme méthode de référence pour les bactéries exigeantes telles que les anaérobies strictes ou *Helicobacter*. Les méthodes de dilution, sur gélose ou en bouillon, sont les plus fiables pour déterminer avec précision la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Figure 3.11) (Martins, 2020).

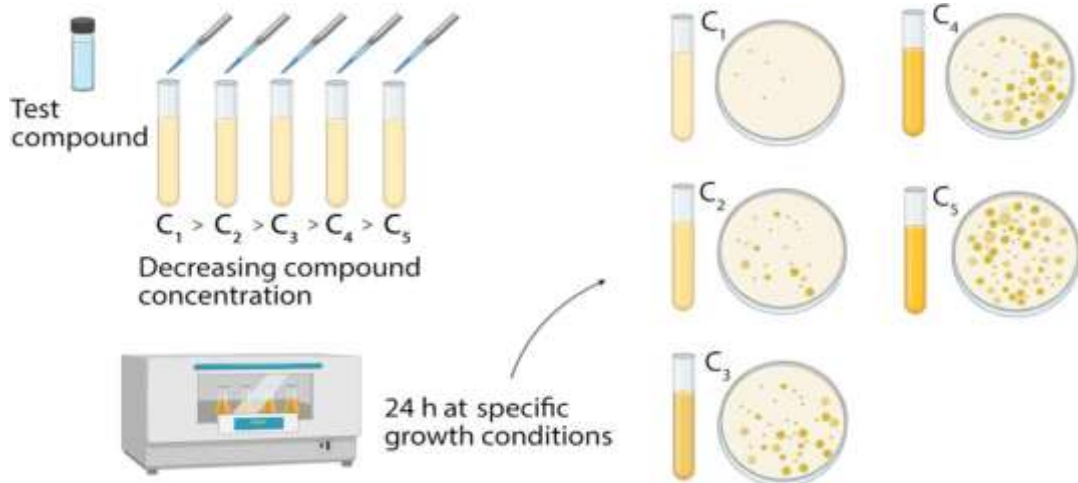


Figure 3.11 : Méthode de dilution sur agar (Guerrero Correa et al., 2020).

- **Test de synergie (méthode en damier)** : La méthode en damier est employée pour évaluer la synergie antimicrobienne en combinant diverses concentrations de substances sur une plaque de microtitration. Les concentrations inhibitrices minimales (CIM) et les indices de concentration inhibitrice fractionnaire (FIC) sont calculés afin d'analyser l'interaction entre les substances, en identifiant des effets synergiques, additifs ou antagonistes (Balouiri et al., 2016).

3.10. Toxicité et effets indésirables

Certaines substances d'origine naturelle, telles que les huiles essentielles, peuvent présenter des risques pour la santé humaine, en particulier celles qui contiennent des phénols et des aldéhydes, comme la Cannelle de Ceylan, le Basilic exotique, la Menthe, le Clou de girofle, le Niaouli, le Thym à thymol, la Marjolaine, la Sarriette et le Lemon-grass. Ces huiles peuvent provoquer des irritations cutanées, oculaires et des muqueuses, notamment au niveau des paupières, des aisselles et du périnée. De plus, certaines huiles, telles que la Cannelle de Ceylan, la Menthe, la Litsée, la Mélisse, le Pin et la Mousse de chêne, peuvent induire des réactions allergiques cutanées, allant du prurit à l'eczéma (Meynadier et Raison, 1997).

L'ingestion accidentelle d'huiles essentielles peut entraîner des intoxications graves, pouvant aller jusqu'au coma ou à la mort, tandis que leur inhalation peut provoquer des pneumonies. Certaines huiles deviennent toxiques sous l'effet de la lumière (comme le Citron, l'Orange amère et la Bergamote), d'autres présentent des effets hépatotoxiques (Clou de girofle, Thym, Origan) ou neurotoxiques (Romarin, Sarriette, Cèdre) (OFSP, 2008).

Certaines plantes hautement toxiques, telles que l'Aconit, la Belladone ou le Colchique, sont également utilisées en homéopathie. La toxicité des huiles essentielles dépend de la dose et de la voie d'exposition (Degryse et al., 2008), et elles ne deviennent réellement dangereuses qu'en cas de surdosage.

Partie expérimentale

Chapitre 4 :
Matériel et méthodes

4.1. Cadre de l'étude et objectif général

Cette étude expérimentale a été conduite en deux phases principales. La première s'est déroulée au sein du laboratoire d'analyses médicales *Dr. Zerrar A.* situé dans la wilaya de Tizi-Ouzou, durant la période allant de février à fin mars 2025. La seconde phase a été réalisée au niveau du laboratoire d'Écologie, Biotechnologie et Santé de la Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou du mois d'avril au mois de mai 2025.

Cette étude s'inscrit dans une approche de recherche de solutions alternatives aux antibiotiques classiques, face à la montée préoccupante de la résistance bactérienne. L'objectif principal est d'évaluer *in vitro* l'efficacité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare*) et celle du thym à thymol (*Thymus vulgaris*) contre deux souches multirésistantes : *Escherichia coli*, isolée à partir d'une infection urinaire et *Staphylococcus aureus* responsable d'une otite.

En parallèle, l'étude explore de potentielles synergies entre ces huiles essentielles et certains antibiotiques, dans le but d'optimiser l'efficacité des traitements existants. Cette stratégie vise à proposer des alternatives naturelles et complémentaires, susceptibles de limiter la propagation des résistances antimicrobiennes.

4.2. Matériel biologique

Les huiles essentielles : L'huile essentielle d'origan (*Origanum compactum*) et celle de thym à thymol (*Thymus vulgaris*), obtenues par distillation à la vapeur, ont été acquises auprès d'un producteur local.

Tableau 4.1 : Généralités sur les huiles essentielles utilisées

Nom commun	Nom scientifique	Famille	Propriétés thérapeutiques
Origan	<i>Origanum compactum</i>	<i>Lamiaceae</i>	Antiseptique, digestif, expectorant, anti- inflammatoire, antioxydant et antibactérienne
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lamiaceae</i>	Antiseptique, antifongique, antioxydant, expectorant et antibactérienne

Souches bactériennes : Dans notre étude, deux souches bactériennes ont été utilisées : *Escherichia coli*, isolée à partir d'un échantillon urinaire, et *Staphylococcus aureus*, isolée à partir d'un prélèvement d'otite, toutes les deux provenant du laboratoire d'analyses médicales Dr. Zerrar.

Matériaux non biologiques : La liste complète des matériels non biologiques utilisés dans cette étude, y compris l'équipement, les milieux de culture, les réactifs, les antibiotiques, le matériel jetable et autres fournitures, est détaillée dans les annexes.

4.3. Prélèvement, transport et de conservation des échantillons biologiques

La fiabilité des résultats microbiologiques repose sur la rigueur des prélèvements, du transport et de la conservation des échantillons.

4.3.1. Prélèvements

- **Urines :** Les échantillons ont été prélevés lors de la première miction du matin, en milieu de jet, après une toilette antiseptique. Les prélèvements ont été réalisés dans des conditions d'asepsie strictes, en tenant compte des particularités (périodes non menstruelles chez la femme, poches adhésives stériles pour les nourrissons, ponction aseptique des sondes chez les sondés).
- **Pus :** Les prélèvements ont été faits avant tout traitement antibiotique, avec du matériel stérile adapté, au niveau de la zone la plus infectée, en évitant les contaminations externes.

4.3.2 Transport et conservation :

- **Urines :** Acheminées sous 2 h ou conservées à 2-8 °C jusqu'à 12 h. Des tubes boratés ont été utilisés si le transport dépassait 2 h.
- **Pus :** Transporté rapidement (idéalement sous 2 h), sinon conservé à 2-8 °C jusqu'à 24h. Les écouvillons ont été placés dans des milieux de transport spécifiques (Stuart ou Amies).

Chaque échantillon était étiqueté avec les informations nécessaires : identité du patient, type de prélèvement, date et heure, et données cliniques pertinentes.

4.4. Examen cytobactériologique des urines

4.4.1. Examen macroscopique des urines

L'examen macroscopique de l'urine permet de détecter des signes anormaux pouvant évoquer une infection urinaire. Ces premières observations aident à orienter le diagnostic et à décider des analyses microscopiques à réaliser pour confirmer l'infection et adapter le traitement (**Abdessemed, 2016**)

L'aspect macroscopique des urines, incluant la couleur et la présence éventuelle de pus ou de sang, doit être soigneusement évalué (**El Manni et al., 2004**). Une urine de couleur jaune clair est généralement considérée comme normale, tandis qu'un aspect trouble peut indiquer une infection urinaire ou la présence de cristaux. Ces derniers peuvent être liés à des facteurs alimentaires ou à la prise de certains médicaments (**Konan, 1992**).

4.4.2. Examen microscopique des urines

L'examen à l'état frais de l'urine, réalisé entre lame et lamelle à l'aide d'une cellule de Malassez, constitue une analyse essentielle pour évaluer l'état du système urinaire. Il présente un double intérêt : qualitatif et quantitatif. L'analyse qualitative permet d'identifier les éléments présents dans l'échantillon, tels que les cellules épithéliales, les levures, la flore microbienne ainsi que les cristaux (comme les oxalates de calcium), dont la présence peut orienter vers des pathologies spécifiques (**VIDAL, 2013**). L'analyse quantitative, quant à elle, repose sur le dénombrement précis des leucocytes et des hématies à l'aide de la cellule de Malassez, qui définit un volume standardisé de 1 mm³ (ou 1 µl). Après homogénéisation de l'échantillon et observation au microscope optique avec un grossissement de 40x, le comptage est effectué dans cinq rectangles de la grille, puis les résultats sont multipliés pour obtenir la concentration réelle. Cet examen permet ainsi de détecter des anomalies telles que les infections urinaires, une hématurie ou la présence d'agents infectieux (**Roxe, 1990**).

4.4.3. Culture bactériologique de l'urine

La mise en culture des urines vise principalement l'isolement et la numération des bactéries responsables des infections urinaires. Elle constitue la méthode de référence pour une identification précise des agents pathogènes. Le choix du milieu de culture dépend de la qualité de l'échantillon et des résultats de l'examen microscopique.

L'échantillon est d'abord homogénéisé, puis une goutte de 10 µl est prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile. Cette goutte est ensuite ensemencée par stries sur une gélose nutritive

(GN) ou un Chromagar, selon le cas. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Le choix du milieu repose sur la concentration bactérienne :

- Si elle est $\geq 10^5$ UFC/ml, on utilise la gélose nutritive pour favoriser la croissance, et le Chromagar pour une orientation rapide et une identification préliminaire grâce à la coloration des colonies.
- Si elle est $< 10^5$ UFC/ml, seule la gélose nutritive, milieu non sélectif, est utilisée.

4.5. Examen cytobactériologique du pus (ECBP)

4.5.1. Observation macroscopique

L'observation macroscopique du pus constitue une étape essentielle du diagnostic initial. Elle permet d'apprécier plusieurs paramètres visuels tels que la consistance, la couleur, l'aspect, l'odeur et la viscosité de l'échantillon. Le pus peut être épais, fluide, visqueux ou élastique, parfois mêlé à du sang. Sa couleur varie du blanc au brun chocolat, et peut également présenter des teintes verdâtres, en lien avec la nature de l'infection. La présence de débris visibles et une odeur fétide renforcent la suspicion d'une infection bactérienne active.

4.5.2. Examen microscopique à l'état frais

L'examen à l'état frais consiste à observer une goutte du pus directement sous le microscope, après l'avoir déposée entre une lame et une lamelle. Réalisé à l'objectif x40, cet examen permet de détecter rapidement la présence de bactéries, d'observer leur forme (morphologie) et parfois leur mobilité. Il offre également une première estimation du nombre de leucocytes (globules blancs) et de cellules épithéliales, ce qui aide à évaluer l'intensité de la réaction inflammatoire (**Anonyme**)

4.5.3. Culture

L'ensemencement du pus s'effectue sur plusieurs milieux de culture afin de favoriser la croissance des agents pathogènes. Le protocole consiste à déposer environ un tiers du prélèvement à l'aide d'un écouvillon stérile sur la surface du milieu. Le reste de l'échantillon est ensuite réparti en stries serrées à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, sur la même surface, afin d'optimiser l'isolement des colonies bactériennes.

Le **Tableau 4.2** ci-dessous présente les différents milieux de culture utilisés au cours de notre étude microbiologique

Tableau 4.2: Principaux milieux de culture ensemencés.

Milieux	Spécificité	Incubation	Temps
Gélose au sang cuit	Milieux enrichis pour les bactéries exigeantes	La jarre à 37°C	18 à 24 h
Gélose au sang frais	Milieux enrichis surtout pour les bactéries ayant un pouvoir hémolytique (ex : <i>Streptocoques</i>)	Etuve à 37°C	18 à 24 h
Chapman	Milieu d'isolement des Staphylocoques grâce à un taux élevé de NaCl (pouvoir sélectif)	Etuve à 37°C	18 à 24h
Hektoen	Milieu d'isolement des BGN surtout les Enterobacteries grace à une présence de sel biliaire.	Etuve à 37°C	18 à 24h
Sabouraud	Milieu sélectif utilisé pour la détection qualitative et l'isolement des dermatophytes et autres moisissures	Etuve à 37°C	18 à 24h

4.6. Identification des souches bactériennes

4.6.1. Observation des cultures et différenciation des colonies

L'observation macroscopique des cultures on prend en considération la forme des colonies (rondes, irrégulières), leur taille (petite ou grande), leur couleur (blanc, jaune, rouge), leur texture (lisse ou rugueuse) et leur opacité (transparente, translucide, opaque).

L'identification de la bactérie est menée en fonction de la morphologie des colonies, et des premiers caractères biochimiques d'orientation, propres à chaque espèce (production d'une catalase, d'une oxydase, coagulase, fermentation de certains sucres, etc.) (**Leroy et Mariani-Kurkdjian, 2004**)

- **La coloration de Gram** est une technique essentielle en microbiologie, permettant de différencier les bactéries en deux grands groupes : **Gram positives** (violette) et **Gram négatives** (rose), en fonction de la composition de leur paroi cellulaire. Elle fournit également des informations précieuses sur **la forme** (cocques, bacilles), **le groupement** (isolés, en chaînes ou en amas) et **la réaction inflammatoire** locale.

La méthode consiste à préparer un **frottis** sur lame, le fixer à la chaleur, puis appliquer successivement : violet de gentiane, Lugol, alcool pour la décoloration, et enfin une contre-coloration (fuchsine ou safranine). L'observation se fait au **microscope à immersion, objectif x100**.

4.6.2. Test de l'oxydase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram (-) comme *Escherichia coli*, Il permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène-diamine-oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N-diméthylparaphénylène diamine.

Ce test est réalisé à partir d'un disque d'oxydase sur lequel on dépose une à deux colonies bactériennes à l'aide d'une pipette pasteur. On peut conclure que la bactérie est :

- Oxydase (+) si une tache violette est observée.
- Oxydase (-) si de tache violette n'est pas observée.

4.6.3. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs, elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène. La recherche de cette enzyme est utilisée pour différencier les Staphylocoques des Streptocoques **(Reiner, 2010)**

Ce test consiste à déposer une goutte d'eau oxygénée ensuite ajouter une colonie bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur. L'observation du résultat est immédiate :

- Catalase + observation de dégagement de bulles gazeuses.
- Catalase - absence de bulles gazeuses.

4.6.4. Test de coagulase

C'est une technique nous a permis d'identifier le *staphylococcus aureus*, elle se repose par la production de la coagulase par ce germe ce dernier va s'intégrer avec la prothrombine présente dans le plasma, entraine la formation de caillot (coagulant) Cette capacité permet de distinguer *S. aureus* des autres staphylocoques qui ne produisent pas cette enzyme **(Katz, 2010 ; Chamberlain, 2009)**.

Le test se réalise de la manière suivante : on prépare trois tubes à hémolyse contenant respectivement de l'EDTA, du citrate et de l'héparine. Après centrifugation, une colonie bactérienne est introduite dans chacun des tubes. On laisse ensuite incuber pendant environ deux heures avant d'observer les résultats.

Après 2 heures d'incubation, l'apparition d'un caillot dans l'une des tubes indique une réaction positive traduisant la production de coagulase

- Résultat positive formation d'un coagulant visible
- Résultat négative absence de coagulant

4.7. Identification biochimique

4.7.1. Galerie Api 20E

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprennent 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

4.7.2. Galerie Api STAPH

Le système STAPH permet d'identifier de manière standardisée les bactéries des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*, ainsi que des genres proches comme *Rothia* et *Aerococcus*. Il repose sur 26 tests biochimiques miniaturisés, et comprend un medium de 10ml « solution saline » pour la préparation de la suspension bactérienne (**bioMérieux, 2006**) (figure 4.1).

- **Technique**

- À l'aide d'une pipette Pasteur, prélever 2 à 4 colonies bactériennes pures et les transférer dans 10 ml d'eau physiologique afin de préparer une suspension bactérienne correspondant à une densité de 0,5 Mcfarland.
- Remplir le couvercle de l'api avec un peu d'eau pour éviter la dessiccation lors de l'incubation à 37° pendant 24h.
- Remplir les cupules avec la suspension préparé à l'aide d'une seringue tout en évitant émettre des bulles.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des tests soulignés Ex : ADH

- **Lecture**

- La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification, après incubation à 37°C pendant 24h (Voir les annexes).
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées ou révélées par l'addition des réactifs.



Figure 4.1 : Galeries biochimiques API 20E et API STAPH (photo original)

4.8. Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

Après l'isolement et l'identification d'une bactérie, il est crucial de déterminer son profil de sensibilité aux antibiotiques. Cette étape permet d'orienter le clinicien vers le traitement le plus adapté pour le patient. L'antibiogramme constitue ainsi un outil essentiel en microbiologie médicale. Parmi les différentes méthodes disponibles, la technique de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton est la plus couramment utilisée. Elle permet d'identifier les antibiotiques auxquels la souche bactérienne est sensible, et de communiquer ces résultats au médecin prescripteur afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique (Gheit, 2011 ; Akualing et al., 2016).

4.8.1. La méthode de diffusion sur gélose : principe et mise en œuvre

La méthode de diffusion sur gélose, ou méthode de Kirby-Bauer, est l'une des techniques les plus utilisées en microbiologie clinique pour évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Appréciée pour sa simplicité, sa fiabilité et sa large applicabilité, elle repose sur

l'utilisation de disques imprégnés d'antibiotiques, déposés sur une gélose (souvent Mueller-Hinton)ensemencée avec une suspension bactérienne standardisée.

L'antibiotique diffuse de manière radiale dans le milieu, formant une zone d'inhibition autour du disque si la bactérie est sensible. Après incubation, le diamètre de cette zone est mesuré afin de déterminer le niveau de sensibilité ou de résistance de la souche testée (**Vandepitte et al., 1994 ; Hudzicki, 2009**).

4.8.2. Étapes de la méthode de Kirby-Bauer

- **Préparation du milieu** : La gélose Mueller-Hinton est versée dans des boîtes de Pétri jusqu'à une épaisseur uniforme de 4 mm, puis laissée à sécher (**Hudzicki, 2009**).
- **Préparation de l'inoculum** : Des colonies bactériennes âgées de 18 à 24 heures sont mises en suspension dans une solution saline stérile. La densité est ajustée à l'équivalent de 0,5 McFarland pour garantir la standardisation (**Vandepitte et al., 1994**).
- **Ensemencement** : À l'aide d'un écouvillon stérile, la suspension est répartie uniformément sur la gélose en trois passages croisés, en tournant la boîte à chaque passage pour une couverture homogène (**Vandepitte et al., 1994**).
- **Application des disques antibiotiques** : Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile, sans être déplacés ensuite. Le nombre de disques est limité à six par boîte de 90 mm pour éviter le chevauchement des zones d'inhibition (**Hudzicki, 2009**) (tableau 4.3) (tableau 4.4)
- **Incubation** : Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures, dans des conditions adaptées à la souche testée (**Vandepitte et al., 1994**).
- **Lecture et interprétation** : À la fin de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un étrier. Ces mesures sont ensuite comparées aux seuils critiques définis par des comités de référence tels que le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CASFM, 2020**). Selon les recommandations, les souches bactériennes sont classées comme :
 - ✓ **Sensible (S)** : le diamètre d'inhibition est supérieur au seuil critique supérieur
 - ✓ **Résistant (R)** : le diamètre est inférieur au seuil critique inférieur
 - ✓ **Intermédiaire (I)** : le diamètre se situe entre les deux valeurs critiques

Cette méthode permet ainsi de classer rapidement les bactéries selon leur profil de sensibilité, et d'adapter de manière ciblée le traitement antibiotique du patient (figure 4.2).

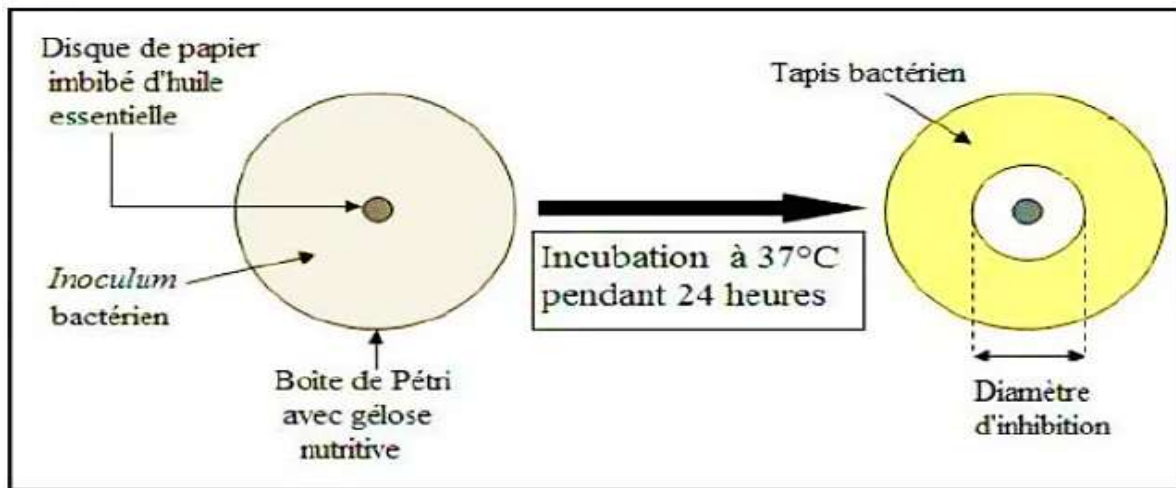


Figure 4.2 : Test de l'antibiogramme

Tableau 4.3 : Liste des antibiotiques associés à une résistance chez *Escherichia Coli*

Abréviation	Nom de l'antibiotique	Famille	Concentration (μg)
COT	Cotrimoxazole (Triméthoprim + Sulfaméthoxazole)	Diaminopyrimidines et sulfamides	25
AUG	Amoxicilline + acide clavulanique	Bêta-lactames (pénicilline/inhibiteur Combinaison)	30
AMP	Ampicilline	Bêtalactamines du groupe A	10
KZ	Cefazoline	Bêtalactamines du groupe des céphalosporines de 1 ^{re} G	30
CFM	Céfixime	Céphalosporines	5
CIP	Ciprofloxacine	Fluoroquinolones	5
NA	Acide Nalidixique	Quinolones	20
IPM	Imipénème	Carbapénèmes	10

Tableau 4.4: Liste des antibiotiques associés à une résistance chez *Staphylococcus aureus*

Abréviation	Nom de l'antibiotique	Famille	Concentration (µg)
PT	Pristinamycine	Streptogramines	15
CIP	Ciprofloxacine	Fluoroquinolones	5
P	Pénicilline	Bêta-lactames	10
LE	Levofloxacine	Fluoroquinolones	5
DA	Clindamycine	Lincosamides	2
OFX	Ofloxacine	Fluoroquinolones	5
E	Erythromycine	Macrolides	15
TE	Tétracycline	Cyclines	30

4.8.3. Test de sensibilité aux huiles essentielles et synergie avec les antibiotiques

Dans le but d'analyser l'efficacité antibactérienne des deux huiles essentielles examinées dans notre recherche, nous avons suivi une méthodologie en trois phases. Premièrement, nous avons élaboré une série de dilutions des huiles essentielles pour obtenir une variété de concentrations. Par la suite, nous avons effectué un aromatochrome afin d'étudier l'impact de ces concentrations sur la prolifération bactérienne de la souche testée. Enfin, nous avons testé la synergie des deux huiles utilisées avec une gamme de trois antibiotiques pour chacune des deux souches résistantes (*E. coli*, *S. aureus*) dans le cas de l'huile de thym, et deux antibiotiques dans le cas de l'huile d'origan. Cette approche nous permet d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles et leur potentiel en tant qu'alternatives aux traitements antibiotiques conventionnels.

- **Préparation des solutions d'huiles essentielles :** Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, nous avons recouru à la technique des dilutions en série, communément appelée « dilution au demi ». Cette approche permet de créer une série de solutions présentant des concentrations décroissantes en diluant de manière successive une solution mère dans un solvant adéquat.

- **Préparation de la solution mère :** La solution mère est préparée en prélevant à l'aide d'une micropipette 1000 µl de solvant (dans notre cas du DMSO (diméthyl sulfoxyde) est

utilisé), auquel 800 μl d'huile essentielle pure (thym ou origan) est ajouté, puis la solution est bien homogénéisée à l'aide d'un vortex.

- **Dilutions en série :** Afin d'obtenir des concentrations décroissantes d'huiles essentielles, nous avons procédé à une série de dilutions successives selon la méthode dite de « dilution au demi ». Cette technique consiste à diluer progressivement une solution mère en mélangeant, à chaque étape, un volume donné de la solution précédente avec un volume équivalent de solvant, ce qui divise la concentration initiale par deux à chaque dilution, donnant ainsi une série de dilutions de l'ordre d'un demi.

Concrètement, pour la première dilution, 500 μl de la solution mère dont la concentration est de l'ordre de 800 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ont été mélangés à 500 μl de solvant (DMSO), aboutissant à une concentration de 400 $\mu\text{l}/\text{ml}$ en huile essentielle. Ce protocole a été répété à chaque étape afin d'obtenir une gamme de concentrations décroissantes : 400 $\mu\text{l}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 12,5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ et 6,25 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Chaque dilution a été réalisée avec précision en respectant le même ratio volume/volume, garantissant ainsi la rigueur et la reproductibilité des résultats expérimentaux.

Il est crucial de bien homogénéiser la dilution primaire avant de procéder à la dilution suivante afin de garantir l'obtention de la bonne concentration des huiles essentielles (Figure 4.4).

- **Solution témoin :** Une solution témoin a également été élaborée, ne contenant aucune huile essentielle, afin de garantir que les effets observés lors des tests étaient exclusivement attribuables aux huiles essentielles et non à d'autres variables.

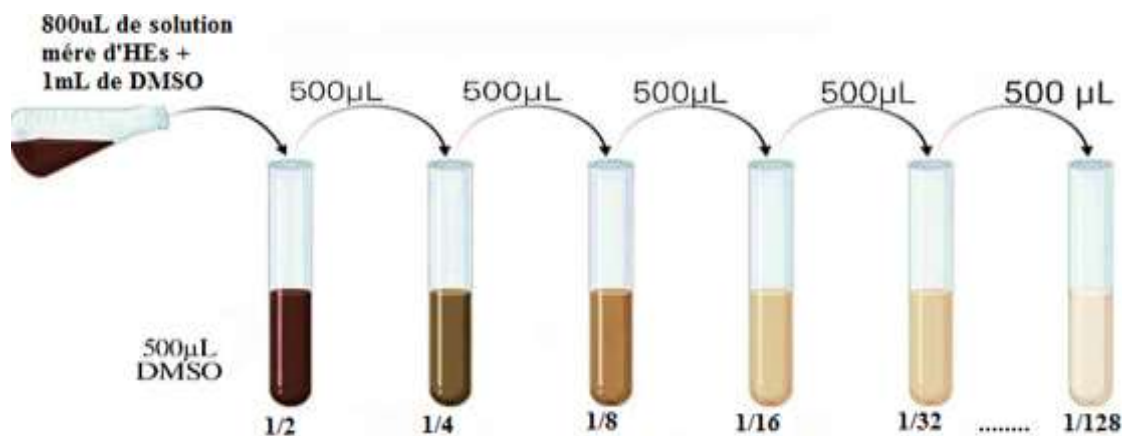


Figure 4.3 : préparation d'une série de dilutions d'HE de l'ordre d'un demi

- **Préparation du milieu de culture :** La préparation du milieu de culture a été réalisée en utilisant le milieu de Mueller Hinton fondue au bain marie, puis laissée refroidir jusqu'à l'atteinte de la température en surfusion, puis versée dans des boîtes de pétri à une épaisseur de 4 mm devant un bec bunsen, et est pré-séchée avant son utilisation.
- **Préparation de la suspension bactérienne :** À partir d'une culture fraîche et pure de bactéries sur un milieu d'isolement (gélose nutritive) âgée de 24 heures maximum, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur scellée et stérile quelques colonies bien distinctes et parfaitement homogènes. Par la suite, la pipette pasteur est vidée dans 5 ml d'eau physiologique stérile, et la suspension bactérienne est homogénéisée au vortex ; elle est ensuite standardisée afin que son opacité corresponde à 0,5 McFarland, équivalente à 10^8 cellules/ml (une densité optique de 0,08 à 0,1) en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm (Tyagi et Malik, 2011).

4.8.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la technique d'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode *in vitro* utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Elle est comparable à l'antibiogramme, à la différence près que les antibiotiques y sont remplacés par des huiles essentielles. La procédure expérimentale se déroule selon les étapes suivantes :

- **Ensemencement des boîtes de pétri :** A partir de la suspension bactérienne préalablement préparée, standardisée, et bien homogénéisée, prélever à l'aide d'un écouvillon stérile l'inoculum, dont l'excès de liquide est éliminé en pressant l'écouvillon contre la paroi interne du tube. La surface d'une boîte de gélose Mueller-Hinton est ensuiteensemencée par un étalement en stries successives de haut en bas, en veillant à couvrir l'intégralité de la surface. Cette opération est répétée trois fois, avec une rotation de la boîte de 60° à chaque fois, afin d'assurer une distribution homogène des bactéries.
- **Application des disques imprégnés d'huiles essentielles :** Dans des conditions aseptiques, des disques de papier absorbant stériles (papier Whattman, diamètre 6 mm) sont placés sur la surface de la gélose préalablementensemencée puis imprégnés de 10 μ L de chaque concentration d'huiles essentielles préparée par dilution.

Les boîtes contenant les témoins (négatif : disque imprégné de DMSO uniquement, positif : disques antibiotiques uniquement) sont également ensemencées et préparées suivant la même procédure.

- **Incubation et évaluation de l'activité antibactérienne :** Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. À l'issue de l'incubation, l'activité antimicrobienne est évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques, exprimée en millimètres. Chaque condition expérimentale est testée en triplicat pour garantir la fiabilité et la reproductibilité des résultats.

Cette méthode permet d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles en mesurant leur capacité à inhiber la croissance du microorganisme testé, fournissant ainsi une évaluation détaillée de leur potentiel antibactérien.

Le diamètre de la zone d'inhibition mesuré nous renseigne alors sur la sensibilité de la souche bactérienne aux huiles essentielles testées comme suit (tableau 4.5) :

Tableau 4.5 : sensibilité et résistance bactérienne aux huiles essentielles (Ponce et al., 2003)

Sensibilité de la souche	Diamètre de la zone d'inhibition
Extrêmement sensible (+++)	Supérieur à 20mm
Très sensible (++)	Entre 15-19mm
Sensible (+)	Entre 9-14mm
Intermédiaire	Entre 6-8mm
Résistante (-)	6mm

4.8.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) s'effectue après la réalisation de l'aromatogramme, en analysant les zones d'inhibition autour des disques imprégnés de diverses concentrations d'huiles essentielles. Les diamètres de ces zones d'inhibition sont mesurés, et la CMI est définie comme la concentration la plus faible entraînant une zone d'inhibition visible, ce qui indique l'arrêt de la croissance des bactéries. Cette concentration représente le seuil à partir duquel l'huile essentielle exerce une inhibition efficace sur le développement du microorganisme, illustrant ainsi son potentiel antibactérien minimal (Andrews, 2001).

4.8.6. Détermination des types d'interactions entre les huiles essentielles et les antibiotiques (tests de synergie)

- **Ensemencement des boîtes de pétri :** En suivant la même procédure d'inoculation utilisée lors de la réalisation de l'aromatogramme, ensemercer les boîtes de gélose MH préalablement coulées et refroidies avec les 2 souches à tester (*E. coli*, *S. aureus*).
- **Application des Disques d'Antibiotiques et des Huiles Essentielles :** Après l'ensemencement des boîtes, des disques d'antibiotiques (Acide Nalidixique, Augmentin : amoxicilline+ Acide Clavulanique, et Cotrimoxazole : Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole, ou Acide Nalidixique et Ciprofloxacine) sont disposés à l'aide d'une pince stérile sur l'agar pour *E. coli*, et des disques de (érythromycine, Ofloxacine, et pristinamycine, ou érythromycine et Ofloxacine) pour *S. aureus*. Par la suite, 10 µl de la dilution de l'huile essentielle correspondant à la concentration minimale inhibitrice (CMI), établie lors de l'aromatogramme (thym ou origan, respectivement), sont additionnés par-dessus chaque disque par le biais d'une micropipette. La dilution supérieure à celle correspondant à la CMI, ainsi que celle inférieure à cette dernière sont également testées suivant le même protocole.

Les essais sont effectués en trois fois pour chacune des deux huiles. Deux boîtes témoins sont également préparées de la même manière en déposant sur chacune d'entre elles les disques d'antibiotiques à tester dépourvus d'huiles essentielles, ainsi qu'un disque imprégné de DMSO uniquement (tableau 4.6)

Tableau 4.6 : Récapitulatif des antibiotiques testés selon les souches bactériennes et les huiles essentielles utilisées

Souches bactériennes	Huiles essentielles	Antibiotiques testés
<i>E. coli</i>	Thym	Acide nalidixique Augmentin (amoxicilline + acide clavulanique) Cotrimoxazole (triméthoprim + sulfaméthoxazole)
<i>E. coli</i>	Origan	Acide nalidixique, Ciprofloxacine
<i>S. aureus</i>	Thym	Erythromycine, Ofloxacine, Pristinamycine
<i>S. aureus</i>	Origan	Erythromycine , Ofloxacine

- **Pré-diffusion et incubation** : Les boîtes ensemencées sont ensuite laissées pré-diffuser pour une quinzaine de minutes à température ambiante, puis sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Cette technique permet d'examiner l'impact de l'association entre les antibiotiques et les huiles essentielles.

À l'issue de l'incubation, les zones d'inhibition autour des disques sont mesurées. L'observation d'une extension des zones d'inhibition suggère une synergie bénéfique, renforçant l'efficacité antibactérienne des deux substances. En revanche, l'absence de changements indique une absence de synergie.

Les résultats sont interprétés de la manière suivante (figure 4.5) :

- **Indifférence** : les deux zones d'inhibition, à savoir la combinaison ATB/HEs et l'addition du diamètre ATB + HE, demeurent constantes. Cela suggère que la combinaison des agents n'améliore pas l'effet antibactérien par rapport à leurs actions individuelles.
- **Antagonisme** : la zone d'inhibition de la combinaison ATB/HEs est inférieure à celle de l'addition ATB+HE. La présence des huiles essentielles semble réduire l'efficacité de l'antibiotique. Ce cas est rare, mais peut indiquer que la combinaison des deux agents est contre-productive.
- **Synergie** : la zone d'inhibition de la combinaison ATB/HEs dépasse celle de l'addition ATB+HE d'au moins 1 mm. Cela signifie que la combinaison des deux agents exerce un effet antibactérien plus important que leurs actions individuelles (Kwiatkowski et al., 2018).

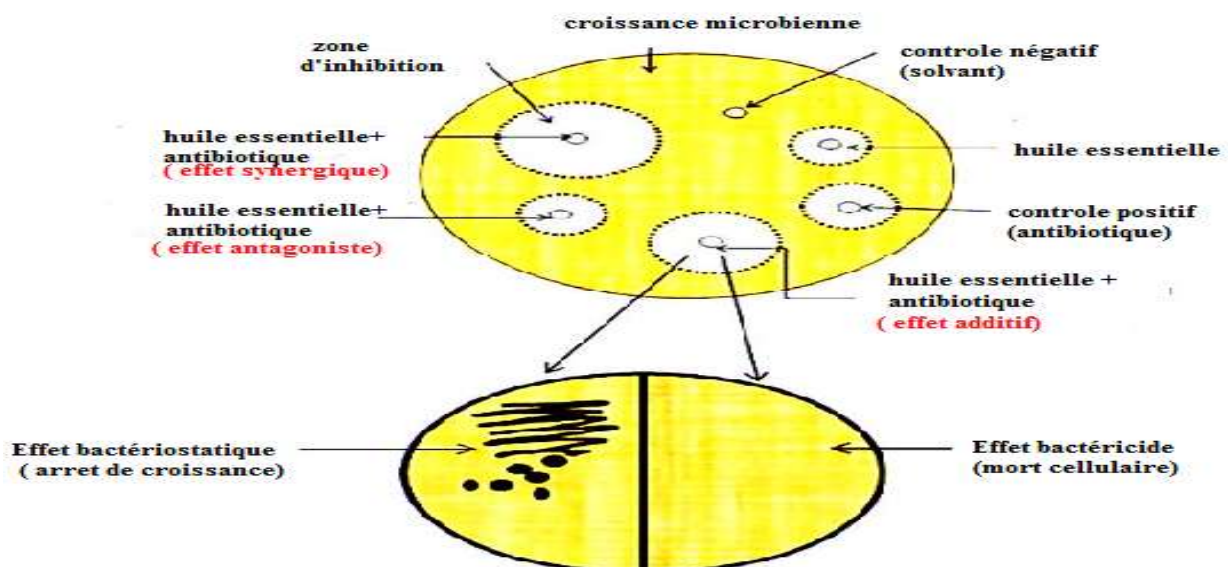


Figure 4.4 : Méthode de diffusion en puits sur gélose pour l'activité synergique (Rolta et al., 2018)

Chapitre 5 :
Résultats et discussion

5.1 Résultats de l'examen cytobactériologique des urines

5.1.1 Examen macroscopique des urines

Après homogénéisation des échantillons dans leurs pots, les urines d'un sujet malade sont caractérisées par un aspect trouble ou purulent, d'une couleur jaune paille (figure 5.1).



Figure 5.1 : Aspect macroscopique de l'urines (Photo originale)

Une urine claire, est due à une hydratation ce qui signifie que la personne boit suffisamment de liquides, cela peut vouloir dire que la personne est en bonne santé. Une urine trouble cependant, est un symptôme à évaluer avec attention. Il peut s'agir d'un signe bénin et réversible provoqué par une consommation excessive de phosphate, ou dû à une infection urinaire touchant la vessie ou les reins (Twizeyimana A, 2016).

5.1.2 Examen microscopique des urines

L'examen cytologique des urines (figure 5.2), nous a permis de mettre en évidence la présence de différents éléments, témoins d'infections urinaires (leucocytes hématies, cellules épithéliales...), ainsi que la présence de germes (bacilles).

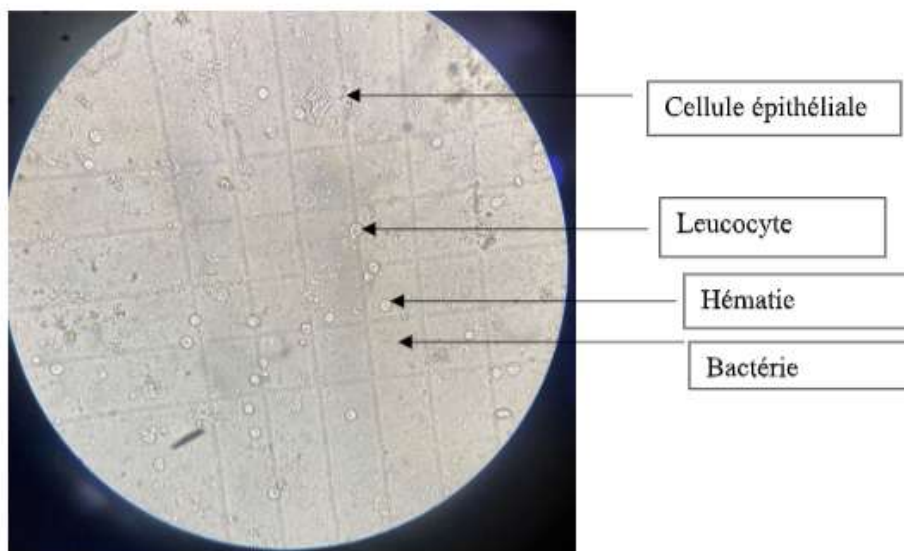


Figure 5.2 : Observation microscopique de l'échantillon d'urine G $\times 40$

Tableau 5.1 : résultats de l'examen cyto bactériologique des urines

Catégorie	Paramètre	Résultat
Macroscopique	Aspect	Trouble
	Couleur	Jaune
Microscopique	Leucocytes	$>10^5/\text{mL}$
	Hématies	5 000/mL
	Cellules épithéliales	Nombreuses
	Cristaux	Absents
	Bactéries	++
	Levures	Absents

5.2 Résultats de l'examen cytologique du pus

5.2.1 Examen macroscopique

L'analyse macroscopique du pus mis en évidence plusieurs éléments caractéristiques. Sa couleur jaunâtre à verdâtre est typique d'une accumulation de leucocytes, en particulier de neutrophiles, indiquant une réponse inflammatoire aiguë à une infection bactérienne. Sa consistance épaisse et visqueuse reflète un processus infectieux actif, impliquant souvent la présence de débris cellulaires, de bactéries mortes ou vivantes, et d'enzymes libérées lors de la phagocytose.

Pour confirmer l'agent infectieux responsable, un examen cyto bactériologique du pus (ECBP), associé à un antibiogramme, est essentiel. L'ECBP permet d'identifier précisément les bactéries présentes dans le pus, tandis que l'antibiogramme détermine leur sensibilité aux différents antibiotiques. (Klinker et al., 2021)

5.2.2 Examen microscopique

L'observation microscopique de l'échantillon de pus prélevé dans le cadre d'une otite (figure 5.3) révèle la présence de nombreux leucocytes, témoignant d'une réaction inflammatoire aiguë liée à une infection active. Des **cellules épithéliales**, issues probablement des tissus irrités du conduit auditif ou de la région infectée, sont également observées. L'analyse met en évidence une **quantité importante de bactéries (+++)**, confirmant l'origine bactérienne de l'otite. **Quelques levures** sont également détectées au microscope. Ainsi, les éléments observés sont en faveur d'une **otite infectieuse purulente**, nécessitant des examens complémentaires.

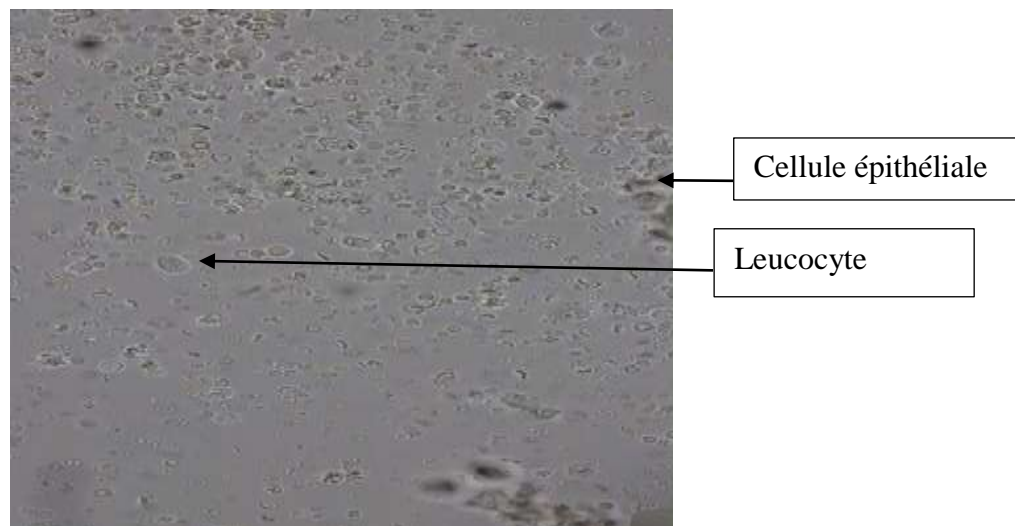


Figure 5.3 : Observation microscopique de l'échantillon de pus $\times 40$

Tableau 5.2 : résultats de l'examen cyto bactériologique du pus

Catégorie	Paramètre	Résultat
Macroscopique	Aspect	épais et visqueux
	Couleur	Jaunâtre à verdâtre
Microscopique	Leucocytes	$>10^5/\text{mL}$
	Cellules épithéliales	Nombreuses
	Bactérie	+++
	Levures	Quelques

5.2.3 Résultats de la culture bactériologique de l'urine

Différents caractères cultureux ont été observés après 24 heures d'incubation à 37°C sur la gélose nutritive (Tableau 5.3).

Tableau 5.3 : caractères cultureux d'*Escherichia coli* sur la gélose nutritive.

Caractère cultureux	Forme	Couleur	Surface	Relief
Résultats	Ronde	Blanc	Lisse-brillant	Bombé

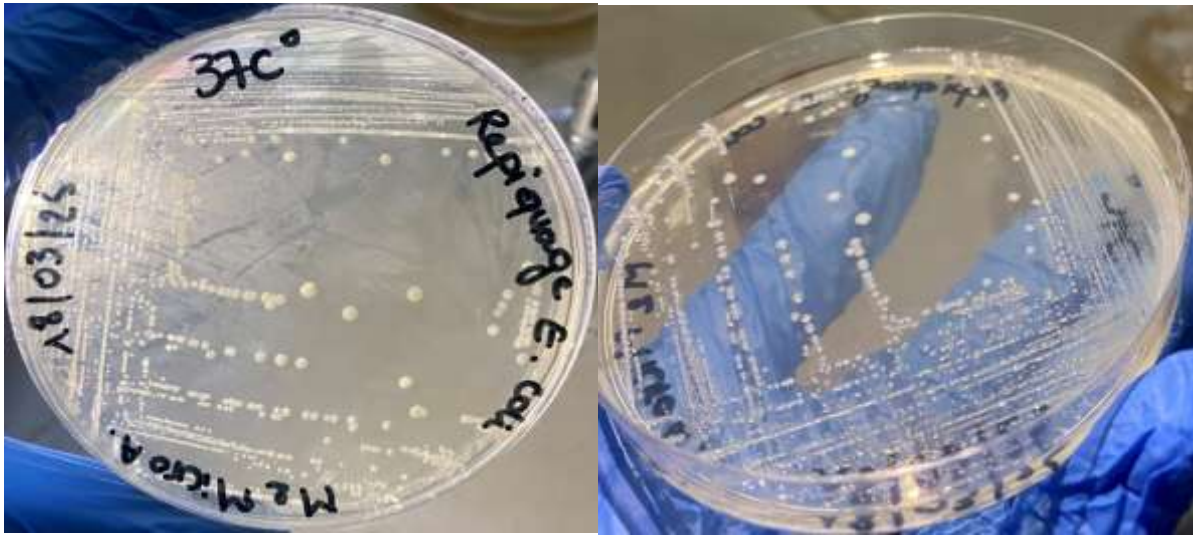


Figure 5.4 : observation des colonies d'*Escherichia coli* sur gélose nutritive

5.3 Résultat d'Identification de la souche bactérienne

5.3.1 Identification sur milieu ChromAgar

Comme décrit dans le chapitre précédent, le milieu chromAgar permet une différenciation visuelle des colonies bactériennes grâce à la présence de substrats chromogènes lorsqu'ils sont dégradés par les enzymes bactériennes, cette coloration varie selon l'espèce, c'est ainsi elle constitue une étape efficace pour orienter le diagnostic avant la confirmation par des tests biochimiques.

Dans notre cas les colonies prennent une couleur violacée qui est une couleur caractéristique à cette espèce la présence de cette coloration spécifique constitue un indice fort et fiable de la présence d'*Escherichia coli* (figure 5.5).

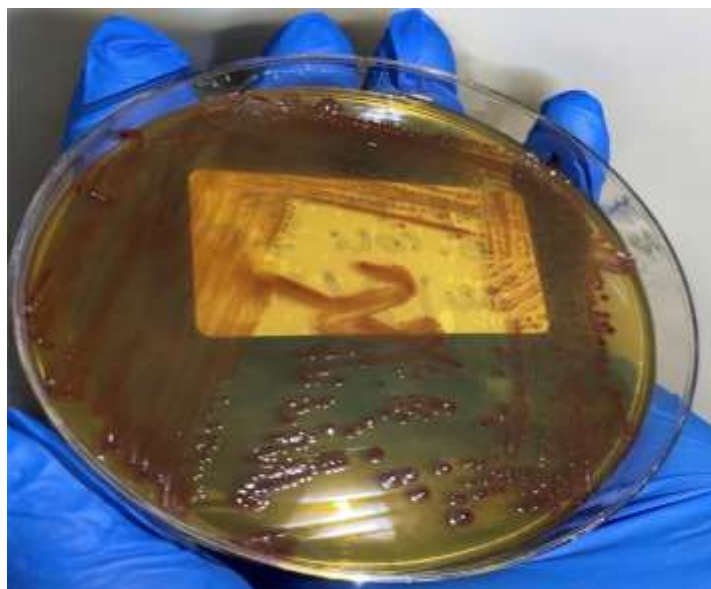


Figure 5.5 : observation des colonies *Escherichia coli* sur milieu ChromAgar

5.4 Résultats de la culture bactériologique de pus

5.4.1 Milieu de Chapman

Sur le milieu de Chapman, les colonies sont pigmentées et entourées d'une aréole jaune (figure 5.6). Ce changement de couleur du milieu, passant du rouge au jaune orangé, témoigne de la fermentation du mannitol par les souches testées. Cette acidification du milieu est une caractéristique typique de *S. aureus*, confirmant ainsi son identification.



Figure 5.6 : Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu Chapman

5.4.2 Gélose au Sang Cuit (GSC)

Sur gélose au sang cuit (GSC), après 24 heures d'incubation (figure 5.7) les colonies sont circulaires, volumineuses, légèrement bombées ou parfois aplaties. Elles sont opaques, éventuellement pigmentées, de couleur jaune doré, avec une surface luisante et humide. Ces colonies sont généralement plus larges que celles observées sur gélose nutritive (GN). Elles présentent un aspect lisse et brillant, typique de *S. aureus*. Aucune hémolyse n'est observée sur ce milieu, les globules rouges ayant été détruits par la cuisson.



Figure 5.7 : Aspect des colonies de *S. aureus* sur gélose au sang cuit

5.4.3 Gélose au sang frais

Sur gélose au sang frais les colonies sont dorées, lisses, convexes, mesurant entre 1 et 3 mm de diamètre. Une hémolyse bêta est observée autour des colonies, se traduisant par une zone claire d'hémolyse totale. Ce phénomène résulte de la production d'hémolysines par la bactérie. Cette hémolyse constitue un critère important pour l'identification de *S. aureus* et permet de le différencier des autres espèces de staphylocoques. Par ailleurs, ce milieu, riche en nutriments, favorise la croissance d'un large éventail de bactéries

5.4.4 Gélose Hektoen

Sur ce milieu sélectif, seules quelques colonies poussent très faiblement. Cette faiblesse de croissance s'explique par la nature sélective du milieu, conçu pour favoriser les entérobactéries tout en inhibant les bactéries Gram-positives, comme *S. aureus*.

5.4.5 Gélose Sabouraud

Sur gélose Sabouraud, on observe la présence de colonies de levures, ce qui est cohérent avec la composition du milieu, spécifiquement formulé pour favoriser la croissance des champignons

5.5 Coloration de Gram

La présence des bacilles à Gram négatif dans l'échantillon d'urine correspond à la présence des entérobactéries et aux BGN fermentaires, ce qui confirme la suspicion d'*E. coli* (B, figure 5.8).

La présence des Cocci à Gram positif en amas, indique la présence des bactéries du genre *Staphylococcus* dans l'échantillon du pus (A, figure 5.8)

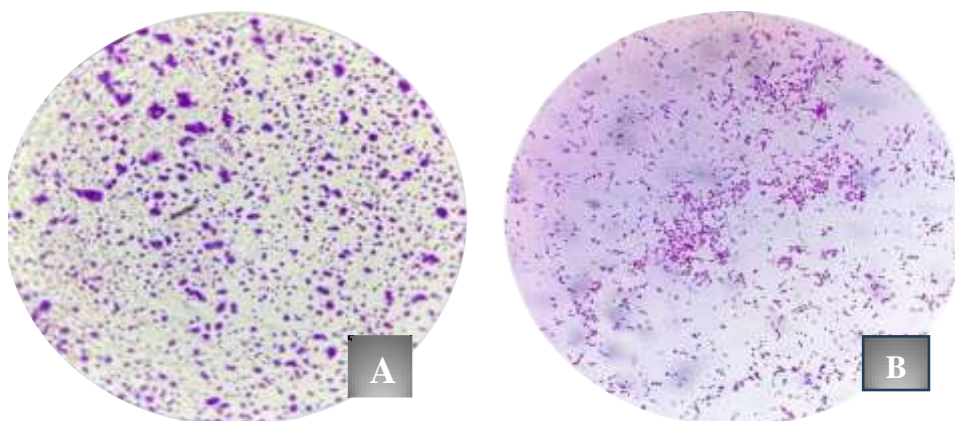


Figure 5.8 : résultats de la coloration de Gram : (A) Cocci en amas à Gram positif (violet) ; (B) Bacilles à Gram négatif (rose)

5.6 Test d'oxydase et de catalase

Après avoir prélevé une colonie des deux souches (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), les tests de catalase et d'oxydase ont été réalisés.



	Test catalase	Test oxydase
<i>Escherichia coli</i>		Négative Aucune coloration violette n'est observée
<i>Staphylococcus aureus</i>		Négative Aucune coloration violette n'est observée

Figure 5.9 : résultats des tests d'oxydase et catalase pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

5.7 Test de coagulase

Le test de coagulase a donné un résultat positif (figure 5.10), après incubation à 37°C pendant 2h, une coagulation visible du plasma a été observée cette réaction est caractéristique de *Staphylococcus aureus*.

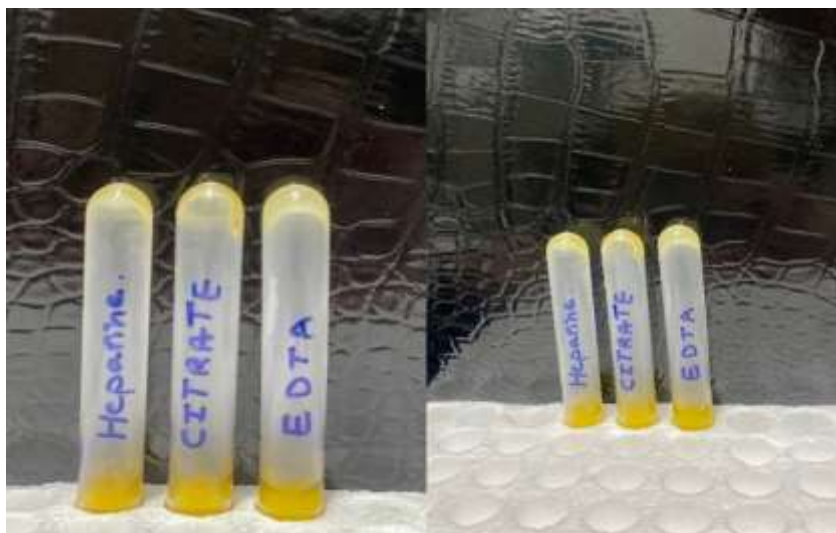


Figure 5.10 : Résultats du test de coagulase (+)

5.8 Résultats d'identification biochimique

5.8.1 Galerie Api 20E

Après incubation pendant 18 à 24 heures certaines cupules sont additionnées de réactifs permettant de révéler les réactions finales, sur la base des réactions biochimiques interprètes à l'aide d'un logiciel dédié. Les résultats, regroupés en 7 ensembles et codés par des chiffres correspondant à des réactions positives ou négatives, permettant d'établir un profil numérique à 7 chiffres lequel est ensuite comparé à un index analytique pour identifier la souche bactérienne.



Figure 5.11 : identification de *Escherichia coli* par système api 20E

Après l'ajout de réactifs pour les capsules TDA indole et VP les résultats ont été observés (figure 5.11). Les réactions biochimiques montrent ces résultats suivants

- Résultats positifs : LDC ODC IND GLU MAN SOR RHA SAC MEL et ARA, Ces résultats indiquent une activité enzymatique ou fermentative positive pour les substrats correspondants.
- Résultats négatifs pour ONPG ADH CIT H₂S URE TDA GEL INO et AMY aucune activité détectée pour ces tests, ce qui traduit l'absence de métabolisme des substrats concernés.

L'essai effectué selon **atlas et al. (1995)** en conformité avec la société française de fabrication (BioMarieux).

Afin de mieux interpréter les résultats biochimiques obtenus à l'aide de la galerie api 20 E il est essentiel de comprendre la signification de chaque test utilisé. Chaque capsule de la galerie contient un substrat spécifique permettant d'évoluer une activité propre à la bactérie étudiée (tableau 5.4).

Tableau 5.4 : tableau récapitulatif des réactions biochimiques de l'api 20E

Code de test résultats négatifs résultats positifs résultats				
β -galactosidase	ONPG	Incolore	Jaune.	-
Arginine dihydrolase	ADH	Jaune	Rouge-orange	-
Lysine décarboxylase	LDC.	Jaune	Rouge-orange	+
Ornithine décarboxylase	ODC	Jaune	Rouge-orange	+
Citrate	CIT	Jaune	Vert-bleu	-
Sulfure d'hydrogène	H ₂ S	Incolore	Sédiments noirs	-
Uréase	URE	Jaune	Rouge-orange	+
Tryptophane désaminase	TDA	Jaune	Marron foncé	-
Indole	IND	Légèrement jaune	Halo rouge	+
Voges-Proskauer	VP	Incolore.	Rose-rouge	-
Gélatinase	GEL.	Pas de pigments	Pigments noirs	-
Glucose	GLU	Bleu	Jaune	+
Mannitol	MAN	Bleu	Jaune	+
Inositol	INO	Bleu	Jaune.	-
Sorbitol	SOR	Bleu	Jaune.	+
Rhamnose	RHA	Bleu	Jaune.	+
Saccharose	SAC	Bleu	Jaune	+
Melobiose	MEL	Bleu	Jaune	+
Amygdaline	AMY	Bleu	Jaune	-
Arabinose	ARA	Bleu	Jaune	+

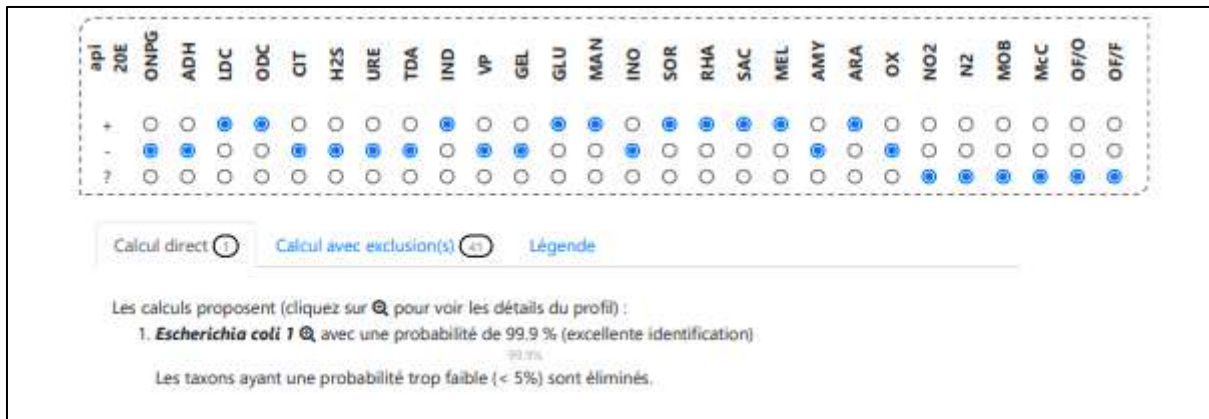


Figure 5.12: Identification bactérienne par api 20e à l'aide du logiciel UBPM le Lab

Suite à l'analyse de l'api 20E à l'aide du logiciel UBPM le Lab (figure 5.12) :

Les résultats biochimiques observés à partir de la galerie API 20E permettent d'identifier la souche testée comme étant *Escherichia coli*, avec une probabilité de 99,9 %, un pourcentage aussi élevé correspond à une identification excellente ce qui confirme que la souche testée est presque certainement s'agit de *Escherichia coli*.

5.8.2 Galerie api STAPH

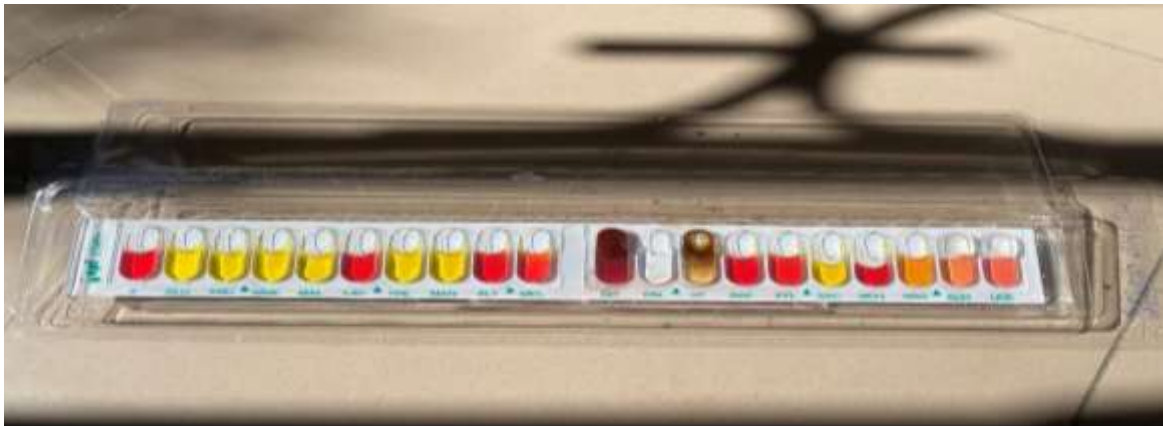


Figure 5.13 : Résultats des tests biochimiques galerie api STAPH

Après une incubation à 37°C pendant 24h suivie de l'ajout des réactifs spécifiques aux cupules de la galerie api STAPH, l'observation des réactions a été réalisée (figure 5.13). Des réactions positives et négatives ont été révélées.

- Les réactions positives : GLU, FRU, MNE, MAL, TRE, MAN, NIT, VP, SAC, NAG, ADH et URE
- Les réactions négatives : LAC, XLT, MEL, RAF, XYL, MDG

La souche étudiée a été soumise à une identification par le système UBPM le LAB (figure 5.14), les résultats indiquent une forte probabilité de 79,5% pour *Staphylococcus aureus* elle est considérée comme fortement fiable.

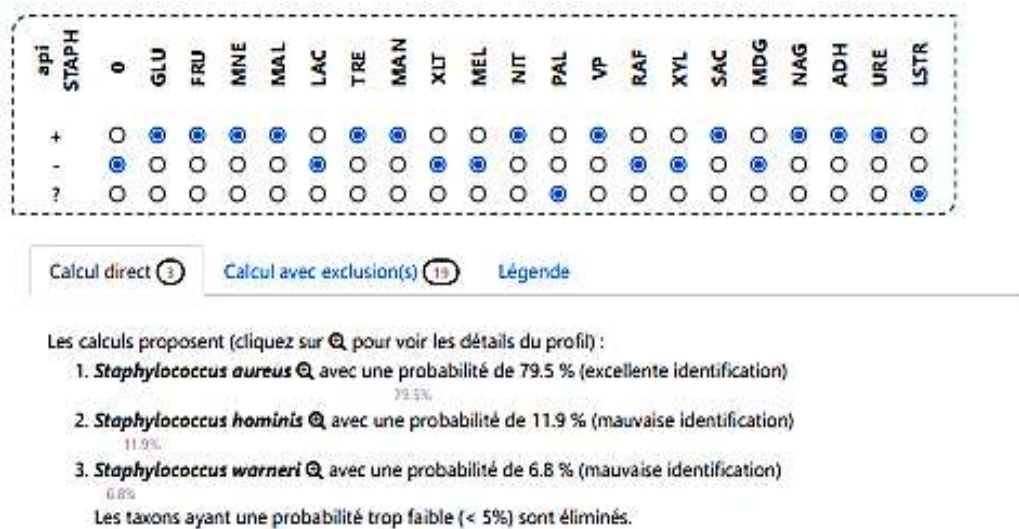


Figure 5.14 : Identification bactérienne par api STAPH à l'aide du logiciel UBPM le Lab

Toutefois, le test PAL (phosphatase alcaline) élément clé pour la confirmation mais elle n'a pas pu être interprétée en raison de l'absence du réactif correspondant

Ce résultat est basé sur la comparaison du profil biochimique obtenu avec une base de données de référence (Tableau 5.5).

Tableau 5.5 : tableau récapitulatif des réactions biochimiques de l'api STAPH

	Code de test	résultats négatifs	résultats positifs	résultats
Aucun	0	Incolore	/	-
Glucose	GLU	Rouge	Jaune	+
Fructose	FRU	Rouge	Jaune	+
Mannose	MNE	Rouge	Jaune	+
Maltose	MAL	Rouge	Jaune	+
Lactose	LAC	Rouge	Jaune	-
Trehalose	TRE	Rouge	Jaune	+
Mannitol	MAN	Rouge	Jaune	+
Xylitol	XLT	Rouge	Jaune	-

Mélibiose	MEL	Rouge	Jaune	-
Nitrate	NIT	Incolore	Rouge	+
Naphtyl-phosphate	PAL	Incolore	Violet	/
Voges-prausker	VP	Incolore	Rose	+
Raffinose	RAF	Rouge	Jaune	-
Xylose	XYL	Rouge	Jaune	-
Saccharose	SAC	Rouge	Jaune.	+
Methyl- α D-glucosamine	MDG	Rouge	Jaune	-
N-acetyl-glucosamine	NAG	Rouge	Jaune	+
Arginine	ADH	Jaune	Rouge	+
Uree	URE	Jaune	Rouge	+

5.9 Résultat de l'antibiogramme

5.9.1 *Escherichia coli*

L'antibiogramme réalisé sur gélose Mueller-Hinton a révélé que la souche *Escherichia coli* présente une résistance à la quasi-totalité des antibiotiques testés (figure 5.17). Ces antibiotiques appartiennent à des différentes familles notamment beta-lactamine quinolone céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération carbapénème.

Ce profil suggère que la souche est multirésistante (MDR), c'est-à-dire qu'elle est résistante à plusieurs classes d'antibiotiques.

La diversité des familles d'antibiotiques concernées par cette résistance suggère une acquisition a plusieurs mécanismes de résistance.

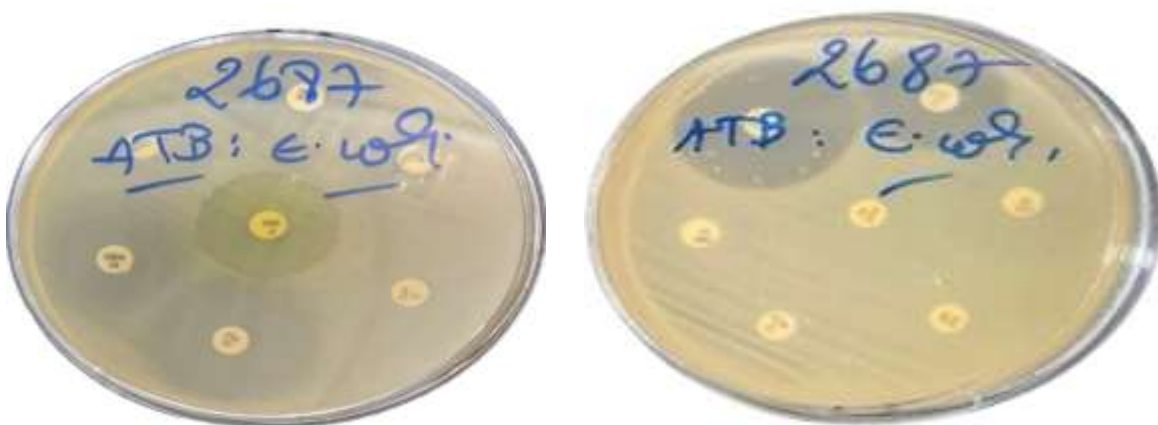


Figure 5.15 : Résultats de l'antibiogramme d'*E. coli* (Photo originale)

Les résultats d'antibiogramme effectué sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 5.6 : Profil de sensibilité aux antibiotiques d'*Escherichia coli*

	LES ANTIBIOTIQUES												
	CFM	CIP	FOT	AMP	AUG	KZ	COT	FOX	AK	GEN	NA	IPM	F
Diamètre	6	6	25	6	6	6	6	17	6	25	6	25	20
Interprétation	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S

R: resistant S: sensible I: intermédiaire

En résumé, l'analyse des diamètres des zones d'inhibition obtenus lors de l'antibiogramme a révélé une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques (tableau 5.6).

Selon les critères interprétatifs définis par le **CLSI (2022)**, cette souche peut être classée comme multirésistante (MDR).

5.9.2 *Staphylococcus aureus*

L'antibiogramme réalisé sur l'isolat de *Staphylococcus aureus* a révélé une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques (figure 5.16), notamment Streptogramines, Fluoroquinolones, Bêta-lactames, Macrolides...etc. Cette résistance étendue témoigne d'un phénotype multirésistant (tableau 5.7).

Ce type de souche limite considérablement les options thérapeutiques et souligne l'importance d'une surveillance stricte.



Figure 5.16 : résultats de l'antibiogramme de *S. aureus* (Photo originale)

Les résultats des antibiogrammes effectués sont illustrés dans les tableaux suivants :

Tableau 5.7 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus*

	LES ANTIBIOTIQUES												
	P	CIP	PT	TE	FC	LE	GEN	FOX	AK	E	DA	OFX	COT
Diamètre	6	6	6	6	28	6	16	24	6	6	6	6	23
Interprétation	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S

R: resistant S: sensible I: intermédiaire

L'analyse des diamètres des zones d'inhibition extraits des recommandations du CASFM/EUCAST 2020 a révélé une résistance à au moins cinq familles d'antibiotiques différentes, ce qui permet de la classer comme multirésistante, conformément à la définition établie.

S. aureus et *E. coli* sont parmi les pathogènes les plus redoutables, responsables de maladies graves, dont de nombreuses infections nosocomiales. Ces bactéries possèdent une remarquable capacité à disséminer des gènes de résistance aux antibiotiques. Elles sont qualifiées de multirésistantes (MDR) lorsqu'elles sont insensibles à au moins trois classes différentes d'antibiotiques (Gan, C., et al, 2023 ; Saudi, B., et al, 2024).

L'étude réalisée par Saudi, B., et collaborateurs en 2024, montre que toutes les souches cliniques isolées lors de leur recherche ont des profils de résistance similaires à ceux décrits dans diverses études menées en Algérie et à l'étranger, ces résultats concordent avec ceux que nous avons obtenus.

5.10 Résultats des tests de sensibilité aux huiles essentielles

5.10.1 Résultats des tests de sensibilité à l'huile d'origan

L'huile d'origan testée sur les 2 souches bactériennes multirésistantes *E. coli* et *S. aureus* a exhibé des résultats significatifs contre ces dernières, montrant ainsi une excellente activité antibactérienne aussi bien sur des bactéries gram positif que gram négatif (Tableaux 5.8 et 5.9 , Figures 5.17 et 5.18).

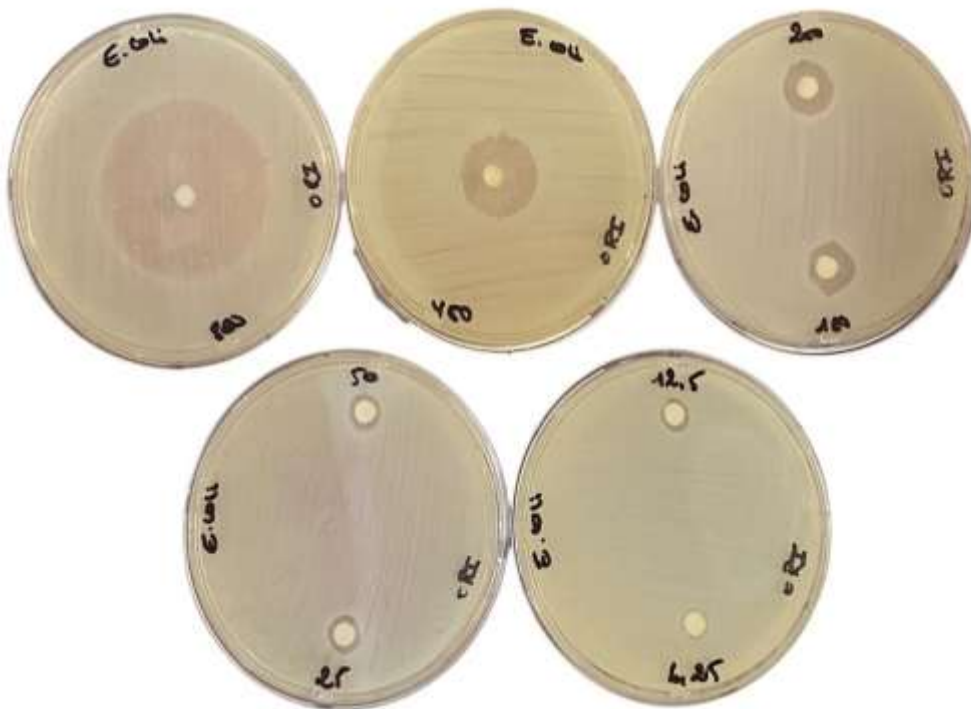


Figure 5.17 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* contre *Escherichia coli*

Tableau 5.8 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* (10 µl/disque) contre *Escherichia coli*, testée par la méthode de diffusion sur disque ; zones d'inhibition exprimées en mm (diamètre du disque (6mm) inclus).

<i>E. coli</i>	Dilutions d'HE d'<i>Origanum compactum</i>	T-	SM	½	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
	Concentrations (µl/ml)	0	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25
	Zones d'inhibitions (mm)	Aucune zone	38.33	20.33	15	11.33	8.66	7.33	7	6.66
	sensibilité	-	+++	+++	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-
	Résistant : (-), Intermédiaire : (+/-), Sensible : (+), Très sensible : (++) , Extrêmement sensible : (+++)									



Figure 5.18 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* contre *Staphylococcus aureus*

Tableau 5.9 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* (10 µl/disque) contre *Staphylococcus aureus*, testée par la méthode de diffusion sur disque ; zones d'inhibition exprimées en mm (diamètre du disque (6mm) inclus).

<i>S. aureus</i>	Dilutions d'HE d'<i>Origanum compactum</i>	T-	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
	Concentrations (µl/ml)	0	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25
	Zones d'inhibitions (mm)	Aucune zone	65.67	46	22	12	6	6	6	6
	sensibilité	-	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
	Résistant : (-), Intermédiaire : (+/-), Sensible : (+), Très sensible : (++) , Extrêmement sensible : (+++)									

Les résultats ont révélé une activité antibactérienne notable de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (tableaux 5.8 et 5.9). La concentration maximale testée (800 µl/ml) a engendré les plus grandes zones d'inhibitions dont le diamètre est de 38.33 mm pour *E. coli* et 65.67 mm pour *S. aureus*, ce qui témoigne d'un puissant effet bactéricide de cette HE contre les deux souches bactériennes avec une sensibilité plus remarquable chez *S. aureus*. En diminuant la concentration, l'activité antibactérienne a également diminué, avec une zone d'inhibition de 11.33 mm et 12 mm respectivement, à 100 µl/ml, et aucune zone d'inhibition notable à 6,25 µl/ml pour les deux espèces testées.

Ces résultats indiquent une relation dose-réponse classique, où l'efficacité antibactérienne s'accroît avec la concentration de l'huile essentielle. Par ailleurs, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle d'origan a été évaluée à 100 µl/ml pour les deux souches, ce qui signifie que cette concentration est nécessaire pour bloquer complètement la croissance aussi bien de *Staphylococcus aureus* que *Escherichia coli* dans les conditions expérimentales examinées.

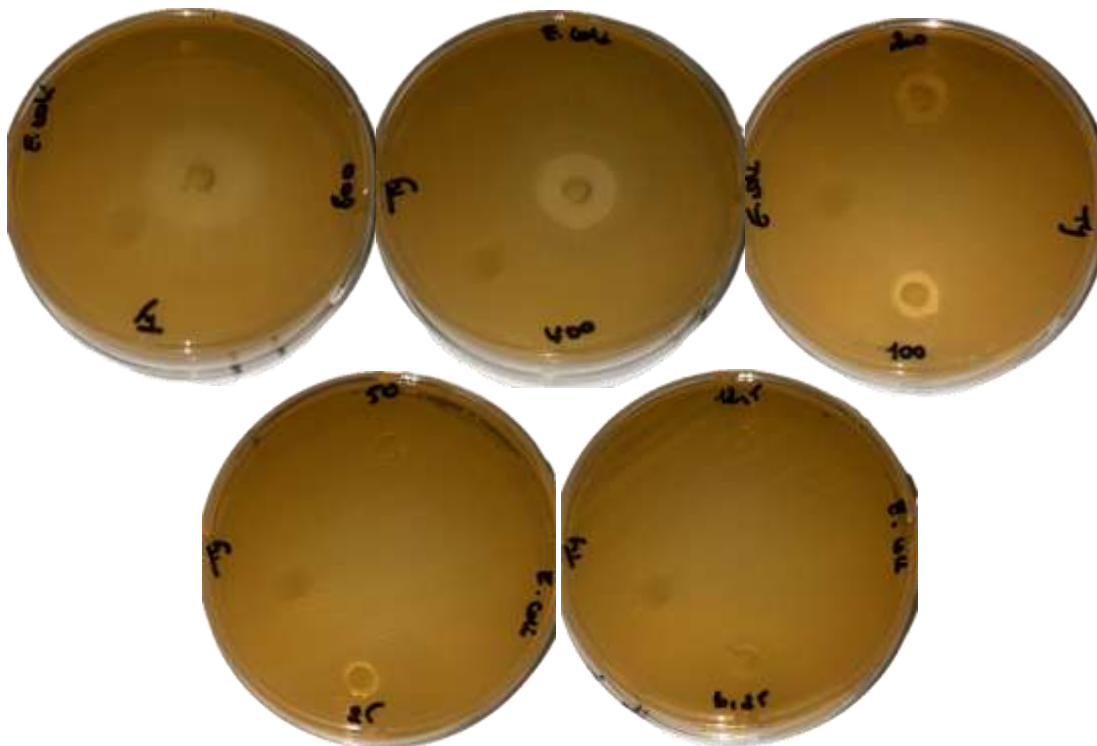
Nos résultats peuvent être confirmés en les comparant à une étude réalisée par **(Hayani, M., et al, 2022)** sur l'huile essentielle d'*Origanum compactum*, obtenue par hydrodistillation des feuilles et fleurs de cette plante, qui visait à évaluer la composition phytochimique, les paramètres de contrôle de qualité ainsi que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite des feuilles et fleurs d'*Origanum compactum*. L'analyse chromatographique (GC/MS) a permis d'identifier 35 composés volatils, parmi lesquels les principaux étaient le thymol, le carvacrol, l'o-cymène et le γ -terpinène, reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes. L'évaluation de l'activité antibactérienne, réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide, a mis en évidence un effet inhibiteur significatif de cette huile essentielle contre plusieurs souches bactériennes, notamment *Escherichia coli*, *E. pseudocoloides*, *E. vekanda*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (CMI = 0,35 µg/mL), ainsi que *Klebsiella pneumoniae* (CMI = 0,7 µg/mL). Ces résultats soulignent le potentiel thérapeutique de *O. compactum* dans la lutte contre les infections bactériennes, y compris celles causées par des souches résistantes.

Une étude similaire réalisée par **(Bouhdid, S ; et al 2008)**, confirme que L'huile essentielle d'*Origanum compactum* contient principalement du carvacrol, du thymol et du γ -terpinène. Elle a montré une forte activité antibactérienne in vitro contre plusieurs souches bactériennes dont des gram positifs et des gram négatifs, sauf pour le genre *Pseudomonas*, qui était résistante. Les CMI et CMB variaient de 0,0078 % à 0,25 % (v/v). Elle possède également une bonne activité antioxydante, liée à sa richesse en composés phénoliques.

L'huile essentielle d'origan, en raison de son principal composé, le carvacrol, démontre des effets antibactériens notables en perturbant la membrane cellulaire des bactéries, ce qui provoque une fuite des éléments cellulaires essentiels. Elle inhibe le cycle de l'acide tricarboxylique ainsi que certaines enzymes clés impliquées dans le métabolisme énergétique, ce qui freine la croissance bactérienne. Par ailleurs, elle interfère avec l'ADN en causant des dommages structurels. De plus, elle diminue l'expression du gène *pvl*, qui est lié à une virulence accrue, renforçant ainsi son efficacité contre les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA) **(Cui et al., 2019)**.

5.10.2 Résultats des tests de sensibilité à l'huile de thym à thymol

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* réalisée par la méthode des disques sur un milieu gélosé, a révélé un effet inhibiteur sur toutes les souches examinées, avec une sensibilité particulièrement marquée aux concentrations les plus élevées (800 µl/ml et 400 µl/ml) (tableaux 5.10 et 5.11, figures 5.19 et 5.20). En effet, une activité inhibitrice très prononcée a été notée vis-à-vis des deux souches bactériennes avec des zones d'inhibition mesurant 46 mm et 44 mm respectivement contre l'isolat clinique de



Staphylococcus aureus et 30 mm et 20 mm respectivement contre l'isolat clinique d'*E. coli*.

Figure 5.19 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* contre *Escherichia coli*

Une sensibilité notable est également observée pour les dilutions allant jusqu'à 50 µl/ml avec une zone d'inhibition de 9mm sur l'ensemble des essais.

Tableau 5.10 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (10 µl/disque) contre *Escherichia coli*, testée par la méthode de diffusion sur disque ; zones d'inhibition exprimées en mm (diamètre du disque (6mm) inclus).

<i>E. coli</i>	Dilutions d'HE de <i>Thymus vulgaris</i>	T-	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
	Concentrations (µl/ml)	0	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25
	Zones d'inhibitions (mm)	Aucune zone	30	20	14	11	9	8	7	7
	sensibilité	-	+++	+++	+	+	+	+/-	+/-	+/-
	Résistant : (-), Intermédiaire : (+/-), Sensible : (+), Très sensible : (++) , Extrêmement sensible : (+++)									

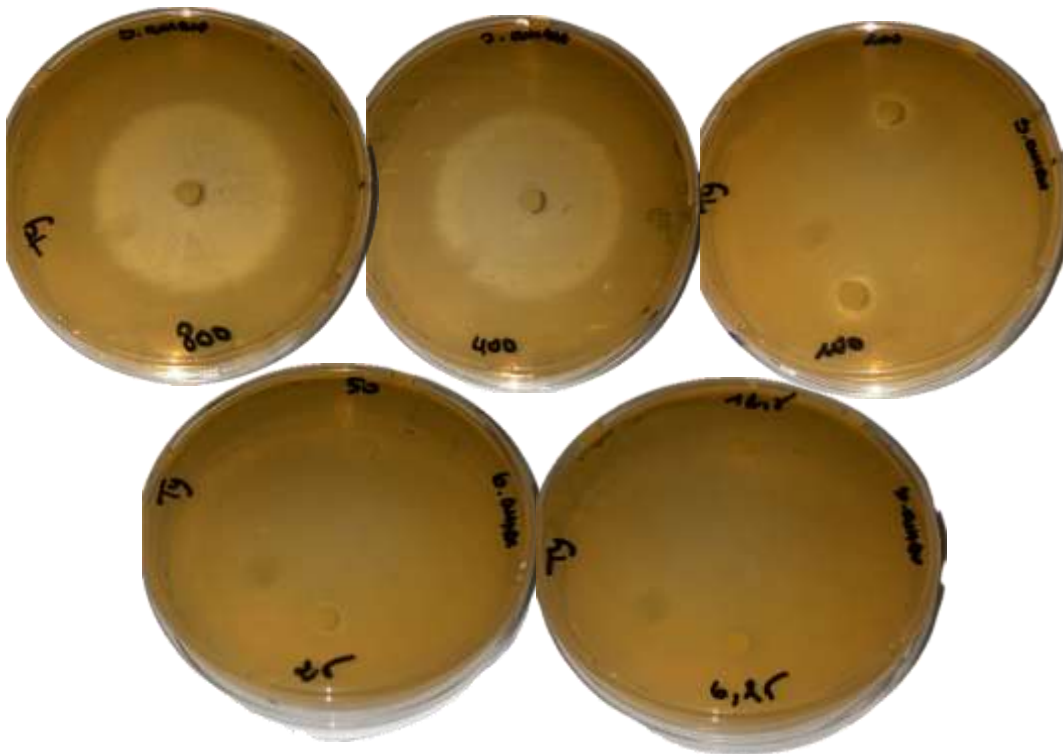


Figure 5.20 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* contre *Staphylococcus aureus*

D'après ces données regroupées dans le tableau 5.11, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle du thym a thymol vis-à-vis d'*Escherichia coli* ainsi que *Staphylococcus aureus* est évaluée à une plage entre 100 et 50 µl/ml. Cette plage de concentration est celle requise pour bloquer complètement la prolifération des bactéries dans les conditions expérimentales mises en œuvre.

Tableau 5.11 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (10 µl/disque) contre *Staphylococcus aureus*, testée par la méthode de diffusion sur disque ; zones d'inhibition exprimées en mm (diamètre du disque (6mm) inclus).

S. aureus	Dilutions d'HE de <i>Thymus vulgaris</i>	T-	SM	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
	Concentrations (µl/ml)	0	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25
	Zones d'inhibitions (mm)	Aucune zone	46	44	14.33	10	9	8	8	6
	sensibilité	-	+++	+++	+	+	+	+/-	+/-	-
	Résistant : (-), Intermédiaire : (+/-), Sensible : (+) , Très sensible : (++) , Extrêmement sensible : (+++)									

Une recherche effectuée par (Cheurfa, M., et al, 2013) concernant l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* contre cinq bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*) responsables de gastroentérites a révélé que cette dernière possède une activité antibactérienne significative vis-à-vis des souches testées. Ces résultats sont en accord avec ceux de notre étude, confirmant ainsi l'action antibactérienne de l'huile de thym tant contre les gram-positifs (*S. aureus*) que les gram-négatifs (*E. coli*). La composition chimique de l'huile de *Thymus vulgaris* a été examinée. Les principaux composants identifiés sont le carvacrol et le thymol, auxquels cette activité est attribuée.

Des recherches similaires ont montré que les huiles essentielles des espèces de thymus présentent une activité antibactérienne significative contre toutes les bactéries testées, comme le démontre l'étude d'Amassmoud, O., et al en 2023. Ces espèces contiennent de fortes concentrations de monoterpènes isomériques bioactifs (carvacrol et thymol), qui sont responsables de l'efficacité des huiles de thymus, grâce à leur structure chimique caractérisée par la présence d'un groupe hydroxyle et leur effet synergique lorsqu'elles sont appliquées ensemble.

Cette huile exerce son activité principalement par l'altération de la membrane cellulaire, en particulier de sa perméabilité, ce qui peut entraîner des pertes anormales d'ions, voire de macromolécules. Le traitement de *Staphylococcus aureus* avec l'huile essentielle de thym provoque une perte d'ions potassium par la bactérie ainsi qu'une inhibition de sa respiration. Concernant *Escherichia coli*, des effets délétères ont été observés sur l'homéostasie du potassium ainsi que sur la respiration dépendante du glucose. Ces résultats suggèrent un impact néfaste de l'huile essentielle sur l'intégrité et les fonctions membranaires des micro-organismes (Cheurfa, M., et al, 2013).

Ermenlieva et al (2025) ont examiné l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'origan (*Origanum vulgare L.*) et de thym (*Thymus vulgaris L.*) contre sept souches microbiennes cliniquement pertinentes, incluant des bactéries à Gram positif dont *Staphylococcus aureus*, à Gram négatif dont *Escherichia coli*, ainsi que la levure *Candida albicans*. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC) a montré que le carvacrol est

le principal composé de l'huile d'origan, tandis que le thymol est dominant dans l'huile de thym. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) ont été établies pour chaque souche. L'huile d'origan a démontré une activité antimicrobienne plus forte, en particulier contre les bactéries à Gram négatif telles que *E. coli* et *P. aeruginosa* contrairement à notre étude où l'huile d'origan malgré son activité significative contre *E. coli*, mais cette dernière s'est montrée plus efficace vis-à-vis de *S. aureus*. En revanche, l'huile de thym s'est avérée plus efficace contre les bactéries à Gram positif, ce qui confirme les résultats obtenus dans notre étude. Ces résultats valident le potentiel thérapeutique de ces huiles essentielles en tant qu'agents antimicrobiens naturels, pouvant être utilisés seuls ou en association avec des antibiotiques conventionnels, ouvrant ainsi des perspectives intéressantes dans la lutte contre la résistance bactérienne et la conservation des aliments.

Il est bien connu que les bactéries à Gram positif montrent généralement une sensibilité accrue aux huiles essentielles par rapport aux bactéries à Gram négatif. Cette distinction peut être attribuée à la composition de leur paroi cellulaire : les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe complexe, rigide et riche en lipopolysaccharides (LPS), ce qui entrave la diffusion des composés hydrophobes présents dans les huiles essentielles. En revanche, les bactéries à Gram positif n'ont pas cette membrane externe ; elles sont entourées d'une épaisse couche de peptidoglycane, qui, bien que solide, demeure suffisamment perméable pour permettre le passage de petites molécules antimicrobiennes. Par ailleurs, la présence d'extrémités lipophiles d'acide lipoteichoïque dans leur membrane pourrait faciliter l'entrée des composants hydrophobes des huiles essentielles (Lupia, C., et al, 2024).

5.11 Résultats des tests de synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques

Dans le cadre de notre étude, nous avons évalué l'effet synergique de l'huile essentielle d'origan (*Origanum compactum*), ainsi que celle du thym (*Thymus vulgaris*) en association avec différentes classes d'antibiotiques pour chacune des deux souches testées.

L'objectif de cette démarche était de déterminer si cette association pouvait entraîner une synergie permettant d'améliorer l'efficacité antibactérienne contre les souches multirésistantes d'*Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*.

5.11.1 Résultats de l'interaction de l'huile d'origan avec les antibiotiques

Dans le cadre de notre étude, deux antibiotiques ont été testés en combinaison avec l'HE d'*origanum compactum* pour chacune des deux souches : NA : acide nalidixique (**Quinolones** 1^{ere} génération) et CIP : ciprofloxacine (Fluoroquinolones 2^{eme} génération) pour *Escherichia coli*, érythromycine (Macrolides) et cefoxitine (**Céphamycines** : sous-groupe des **céphalosporines**, famille des **β-lactamines**) pour *staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus après incubations sont illustrés dans les figures 5.21 et 5.22, et les diamètres des zones d'inhibitions mesurés sont détaillés dans les tableaux suivants :

Tableau 5.12: Résumé des résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle d'*Origanum compactum* et les antibiotiques testés contre *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*

Concentrations de l'huile d' <i>Origanum compactum</i> (µl/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la combinaison HE+ATB			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	NA	CIP	E	OF
200	13.33	12.66	24	25
100	8.33	7.33	13	14
50	7.33	7	9	12

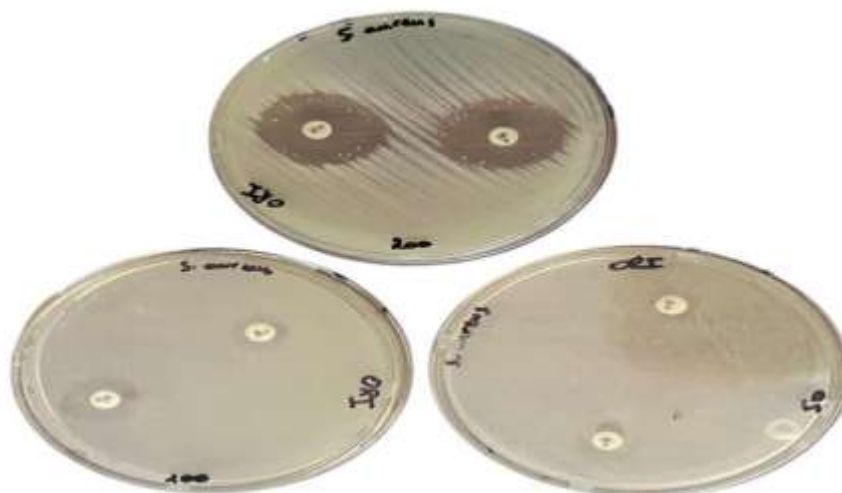


Figure 5.21 : résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle d'*origanum compactum* et les antibiotiques testés contre *Staphylococcus aureus*



Figure 5.22 : résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle d'*Origanum compactum* et les antibiotiques testés contre *Escherichia coli*

La détermination du type d'interaction entre les antibiotiques testés et l'huile d'origan nécessite la comparaison des diamètres de diverses zones d'inhibition, à savoir ceux de l'HE seule, de la combinaison ATB/HEs et l'addition du diamètre ATB+HE (tableaux 5.13 et 5.14).

NB : Les souches utilisées dans notre étude sont résistantes à tous les antibiotiques testés ils ne génèrent donc aucune zone d'inhibition notable, et n'apportent donc aucun effet à l'addition des diamètres HE+ATB

Tableau 5.13 : Résultats de l'interaction de l'huile d'*Origanum compactum* et antibiotiques (NA et CIP) ainsi que les valeurs de l'addition ATB+HE pour *Escherichia coli*

<i>E. coli</i>	Concentrations de l'huile d' <i>Origanum compactum</i> (µl/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
		Association ATB/HE		Addition ATB+HE		HE seule
		NA	CIP	NA	CIP	
200	13.33	12.66	15	15	15	
100	8.33	7.33	11.33	11.33	11.33	
50	7.33	7	8.66	8.66	8.66	

Le tableau 5.13 illustre les résultats obtenus grâce à l'utilisation de trois concentrations (200, 100 et 50µl/ml) de l'huile essentielle de l'origan en combinaison avec l'acide nalidixique ainsi que la ciprofloxacine dans le cas d'*E. coli* ainsi que les valeurs de l'addition des diamètres des zones d'inhibition ATB+HE. En comparant les diamètres des disques d'antibiotiques associés à l'huile essentielle et ceux des disques ATB+HE, nous observons que le diamètre des combinaisons est nettement inférieur à celui des additions pour notre souche clinique concernant les deux antibiotiques testés au niveau des trois concentration d'HE utilisées.

Une diminution d'environ 1.67 mm est observée pour la plus forte concentration concernant l'acide Nalidixique suivie d'une diminution de 3 mm pour la concentration de 100µl/ml et d'1.33mm pour celle de 50µl/ml. Le diamètre de la combinaison ATB/HE est alors nettement inférieur à celui de l'addition ATB+HE.

Un effet similaire est observé avec la ciprofloxacine ou le diamètre de l'addition ATB+HE (ou de l'huile essentielle seule) est nettement inférieur à celui de leur association avec des différences de 2.34 mm, 4 mm et 1.66 mm respectivement pour les trois concentrations de l'HE (200, 100 et 50µl/ml).

Cette diminution illustre un effet antagoniste de l'huile d'origan sur les deux antibiotiques, avec une intensité plus notable à 100µl/ml. Ce phénomène peut s'expliquer par la composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*. Il est suggéré que certains composants de l'huile peuvent inhiber les éléments chimiques des antibiotiques, le cas inverse peut également avoir lieu ou certains composants des antibiotiques peuvent affecter négativement l'action antibactérienne de l'HE, réduisant ainsi la zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique combiné à cette dernière et diminuant l'effet antibactérien.

Cet effet pourrait s'expliquer, d'une part, par la faible quantité d'huile essentielle administrée (10 μ l), probablement insuffisante pour exercer un impact plus marqué sur notre souche dotée d'une résistance assez marquée. D'autre part, il est possible qu'il y ait eu un manque d'interaction entre les composés de l'huile essentielle et les antibiotiques utilisés. De plus, la nature multirésistante des souches testées pourrait également avoir contribué à l'effet antagoniste observé. En effet, l'activité antibactérienne limitée de l'huile essentielle pourrait ne pas avoir permis une perturbation suffisante de la paroi bactérienne, réduisant ainsi l'efficacité de pénétration et d'action de l'antibiotique.

Une recherche réalisée par (Van Vuuren SF., et al, 2009) a examiné les interactions in vitro entre diverses huiles essentielles (*Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* et *Rosmarinus officinalis*) et des antimicrobiens conventionnels (ciprofloxacine et amphotéricine B) lorsqu'ils sont utilisés en association. Les résultats indiquent que la plupart des associations avec la ciprofloxacine contre *Staphylococcus aureus* présentent des profils antagonistes. En ce qui concerne *Klebsiella pneumoniae*, les effets variaient en fonction des proportions utilisées : certaines combinaisons démontraient une synergie, tandis que d'autres étaient additives ou antagonistes. La combinaison la plus prometteuse a été identifiée entre *R. officinalis* et la ciprofloxacine contre *K. pneumoniae*, affichant un effet synergique significatif. En revanche, les associations des huiles essentielles avec l'amphotéricine B contre *Candida albicans* ont principalement révélé des effets antagonistes.

L'étude de (Onofre, S., et al, 2013) avait pour objectif d'évaluer l'impact de l'huile essentielle de *Baccharis coridifolia* sur l'activité de divers antibiotiques (ampicilline, céphalotine, chloramphénicol, gentamicine et tétracycline) en utilisant le test de diffusion sur disque. Les résultats ont révélé que les effets variaient en fonction de l'antibiotique employé et de la souche bactérienne testée (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*).

La synergie la plus marquée a été observée avec la céphalotine pour les deux souches, en revanche, l'ampicilline et le chloramphénicol ont présenté des effets antagonistes pour les deux bactéries. La gentamicine a montré un effet antagoniste avec *S. aureus*, mais un effet indifférent avec *E. coli*, concernant la tétracycline, elle a eu un effet indifférent sur *S. aureus* mais synergique sur *E. coli*.

Ces résultats présentent une certaine similarité avec ceux obtenus lors de notre étude, et confirment alors la possibilité d'obtention d'un effet antagoniste entre les HE et les antibiotiques selon la bactérie traitée, l'antibiotique et l'huile essentielle utilisés ainsi que leurs concentrations.

Tableau 5.14 : Résultats de l'interaction de l'huile d'*Origanum compactum* et antibiotiques (E et OF) ainsi que les valeurs de l'addition ATB+HE pour *Staphylococcus aureus*

<i>S. aureus</i>	Concentrations de l'huile d' <i>Origanum compactum</i> (μ l/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
		Association ATB/HE		Addition ATB+HE		HE seule
		E	OF	E	OF	
	200	24	25	22	22	22
	100	13	14	12	12	12
	50	9	12	6	6	6

Le tableau 5.14 met en évidence les résultats obtenus grâce à l'utilisation de trois concentrations (200, 100 et 50 µl/ml) de l'huile essentielle d'origan, en combinaison avec l'érythromycine et la cefoxitine, dans le cas de *S. aureus*, ainsi que les valeurs de l'addition des diamètres des zones d'inhibition ATB+HE.

En comparant les diamètres des zones d'inhibition des disques d'antibiotiques associés à l'huile essentielle, de l'huile essentielle seule, des antibiotiques seuls et ceux de l'addition ATB+HE, nous observons que le diamètre des combinaisons est nettement supérieur à celui de l'addition HE+ATB ainsi que ceux de l'HE seule pour notre souche de *S. aureus* multirésistante, aussi bien pour l'érythromycine que la cefoxitine aux trois concentrations d'huile essentielle utilisées.

Une synergie remarquable a été constatée entre l'huile essentielle d'origan (*Origanum compactum*) et la cefoxitine. En effet, l'association de ces deux agents à une concentration de 200 µl/ml d'huile a provoqué une augmentation significative de la zone d'inhibition, avec une différence de 3 mm par rapport à l'addition des effets individuels, ce qui traduit un effet synergique prononcé. Cette synergie se maintient à des concentrations plus faibles, avec des différences de 2 mm et 6 mm pour les dilutions suivantes, respectivement, confirmant un effet combiné bénéfique, bien que non linéaire.

De manière similaire, l'érythromycine associée à l'huile essentielle d'origan présente également un effet synergique, bien que moins marqué. Les différences obtenues en soustrayant les diamètres HE/ATB de ceux de l'addition HE + ATB sont de 2 mm à 200 µl/ml, 1 mm à 100 µl/ml, et atteignent 3 mm à 50 µl/ml. Ces résultats suggèrent une synergie dose-dépendante inversée, où l'effet synergique semble se renforcer à la concentration la plus faible testée, ce qui pourrait être dû à des interactions spécifiques entre les composés actifs de l'HE et les molécules de l'antibiotique à différentes concentrations.

Ce phénomène pourrait être attribué à la composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*. En effet, certains composants de l'huile pourraient agir en potentialisant l'activité des antibiotiques, par exemple en modifiant la perméabilité membranaire bactérienne ou en inhibant des mécanismes de résistance, ce qui favorise une meilleure pénétration et efficacité des molécules antibiotiques, entraînant ainsi une augmentation de la zone d'inhibition observée autour des disques d'antibiotiques combinés avec l'huile d'origan, engendrant une meilleure activité antimicrobienne.

Drioiche, A. (2024) a mis en évidence des interactions synergiques entre les huiles essentielles d'origan et certains antibiotiques contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les travaux de **Wendy et al. (2012)** ont montré des interactions synergiques significatives lorsque les huiles essentielles d'*Origanum* étaient associées à des antibiotiques contre ces deux espèces. Des résultats viennent corroborer ces observations en montrant que les huiles essentielles d'*Origanum*, notamment celles d'*O. compactum*, ont un effet synergique lorsqu'elles sont combinées à l'amoxicilline contre *S. aureus* ainsi la ciprofloxacine contre *P. aeruginosa*, *E. cloacae* et *K. pneumoniae*, ces résultats sont en adéquation avec notre étude.

Une étude similaire réalisée par **Magi G, et al (2015)** vient confirmer nos résultats. Dans cette recherche, les auteurs ont examiné l'activité antibactérienne in vitro de diverses huiles essentielles, y compris celles d'*Origanum vulgare* (origan) et de *Thymus vulgaris* (thym),

contre 32 souches de streptocoques du groupe A (GAS) résistantes à l'érythromycine, isolées chez des enfants souffrant de pharyngotonsillite. Les tests de synergie (dilution en damier et courbes de destruction bactérienne) ont mis en évidence une synergie significative entre le carvacrol et l'érythromycine, entraînant une réduction de la CMI de l'érythromycine allant jusqu'à 2048 fois. Une synergie (indice FIC $\leq 0,5$) a été constatée dans 21 des 32 souches, et cette synergie était hautement significative ($p < 0,01$) dans les souches montrant une résistance uniquement en présence d'érythromycine. La synergie a été validée par des courbes de destruction bactérienne sur 24 heures dans 17 des 23 souches testées. Ces résultats indiquent que le carvacrol, que ce soit seul ou en association avec l'érythromycine, pourrait représenter une option thérapeutique prometteuse contre les GAS résistants aux macrolides.

5.11.2 Résultats de l'interaction de l'huile de thym à thymol avec les antibiotiques

La détermination du potentiel synergétique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est réalisée en associant cette dernière à trois antibiotiques différents pour chacune des souches utilisées : E : érythromycine, OF : cefoxitine, et PT : pristinamycine dans le cas de *S. aureus*, NA : acide nalidixique, AMC : Augmentin et SXT : Cotrimoxazole pour *E. coli* (figures 5.2 et 5.25, tableau 5.15).



Figure 5.23 : résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et les antibiotiques testés contre *Staphylococcus aureus*

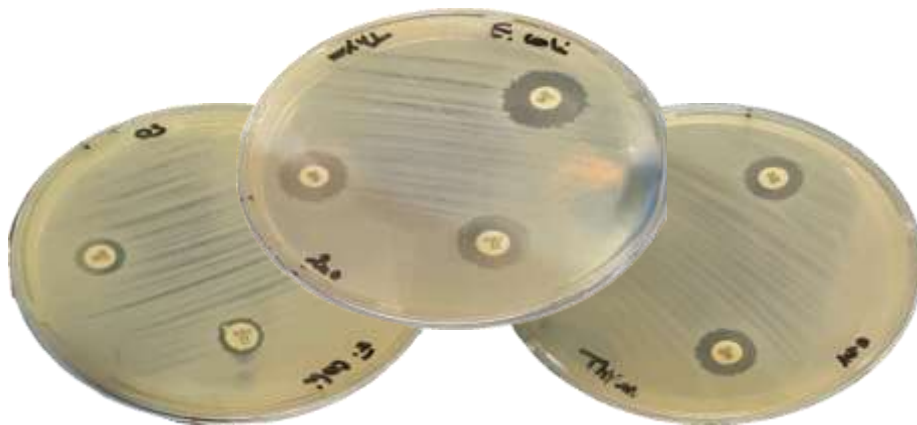


Figure 5.24 : résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et les antibiotiques testés contre *Escherichia coli*

Tableau 5.15 : Résumé des résultats des tests de synergie entre l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et les antibiotiques testés contre *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*

Concentrations de l'huile de <i>Thymus vulgaris</i> (µl/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la combinaison HE+ATB					
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	NA	SXT	AMC	E	OF	PT
200	15	17	15	38	38	35
100	11	11	11	10	13	13
50	8.5	9	10	9.5	12	12

La détermination du type d'interaction entre les antibiotiques testés et l'huile de thym a thymol nécessite la comparaison des diamètres de différentes zones d'inhibition, à savoir ceux de l'HE seule, de la combinaison ATB/HEs et l'addition du diamètre ATB+HE (tableaux 5.16 et 5.17).

Tableau 5.16 : Résultats de l'interaction de l'huile de *Thymus vulgaris* et antibiotiques (NA, SXT, AMC) ainsi que les valeurs de l'addition ATB+HE pour *Escherichia coli*

<i>E. coli</i>	Concentrations de l'huile de <i>Thymus vulgaris</i> (µl/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
		Association ATB/HE			Addition ATB+HE			HE seule
		NA	SXT	AMC	NA	SXT	AMC	
200	15	17	15	14	14	14	14	
100	11	12	12	11	11	11	11	
50	9	9	10	9	9	9	9	

L'évaluation de l'interaction entre l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et trois antibiotiques, à savoir l'acide nalidixique (NA), le cotrimoxazole (SXT) et l'Augmentin (l'amoxicilline/acide clavulanique) (AMC), contre *Escherichia coli* révèle des effets variables en fonction des concentrations et des antibiotiques testés. À la concentration la plus élevée (200 µl/ml), une augmentation significative des diamètres des zones d'inhibition est observée lors des associations ATB/HE par rapport aux simples additions des diamètres ATB+HE. On constate une différence de +1 mm pour NA et AMC, ce qui indique une légère synergie. La différence atteint +3 mm dans le cas de SXT, suggérant une forte synergie. Ces résultats montrent qu'à cette concentration, l'huile essentielle de thym renforce de manière significative l'effet antibactérien, en particulier en association avec le cotrimoxazole.

À une concentration intermédiaire de 100 µl/ml, les différences sont positives avec une augmentation de 1mm concernant les antibiotiques SXT et AMC, suggérant une légère synergie. Cependant, la différence s'est avérée négative pour NA avec une diminution de 1mm ce qui illustre un léger effet antagoniste, suggérant que l'antibiotique, à cette dilution, pourrait perturber l'action antibactérienne de l'huile essentielle testée. Cela pourrait être lié à une interférence chimique entre certains composés de l'huile essentielle et les molécules actives des antibiotiques.

Enfin, à la concentration la plus faible (50 µl/ml), les résultats sont plus nuancés. Pour NA et SXT, la différence entre association et addition est de 0 mm, indiquant un effet nul, autrement dit une indifférence. En revanche, dans le cas d'AMC, une différence positive de +1 mm est notée, témoignant d'une synergie légère. Ces observations confirment que la concentration de l'huile essentielle joue un rôle déterminant dans la modulation de l'effet combiné avec les antibiotiques, et que certaines associations peuvent maintenir une activité synergique même à des concentrations plus faibles.

Tableau 5.17 : Résultats de l'interaction de l'huile de *Thymus vulgaris* et antibiotiques (E, OF, PT) ainsi que les valeurs de l'addition ATB+HE pour *Staphylococcus aureus*

<i>S. aureus</i>	Concentrations de l'huile de <i>Thymus vulgaris</i> (µl/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
		Association ATB/HE			Addition ATB+HE			HE seule
		E	OF	PT	E	OF	PT	
200	38	38	35	14.33	14.33	14.33	14.33	
100	10	13	13	10	10	10	10	
50	9.5	12	12	9	9	9	9	

Les résultats obtenus mettent en évidence une interaction remarquable entre l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et les antibiotiques érythromycine (E), ofloxacine (OF) et pristinamycine (PT) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. À la concentration la plus élevée testée (200 µl/ml), une synergie très marquée est observée. En effet, les diamètres des zones d'inhibition issus des associations ATB/HE dépassent largement ceux de l'addition des effets individuels. Les différences atteignent 23,67 mm pour l'érythromycine et l'ofloxacine, et 20,67 mm pour la pristinamycine. Cette amplification suggère une potentialisation très prononcée de l'effet antibactérien des antibiotiques par les composés actifs de l'huile de thym, probablement en raison de mécanismes d'altération de la perméabilité membranaire ou d'inhibition synergique de cibles métaboliques bactériennes.

À une concentration intermédiaire (100 µl/ml), les résultats montrent une synergie significative pour l'ofloxacine et la pristinamycine, avec une augmentation des diamètres de l'ordre de 3 mm par rapport aux valeurs attendues. En revanche, aucun effet synergique n'est observé avec l'érythromycine (différence nulle), traduisant une interaction qualifiée d'indifférente. Cela pourrait indiquer une dépendance de l'effet synergique vis-à-vis du type d'antibiotique, notamment en fonction de leur structure chimique ou de leur mode d'action.

Enfin, à la concentration la plus faible (50 µl/ml), une synergie légère est maintenue pour l'ofloxacine et la pristinamycine, avec des différences de 3 mm dans les deux cas. Concernant l'érythromycine, seule une très faible différence de 0,5 mm est notée, traduisant une quasi-absence d'interaction. Cette diminution progressive de l'effet synergique en fonction de la concentration d'huile essentielle suggère une dépendance dose-effet, confirmant l'importance de la concentration en composés actifs.

L'étude de (Drioiche, A., et al 2024) montre que la synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques constitue l'une des approches les plus récentes pour lutter contre la résistance

bactérienne . On parle d'effet synergique lorsque deux substances agissent mieux ensemble que séparément, ce qui se traduit par une inhibition observée du mélange supérieure à celle attendue des composés pris individuellement. La présence de multiples constituants antibactériens actifs et les interactions entre les différents composants des huiles sont responsables de ce phénomène de synergie. Ces interactions peuvent perturber les membranes internes des bactéries, augmenter la perméabilité des structures, inhiber la motilité microbienne, inhiber l'ATPase microbienne ou les pompes d'efflux. Elles peuvent également accroître la solubilité ou la disponibilité d'un ou plusieurs constituants de l'huile, ou agir sur différentes cibles, ce qui entraîne des effets antibactériens renforcés

Mayyas et al. (2021) ont montré que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, associée à la clindamycine, exerce une forte activité inhibitrice contre deux souches standards de *Staphylococcus aureus*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) réduites. Selon leurs conclusions, l'association d'un antimicrobien à une plante pourrait permettre de réduire la consommation d'antibiotiques et ainsi retarder l'apparition de résistances. Ces résultats sont en accord avec ceux de notre recherche. Par ailleurs, l'étude de **Aelenei et al. (2016)** a démontré que le thymol présente d'excellents effets synergiques avec la pénicilline contre *Escherichia coli*, une bactérie résistante à certains antibiotiques de la famille des β -lactamines.

Une autre recherche conduite par **Bastida-Ramírez, L. J., et al (2024)** a révélé que les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Lippia organoides* présentent une activité antibactérienne in vitro contre des souches d'*Escherichia coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu (ESBL). Les composés actifs, le thymol et le carvacrol, ont respectivement diminué la croissance bactérienne de 39,9 % et 70,4 %, avec des halos d'inhibition de 32 mm pour les deux huiles, les CMI variaient entre 632 et 940 $\mu\text{g/ml}$. Surtout, une synergie significative a été notée à faibles doses, entre les deux huiles essentielles ainsi qu'entre les huiles et l'ampicilline, ce qui met en évidence leur potentiel en tant qu'adjuvants pour renforcer l'efficacité des antibiotiques contre les bactéries multirésistantes.

Rosato et al. (2007) ont montré que la combinaison de substances médicinales en général, et d'antibiotiques en particulier, présente un grand intérêt, car elle permet de réduire les éventuels effets secondaires des traitements actuels en diminuant la dose de composé utilisée. **Wagner et Ulrich-Merzenich (2009)** ont précisé qu'un effet synergique résulte lorsque les constituants d'un mélange agissent sur des cibles différentes. En revanche, la combinaison de substances agissant sur la même cible du microorganisme engendre des effets antagonistes ou additifs.

Bien que la majorité des combinaisons soient favorables, certaines montrent un antagonisme, indiquant que l'association d'huiles essentielles avec des antibiotiques peut parfois réduire leur efficacité. Il est donc recommandé d'utiliser ces thérapies naturelles avec précaution, surtout en association avec des traitements antimicrobiens.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'utilisation irrationnelle des antibiotiques a favorisé l'émergence de bactéries résistantes telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, représentant une menace majeure pour la santé mondiale. Dans ce contexte, cette recherche vise à contribuer à la suppression de l'antibiorésistance en explorant les synergies entre des huiles essentielles d'*Origanum compactum* et de *Thymus vulgaris* et des antibiotiques commerciaux, tout en évaluant leur activité antibactérienne.

Les résultats obtenus, particulièrement encourageants, mettent en évidence le potentiel des huiles essentielles riches en thymol et carvacrol, notamment lorsqu'elles sont associées à des antibiotiques. Une meilleure compréhension de leurs profils phytochimiques, et en particulier des rôles spécifiques du thymol et du carvacrol, pourrait permettre d'approfondir nos connaissances sur leurs modes d'action. Ces huiles apparaissent ainsi comme des outils prometteurs dans les stratégies de lutte contre les infections et pourraient représenter un progrès majeur en matière de santé publique.

Au vu de ces résultats, la présence d'interactions synergiques entre les antibiotiques et les huiles essentielles (HE) est clairement confirmée, ce qui ouvre de nombreuses perspectives d'utilisation. Ces associations pourraient constituer une approche prometteuse pour lutter contre l'antibiorésistance des souches bactériennes, notamment en milieu hospitalier. Il serait ainsi pertinent de valoriser et de développer des solutions à base d'HE afin de renforcer l'efficacité des antibiotiques tout en réduisant leurs effets secondaires et le risque pour la santé des patients. Poursuivre ce type de recherche en explorant les huiles essentielles d'autres plantes locales, telles que la menthe, l'origan ou le thym, et en ajustant les concentrations, pourrait permettre de limiter l'utilisation excessive des antibiotiques et freiner la propagation de la résistance, en particulier dans les services de soins intensifs.

Les huiles essentielles (HE) ne résoudre probablement pas complètement les problèmes actuels de résistance aux antibiotiques, mais elles pourraient jouer un rôle dans la solution globale visant à réduire l'utilisation des antibiotiques. De nombreux composants des HE n'ont pas encore été testés quant à leur potentiel d'amélioration de l'efficacité des antibiotiques. Le mode d'administration sera un facteur important afin de garantir que les HE atteignent l'emplacement de l'infection bactérienne à des concentrations suffisamment élevées, déterminant ainsi l'efficacité des HE en combinaison avec les antibiotiques. De plus, les facteurs pouvant affecter l'efficacité des HE in vivo, par exemple la présence de mucus ou de protéines sériques, devraient être mieux documentés. Dans cet esprit, une application topique des HE semble être l'option la plus facilement envisageable et pourrait contribuer à une réduction de l'utilisation des antibiotiques pour les infections. Cependant, l'utilisation systémique des HE, bien que difficile, ne doit pas être exclue comme une application future.

Bibliographie

1. Abbas, A., Marihal, S. C., Mujeeb, M., Khan, M. A., & Aeri, V. (2016). Biofilm inhibition and virulence attenuation in drug-resistant *Staphylococcus aureus* by eugenol and thymol. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1056-7>
2. Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews of Infectious Diseases*, *10*(4), 677–678.
3. Aghababa, A. A., & Nadi, M. (2021). Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria: A review. *Environment*, *20*(23), 24–25.
4. Akualing, J. S., & Rejeki, I. P. S. (2016). Spectre antibactérien. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, *23*(1), 90–95.
5. Alwan, S., El Omari, K., Soufi, H., Zreika, S., Sukarieh, I., Chihib, N. E., Jama, C., & Hamze, M. (2016). Evaluation of the antibacterial activity of *Micromeria barbata* in Lebanon. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *19*(2), 321–327. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.962623>
6. Amassmoud, O., Abbad, I., Iriti, M., Hassani, L., Mezrioui, N., & Abbad, A. (2023). Antibacterial activity of essential oil combinations based on *Thymus broussonnetii*, and their synergism with some antibiotics. *Current Microbiology*, *80*(12), 398. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03510-x>
7. Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, *1*, 134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
8. Andremont, A., Corpet, D., & Courvalin, P. (1997). La résistance des bactéries aux antibiotiques. *Pour la Science*, *232*, 66–73.
9. Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *48*(Suppl. 1), 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
10. Arras, G., & Usai, M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four post-harvest citrus pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*, *64*(7), 1025–1029.
11. Asbahani, A.E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.A., Casabianca, H., Mousadik, A.E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F., & Elaissari, A. (2015). Huiles essentielles: de l'extraction à l'encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, *483*(1-2), 220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.06>
12. Bachiri, L., Echchegadda, G., Ibjibjen, J., & Nassiri, L. (2016). Étude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de lavande autochtones au Maroc: *Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L. *European Scientific Journal*.
13. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils: A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
14. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
15. Banquour, N. (2000). Étude de l'effet de thym (décoction) et de son huile essentielle sur l'évolution de la flore microbienne et quelques paramètres chimiques du smen, au cours de son élaboration (Thèse de doctorat). Université Cadi Ayad, Marrakech.
16. Barra, A. (2009). Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. *Natural Product Communications*, *4*(8), 1147–1154.
17. Bastida-Ramírez, L. J., Buendía-González, L., Mejía-Argueta, E. L., Sandoval-Cabrera, A., García-Fabila, M. M., Pavón-Romero, S. H., Padua-Ahumada, M., &

- Santillán-Benítez, J. G. (2024). *Lippia origanoides* and *Thymus vulgaris* essential oils synergize with ampicillin against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 12(8), 1702. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081702>
18. Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.018>
19. Benameur, Q., Gervasi, T., Pellizzeri, V., Pluchtová, M., Tali-Maama, H., et al. (2019). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, seule et en association avec le céfotaxime contre des souches multirésistantes d'Enterobacteriaceae productrices de blaESBL. *Natural Product Research*, 33(18), 2756–2759. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1466124>
20. Benayad, N., Ebrahim, W., Hakiki, A., & Mosaddak, M. (2012). Caractérisation chimique et évaluation insecticide de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* L. et *Mentha pulegium* L. cultivées au Maroc. *Études et Recherches Scientifiques. Chimie & Génie Chimique, Biotechnologie, Industrie Agroalimentaire*, 13(1), 27.
21. Benkada, M. (1990). Isolation des huiles essentielles de la menthe *suaveolens* Ehrh (Bous Domrane) de la région de Tlemcen et leur analyse par différentes méthodes chromatographiques : mise en évidence du composé majoritaire « la pulégone » (Mémoire de Magistère). Université de Tlemcen, pp. 42–76.
22. Benouda, A. (1982). Les propriétés antiseptiques des huiles essentielles de trois plantes médicinales marocaines : L'armoise blanche, le thym et l'eucalyptus (Thèse de doctorat en médecine). Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.
23. Benveniste, R., & Davies, J. (1973). Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(8), 2276–2280. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.8.2276>
24. Berkowitz, F. E., & Jerris, R. C. (2016). *Practical Medical Microbiology for Clinicians*. John Wiley & Sons.
25. Beylier-Maurel, M. F. (1976). Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.*
26. Bharadwaj, A., Rastogi, A., Pandey, S., Gupta, S., & Sohal, J. S. (2022). Multidrug-resistant bacteria: Their mechanism of action and prophylaxis. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2022/2291028>
27. Bharadwaj, A., Rastogi, A., Pandey, S., Gupta, S., & Sohal, J. S. (2022). Multidrug-resistant bacteria: Their mechanism of action and prophylaxis. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2022/2291028>
28. Bonnafous, C. (2013). *Traité scientifique d'aromathérapie : Aromatologie & aromachologie*. Éditions Dangles.
29. Bouhdid, S., Skali, S. N., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Amensour, M., & Abrini, J. (2008). Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African Journal of Biotechnology*, 7(10), 1563–1570. <http://www.academicjournals.org/AJB>
30. Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & Kameli, A. (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : Revue de littérature. *Revue Agrobiologia*, 9(3), 1653–1659.
31. Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>

32. Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Inhibition de la détection du quorum chez *Staphylococcus* spp. *Current Pharmaceutical Design*, 21(16), 2101–2108.
33. Brown, D. F., & Kothari, D. (1975). Comparaison de disques antibiotiques provenant de différentes sources. *Journal of Clinical Pathology*, 28(10), 779–783. <https://doi.org/10.1136/jcp.28.10.779>
34. Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales* (1re éd.). Tec & Doc, Lavoisier.
35. Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales* (2e éd.). Lavoisier.
36. Bruneton, J. (1995). *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales* (3e éd.). Lavoisier-Tec & Doc.
37. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
38. Bush, K. (2013). Prolifération et signification de cliniquement pertinentes β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277, 84–90. <https://doi.org/10.1111/nyas.12085>
39. Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibiteurs: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>.
40. Caballero, B., Trugo, L. C., & Finglas, P. M. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press.
41. Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104(6), 901–912. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00286-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-6)
42. Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! *Pharmactuel*, 2, 6–21.
43. CA-SFM. (2020). *Recommandations 2020 du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*. Société Française de Microbiologie (SFM), Paris.
44. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States*. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
45. Chadha, P., Katare, O. P., & Chhibber, S. (2016). Efficacité in vivo du cocktail phagique contre les infections causées par *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 99, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.001>
46. Charpentier, B. (1998). *Guide du préparateur en pharmacie*. Masson.
47. Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
48. Chen, P., Chen, X., Yu, W., Zhou, B., Liu, L., et al. (2022). Ciprofloxacin-induced stress alters key enzymes and intracellular metabolites in *Lactobacillus plantarum* DNZ-4. *Food Science and Human Wellness*, 11(2), 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.11.007>
49. Cheurfa, M., Allem, R., Sebahia, M., & Belhireche, S. (2013). Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites. *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0777-7>
50. Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>

51. Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—Present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
52. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (33rd ed.). CLSI supplement M100.
53. Cohen, N., & Karib, H. (2006). Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés : un réel problème de santé publique. *Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Les Technologies de Laboratoire*, 1, 5–9.
54. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). (2018). *CASFM/EUCAST: Société Française de Microbiologie* (Vol. 2).
55. Cornet, F. (1981). L'aromatogramme. *Phytomédecine*, 1–2, 109–117.
56. Cos, P., Vlietinck, A. J., Vanden Berghe, D., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>
57. Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130–135. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x>
58. Couderc, L. (2001). *Toxicité des huiles essentielles*. Université Paul Sabatier de Toulouse
59. Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
60. Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 1250–1318). American Society of Plant Physiologists.
61. Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. (2019). Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*, 139, 111498. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111498>
62. Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
63. Davis, B. D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological Reviews*, 51(3), 341–350. <https://doi.org/10.1128/membr.51.3.341-350.1987>
64. Degryse, A. C., Delpla, I., & Voinier, M. A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier Santé Environnement - IGS - EHESP*, 87. (Cité dans Bouguerra, A., 2011-2012)
65. Deschepper, R. (2017). *Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie* (Thèse de doctorat). Université libre de Bruxelles.
66. Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the era of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(7), 457–471. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.23>
67. Djilani, A., & Dicko, A. (2012). Les avantages thérapeutiques des huiles essentielles. In *Well-being and health* (Vol. 7, pp. 155–179). <https://doi.org/10.5772/25344>

68. Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Hernández-Allés, S., del Carmen Conejo, M., Pascual, A., Tomás, J. M., Albertí, S., & Benedí, V. J. (2003). Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3332–3335. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3332-3335.2003>
69. Doublet, B., Praud, K., Weill, F. X., & Cloeckert, A. (2012). Antibiorésistance et les flux de gènes. *Innovations Agronomiques*, 24, 79–90.
70. Drioiche, A., Baammi, S., Zibouh, K., Al Kamaly, O., Alnakhli, A. M., Remok, F., Saidi, S., Amaiaich, R., El Makhoukhi, F., Elomri, A., et al. (2024). A study of the synergistic effects of essential oils from *Origanum compactum* and *Origanum elongatum* with commercial antibiotics against highly prioritized multidrug-resistant bacteria for the World Health Organization. *Metabolites*, 14(4), 210. <https://doi.org/10.3390/metabo14040210>
71. Drlica, K., & Malik, M. (2003). Fluoroquinolones: Action and resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(3), 249–282. <https://doi.org/10.2174/1568026033452153>
72. Drlica, K., & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(3), 377–392. <https://doi.org/10.1128/membr.61.3.377-392.1997>
73. Dufour, N., & Debarbieux, L. (2017). La phagothérapie. *Médecine/Sciences*, 33(4), 410–416. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173304011>
74. Ebongue, C. O., Tsiyok, M. D., Mefo'o, J. P., Ngaba, G. P., Beyiha, G., & Adiogo, D. (2015). Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'Hôpital Général de Douala de 2005 à 2012. *Pan African Medical Journal*, 20, 227. <https://doi.org/10.11604/pamj.2015.20.227.4770>
75. El-Desoukey, R. M. A., Albarakaty, F. M., Alqahtani, N. M., Lina, A. L., Safaa, A. A., Amal, B. A., Mona, M. M., Najlaa, H. A., & Zainab, N. A. (2022). Unexpected antimicrobials. [Données incomplètes – à compléter avec source exacte]
76. Ermenlieva, N., Stamova, S., Tsankova, G., & Georgieva, E. (2025). New perspectives in the antimicrobial potential of thyme and oregano essential oils. *Farmacía*, 73(2), 393. <https://doi.org/10.31925/farmacía.2025.2.13>
77. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2021). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2021>
78. Faborode, M. O., & Favier, J. F. (1996). Identification and significance of the oil-point in seed-oil expression. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 65(4), 335–345.
79. Faculté de Médecine Annaba. (2020). *Examen cyto bactériologique des pus*. Document pédagogique en ligne.
80. Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pagès, J. M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.001>
81. Ferro, T. A. F., et al. (2016). Synergistic antibacterial activity of thymol, carvacrol and eugenol against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 112, 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.012>
82. Food and Agriculture Organization (FAO). (2016). *The role of agriculture in the spread of antimicrobial resistance*. <http://www.fao.org/antimicrobial-resistance/en/>

83. Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856–8874. <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>
84. Friedman, M., Henika, P. R., Mandrell, R. E. (2004). Structure–activity relationships of substituted phenols and essential oil components and their antibacterial activity against *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 6042–6048.
85. Gabriel, I., Alleman, F., Dufourcq, V., Perrin, F., & Gabarrou, J. F. (2013). Nutrition, santé et immunité. *INRA Productions Animales*, 26(1), 13–24.
86. Gan, C., Langa, E., Valenzuela, A., Ballesteros, D., & Pino-Otín, M. R. (2023). Synergistic activity of thymol with commercial antibiotics against critical and high WHO priority pathogenic bacteria. *Plants*, 12(9), 1868. <https://doi.org/10.3390/plants12091868>
87. Gaynor, M., & Mankin, A. S. (2003). Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(9), 949–961. <https://doi.org/10.2174/1568026033452153>
88. Ghaderi, L., Moghimi, R., Aliahmadi, A., McClements, D., & Rafati, H. (2017). Development of antimicrobial nanoemulsion-based delivery systems against selected pathogenic bacteria using a thymol-rich *Thymus daenensis* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 832–840. <https://doi.org/10.1111/jam.13541>
89. Gheit, A. (2011). *Les principales bactéries isolées des pus superficiels et leur comportement vis-à-vis des antibiotiques* (Thèse de doctorat). Université Constantine 1, Algérie.
90. Giamarellos-Bourboulis, E. J., Tziolos, N., Routsis, C., Katsenos, C., Tsangaris, I., Pneumatikos, I., ... & Theodorou, V. (2016). Improved outcomes of serious infections caused by multidrug-resistant pathogens with IgM-enriched polyclonal immunoglobulins. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(6), 499–506. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.021>
91. Gibbons, S. (2008). Phytochemicals for bacterial resistance – strength in numbers. *Phytotherapy Research*, 22(8), 1030–1032. <https://doi.org/10.1002/ptr.2404>
92. Giordani, R., & Kaloustian, J. (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Journal de Phytothérapie*, 4(3), 121–124.
93. Goldman, E., & Green, L. H. (Eds.). (2015). *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press.
94. Guerrero Correa, M., Martínez, F. B., Vidal, C. P., Streitt, C., Escrig, J., et al. (2020). Nanoparticles antimicrobiennes à base de métaux : synthèse, types et action antimicrobienne. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 1450–1469. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.129>
95. Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., et al. (2010). Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2186–2192. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.044>
96. Hasdemir, U. O., Chevalier, J., Nordmann, P., & Pagès, J.-M. (2004). Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2701–2706.
97. Hayani, M., Bencheikh, N., Ailli, A., Bouhrim, M., Elbouzidi, A., Ouassou, H., Kharchoufa, L., Baraich, A., Atbir, A., Ayyad, F. Z., et al. (2022). Quality control, phytochemical profile, and antibacterial effect of *Origanum compactum* Benth.

- essential oil from Morocco. *International Journal of Plant Biology*, 13(4), 546–560. <https://doi.org/10.3390/ijpb13040044>
98. Hemaiswarya, S., & Doble, M. (2013). Synergistic interaction of phytochemicals with antibiotics against bacterial pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 13–19. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.047399-0>
99. Hesham, H. A. R., Abdurahman, H. N., & 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.
100. Hooper, D. C. (2002). Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(9), 530–538. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00369-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00369-9)
101. Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology*, 1–23.
102. Huovinen, P. (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1608–1614. <https://doi.org/10.1086/32053>
103. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
104. Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathélet, J.-P., Ankit, M., Khedid, K., & El Bachiri, A. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(2), 205–208.
105. Jafri, H., Ansari, F. A., & Ahmad, I. (2019). Prospects of essential oils in controlling pathogenic biofilm. In V. K. Gupta & A. Trevan (Eds.), *New Look to Phytomedicine* (pp. 203–236). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00009-2>
106. Jennes, S., Merabishvili, M., Soentjens, P., Pang, K. W., Rose, T., Keersebilck, E., Soete, O., François, P.-M., Teodorescu, S., & Verween, G. (2017). Utilisation de bactériophages dans le traitement de la septicémie de *Pseudomonas aeruginosa* sensible à la colistine seulement chez un patient atteint de lésion rénale aiguë – un rapport de cas. *Critical Care*, 21, 1–3.
107. Jordán, M. J., Martínez, R., Goodner, K., Baldwin, E., & Sotomayor, J. (2006). Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.008>
108. Julie, B. (2014). Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin, démarche d'accompagnement dans sept élevages. [Thèse de doctorat, École nationale vétérinaire d'Alfort].
109. Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., & Walsh, C. (2005). Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2), 425–448. <https://doi.org/10.1021/cr030103a>
110. Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
111. Kant, R., & Kumar, A. (2022). Review on essential oil extraction from aromatic and medicinal plants: Techniques, performance and economic analysis. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 30, 100829. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100829>

112. Kaur, S., & Kaur, S. (2015). Bacteriocins as potential anticancer agents. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 272. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272>
113. Kaya, D. A., Ghica, M. V., Dănilă, E., Öztürk, Ş., Türkmen, M., Kaya, M. G. A., & Dinu-Pîrvu, C.-E. (2020). Selection of optimal operating conditions for extraction of *Myrtus communis* L. essential oil by the steam distillation method. *Molecules*, 25(10), 2399. <https://doi.org/10.3390/molecules25102399>
114. Kezzal, K. (1993). *Les antibiotiques, classification, mode d'action, résistance, action in vitro*. Office des publications universitaires.
115. Khoddami, M., Hosseini, M. S., & Hassanshahian, M. (2018). Antibacterial activity of *Semenovia suffruticosa* (essential oil) against pathogenic bacteria and determination of chemical composition of essential oils by gas chromatography mass spectrometry analysis in four regions of Kerman. *Journal of Dietary Supplements*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1320003>
116. Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., & Mozina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
117. Klinker, K. P., Hidayat, L. K., DeRyke, C. A., DePestel, D. D., Motyl, M. R., & et al. (2021). L'intendance antimicrobienne et les antibiogrammes: l'importance d'aller au-delà des antibiogrammes traditionnels. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 8, 20499361211011373. <https://doi.org/10.1177/20499361211011373>
118. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423–435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
119. Kot, B., Wierzchowska, K., Gruzewska, A., & Lohinau, D. (2018). The effects of selected phytochemicals on biofilm formed by five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*, 32(11), 1299–1302. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1340282>
120. Kotra, L. P., Haddad, J., & Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3249–3256. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000>
121. Kwiatkowski, P., Pruss, A., Grygorcewicz, B., Wojciuk, B., Dołęgowska, B., Giedrys-Kalemba, S., Kochan, E., & Sienkiewicz, M. (2018). Preliminary study on the antibacterial activity of essential oils 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*, 24(9), 1368–1375. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0051>
122. Lambert, R., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
123. Lahmar, A., Bedoui, A., Mokdad-Bzeouich, I., Dhaouifi, Z., Kalboussi, Z., Cheraif, I., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2017). L'inversion de la résistance bactérienne sous-tend l'effet synergique des huiles essentielles avec les antibiotiques conventionnels. *Microbial Pathogenesis*, 106, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.018>
124. Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., ... & Cars, O. (2013). Antibiotic resistance—the need for global

- solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
125. Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 482–492. <https://doi.org/10.1086/324626>
126. Lee, S., Kim, H., Beuchat, L. R., Kim, Y., & Ryu, J. (2020). Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. *Food Microbiology*, 90, 103489. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103489>
127. Lehar, S. M., Pillow, T., Xu, M., Staben, L., Kazihara, K., Vandlen, R., ... & Morisaki, H. (2015). Novel antibody–antibiotic conjugate eliminates intracellular *Staphylococcus aureus*. *Nature*, 527(7578), 323–328. <https://doi.org/10.1038/nature16057>
128. Lemaoui, C.-E., Farah, W., & Ouhdouch, Y. (2017). Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux*, 19(2), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2017.01.003>
129. Levine, D. P. (2006). Vancomycin: A history. *Clinical Infectious Diseases*, 42(Suppl 1), S5–S12. <https://doi.org/10.1086/491709>
130. Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12), S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
131. Li, X. Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: An update. *Drugs*, 69(12), 1555–1623. <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>
132. Li, X. M., Tian, S. L., Pang, Z. C., Shi, J. Y., Feng, Z. S., & Zhang, Y. M. (2009). Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chemistry*, 115(3), 1114–1119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.012>
133. Lim, D., & Strynadka, N. C. J. (2002). Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*, 9(11), 870–876. <https://doi.org/10.1038/nsb858>
134. Livermore, D. M. (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557–584. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.557>
135. Löfmark, S., Edlund, C., & Nord, C. E. (2010). Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clinical Infectious Diseases*, 50(Suppl 1), S16–S23. <https://doi.org/10.1086/647939>
136. Loum, N. A. (2005). *Les entérobactéries sécrétrices de bêtalactamases à spectre élargi* [Thèse de doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar].
137. Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.083>
138. Lupia, C., Castagna, F., Bava, R., Naturale, M. D., Zicarelli, L., Marrelli, M., ... & Britti, D. (2024). Use of essential oils to counteract the phenomena of antimicrobial resistance in livestock species. *Antibiotics*, 13(2), 163. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020163>
139. Machado, C. A., Oliveira, F. O., de Andrade, M. A., Hodel, K. V. S., Lepikson, H., & Machado, B. A. S. (2022). Steam distillation for essential oil extraction: An

- evaluation of technological advances based on an analysis of patent documents. *Sustainability*, 14(12), 7119. <https://doi.org/10.3390/su14127119>
140. Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 6, 165. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00165>
 141. Maharaj, S., & McGaw, D. (2020). Mathematical model for the removal of essential oil constituents during steam distillation extraction. *Processes*, 8(4), 400. <https://doi.org/10.3390/pr8040400>
 142. Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Étude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie, B - Sciences Agronomiques et Biologiques*, 9, 35–40.
 143. Malecky, M. (2008). *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins* [Thèse de doctorat, AgroParisTech].
 144. Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
 145. Martins, A. (2020). Les huiles essentielles antibactériennes : exemple du thym (*Thymus*). *Mémoire de Master*, Université Hassan II de Casablanca.
 146. Mehani, M. (2015). *Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camaldulensis dans la région d'Ouargla* [Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah Ouargla].
 147. Mehdi, S. (2008). *La fréquence des bactéries multirésistantes à l'hôpital Hassan II de Settat* [Thèse de doctorat en pharmacie, Université Mohammed V de Rabat].
 148. Meynadier, J. M., & Peyron, N. R. (1997). Allergie aux parfums. *Revue Française d'Allergologie*, 37(5), 641–650.
 149. Moradi, S., Fazlali, A., & Hamedi, H. (2018). Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from rosemary: Comparison with traditional distillation. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 10(1), 22–27.
 150. Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: Gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15, A.3C.1–A.3C.8. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc03c01s15>
 151. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
 152. Myers, T. G., Valverde, A., Aguarales, M., Calvo-Schwarzwalder, M., & Font, F. (2022). Modelling mass transfer from a packed bed by fluid extraction. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 188, 122562. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2022.122562>
 153. National Cancer Institute. (2012). *Aromatherapy and essential oils (PDQ®) – General information*. <https://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/aromatherapy/healthprofessional/page2>
 154. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/mmlbr.67.4.593-656.2003>
 155. Nwobodo, C. C., Ugwu, M. C., Anie, C. O., Al-Ouqaili, M. T., Ikem, J. C., Umezurike, V. C., & Saki, M. (2022). Antibiotic resistance: The challenges and some

- emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(9), e24655. <https://doi.org/10.1002/jcla.24655>
156. O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*. <https://amr-review.org/>
 157. Office fédéral de la santé publique (OFSP). (2008). *Plan d'action national contre les résistances aux antibiotiques*.
 158. Okuda, K.-i., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K., & Mizunoe, Y. (2013). Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5572–5579. <https://doi.org/10.1128/AAC.00530-13>
 159. Oliveira, J. B., Teixeira, M. A., de Paiva, L. F., de Oliveira, R. F., dos Anjos Mendonça, A. R., & de Brito, M. J. A. (2019). Multidrug-resistant bacteria: Resistance mechanisms and therapeutic options. *Microbial Drug Resistance*, 25(6), 890–908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>
 160. Onofre, S., Canton, M., & Pires, P. (2013). Action of essential oils obtained from *Baccharis coridifolia* D. C. (Asteraceae-Astereae) on the activity of antibiotics. *Advances in Microbiology*, 3(2), 166–170. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.32026>
 161. Organisation mondiale de la santé (OMS). (2021). *Global action plan on antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>
 162. Oussou, K. R. (2009). *Étude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne* [Thèse de doctorat, Université de Cocody-Abidjan].
 163. Pagès, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
 164. Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>
 165. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088–17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
 166. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
 167. Patrick, G. L. (2003). *Chimie pharmaceutique*. De Boeck Supérieur.
 168. Phakawat, T., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1237–R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
 169. Phumisantiphong, U., Siripanichgon, K., Reamtong, O., & Diraphat, P. (2017). A novel bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant enterococci. *PLOS ONE*, 12(10), e0186415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186415>
 170. Ponce, A. G., Fritz, R., del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679–684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)
 171. Qiu, J., Feng, H., Shi, J., Du, Y., Wang, M., & Wang, J. (2010). Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus*

- aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5846–5851. <https://doi.org/10.1128/AEM.00680-10>
172. Qiu, J., Zhang, Y., Wang, X., et al. (2011). Effect of subinhibitory concentrations of thymol on the production of α -hemolysin and enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 111(2), 421–430. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05069.x>
173. Ramalingam, B., Parandhaman, T., & Das, S. K. (2016). Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nanomechanical properties of gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(7), 4963–4976. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09347>
174. Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
175. Rhayour, K. (2002). *Étude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. [Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah].
176. Roberto, V., Ana, A. T. B., Silvio, S. D., & Sona, J. (2019). Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: An overview. *Microbial Drug Resistance*, 25(6), 890–908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>
177. Roberts, M. C. (1996). Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(1), 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574->
178. Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., & Seppälä, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.12.2823>
179. Rolta, R., Sharma, A., Kumar, V., Sourirajan, A., & Baumler, D. (2018). Methanolic extracts of the rhizome of *Rheum emodi* act as bioenhancers of antibiotics against bacteria and fungi and exhibit antioxidant potential. *Medicinal Plant Research*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.5376/mp.2018.08.0009>
180. Rossmann, F. S., Laverde, D., Kropec, A., Romero-Saavedra, F., Meyer-Buehn, M., & Huebner, J. (2015). Isolation of highly active monoclonal antibodies against multidrug-resistant Gram-positive bacteria. *PLOS ONE*, 10(2), e0118405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118405>
181. Sahraoui, N., Vian, M. A., Bornard, I., Boutekedjiret, C., & Chemat, F. (2008). Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils: Comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*, 1210(1), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.013>
182. Schmidt, R., Prado-Gonjal, J., & Morán, E. (2022). Microwave assisted hydrothermal synthesis of nanoparticles. *arXiv*. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2203.02394>
183. Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2), 201–222. <https://doi.org/10.1128/membr.59.2.201-222.1995>
184. Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71–109. <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10>
185. Silverman, J. A., Perlmutter, N. G., & Shapiro, H. M. (2003). Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus*

- aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2538–2544. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2538-2544.2003>
186. Singleton, P. (2005). *Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies* (6e éd.). Dunod.
187. Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Perroux, R., & Cluzel, R. (1987). Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20(3), 323–334. <https://doi.org/10.1093/jac/20.3.323>
188. Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), 155–160. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
189. Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2013). Chemical and genetic characterization of bacteriocins: Antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 28–44. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6293>
190. Société Française de Microbiologie. (2019). *Résistances naturelles aux antibiotiques des principales espèces bactériennes d'intérêt médical*. CASFM / EUCAST.
191. Soilleux, M. (2007). *Antibiotiques*. DCEM antibioti poly réel, 1–12.
192. Soyngbe, O. S., et al. (2015). Essential oil of *Eucalyptus grandis* exhibits anti-efflux and synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Industrial Crops and Products*, 77, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.051>
193. Stéphanie, F. (2009). *Transfert d'un gène de résistance aux bêta-lactamines blaCTX-M-9 entre Salmonella et les entérobactéries de la flore intestinale humaine: influence d'un traitement antibiotique* (Thèse de doctorat). Université Rennes 1.
194. Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S. W., & Miltz, J. (2008). Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT – Food Science and Technology*, 41(5), 779–788. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.019>
195. Szabó, M. A., et al. (2010). Antibacterial effect of essential oils on the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *Acta Biologica Hungarica*, 61(4), 454–464. <https://doi.org/10.1556/ABiol.61.2010.4.4>
196. Szabó, M. A., Varga, G. Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., & Molnár, J. (2009). Inhibition of quorum sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research*, 24(5), 782–786. <https://doi.org/10.1002/ptr.3010>
197. Szijártó, V., Guachalla, L. M., Visram, Z. C., Hartl, K., Varga, C., Mirkina, I., Zmajkovic, J., Badarau, A., Zauner, G., & Pleban, C. (2015). Lipopolysaccharide O-specific monoclonal antibodies protect mice against multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131-O25b:H4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3109–3116. <https://doi.org/10.1128/AAC.04494-14>
198. Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), S3–S10. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
199. Terreni, M., Taccani, M., & Pregnolato, M. (2021). New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: Latest research and future perspectives. *Molecules*, 26(9), 2671. <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>
200. The Lancet. (2022). Antibiotic resistance: Time to act. *The Lancet*, 399(10330), 1591. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00721-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00721-X)
201. Mangine, L. (2016). *Antibiotique et résistance* (Thèse de doctorat). École Nationale Vétérinaire d'Alfort

202. Thilakarathna, R., Siow, L. F., Tang, T.-K., & Lee, Y. Y. (2023). A review on application of ultrasound and ultrasound assisted technology for seed oil extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 60(4), 1222–1236. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05494-2>
203. Tomi, F., & Casanova, J. (2006). ¹³C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae – A review. *Acta Horticulturae*, 723, 185–192. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.723.20>
204. Trosko, J. E. (2016). Quorum sensing and biofilm formation in bacterial pathogens and their inhibition by natural products. *Current Pharmaceutical Design*, 22(42), 6431–6440. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160701121124>
205. Tyagi, A., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.022>
206. Ugarte-Valdivieso, M., Gómez-Lopera, C., Prieto-Domínguez, J., & Gil-Agudo, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11(11), 2786. <https://doi.org/10.3390/nu11112786>
207. Valnet, M. (2005). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1–2), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.11.004>
208. Van Vuuren, S. F., Suliman, S., & Viljoen, A. M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 440–446. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x>
209. Vandepitte, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C. C., & Organisation mondiale de la santé. (1994). *Bactériologie clinique: Techniques de base pour le laboratoire*. Organisation mondiale de la santé.
210. Velkov, T., Roberts, K. D., Thompson, P. E., & Li, J. (2016). Polymyxins: A new hope in combating Gram-negative superbugs? *ACS Infectious Diseases*, 2(11), 850–858. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00105>
211. Vivas, R., Barbosa, A. A. T., Dolabela, S. S., & Jain, S. (2019). Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: An overview. *Microbial Drug Resistance*, 25(6), 890–908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>
212. Wang, L., Zhang, J., Zhao, B., He, X., Li, N., & Liu, Y. (2016). Antibacterial activity of cinnamaldehyde and eugenol against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* and the mechanism of action. *Food Control*, 59, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.032>
213. Weingarten, R. A., Johnson, R. C., Conlan, S., Ramsburg, A. M., Dekker, J. P., Lau, A. F., ... & Frank, K. M. (2018). Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance. *mBio*, 9(1), e02011-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02011-17>
214. Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3), 577–585. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.577>
215. Wendakoon, C. N., & Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Protection*, 58(5), 543–547. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.5.543>

216. White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., & Bosso, J. A. (1996). Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1914–1918. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.8.1914>
217. Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
218. World Bank. (2017). *Drug-resistant infections: A threat to our economic future*. <https://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-our-economic-future>
219. World Health Organization (WHO). (2020). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
220. World Health Organization (WHO). (2023). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
221. Yala, D., Merad, A. S., Mohamedi, D., & Ouar Koriche, M. N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91, 1–7.
222. Yangilar, F. I. (2021). Activités biologiques, avantages pour la santé, méthodes d'extraction, applications alimentaires et effets bénéfiques des huiles essentielles. *Nutriments Fonctionnels*, 8(2), 1–12.
223. Zahalika, J.-P. (2010). *Les huiles essentielles*. Dauphin, Paris

Annexes

Annexe 01**Matériels non biologiques**➤ **Matériels**

- Bec Bunsen
- Incubateur
- Balance électronique
- Réfrigérateur
- Microscope optique
- Vortex (mélangeur vortex)
- Bain-marie
- Bocal / Jarre
- Autoclave
- Densitomètre
- Jarre anaérobie

➤ **Verre et petits matériels**

- Pipettes de Pasteur
- Anse de platine
- Seringues
- Lames et lamelles
- Tubes à hémolyse
- Gants stériles
- Boîtes de Pétri
- Pincettes bactériologiques
- Poire pour pipette
- Porte-tubes

➤ **Milieux de culture**

- Gélose Hektoen
- Gélose nutritive
- Gélose Mueller-Hinton

➤ **Colorants**

- Lugol (iode de Lugol)
- Fuchsine
- Violet de gentiane

➤ **Réactifs indicateurs**

- Réactif de Kovac
- Réactifs de Voges-Proskauer (VP1 et VP2)
- Réactifs de réduction des nitrates (NR1 et NR2)
- Milieu urée-indole
- Disques à oxydase
- Huile de vaseline

➤ **Agents diluants**

- Eau physiologique stérile
- Eau distillée

➤ **Agent désinfectant**

- Eau de Javel



➤ **Antiseptiques**

- Alcool

Annexe 02

Matériels biologiques

Tableau : recapulatif des constituants majoritaires de *Thymus vulgaris* et *Origanum compactum*

Huile essentielle	Principaux constituants (pourcentage approximatif)	Propriétés
 <p><i>Origanum compactum</i></p>	<p>Carvacrol : entre 21 et 55%</p> <p>Thymol : entre 8 et 28%</p> <p>γ-terpène : entre 9 et 26%</p> <p>Para-cymène : entre 3 et 20%</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Antibactérienne • Antifongique • Antioxydant
 <p><i>Thymus vulgaris</i></p>	<p>Carvacrol : entre 2 et 10%</p> <p>Thymol : entre 30 et 50 %</p> <p>γ-terpène : entre 5 et 15%</p> <p>Para-cymène : entre 3 et 20%</p> <p>Linalol : entre 1 et 5%</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Antibactérienne • Antifongique • Antispasmodiques

Annexe 03**Composition du milieu Chapman**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée.

Peptones 10,00g

Extrait de viande de bœuf 1,00g

D-mannitol 10,00g

Chlorure de sodium 75,00g

Rouge de phénol 0,025g

Agar 15,00g

pH final à 25°C : $7,4 \pm 0,2$

Composition du milieu Hektoen

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone 12,00g

Lactose 12,00g

Extrait de levure 3,00g

Bleu de bromothymol 0,065g

Thiosulfate de sodium 5,00g

Saccharose 12,00g

Sels biliaries N° 3 9,00g

Fuchsine acide 0,10g

Citrate ferrique ammoniacal 1,50g

Salicine 2,00g

Agar 14,00g

pH final à 25°C : $7,5 \pm 0,2$

Composition de la gélose nutritive

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée.

Peptone 5,00g

Extrait de viande de bœuf 3,00g

Chlorure de sodium 5,00g

Agar 15,00g

pH final à 25°C : $7,3 \pm 0,2$



Composition du milieu CHROMagar

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée.

Agar 15g

Mélange chromogène 4,8g

Peptone & extrait de levure 8g

NaCl 5g

pH: $7,2 \pm 0,2$. (Formule typique pouvant être ajustée et/ou supplémentée pour répondre à des critères de performance).



Résumé

La résistance bactérienne aux antibiotiques représente un défi majeur en santé publique, notamment face à des pathogènes courants tels que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cette étude vise à évaluer le potentiel antimicrobien de composés naturels, en particulier les huiles essentielles, comme alternatives ou compléments aux traitements classiques. Nous avons étudié l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan (*Origanum compactum*) et de l'huile essentielle de thym à thymol (*Thymus vulgaris*) sur des souches de *E. coli* et *S. aureus*. Les résultats ont révélé une activité inhibitrice marquée pour les deux huiles, confirmée par des tests standards de sensibilité. En outre, des effets synergiques ont été observés lors de la combinaison de ces huiles avec certains antibiotiques, suggérant un renforcement de l'efficacité antibactérienne. Ces données soutiennent l'intérêt croissant pour les huiles essentielles en tant qu'agents thérapeutiques complémentaires dans la lutte contre les infections bactériennes résistantes.

Mots clés

Résistance aux antibiotiques, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, huiles essentielles, *Thymus vulgaris*, *Origanum compactum*, synergie

Abstract

Antibiotic resistance among bacteria represents a major public health concern, particularly with common pathogens such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. This study investigates the antimicrobial potential of natural compounds, especially essential oils, as alternative or complementary approaches to conventional treatments. We assessed the antibacterial activity of oregano essential oil (*Origanum compactum*) and thyme essential oil rich in thymol (*Thymus vulgaris*) against *E. coli* and *S. aureus* strains. Both oils demonstrated significant inhibitory activity, as confirmed by standard antimicrobial sensitivity tests. Furthermore, synergistic effects were observed when these essential oils were combined with certain antibiotics, indicating enhanced antibacterial efficacy. These findings support the growing interest in essential oils as complementary therapeutic agents in the fight against resistant bacterial infections.

Keywords

Antibiotic resistance, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, essential oils, *Thymus vulgaris*, *Origanum compactum*, synergy

المخلص

تُعد مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية تحديًا كبيرًا في مجال الصحة العامة، لا سيما في مواجهة مسببات الأمراض الشائعة مثل الإشريكية القولونية (*Escherichia coli*) والعنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*). تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا لبعض المركبات الطبيعية، وخاصة الزيوت الأساسية، كبديل أو مكملات للعلاج التقليدي. قمنا بدراسة النشاط المضاد للبكتيريا لزيوت الأوريغانو الأساسي (*Origanum compactum*) وزيوت الزعتر الغني بالثيمول (*Thymus vulgaris*) على سلالات من *E. coli* و *S. aureus*. أظهرت النتائج نشاطًا مثبطًا قويًا لكلا الزيتين، وفقًا لاختبارات الحساسية الميكروبية القياسية. كما أظهرت النتائج وجود تأثيرات تآزرية عند دمج هذه الزيوت مع بعض المضادات الحيوية، مما يشير إلى تعزيز فعاليتها ضد البكتيريا. تدعم هذه النتائج الاهتمام المتزايد باستخدام الزيوت الأساسية كعوامل علاجية مساعدة في مكافحة العدوى البكتيرية المقاومة.

الكلمات المفتاحية

مقاومة المضادات الحيوية، الإشريكية القولونية، العنقودية الذهبية، الزيوت الأساسية، *Thymus vulgaris*، *Origanum compactum*، تأثير تآزري



Ugur ay la yettimyuren n tbaktiriyin ay izemren ad yelvent atas n lizuntibyutik d ayen ay d yesskanayen ayilif ameqran i tdawsa tayelnawt. Tazrawt-a tettato yef tzemmar n yiferdisen inagmayen, ladya zzit n zaatar akked win n z3itra, d tifat i lmend n yimenyi mgal yiferdisen n tdawsa ay izemren ad ttwahebsen. S usexdem n yiwen n sşenf n *Escherichia coli* d win n *Staphylococcus aureus*, nessemres azal n tmezdiyin n zzit n *Origanum compactum* d zzit n *Thymus vulgaris*. Sin-a n zzit sseknen-d tigawt ijehden mgal tbaktiriyin s ttawilat n ueeyen n tmenawt, dya aya yesskanay-d tazmert nsen d tifat n yimuḍinen n tmezdiyin tiqburin. Rnu yer waya, asdukkel n zzit-a tazegzawt d lizuntibyutik yesskanay-d azal n tdukli ay izemren ad d-yili, yerna yesselhu-d lfayda n yimuḍinen yerna yessehbiber yef tmezdiyin. Tazrawt-a tettqadar aseqdec n zzitat agi am yisufar n tkemmelt i lmend n ueiwen n uhezzeb mgal Aybel n lizuntibyutik.

ΞΑΘ.ΕΞΙ

Tyellist n tmezdiyin i lizuntibyutik, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, zzitat tiqburin, *Thymus vulgaris*, *Origanum compactum*, tdukli/synergie