

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU**

**Mémoire de Fin d'Etudes**



En vue de l'obtention du diplôme de **Master Académique**

Filière : science Biologique

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

**Propriétés antiseptiques des huiles essentielles contre  
les bactéries responsables de caries dentaires**

Présentée par :

**M elle BERKOU D Léticia**

**M elle BOUJEMAI Léticia**

**Devant le Juré :**

**AMROUCHE Tahar** Maitre de conférence à l'UMMTO classa B

**TITOU CHE Yacine** Maitre de conférence à l'UMMTO classe A

**LEFSIH Khalef** Maitre de conférences a l'UMMTO classe A

Encadré par :

**Mr LEFSIH Khalef**

Maitre de conférences a l'UMMTO classe A

**Promotion : 2023/2024**

## *Remerciements*

Tout d'abord nous remercions **ALLAH**, le tout puissant pour la santé, la volonté, la patience et le courage qu'il nous a donné pour mener à bon port ce mémoire de fin d'études.

Il nous tient à cœur d'adresser nos remerciements les plus distingués aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce que ce travail soit à la hauteur.

Nos remerciements vont particulièrement à :

✚ Notre promoteur Docteur **LEFSIH. K**

Nous vous remercions de nous avoir aidé à mener à terme ce mémoire, car vous n'avez jamais lésiné ni sur votre temps, ni sur votre savoir, tout au long de ce travail, pour votre suivi continu.

Puisse-vous trouvez l'expression de notre sincère gratitude et notre plus grand respect.

Puisse ce mémoire être à la hauteur de vos attentes.

✚ Madame **ASMANI. K** maître de conférences pour ses précieux conseils.

✚ Monsieur **TITOUCHE. Y**, maître de conférences classes A à la (FSBSA) pour sa générosité de nous avoir fourni le sang qui nous est nécessaire.

✚ Monsieur **AMROUCHE.T**, maître de conférences classe B pour nous avoir ouvert les portes de son laboratoire pour n'avoir aucun problème de matériel.

✚ La directrice de la bibliothèque de Biomédical pour nous avoir accordé l'accès à la Bibliothèque pour poursuivre nos recherches.

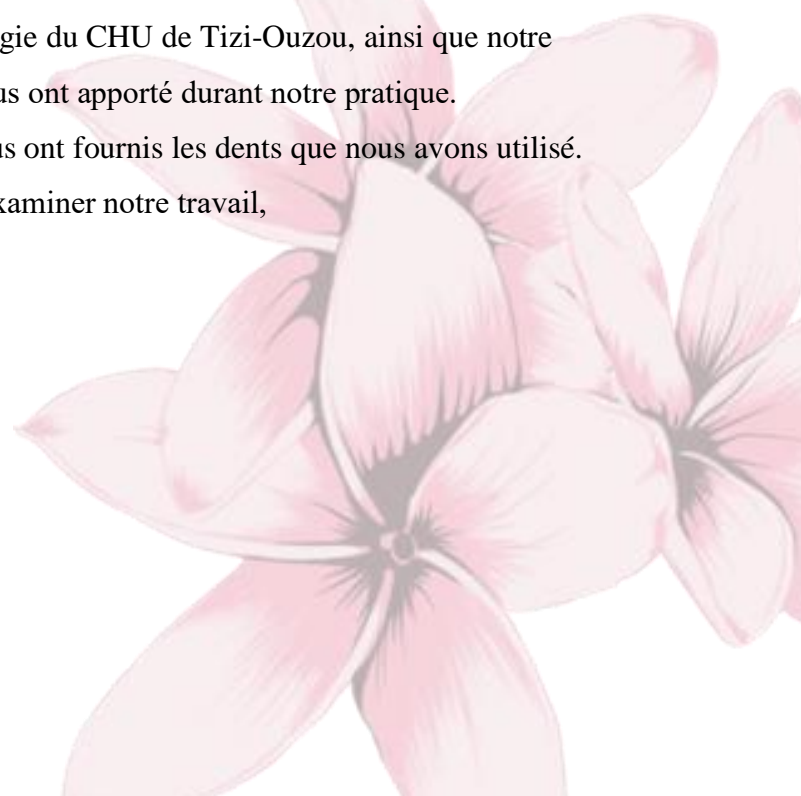
✚ Au personnel du laboratoire de Microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou, ainsi que notre camarade **CHAIB. L** pour l'aide qu'ils nous ont apporté durant notre pratique.

✚ Aux deux cabinets dentaires privés qui nous ont fournis les dents que nous avons utilisé.

✚ Aux membres de Jury, qui ont accepté d'examiner notre travail,

**Mr AMROUCHE Tahar** : président.

**Mr TITOUCHE Yacine** : Examineur.



## Dédicace

Je dédie ce long et modeste travail tout d'abord au **Dieu** le tout puissant qui a procuré la force et la patience de ne pas lâcher et de continuer d'avancer

Ensuite, à **mes parents bien-aimés** qui m'ont constamment soutenu pendant la rédaction de ce mémoire.

A mon frère **JUBA**, que Dieu t'accorde dans cette vie selon la pureté de ton âme.

A ma grand-mère, mes tantes **Dalila, Rachida** et **Amel** que j'espère seront fière de moi.

A toutes mes cousines **Yasmine** et **Warda** qui m'ont encouragé, aider et soutenu durant cette période.

A tous mes amis (es) aux bons moments passés ensemble.

A tous les gens qui ont cru en moi, et qui me donnent l'envie d'aller de l'avant. Je vous remercie tous, votre soutien et vos encouragements me donnent l'espoir et la force de continuer.

Enfin, j'espère du fond du cœur que tout ce petit monde à moi trouve ici un mot de reconnaissance, et que chacun se reconnaisse en ce qui le concerne.

Léticia

## *Dédicace*

*Je remercie **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la santé et la force jusqu'à l'achèvement de ce mémoire de fin d'études.*

*Je dédie ce modeste travail à :*

***Ma très chère mère,***

*Quoi que je dise ou que je fasse, je ne saurais point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés m'a toujours été une source de force pour affronter les différents obstacles.*

***Mon très cher père,***

*L'épaule solide, l'œil veillant, l'oreille attentive, l'infatigable, la personne la plus digne de mon estime et de mon respect, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

***Mon unique frère Sofiane.***

*Mes chères sœurs **Katia, Kamélia et Lydia** ; et leurs maris **Arezki, Lyes et Youcef** pour leurs soutien et leurs conseils qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici car ils ont cru en moi.*

*Mes chers neveux et nièce **Ghiles, Said-Axel, Amélia et Achour** que dieu vous garde.*

*Mes très chères copines **Lisa et Amel** qui m'étaient toujours une source de motivation et de compréhension.*

*Ma binôme **Léticia**, elle qui m'a agréablement accompagné tout au long de ce travail avec sa positivité et sa joie de vivre.*

*La belle âme du **petit ange Alicia**, que le paradis soit sa demeure éternelle.*

*A toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment.*

*A vous tous, je vous souhaite santé, amour, bonheur et prospérité.*

**BOUDJEMAI Léticia**

## Liste des abréviations

**API** : Interface de programme d'application.

**ATB** : antibiotique.

**BGT** : Bouillon glucosé tamponné.

**BMR** : Bactérie multirésistante.

**(Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>OH<sub>2</sub>)** : Cristaux d'hydroxyapatite.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**DMSO** : Diméthyle sulfoxyde.

**E** : Erythromycine.

**G** : feuille de girofle

**Gram +** : Gram positif.

**Gram -** : Gram négatif.

**HE** : Huile essentielle.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Eau oxygénée.

**MH** : Muller Hinton.

**NIT** : Nitrate réductase.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**PAL** : Phosphatases alcalines.

**pH** : Potentiel d'Hydrogène.

***S. auricularis*** : *Staphylococcus auricularis*.

**T** : Thym à thymol

**VP** : Vogues-Proskaur.

**ZYM** : Zymographie.

## Liste des figures

Figure 01 : Vue antérieur de la flore buccale (VACHER C., MALADIERE E).....	3
Figure 02:Structure de la dent (GOUIGAH, HAOUS et al. 2020).....	11
Figure 03: carie initiale (Kaibouche, Brighen et al. 2013).....	17
Figure 04: carie superficielle (Kaibouche, Brighen et al. 2013).....	17
<b>Figure 05:</b> carie profonde ( <b>Kaibouche, Brighen et al. 2013</b> ). ....	18
<b>Figure 06:</b> carie pénétrante ( <b>Kaibouche, Brighen et al. 2013</b> ). ....	19
<b>Figure 07:</b> carie perforante ( <b>Kaibouche, Brighen et al. 2013</b> ).....	19
Figure 08:Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique (Singh & Barrett, 2006). ....	30
Figure 09:Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie gram négative, adapté de guardabassi et Courvalin (2006). ....	37
Figure 10:les différents modes d'acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Levy & Marshall, 2004). ....	39
Figure 11:Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Hellal 2011).1 : Chauffe ballon ; 2 : Ballon ; 3 : Thermomètre ; 4 : Réfrigérant ; 5 : Entrée et sortie d'eau ; 6 : Erlenmeyer ; 7 : Matière à extraire l'essence ; 8 : La couche d'HE.....	51
Figure 12:Distillation par entrainement à la vapeur (Peyron 1992).....	52
Figure 13: Extraction à froid (Farhat 2010). ....	53
Figure 14:Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Abib and Lazib2022). ....	57
Figure 15:Protocole d'isolement et d'identification des bactéries cariogènes. ....	67
Figure 16: La galerie API-staph après incubation. A : Cas etudiee ici ; B : Cas standard .....	71
Figure 17:illustration de la méthode de aromatogrammes sur boite de pétri (Pibiri 2006). ....	75
Figure 18:Résultats de l'enrichissement (présence de troubles) (Photo personnelle). ....	78
Figure 19:Aspects macroscopique des colonies isolées. ....	79
Figure 20:Aspect microscopique des bactéries après coloration de Gram. ....	80
Figure 21:catalase (+) .....	80
Figure 22 :oxydase (-) .....	80
Figure 23:coagulase (-). ....	81
Figure 24: Galerie API-Staph après incubation .....	81
Figure 25:Sensibilité de la souche staphylococcus auricularis aux antibiotiques (Erythromycine). ....	82
Figure 26:Effet des huiles essentielles de Thymus Vulgaris et Eugenia caryophyllatasur S. auricularis avec Erythromycine E. ....	88

## Liste des tableaux

Tableau 01:Autres bactéries responsables des caries dentaires (Aas, 2008). .....	25
Tableau 02:mode d'action de quelques grandes familles d'antibiotiques .....	33
Tableau 03:matériel utilisé dans notre travail.....	62
Tableau 04:les tests biochimiques du type staphylocoque auricularis .....	68
Tableau 05:liste des antibiotiques utilisés .....	73
Tableau 6: Résultats de l'isolement des différents prélèvements. ....	79
Tableau 7:Sensibilité de staphylococcus auricularis vis-à-vis des antibiotiques testés. ....	82
Tableau 8:Résultats de l'identification de la bactérie isolée. ....	83
Tableau 9:valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI. ....	84
Tableau 10:Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Thymus Vulgaris et Eugenia caryophyllata réalisée par la méthode de diffusion sur disque.....	85
Tableau 11:Les valeurs des CMI des H.Es testées sur S. auricularisen (µl/ml).....	86
Tableau 12:Résultats de l'interaction entre huiles essentielles avec Erythromycine.....	88

# Sommaire

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : LA FLORE BUCCALE</b>	<b>1</b>
1.1 Qu'est-ce que la flore buccale	3
1.2 Les défenses naturelles de notre bouche	4
1.2.1 La flore résidente	4
1.2.1.1 Notre barrière biologique	4
1.2.1.2 Les muqueuses : premier obstacle	4
1.2.1.3 La salive : un antiseptique qui lubrifie les muqueuses et dissout les aliments	4
1.2.1.4 Le fluide gingival	4
1.2.2 Le sang et le réseau lymphatique garants de notre immunité	5
1.3 Ecologie buccale	5
1.3.1 Distribution des bactéries dans la cavité buccale	5
1.3.2 Bactéries buccales	5
1.4 Hygiène bucco-dentaire optimale	6
1.4.1 Le brossage	6
1.4.1.2 Utilisation des bains de bouche	7
1.4.1.3 Alimentation équilibrée	9
1.4.1.4 Éviter les facteurs perturbateurs	9
1.4.1.5 Utilisation de probiotique	9
<b>CHAPITRE II : LA DENT</b>	<b>3</b>
2.1 Définition	11
2.2. Structure et anatomie	11
2.2.1 Odonte	11
2.2.1.1 Email	11
2.2.1.2 Dentine	12
2.2.1.3 Cément	12
2.2.1.4 Pulpe	12
2.2.2 Parodonte	12
2.2.2.1 Desmodonte ou ligament alvéolo-dentaire	12
2.2.2.2 Os alvéolaire	13
2.2.2.3 Gencive	13

2.3. SOS nos dents sensibles !	13
3. La carie dentaire	13
3.1. Définition	13
3.2. Caractères généraux	14
3.3 Comment se forme une carie ?	14
3.4. Evolution de la carie	15
3.5. Types de caries dentaires	16
3.5.1 Carie initiale	16
3.5.2 Carie superficielle	17
3.5.3. Carie profonde	18
3.5.4 Carie pénétrante	18
3.5.5 Carie perforante	19
3.6 Diagnostic des caries	20
3.7 Facteurs de risque	20
3.8 Les principaux germes responsables des caries dentaires	21
3.8.1 Streptococcus	21
3.8.2 Lactobacillus	22
3.8.3 Actinomycetes	23
3.8.4 Autres microorganismes responsables des caries dentaires	25
3.9. Traitement des caries	25
3.9.1. Reminéralisation des dents	25
3.9.2. Restauration des dents	25
<b>CHAPITRE III : LA RESISTANCE BACTERIENNE</b>	<b>11</b>
3.1. Les antibiotiques	29
3.1.1. Définition	29
3.1.2 Historique	29
3.1.3 Classification des antibiotiques	30
3.1.4 Les Mécanismes d'action des antibiotiques	31
3.1.5 Les grandes familles d'antibiotiques	31
3.2 La résistance bactérienne	34
3.2.1 Définition de la résistance aux antibiotiques	34
3.2.2 Historique	34
3.2.3 Origines et causes de la résistance bactérienne	35
3.2.4 Les modes de résistances aux antibiotiques	35

3.2.4.1 La résistance naturelle (intrinsèque)	35
3.2.4.2 La résistance acquise	36
A. La résistance mutationnelle	37
B. La résistance acquise par transfert horizontal des gènes	38
3.2.5 Les mécanismes de la résistance bactérienne	40
3.2.5.1 Modification de l'antibiotique	40
3.2.5.2 Dégradation de l'antibiotique	40
3.2.5.3 Modification enzymatique de la structure de l'antibiotique	41
3.2.5.4 Diminution de la pénétration et de l'efflux d'antibiotique	41
A. Diminution de la perméabilité	41
B. Les pompes à efflux	42
3.2.5.5 Changement dans la cible de l'antibiotique	43
A. Protection de la cible	43
3.2.5.6 Modification de la cible	43
A. Mutation de la cible	43
B. Modification de la cible	44
C. Remplacement complet de la cible	44
3.2.6 Les bactéries multi-résistantes	44
<b>CHAPITRE IV : LES HUILES ESSENTIELLE</b>	<b>29</b>
4.1 Généralités et définition	47
4.2 Localisation et lieu de synthèse	47
4.3 Caractéristiques des huiles essentielles	48
4.3.1 Composition chimique	48
4.3.1.1 Les terpènes	48
4.3.1.2 Les composés aromatiques	48
4.3.2 Propriétés physiques	48
4.3.3 Notion de chémotype	48
4.4 Rôle physiologique	49
4.5 Toxicité des huiles essentielles	49
4.6 Précautions d'utilisation des huiles essentielles	50
4.7 Méthodes d'extraction des huiles essentielles	50
4.7.1 Distillation	51
4.7.1.1 Hydrodistillation	51
4.7.1.2 Distillation par entraînement à la vapeur	51

4.7.1.3 Hydro-diffusion	52
4.7.2 Extraction à froid	53
4.7.3 Extraction assistée par micro-ondes	53
4.7.4 Extraction par les solvants et les graisses	53
4.7.5 Extraction par fluide supercritique	54
<b>CHAPITRE V : L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES HUILES ESSENTIELLES</b>	<b>47</b>
5.1 Activité antibactérienne des HEs	56
5.1.1 L'activité antibactérienne des HEs et leurs composants	56
5.1.2 Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles	56
5.1.3 Facteurs influençant l'activité antibactérienne des HEs	58
5.2 Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne	58
5.2.1 Aromatogramme (méthode de diffusion en milieu gélosé)	58
5.2.2 Méthode de dilutions	59
5.2.3 Méthode de micro-atmosphère	59
5.3 Sensibilité des bactéries aux huiles essentielles	59
5.4 La synergie	60
5.4.1 Effet synergique des huiles avec les antibiotiques	60
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>56</b>
6.1. Rappels des objectifs	62
6.2. Matériel	62
6.3. Méthodes	63
6.3.1 Echantillonnage et techniques de prélèvements	63
6.3.2 Méthode d'analyse	63
6.3.2.1 Enrichissement	63
6.3.2.2 Isolement	63
6.3.2.3 Purification	64
6.3.2.4 Identification	65
6.3.3. Recherche des staphylocoques	68
6.3.3.1 Mode opératoire	68
6.3.3.2 Lecture et interprétation	68
6.3.3.3 Tests complémentaires	69
6.3.3.4 La galerie biochimique	69
6.4. Antibiogramme	72
6.4.1. Principe	72

6.4.2. Préparation de l'inoculum	72
6.4.3. Ensemencement	72
6.5. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	73
6.5.1. Protocole expérimental	73
6.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	74
6.6. La synergie ATB/HE	75
<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	<b>62</b>
7.1. Résultats de l'enrichissement	78
7.2 Aspect macroscopique après l'isolement	78
7.3. Aspect microscopique des cellules bactériennes (objectif X100)	79
7.4. Tests biochimiques	80
7.5. Résultat de l'enrichissement et la purification (repiquage)	81
7.7. Détermination de la sensibilité des antibiotiques	82
7.8. Activité antibactérienne d'huile essentielle	84
7.8.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque	84
7.8.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	86
7.8.3. Synergie entre HE/ATB	87
<b>Conclusion</b>	<b>78</b>
<b>Résumé</b>	<b>91</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	

# **Introduction**

**Introduction**

La bouche est une partie du corps des plus aseptiques. Sa flore bactérienne particulièrement riche constitue avec le milieu buccal un écosystème dans lequel toute rupture d'équilibre peut être le point de départ d'un processus pathogène (Mouton, Robert et al. 1994).

La flore buccale abrite un écosystème complexe renfermant divers microorganismes qui constituent une entité structurale spécifique nommé : le biofilm buccal. Ce microbiote buccal évolue dans un état d'équilibre global veillant sur la santé bucco-dentaire qui est considérée comme une fenêtre sur la santé entière d'un individu car en plus d'être une barrière au monde extérieur, la cavité orale agit comme un organe à part entière (Rouabhia and Microbiology 2002).

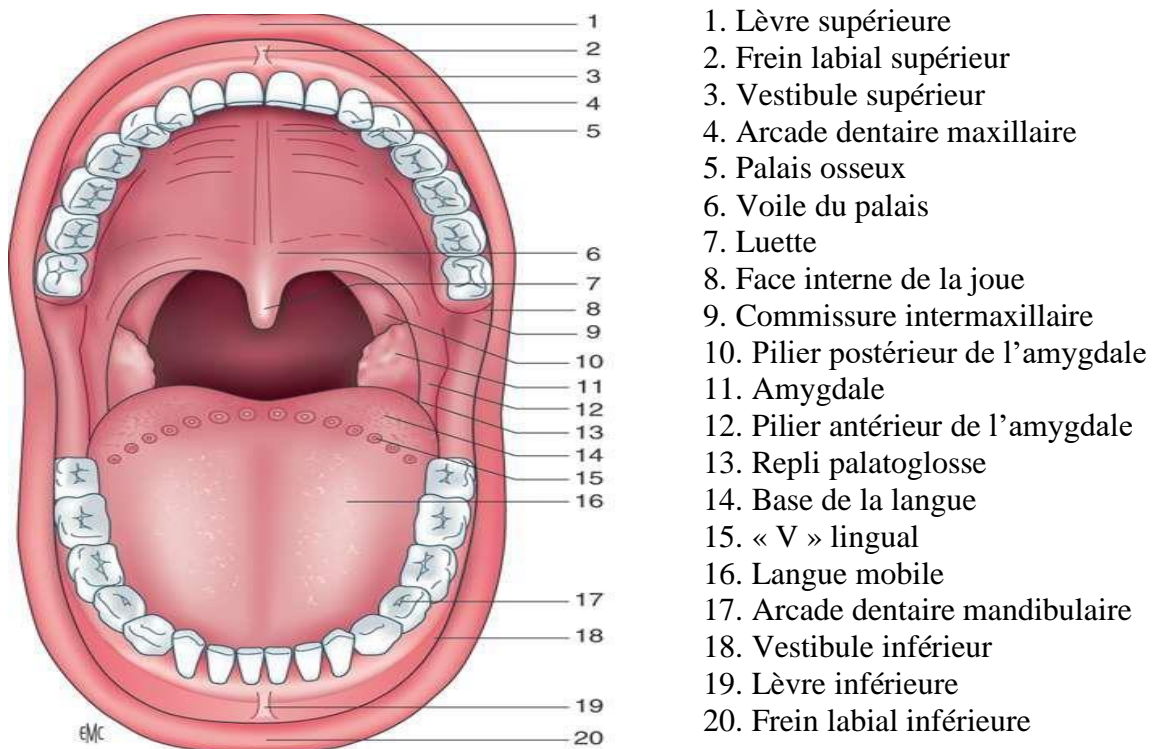
La flore microbienne buccale humaine constitue un biofilm très diversifié. Vingt-cinq espèces de streptocoques buccaux résident dans la cavité buccale humaine et représentent à peu près 20% du total des bactéries buccales. La taxonomie de ces bactéries est complexe et reste provisoire. Les streptocoques buccaux englobent à la fois des bactéries inoffensives et dangereuses. Chaque espèce a développé des propriétés spécifiques pour coloniser les différents sites buccaux soumis à de constants changements de conditions, pour combattre les compétiteurs et pour résister aux agressions externes (système immunitaire de l'hôte, chocs physico-chimiques et frictions mécaniques). Les déséquilibres dans la flore indigène sont la cause de maladies buccales et sous des conditions propices, des streptocoques commensaux peuvent devenir des pathogènes opportunistes initiateurs de maladies et de dommages chez l'hôte. Le groupe des « streptocoques mutans » inclus les principales bactéries impliquées dans la formation de la carie dentaire. L'espèce *Streptococcus mutans*, bien que naturellement présente dans la microflore buccale humaine, est considérée comme responsable de l'initiation des lésions carieuses. La carie dentaire est une maladie bactérienne chronique multifactorielle qui provoque une déminéralisation et une destruction des tissus durs, généralement par production d'acide par fermentation bactérienne des débris alimentaires accumulées à la surface de la dent. Aujourd'hui la carie reste l'une des maladies les plus courantes dans le monde. Les individus sont sensibles à cette maladie tout au long de leur vie (Karpiński and Szkaradkiewicz 2013).

# **CHAPITRE I : LA FLORE BUCCALE**

### 1.1 Qu'est-ce que la flore buccale

La bouche ou la flore buccale constitue la partie initiale du tube digestif liant l'organisme au milieu extérieur, elle contient l'organe de la gustation destinée à la mastication et l'insalivation des aliments. C'est à ce niveau que commence la digestion notamment par la mastication des aliments où interviennent les dents et la salive (**Figure1**).

La communauté microbienne complexe qui réside dans la cavité buccale est appelée microbiote oral. La flore buccale constitue un écosystème riche, complexe et non uniforme, présentant d'importantes variations quotidiennes pour le microbiote résident. Dans ce milieu, plus de 1000 espèces de micro-organismes co-existent, comprenant des bactéries, des virus, des champignons, des archées et quelques protozoaires. Cet écosystème, caractérisé par sa très grande hétérogénéité, son humidité et sa chaleur, offre un terrain propice au développement des micro-organismes sur diverses surfaces, telles que les dents, la langue, la salive, les muqueuses, le palais et les poches parodontales (**Dubois, Ortis et al. 2024**).



**Figure 01** : Vue antérieur de la flore buccale (VACHER C., MALADIERE E)

## 1.2 Les défenses naturelles de notre bouche

La bouche possède les mêmes moyens de défense que les autres organes de notre corps, avec certaines spécificités : comment s'organise notre protection naturelle face aux micro-organismes agresseurs ?

### 1.2.1 La flore résidente

#### 1.2.1.1 Notre barrière biologique

Comme la peau, les bronches ou le vagin, le tube digestif, au niveau de la cavité buccale, possède une flore bactérienne abondante. Ces bactéries s'implantent dans notre organisme dès les premiers jours de la vie et constituent la flore résidente des muqueuses. Dans une bouche saine, on estime qu'il y a près de 700 espèces présentes dont le poids avoisinerait les 20g. En s'opposant à l'implantation des bactéries agressives, elles jouent un rôle de barrière biologique qui nous protège. (**Zitoun-Sztainman 2007**).

#### 1.2.1.2 Les muqueuses : premier obstacle

Ce sont les tissus de revêtement de notre cavité buccale. L'accumulation d'une protéine (la kératine) à la surface de la gencive forme une barrière imperméable et résistante qui prévient l'invasion bactérienne. A la différence de la peau qui possède plusieurs couches de cellules, les muqueuses sont bien plus minces. En revanche, elles sont recouvertes en permanence d'un liquide protecteur, la salive. (**Samaranayake and Matsubara 2017**)

#### 1.2.1.3 La salive : un antiseptique qui lubrifie les muqueuses et dissout les aliments

Nos glandes salivaires sécrètent en moyenne 1,5 litre de salive par jour. Le flux de sécrétion varie au cours des 24 heures. La salive est composée de près de 99% d'eau et de sels minéraux en solution (sodium, chlorure, phosphate, bicarbonate et potassium...). Elle découpe, dissout les aliments et amorce la digestion. De plus, elle a une action nettoyante, mécanique car elle lubrifie nos muqueuses et piège les particules, mais aussi chimique, car elle a un pouvoir antiseptique. Elle contient certaines protéines capables de détruire les micro-organismes étrangers et de diminuer le risque de candidoses. (**Zitoun-Sztainman 2007**).

#### 1.2.1.4 Le fluide gingival

C'est un sérum qui traverse les artérioles et les muqueuses pour se déverser avec un débit de 0.2µl (1µl = 0.000001 litre) par heure dans le sillon de gencive qui entoure la couronne de la dent. Chez un sujet sain, le fluide gingival contient tous les éléments de sérum sanguin et

principalement certains globules blancs qui assurent notre défense contre les agresseurs extérieurs. (Zitoun-Sztainman 2007).

### 1.2.2 Le sang et le réseau lymphatique garants de notre immunité

Les organes lymphatiques et le sang abritent les globules blancs, agents essentiels des défenses de l'organisme et de la résistance aux maladies. Les plaquettes se chargent d'arrêter le saignement et protège ainsi notre système immunitaire (Zitoun-Sztainman 2007).

## 1.3 Ecologie buccale

### 1.3.1 Distribution des bactéries dans la cavité buccale

Jusqu'en 1963, la plupart des bactériologistes ont considéré que la flore orale était uniformément répartie dans la cavité buccale. Les efforts de recherche furent donc concentrés sur la composition bactériologique de la salive comme étant un reflet de celle de la bouche. Puis des études comparatives de différents sites oraux ont clairement établi que les micro-organismes présents sur les surfaces dentaires n'étaient pas nécessairement les mêmes que ceux retrouvés sur la face dorsale de la langue ou sur les muqueuses jugales (Sixou, Diouf et al. 2007).

Par exemple, l'apparition de surface dentaire dure de type émail dans la cavité buccale au cours de l'éruption des premières dents lactéales de l'enfant permet l'installation de *Streptococcus sanguis* et de *Streptococcus mutans*. *Streptococcus salivarius* est largement distribué sur les joues et la langue. Cependant, *Streptococcus salivarius* aura une fixation plus importante sur la muqueuse de la face dorsale de la langue que sur les autres surfaces muqueuses de la cavité buccale majoritairement de cocci et de bacilles à Gram positif. Quelques rares Gram négatif peuvent être rencontrés. À l'inverse, la plaque constituée côté épithélium est faiblement adhérente et principalement composée de cocci et bacilles à Gram négatif. On rencontre également en quantité importante des bactéries mobiles dont des spirochètes (Sixou, Diouf et al. 2007).

### 1.3.2 Bactéries buccales

Un grand nombre d'espèces bactériennes ont été détectées dans la cavité buccale, et il a déjà été estimé que plus de 620 espèces sont hébergé dans la cavité buccale, bien qu'avec les techniques moléculaires largement utilisées, ce nombre puisse en réalité être plus élevé. (Stringer, Logan et al. 2015). La population bactérienne varie selon les sites de la cavité buccale. On pense que la microflore des lèvres est constituée d'anaérobies facultatifs,

principalement ceux du genre streptococcus. D'autres microbes ont été détectés en nombre relativement faible et comprenant veillonella, neisseria et candida (en cas de dommages sous-jacents). La joue et la langue abritent un certain nombre d'espèces de streptococcus ainsi que actinomyces et haemophilus. Les microbes habitent les dents sont appelés plaque dentaire et sont constitués de streptococcus, actinomyces et haemophilus, ainsi que des anaérobies obligatoires trouvées dans crevasse gingivale pauvre en oxygène. Une étude récente de pyroséquençage a montré que les genres prédominants dans la plaque sont streptococcus, veillonella, corynebacterium, actinomyces, fusobacterium et rothia. **(Stringer, Logan et al. 2015)**

Des bactéries sont également présentes dans la salive, les genres prédominants étant *Prevotella*, *Streptococcus* et *Veillonella*. La variation des populations microbiennes entre les régions est due aux variations de la disponibilité des nutriments ; des capacités d'adhésion et du potentiel redox. Des virus ont également été détectés dans un certain nombre de scénario : cependant, ce genre de microbes n'a pas été considéré jusqu'à présent comme faisant partie de la population commensale, car leur survie nécessite l'invasion des cellules hôtes. Une étude métagénomique récente menée par Williner et ses collègues a démontré que des virus sont présents dans la cavité buccale des individus en bonne santé ; cependant d'autres évaluations de ces populations doivent être réalisées avant de pouvoir les examiner en détail **(Samaranayake and Matsubara 2017)**.

## **1.4 Préserver l'équilibre de la flore buccale**

Pour préserver la flore buccale, il est essentiel de maintenir un équilibre délicat entre les bonnes ou mauvaises bactéries présentes dans les cavités buccales. Conseils pour prendre soin de votre bouche et de votre microbiote buccal peuvent être récapitulés comme suit :

### **1.4.1 Hygiène bucco-dentaire optimale**

Une bonne hygiène bucco-dentaire participe à une meilleure qualité de vie et prévient la survenue d'affections susceptibles d'être graves. C'est une combinaison d'actes qui permet de garder la bouche propre, saine et en bonne santé. Elle repose sur les habitudes du quotidien, telles que :

#### **1.4.1.1 Le brossage**

Un brossage des dents réalisé au moins deux fois par jour durant environ trois minutes, de la racine au bord de la dent, avec une brosse bien rincée et changée tous les deux à trois mois.

Après le brossage du soir, le patient ne doit plus manger ou boire (particulièrement des aliments sucrés). De même, il doit prévoir de prendre tout traitement médicamenteux (sirop notamment) avant de se laver les dents. Le brossage peut être complété par l'utilisation de fil dentaire, de brossettes inter dentaires et de jets dentaires (qui éliminent, sous la pression de l'eau, les débris) **(Pillon and Pillot 2015)**

- Brosse à dents : Le nettoyage mécanique des dents s'effectue avec une brosse à dents manuelle ou électrique. **(Hitz Lindenmüller and Lambrecht 2011)**.  
Elle joue un rôle essentiel dans l'hygiène buccale, elle permet l'élimination des résidus alimentaire responsable de la formation de la plaque dentaire qui est à l'origine de l'apparition de plusieurs pathologies bucco-dentaire. **(Sabrae 2023)**.
- Dentifrice : Utiliser un dentifrice est impérative pour le nettoyage quotidien des dents. Utiliser les dentifrices fluorés pour prévenir l'apparition de caries dentaires.  
Les dentifrices au fluor contiennent généralement les ingrédients suivants :  
Les fluorures (fluorure de sodium, fluorure d'amine, monofluorure de sodium) inhibent la perte de minéraux, reminéralisent l'émail dentaire et réduisent la formation de plaque acidogène, ce qui contribue à prévenir des caries. **(Hitz Lindenmüller and Lambrecht 2011)**.
- S'hydrater correctement, ce qui permet d'augmenter la production de salive.
- Un fil dentaire : Utiliser un fil dentaire est un accessoire indispensable qui assure un nettoyage et une protection efficace contre les caries, au niveau des espaces interdentaires. Il y permet une élimination efficace de la plaque et complète l'action d'un bon brossage. **(Sabrae 2023)**.
- Gratte langue : Utiliser une gratte langue qui contribue à l'hygiène de la cavité buccale. C'est un dispositif simple permettant le nettoyage de la face dorsale de la langue et donc l'élimination de l'enduit bactérien lingual responsable de la production de composés malodorants à l'origine de mauvaise haleine. **(Sabrae 2023)**.

#### 1.4.1.2 Utilisation des bains de bouche

Les bains de bouche sont des solutions de rinçage ayant un effet préventif ou curatif Ils se définissent comme un mode de traitement local consistant à placer, au contact de la bouche et des gencives, un liquide froid ou tiède. Ils permettent d'atteindre des zones difficiles d'accès et complètent, sans le remplacer, le brossage des dents ou l'utilisation du fil dentaire. **(Pillon 2010)**

Les bains de bouche sont soit des solutions à usage thérapeutique, soit des solutions d'hygiène

- Les bains de bouche à usage thérapeutique se définissent comme une forme galénique liquide utilisée pour traiter une pathologie.

Ils peuvent se présenter :

- en solution concentrée (à mélanger avec de l'eau avant usage) ;
- en solution non concentrée (Prête à l'emploi) ;
- en comprimé effervescent ;
- sous forme de poudre.

Ils peuvent également avoir un statut de médicament.

L'objectif de leur utilisation est de prévenir une infection grâce à la chlorhexidine (Eludril®, Paroex®, Prexidine®), à l'hexétidine (Hextril®)...

L'usage de ces solutions doit rester ponctuel, en général quelques jours. En effet, à long terme, ce traitement pourrait provoquer une résistance bactérienne, un déséquilibre de la flore buccale (risque de mycoses), une coloration brunâtre des dents ou de la langue, et éventuellement une perturbation du goût. **(Mouton, Robert et al. 1994)**

- Les bains de bouche à usage quotidien sont utilisés comme produit de complément du brossage. Les effets recherchés sont une sensation de bouche plus propre et d'haleine plus fraîche. Les produits vendus dans le commerce sont antiseptiques et/ou anti-inflammatoires grâce aux ammoniums quaternaires, aux huiles essentielles ou à l'énoxolone qu'ils contiennent. En prévention de la carie, il est conseillé d'opter pour un bain de bouche fluoré. **(Pillon 2010)**

Diminuer l'inflammation et la formation de plaque dentaire, donc à prévenir les infections et les gingivites. L'antiseptique de référence est la chlorhexidine (0,12 ou 0,2 %) mais on retrouve également l'hexamidine, la povidone iodée et l'association fluorure d'amines/fluorure d'étain. Ils peuvent se présenter avec ou sans alcool, à diluer ou non avant utilisation, et contenir ou non un agent anesthésique (chlorobutanol dans Eludril®).

D'après **(Pillon and Pillot (2015))**, ces bains de bouche peuvent ainsi être à base de :

- Chlorhexidine (Paroex®, Prexidine®, Eludril®) ;
- Hexétidine (Hextril®) ;
- Peroxyde d'hydrogène (Dentex®) ;
- Chlorure de cétylpyridinium (Alodont®, Veudent®) ;

- Povidone iodée (Bétadine bain de bouche®) ;
- Fluorure d'amines/fluorure d'étain (Méridol®).

### 1.4.1.3 Alimentation équilibrée

D'après (Lopez, Jacquelin et al. (2007), une alimentation équilibrée se base sur la limitation la consommation d'aliments sucrés qui favorisent des bactéries nocives et l'adoption une alimentation saine et équilibrée pour soutenir la santé de la flore buccale.

### 1.4.1.4 Éviter les facteurs perturbateurs

L'équilibre du microbiote reste cependant fragile et sous l'influence de différents facteurs (ZEGHOUF, SAKET et al. 2020) :

- Réduire la consommation d'alcool et tabac qui peuvent perturber l'équilibre de la flore.
- Eviter les aliments acides ou agressifs pour les dents.
- Le tabagisme
- La prise d'antibiotique
- Le stress

### 1.4.1.5 Utilisation de probiotique

Les probiotiques peuvent contribuer à maintenir une flore buccale saine en favorisant l'équilibre des bonnes bactéries. Ils vont empêcher la fixation de micro-organismes pathogènes. Il ne s'agit pas de l'ingérer mais de recréer un environnement microbiotique sain (HINSCHBERGER 1997).

En suivant ces recommandations, il est possible de préserver l'équilibre de la flore buccale, ce qui est essentiel pour une bonne santé bucco-dentaire et générale.

## **CHAPITRE II : LA DENT**

## 2.1 Définition

Les dents sont des organes durs et blanchâtres implantés sur le bord des maxillaires et destinés à la mastication. Elles se divisent d'après leur situation et leur forme en incisives, canines, prémolaires et molaires (Kaibouche, Brighen et al. 2013).

## 2.2. Structure et anatomie

A la description classique de la dent, formée d'une couronne, d'une racine et creusée d'une cavité pulpaire, s'est substitué le concept plus large d'organe dentaire. Cet organe dentaire est formé de l'odonte (ou dent anatomique) et de ses tissus de soutien, ou parodonte.

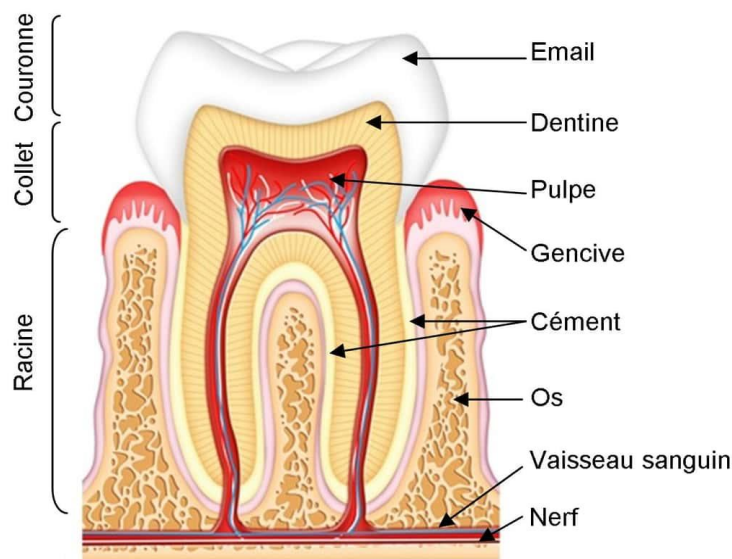


Figure 02: Structure de la dent (GOUIGAH, HAOUS et al. 2020).

### 2.2.1 Odonte

#### 2.2.1.1 Email

C'est un tissu calcifié et acellulaire composé d'une phase minérale représentant 97% de son poids ; elle est essentiellement constituée de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ) et contient environ 2% d'eau, et d'une phase organique qui se situe dans des espaces inter-cristallines et se compose :

- De protéines (énamélines, phosphoprotéines)
- De lipides (phospholipides liés à des phosphoprotéines)
- De complexes protéines-polysaccharides

### 2.2.1.2 Dentine

C'est un tissu cellulaire moins minéralisé que l'email, elle est composée d'une partie minérale représentant 70% du poids de la dentine, essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite et d'une partie organique environ 18% du poids, constituée de collagène du type I, de protéines non collagéniques de complexes protéines-polysaccharides, de citrates et de phospholipides. L'eau représente 12% du poids de la dentine (**Lüllmann-Rauch and Sprumont 2008**).

### 2.2.1.3 Cément

C'est un tissu minéralisé, cellulaire dont l'épaisseur augmente avec le temps, il est composé d'une phase minérale qui représente 65% du poids du cément (ce pourcentage croît avec l'âge). Elle est composée en majeure partie d'hydroxyapatite (**Palo, Bonetti-Filho et al. 2012**).

### 2.2.1.4 Pulpe

C'est un tissu conjonctif possédant des fonctions nutritives, neuro-sensorielles et réparatrices. Elle se divise en deux zones :

-une zone périphérique constituée des odontoblastes et de la couche sous odontoblastique.

-une zone centrale contenant le tissu pulpaire proprement, elle est constituée de :

- Le réseau vasculaire dense
- Les fibres nerveuses sensibles proviennent du nerf trijumeau et les fibres vasomotrices sont issues du système sympathique.
- Les éléments cellulaires sont : fibroblastes et microcytes, cellules indifférenciées, cellules endothéliales et péricytes qui sont des cellules de défense (**Wang, Samann et al. 2013**).

## 2.2.2 Parodonte

### 2.2.2.1 Desmodonte ou ligament alvéolo-dentaire

Il relie la surface cimentaire de la racine dentaire à l'os alvéolaire par un système de fibres. En réalité, des remaniements importants dans l'architecture desmodontale interviennent (**Young, O'Dowd et al. 2015**).

### 2.2.2.2 Os alvéolaire

Il constitue le support des dents temporaires puis des dents permanentes, il est en continuité avec l'os basal maxillaire et mandibulaire. Son architecture est constamment remodelée au cours de la croissance alvéolaire, son existence est liée à la présence des dents.

### 2.2.2.3 Gencive

Elle recouvre une partie des corticales des procès alvéolaires et entoure la région cervicale des dents (**Kierszenbaum and do Nascimento 2008**).

## 2.3. SOS nos dents sensibles !

L'hypersensibilité dentinaire est très courante. Elle touche en moyenne 20% de la population. La rétraction des gencives (souvent visible dans les cas de parodontite) et l'érosion de l'émail par des attaques acides mettent à nu la dentine. Cette dernière est dotée de micro canaux, les tubulis, reliant la pulpe à l'émail ou au ciment. Quand les tubulis sont en contact direct avec le milieu oral, ils transmettent directement au nerf de la cavité pulpaire des stimuli comme les variations de température, le toucher, l'acidité...ce qui entraîne une douleur brève et vive. Il est important de traiter la dent car ces douleurs aiguës freinent le brossage et risquent donc d'aggraver le phénomène (**Zitoun-Sztainman 2007**).

## 3. La carie dentaire

### 3.1. Définition

L'OMS définit la carie dentaire comme étant un processus pathologique localisé d'origine externe qui engendre le ramollissement des tissus durs de la dent (email ou ciment) et conduit à la formation d'une cavité.

La carie dentaire est une maladie infectieuse post-éruptive des tissus durs de la dent. Elle est caractérisée par des périodes de déminéralisation alternant avec des périodes de reminéralisation. Elle est localisée, allant de l'extérieur vers l'intérieur de la dent. Elle affecte les tissus durs de la dent à des degrés variables, allant d'une simple perte de minéraux, non détectable à l'œil nu, à une destruction complète de la dent. Le processus carieux est généralement réversible aux stades initiaux et dans des conditions favorables, tandis qu'il est irréversible aux stades avancés (**AFIRI, ATTAF et al. 2022**).

### 3.2. Caractères généraux

La carie ramollit les tissus dentaires durs et ensuite, elle les détruit. La radiographie montre que le ramollissement résulte d'une déminéralisation. La carie est la seule maladie qui ramollit les tissus dentaires avant de les détruire.

La carie se développe seulement sur les dents en contact avec le milieu buccal, jamais sur les dents complémentaires incluses, ou bien isolées du milieu buccal, sous une couronne (**Magitot, 1867**).

La carie peut se produire sur des dents avec pulpe, sur des dents sans pulpe, sur des dents sans périodontie (dents naturelles, sans racine, fixées dans un pont ou dans une prothèse). Elle peut se produire chez l'homme et les animaux vivants (elle s'arrête après la mort).

D'après **Mézl (1977)**, la carie commence sur la surface de la dent, surtout sur l'email, parfois sur le cément et la dentine si ceux-ci sont exposés au milieu buccal. La carie procède de l'extérieur vers l'intérieur de la dent. C'est une maladie chronique, très lente, et incurable. Ceci est dû plutôt au caractère spécial des tissus dentaires qui ne peuvent pas régénérer.

### 3.3 Comment se forme une carie ?

Comme nos muqueuses buccales, l'email de nos dents est colonisé par différentes espèces bactériennes qui forment un écosystème très protégé de l'extérieur : le biofilm de la plaque dentaire (**SOMMAIRE, 2001**). Ces bactéries résidentes nous protègent contre les bactéries agressives. Alors, pourquoi désorganiser ce biofilm en se brossant les dents ?

Parce qu'en l'absence de nettoyage, la plaque dentaire ne cesse de croître. En assimilant le saccharose et d'autres sucres provenant de notre alimentation, les bactéries se multiplient. Ainsi, le biofilm se consolide et devient de plus en plus dense. Les bactéries agglutinées à la surface de l'email se retrouvent sans oxygène ; elles libèrent des acides qui ne peuvent s'échapper. La surface de la dent s'acidifie, le pH diminue (le pH mesure le taux d'acidité ; plus il est bas, plus le milieu est acide). S'il est inférieur à 5,6, la déminéralisation de l'email commence et une cavité, la carie se forme et s'agrandit insidieusement (**Kaoutar, 2013**).

D'après (**Zitoun-Sztainman 2007**), Le délai d'apparition des caries varie fortement en fonction des individus. Cela dépend de différents facteurs :

- La composition du biofilm

- Les apports en sucres de l'alimentation
- Le terrain : composition de l'email, anatomie du site, profondeur des sillons de la dent, composition.

### 3.4. Evolution de la carie

Si la carie est abandonnée à elle-même, elle suit une évolution progressive (on note une exception : la carie arrêtée). La carie débute sous les plaques bactériennes, dans les zones de prédilection. La carie débute sur la surface de l'email comme une petite tache opaque, d'un blanc crayeux ou d'un brun plus ou moins foncé. Cette tâche est une partie de l'email sous-jacent sont ramollies (**Benigeri, 2001**).

A l'intérieur de la dent, la lésion présente la forme d'un cône parce qu'elle se propage par les voies naturelles, les bâtonnets de l'email, à partir d'un point central. Sur les surfaces lisses, la base du cône est située sur la surface de l'email, la pointe en profondeur. Quand la carie débute dans une fissure ou dans un puits, la pointe du cône est près de la surface, la base en profondeur, parce qu'ici les bâtonnets se dirigent vers la paroi de la fissure là où est aussi accolée la plaque bactérienne. On pourrait la comparer à deux cônes provoqués par deux caries de surface lisse sur les parois de la fissure (**Bahije, 2008**).

Cette lésion conique déminéralisée évolue lentement pendant une période qui varie dans la plupart des cas de 6mois à 24 mois ; une partie de l'email est ensuite détruite et la carie forme la cavité.

La cavité est considérée comme caractéristique de la carie, surtout par les profanes. Mais ce n'est pas entièrement correct : la carie initiale évolue longtemps avant de former une cavité ; l'érosion, l'abrasion, l'attrition, l'hypoplasie de l'email peuvent parfois produire des cavités qu'il faut distinguer de la carie (**Fellahi, 2022**). La cavité avec des parois ramollies est très caractéristique de la plupart des caries avancées.

Dans la dentine, la propagation de la carie est plus facile que dans l'émail parce que la dentine et le joint énamo-dentinaire sont moins calcifiés ; les fibres de Tomes ne sont pas calcifiés, il y a des anastomoses entre les tubuli. Dans la dentine, la carie forme un cône plus large que celui formé dans l'émail parce qu'elle se propage en profondeur par les tubuli, latéralement par le joint énamo-dentinaire et par les ramifications des tubuli (**Kaoutar, 2013**).

L'intérieur du cône est constitué de dentine ramollie. Autour de la dentine ramollie on peut distinguer plusieurs zones et des phénomènes de défense, si la pulpe est vivante et capable de

se défendre. A l'œil nu, on note surtout une zone translucide, la sclérose de la dentine et dans la chambre pulpaire, de la dentine réactionnelle. La cavité dans l'email s'approfondit et la carie forme une cavité dans la dentine. Cette cavité dans la dentine. Cette cavité continue à s'approfondir et s'élargir. Son évolution varie d'après les formes cliniques (**Nicolas, 2011**).

On cite parfois des caries qui ont altéré la dentine sans produire d'abord le cône classique au niveau de l'email ; on suppose alors que l'agent cariogène a pénétré à travers une lamelle ou une craquelure de l'email. La documentation est douteuse, habituellement liée aux spéculations sur la théorie protéolytique et accompagnée par des trucs de technique histologique (utilisant par exemple des coupes à la périphérie de la lésion). Si de telles lésions existent, elles sont bien exceptionnelles.

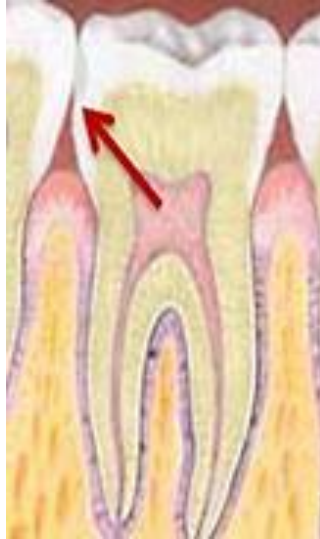
La pigmentation de la lésion est considérée comme caractéristique par certains auteurs mais elle n'est pas toujours visible à l'œil nu. Si l'évolution est relativement rapide, elle est d'un jaune blanchâtre. Si l'évolution est lente, elle est d'un jaune brunâtre ; elle est brune, brun foncé, presque noire si l'évolution est très lente ou chez les gros fumeurs (**Mézi 1977**).

### **3.5. Types de caries dentaires**

Les caries sont classées selon l'aspect clinique de la cavité et selon le degré d'atteinte des différents tissus touchés. Les cinq classes de carie sont : carie initiale, carie superficielle, carie profonde, carie pénétrante, carie perforante.

#### **3.5.1 Carie initiale**

C'est une déminéralisation partielle des cristaux sains de l'email par les acides. A ce stade la surface de l'email reste intacte (l'absence de la cavité). L'aspect clinique est une tache crayeuse ou blanchâtre située souvent dans les espaces inter proximaux. Cette carie est la seule carie réversible, à condition d'améliorer l'hygiène et si possible d'effectuer une fluoruration (**Yonghong, Lihong et al. 2013**).



**Figure 03:** carie initiale (Kaibouche, Brighen et al. 2013).

### 3.5.2 Carie superficielle

La carie superficielle est une carie qui n'atteint que l'émail et/ou le cément. La rupture superficielle de l'émail permet l'extension de la plaque dentaire dans la lésion, alors l'élimination mécanique de la plaque dentaire devient impossible. Les acides provenant de la dégradation des hydrates de carbone par les bactéries de la plaque dentaire peuvent facilement atteindre la limite jonction email-dentine. Cliniquement on détecte une petite cavitation où la sonde croche. La lésion présente une petite coloration par asymptotique (aucune douleur pour le patient) (Yonghong, Lihong et al. 2013).



**Figure 04:** carie superficielle (Kaibouche, Brighen et al. 2013).

### 3.5.3. Carie profonde

La carie profonde est une lésion qui atteint l'émail et la dentine. La cavité qui est présente au niveau de l'émail est plus petite que la cavité interne. En effet, une fois que la carie a atteint la jonction émail-dentine, elle progresse plus rapidement dans la dentine car celle-ci est peu minéralisée. A ce stade, la pulpe ne présente aucune altération et si la carie est soignée la dent reste vivante (**Rada 2013**).



**Figure 05:** carie profonde (**Kaibouche, Brighen et al. 2013**).

### 3.5.4 Carie pénétrante

La carie pénétrante est une carie qui a détruit l'émail et la dentine. La dentine réactionnelle est touchée à son tour, et la carie avance rapidement en direction de la pulpe. A ce stade, la pulpe est vivante, mais présente des troubles importants (douleurs aiguës). Les douleurs sont spontanées principalement en phase aiguë, on parle alors de pulpe aiguë. L'évolution vers une phase chronique n'est pas rare (**Jablonski-Momeni, Lange et al. 2013**).



**Figure 06:** carie pénétrante (Kaibouche, Brighen et al. 2013).

### 3.5.5 Carie perforante

La carie perforante est une carie où tous les tissus dentaires sont détruits. La pulpe est nécrose et les microorganismes de la carie ont envahi les tissus. Il devient difficile de reconnaître la structure pulpaire typique. Des complications per apicales (granulomes, kystes) peuvent se développer. En fonction du degré de nécrose et du stade d'infection chronique, le patient présente des douleurs qui peuvent être intolérables ou pas (Hashimoto, Sato et al. 2010).



**Figure 07:** carie perforante (Kaibouche, Brighen et al. 2013).

### 3.6 Diagnostic des caries

Une évaluation clinique systématique et fréquente (tous les 3 à 12 mois en fonction du risque carieux évalué par un dentiste) identifie les caries précoces à un moment où une intervention minimale empêche leur progression. Une sonde fine, parfois des colorants spéciaux, et la transillumination par fibres optiques sont utilisées, bien que rarement, complétées par de nouveaux dispositifs qui détectent les caries par des modifications de la conductivité électrique ou de la réflectivité laser ou la transillumination (y compris l'utilisation de dispositifs lumineux dans le proche infrarouge). Cependant, l'examen rx est toujours le plus important pour la détection des caries, pour déterminer la profondeur de l'atteinte et pour identifier les caries sous les restaurations existantes (**Louvié 2023**).

### 3.7 Facteurs de risque

Il existe plusieurs facteurs de risque dans la maladie carieuse :

- Contrôle inadéquat de la plaque
- Anomalies dentaires
- Alimentation, consommation particulièrement fréquente de glucides et de sucres alimentaires
- Environnement à haute teneur en acide et/ou bas en fluor

Caractéristiques de la salive, dont un débit salivaire réduit (p. ex., en raison de médicaments, d'une radiothérapie, de troubles systémiques qui provoquent un dysfonctionnement des glandes salivaires), et la capacité de tamponnement et le pH.

- Facteurs génétiques héréditaires

De nombreuses dents présentent des sillons, des puits et des fissures pouvant s'étendre de la surface de l'émail à la dentine. Ces défauts sont suffisamment larges pour héberger des bactéries mais trop étroits pour être nettoyés correctement. Leur existence prédispose aux caries (**Trentesaux, 2011**).

L'exposition alimentaire fréquente aux glucides et aux sucres favorise la croissance des bactéries présentes dans la plaque dentaire. Le développement de caries sévères de la petite enfance (caries invasives des dents de lait) provient du contact prolongé de ces dents avec du lait ou du jus de fruit, le plus souvent lorsque le nourrisson s'endort avec son biberon (caries

précoces ou caries du biberon). Ainsi, les biberons avant le coucher ne doivent contenir que de l'eau (**Reich, 1999**).

La surface dentaire est plus sensible à l'atteinte carieuse lorsqu'elle est peu calcifiée, est peu exposée au fluor et/ou exposée à un environnement acide. Typiquement, la décalcification débute quand le pH à la surface de la dent descend en dessous de 5,5 (p. ex., en cas de colonisation par des bactéries productrices d'acide lactique ou lorsque les sujets boivent des boissons gazeuses, des boissons pour sportifs ou des boissons énergisantes, qui ont généralement des pH inférieurs à 5,5) (**Benkaddour, 2014**).

Les personnes âgées polymédiquées ont une diminution du débit salivaire, les prédisposant à l'atteinte carieuse. Les personnes âgées présentent également une incidence plus grande de caries radiculaires du fait de la récession gingivale, de l'exposition des surfaces radiculaires et d'une dextérité manuelle diminuée (limitant l'hygiène bucco-dentaire) (**Louvié 2023**).

### **3.8 Les principaux germes responsables des caries dentaires**

Parmi les microorganismes responsables des caries dentaires, trois genres bactériens sont prédominants : le groupe des *Streptococcus mutans* impliqué dans l'initiation de la lésion carieuse (**Takahashi and Nyvad 2011**), le genre *Lactobacillus*, impliqué dans la progression de la lésion carieuse et le genre *Actinomyces*, impliqué plus particulièrement dans les caries radiculaires (**Leme, Koo et al. 2006**).

#### **3.8.1 Streptococcus**

Ce sont des cocci à Gram positif, sphériques ou ovoïdes, disposés en paire pour former des diplocoques et pouvant se présenter sous forme de chaînettes parfois longues, ils ne sporulent pas. Ils ne possèdent ni catalase, ni oxydase. Ils peuvent se développer en aérobiose et ont un métabolisme fermentatif, ces bactéries sont à considérer comme des anaérobies tolérants l'oxygène (**Avril 1991**).

Les principaux groupes de bactéries impliqués dans la physiopathologie de la carie dentaire sont: *Streptococcus mutans*, agent étiologique majeur des caries dentaires, et d'autres espèces telles que *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus oralis* (**Avril 1991**).

Les propriétés acidogéniques et aciduriques des streptococcus mutans en font les bactéries les plus cariogènes de la plaque dentaire (**Marsh 2004**). A partir des sucres provenant de

l'alimentation, les *Streptococcus mutans* synthétisent des polysaccharides extracellulaires, glucanes et fructanes, qui leur confèrent la capacité d'adhérer aux surfaces dentaires (**Hojo, Nagaoka et al. 2009**). De plus, en métabolisant les hydrates de carbone alimentaires, les *Streptococcus mutans* produisent de l'acide, surtout de l'acide lactique (**Colon and JJ 2009**). Par ailleurs, *Streptococcus mutans* peut survivre et même se développer dans un milieu extrêmement acide à un pH auquel la majeure partie des bactéries ne sont plus actives (**Matsui and Cvitkovitch 2010**). Faiblement présent au début dans la plaque dentaire (moins de 1 %), *Streptococcus mutans* devient majoritaire dans la plaque cariogène active. Cette bactérie est particulièrement virulente du fait de son utilisation optimale du saccharose. En effet *Streptococcus mutans* est doté d'un facteur de virulence supplémentaire : lorsque les glucides exogènes sont abondants, celui-ci peut polymériser le glucose à l'intérieur de la cellule et le stocker.

Ces polysaccharides intracellulaires sont dépolymérisés quand les hydrates de carbone exogènes ne sont plus disponibles. Cette particularité entraîne une production d'acide continue (**Rosan, 2000**).

### 3.8.2 Lactobacillus

Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram positif, asporulés, parfois groupés en paire ou en chaîne, généralement immobiles. Ils n'ont pas de catalase, sont des micro-aérophiles ou anaérobies, ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Les Lactobacilles exigent pour leur développement des milieux bien adaptés, riche en acides aminés, vitamines et acides gras : ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques (**Guiraud, 2004**). Les espèces les plus fréquemment isolées dans la cavité buccale sont *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus salivarius* (**Horiuchi, 2009**). Leur croissance exige des milieux enrichis en facteurs de croissance (**Avril, 1991**).

Les bactéries du genre *Lactobacillus* appartiennent à la flore normale de la cavité buccale. Elles apparaissent au cours de la première année de la vie de l'enfant avec les premières dents et sont alors retrouvées au niveau de la salive, de la surface de la langue, de la plaque dentaire et des dents. Dans la salive, leur présence est d'autant plus fréquente que l'âge des sujets augmente. Au niveau de la plaque dentaire, les auteurs s'accordent à constater une augmentation de leur taux préalablement à l'établissement d'une lésion carieuse ; ce taux passe

de 1 % à 4 à 5%. Ceci s'explique par la production d'une protéine d'adhésion se trouve sur les surfaces de cellules de lactobacilles ont une couche de S, cette couche de protéine a une structure cristalline est responsable de l'hydrophobicité extérieur. Les bactéries peuvent adapter leur hydrophobicité extérieure aux changements environnementaux (pH, concentration ionique). Cependant, on a démontré que les contraintes avec une couche de S n'adhèrent pas mieux que des contraintes sans couche de S. Ils ont une faible capacité d'adhérence aux surfaces lisses et donc une affinité relativement faible pour les tissus dentaires. Ainsi, ils colonisent essentiellement les sites de la cavité buccale qui permettent une rétention mécanique, comme les anfractuosités naturelles de la dent, les restaurations débordantes ou non étanches et les dispositifs orthodontiques (**Badet, 2008**).

Le nombre de Lactobacilles salivaires est ainsi corrélé à la consommation en glucides fermentescibles : il s'élève lors d'un régime sucré, diminue lors de la suppression des sucres. Ces bactéries sont impliquées dans le processus carieux, et plus particulièrement dans la progression de la lésion de la dentine. Il semble que l'adhérence des Lactobacilles à la dentine soit favorisée par leur affinité pour la matrice collagénique rendue accessible par la déminéralisation. Certaines espèces de lactobacilles ont un métabolisme homofermentaire strict et produisent deux molécules de lactate par une molécule de glucose fermenté par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas. D'autres ont un métabolisme hétérofermentaire et synthétisent d'autres produits finaux comme l'acétate, l'éthanol, le formiate, le succinate et le CO<sub>2</sub> (**Guiraud, 2004**).

### 3.8.3 Actinomycetes

Les genres *Arachina* et *Actinomyces* sont classés dans la section des bacilles irréguliers, non sporulés à Gram positif, ce sont des diphtéroïde, ramifié, à catalase positive (sauf l'espèce *Actinomycesviscosus*). La réduction des nitrates est variable selon l'espèce. Ce sont des anaérobies stricts ou facultatifs, non alcool-acido-résistants, immobiles. Les produits de leur métabolisme glucidique sont les acides succinique, acétique et lactique. Chez l'homme, les espèces du genre *Actinomyces* font partie de la flore endogène commensale des muqueuses des voies aéro-digestives supérieures, du tractus intestinal et vaginal. Une dizaine d'espèces d'*Actinomyces* est retrouvée au niveau de la cavité buccale. Deux espèces majeures, *Actinomycesviscosus* et *Actinomycesnaeslandii*, sont responsables des caries dentaires et d'affections périodontales, souvent en association avec d'autres bactéries telle que les Streptocoques, mais il peut exister d'autres espèces telle que *Actinomycesisraelii*, *Actinomycesmeyerii*. Ces genres de ces bactéries s'accumulent au niveau de l'émail dentaire le

long de la gencive. La plaque formée in vitro par *Actinomyces viscosus* montre clairement un potentiel acidogène moins que la plaque formée par *Streptococcus mutans* ce qui expliquerait que ces bactéries soient responsables de caries localisées au niveau du cément qui est un tissu nettement moins minéralisé que l'émail. Les Actinomyces seraient également des bactéries qui interviendraient dans un deuxième temps dans la carie dentaire en participant à la lésion carieuse au niveau de la dentine. Outre, les Actinomyces sont les principales bactéries colonisées dans la plaque supra-gingivale des enfants. La prévalence de l'*Actinomyces* spp. Peut avoir une relation négative avec les petites caries, et n'a rien à voir avec des endroits différents des dents (**Yang, 2007**).

Une lésion des muqueuses, permettant le passage des Actinomyces dans les tissus, constitue la phase initiale de l'Actinomycose. Dans la forme cervico-faciale, il s'agit le plus souvent d'un traumatisme au niveau de la bouche, comme une extraction dentaire. Les sujets ayant une mauvaise hygiène bucco-dentaire, des pyorrhées, des abcès et des caries dentaires sont particulièrement prédisposés. Il s'ensuit une induration des tissus mous adjacents dus à une infiltration à leucocytes polynucléaire et à une réaction de sclérose tenant à limiter la diffusion des lésions. Le plus souvent la région parotidienne ou l'angle maxillaire sont alors concernés.

L'évolution des espèces de ce genre est lente et apyrétique. Localement on observe une tuméfaction, le plus souvent indolore, dure au toucher et un érythème (**Shah, 2013**).

### 3.8.4 Autres microorganismes responsables des caries dentaires

**Tableau 01:Autres bactéries responsables des caries dentaires (Aas, 2008).**

Email	Dentine coronaire	Racine
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Capnocytoph gas putigena</i>	<i>Eubacterium spp</i>	<i>Selenomonas spp</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Fusobacterium animalis</i>	<i>Atopobium spp</i>
<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Veillonella spp</i>	<i>Prevotella multisaccharivorax</i>
		<i>Pseudoramibactera lactolyticus</i>
		<i>Propionibacterium spp</i>

## 3.9. Traitement des caries

### 3.9.1. Reminéralisation des dents

La reminéralisation des dents en cas de caries naissantes (limitées à l'émail) est généralement tentée par des soins à domicile améliorés (brossage et fil dentaire), des nettoyages, des prescriptions de dentifrices à haute teneur en fluor et des applications multiples de fluor au cabinet dentaire. D'autres produits topiques proposés pour promouvoir la reminéralisation contiennent du calcium et des phosphates, mais sont moins efficaces pour reminéraliser les caries que le fluor. Le fluorure de diammine d'argent, disponible dans le commerce aux États-Unis depuis 2015, peut arrêter et reminéraliser les lésions carieuses. Cependant, le fluorure de diamine d'argent colore de façon permanente les caries en noir, il est donc principalement appliqué sur les dents de lait (**García-Godoy, 2008**).

### 3.9.2. Restauration des dents

Le traitement principal des caries ayant atteint la dentine est l'éviction mécanique des tissus cariés, suivie du comblement de la cavité formée.

L'obturation des cavités occlusales des dents postérieures qui supportent de fortes forces masticatoires sera effectuée à l'aide de matériaux résistants, dont :

- Amalgame des dents
- Résines composites (**Dawes, 2003**).

**Les amalgames dentaires**, sont des alliages d'argent, de mercure, de cuivre, d'étain et parfois de zinc, de palladium ou d'indium. L'amalgame est un produit peu coûteux, d'une durée de vie moyenne de 14 ans. Cependant, avec une bonne hygiène buccale et une mise en œuvre sous digue pour l'isolation salivaire, nombre d'amalgames dentaires restent fonctionnels > 40 ans. L'amalgame est un matériau très durable avec des taux d'échec annuels inférieurs à ceux des résines composites ; par conséquent, les restaurations en amalgame durent plus longtemps et sont plus résistantes aux caries secondaires que les restaurations en composite.

L'utilisation des amalgames diminue pour 2 raisons principales :

- Les résultats ne sont pas aussi esthétiques que ceux obtenus avec des composites ou des ionomères de verre.
- Il existe des préoccupations environnementales concernant l'élimination du mercure des amalgames.

Bien que l'intoxication par le mercure ait été un sujet de préoccupation, la quantité d'amalgames chez un patient n'a aucune conséquence sur les taux de mercure dans leur sang. Remplacer un amalgame n'est pas recommandé car cela est coûteux, cela altère la structure de la dent et de plus augmente l'exposition du patient au mercure et nécessite l'utilisation de séparateurs d'amalgame pour éviter l'élimination de son contenu en mercure dans l'environnement. En raison des préoccupations environnementales récentes concernant l'élimination du mercure des obturations traditionnelles, la tendance est d'utiliser des matériaux dentaires autres que les amalgames (**Aas, 2008**).

**Les résines composites**, plus esthétiques, sont utilisées depuis longtemps pour les dents antérieures, où l'apparence prime sur des forces de mastication plus faibles que dans le secteur postérieur. De nombreux patients demandent également à en bénéficier pour les restaurations des dents postérieures pour lesquelles ils sont maintenant couramment utilisés. Les premières générations de résines composites sous contrainte occlusale élevée duraient moins de la moitié de ce que duraient les amalgames et avaient tendance à laisser se développer des caries récurrentes car la résine composite rétrécit lorsqu'elle durcit et se dilate et se contracte sous l'effet de la chaleur et du froid. La génération actuelle de composites simule mieux la dureté de l'émail et ne semble pas avoir la même incidence de récurrences de caries que les matériaux

précédemment utilisés et peut durer plus longtemps. L'utilisation de restaurations en résine composite liée permet une meilleure conservation de la structure de la dent par rapport aux préparations d'amalgame (**Mueller, 2006**).

**Le verre ionomère**, un matériau d'obturation qui a la couleur des dents, libère du fluor lorsqu'il est en place, un avantage chez les patients particulièrement sujets aux caries dentaires. Il est également utilisé pour restaurer les zones lésées par un brossage trop zélé. Le verre ionomère n'est pas aussi esthétique que le composite, et il ne doit pas être utilisé sur les surfaces de mastication car son taux d'usure est élevé. Des matériaux en verre ionomère résineux sont également disponibles et apportent une amélioration esthétique par rapport aux verres ionomères conventionnels (**Louvié, 2023**).

Si la carie laisse trop peu de dentine pour conserver une couverture totale ou partielle, le dentiste remplace la dentine manquante par du ciment, des amalgames, des matériaux composites ou d'autres matériaux. Parfois, un tenon doit être inséré dans une ou plusieurs racines pour soutenir un noyau en or, en argent ou en composite, qui remplace la dentine coronaire. Ce procédé nécessite un traitement endodontique pour lequel une ouverture (cavité d'accès) est réalisée dans la dent et la pulpe est retirée. Les canaux radiculaires sont nettoyés, mis en forme puis obturés avec du gutta-percha. Les surfaces externes des dents (qui correspondent à l'émail) sont ensuite réduites afin qu'une couronne artificielle, généralement en métal, en porcelaine ou en céramique puisse être placée. Les couronnes pour les dents antérieures sont en porcelaine ou en céramique ou en sont recouvertes (**Louvié 2023**).

# **CHAPITRE III : LA RESISTANCE BACTERIENNE**

### 3.1. Les antibiotiques

#### 3.1.1. Définition

Un antibiotique, du grec anti « contre », et bios « la vie » (**Guardabassi and Courvalin 2005**). selon (**Aouni, Pelen et al. 2013**) Un antibiotique est une substance naturelle, synthétique ou semi synthétique qui a pour effet de détruire les micro-organismes et les bactéries ou de les empêcher de se développer (effet bactéricide). L'origine du terme « antibiotique » est reliée au mot « antibiose » utilisé pour la première fois en 1889 par Paul Vuillemin pour décrire le phénomène d'antagonisme entre les micro-organismes (**Bentley & Bennett, 2003**).

L'étendue de l'action antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action, plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large (**Guinoiseau, 2010**). L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de « bactériostatique ». Alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits « bactéricides ». L'administration d'antibiotique bactériostatique suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé (**Guinoiseau, 2010**).

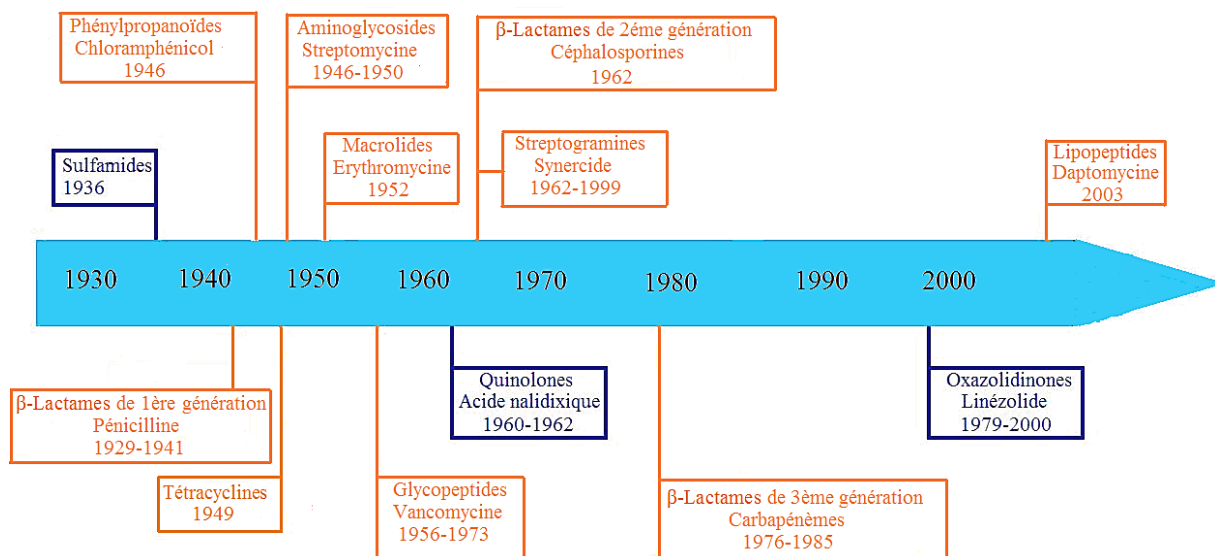
#### 3.1.2 Historique

La découverte de l'activité antibactérienne des sulfamides synthétiques par Paul Gerhard Domagk dans les années 1930, est un événement important dans l'histoire des antibiotiques. Ces produits, sont ainsi, les premiers antibiotiques synthétiques utilisés cliniquement dès 1936 (**Davies et al., 2010**). Cependant, la véritable naissance du premier antibiotique est marquée par la découverte d'Alexandre Fleming, en 1929, pour la pénicilline, un antibiotique naturellement produit par la moisissure *Penicillium notatum*. Il a fallu attendre jusqu'à 1945 pour que ce Beta-lactamine soit disponible pour la population (**Etebu & Arikekpar, 2016**).

Cet événement a ouvert ainsi la voie pour l'identification de plusieurs autres classes d'antibiotiques d'origine naturelles, incluant les phénicolés, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les streptogramines, les céphalosporines et enfin les carbapénèmes à la fin des années 1970. Dans les années 1980, une autre substance

antibiotique naturelle nommée daptomycine a été découverte, celle-ci, est produite par *Streptomyces roseosporus*, et possède une activité exclusive contre les bactéries à Gram positif ; elle fut commercialisée à partir des années 2000 (Taylor et al., 2016).

Durant cette période, les efforts fournis dans l'industrie pharmaceutique ont permis aussi, d'élucider deux autres classes d'antibiotiques synthétiques, les quinolones et les oxazolidinones. La (figure 08) suivante résume l'enchaînement chronologique de la découverte des antibiotiques qui s'est étendu de 1936 à 1962.



**Figure 08:**Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique (Singh & Barrett, 2006).

### 3.1.3 Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine de l'antibiotique, la nature chimique, le mode d'action et le spectre d'activité

- **L'origine de l'antibiotique** : les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés (pénicilline). Elaboré par un organisme naturel ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique) (Singh & Barrett, 2006).
- **La nature chimique** : C'est la classification la plus adaptée pour laquelle les antibiotiques sont classés en familles. Dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques (Bennani, 2014).

- **Le mode d'action** : les antibiotiques peuvent agir sur la paroi bactérienne (peptidoglycane), la membrane cytoplasmique, la synthèse des acides nucléiques (**Singh & Barrett, 2006**).
- **Le spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large). Le spectre d'un antibiotique est destiné à caractériser l'activité microbiologique d'un antibiotique sur une espèce bactérienne en tenant compte des résistances naturelles et acquises. Plus le spectre est large plus le nombre d'agents infectieux sensibles à l'antibiotique est important et diversifié (**Mehamdia Naima, 2014**).

### 3.1.4 Les Mécanismes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne ; Il existe plusieurs mécanismes de résistance, dont certains très complexes, qui ne sont que le reflet de l'adaptation du monde microbien envers les agresseurs que sont les antibiotiques (**Weiss, 2002**).

Le mécanisme d'action peut être récapitulé selon quatre grands mécanismes (**Kadri Ekade Hannatou-Sacko Aissata, 2011**).

- Inhibition de la formation de la paroi bactérienne lors de la multiplication cellulaire,
- Désorganisation de la structure de la membrane cellulaire de la bactérie,
- Blocage de la synthèse biologique des protéines dans les ribosomes,
- Blocage de la biosynthèse protéique par entrave à la réplication de l'ADN bactérien.

### 3.1.5 Les grandes familles d'antibiotiques

**Les  $\beta$ -lactamines** : les  $\beta$ -lactamines constituent la famille d'antibiotique la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutiques et en prophylaxie des infections bactériennes (**Cavallo et al., 2004**). Les  $\beta$ -lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne (**Yadav & Prakash, 2017**). Les membres de cette classe d'antibiotiques contiennent un composé à 3 carbones et un cycle 1-azote hautement réactif. Ils interfèrent avec les protéines essentielles à la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne et, ce faisant tuent ou inhibent leur croissance. Plus succinctement, certaines enzymes bactériennes appelées protéines liant la pénicilline (PBP) sont responsables de la réticulation des unités peptidiques lors de la synthèse du peptidoglycane. Les membres des antibiotiques bêta-lactamines sont capables de se lier à ces enzymes PBP et, ce faisant,

interfèrent avec la synthèse du peptidoglycane, entraînant la lyse et la mort cellulaire. Les représentants les plus éminents de la classe des bêta-lactamines comprennent les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (Etebu & Arikekpar, 2016).

**Les tétracyclines :** les tétracyclines constituent une famille d'antibiotiques très homogènes, caractérisée par une activité bactériostatique à spectre très large (actifs contre les bactéries Gram négatives, Gram positifs, les rickettsies, les chlamydes, et les mycoplasmes) (Kadri Ekade Hannatou-Sacko Aissata, 2011). Les tétracyclines a été découverte en 1945 à partir d'une bactérie du sol de genre Streptomyces par Benjamin Duggar (Sánchez, Rogers III et al. 2004). Le premier membre de cette classe était la chlorotétracycline (auréomycine). Les membres de cette classe ont quatre cycles hydrocarbonés et sont connus sous le suffixe « cycline ».

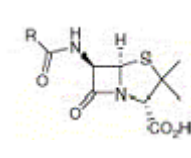
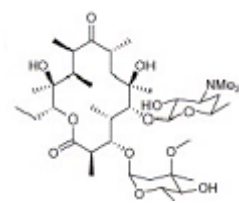
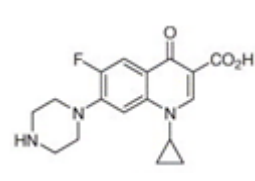
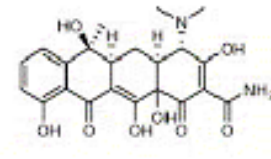
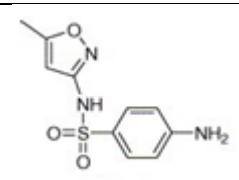
- On distingue les cyclines naturelles et les cyclines semi synthétiques. Les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30 S du ribosome. La cible de leur activité antimicrobienne chez les bactéries est le ribosome. Ils perturbent l'ajout d'acides aminés aux chaînes polypeptidiques lors de la synthèse des protéines dans cet organe bactérien (Yadav & Prakash, 2017).

**Les quinolones :** Les quinolones ont une structure générale dérivant de l'acide dihydro-1,4-oxo-4-quinoléine carboxylique. La première molécule des quinolones est Negram (acide nalidixique). Depuis, plusieurs molécules ont été synthétisées pour exalter le pouvoir antibactérien et améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques (LES AMINOSIDES). Cette classe d'antibiotiques a été découverte pour la première fois sous le nom d'acide nalidixique par des scientifiques impliqués dans la recherche de médicaments antipaludiques (Etebu & Arikekpar, 2016). La nomenclature des membres de cette classe d'antibiotiques est complexe, mais les membres de cette classe sont souvent connus par le suffixe oxacine, comme la floxacine. Des modifications de la structure de base des quinolones auraient amélioré leur biodisponibilité, et augmenter à la fois leur spectre d'activité et leur puissance. (Domagala 1994)

**Les macrolides :** Les macrolides sont des médicaments bactériostatiques ayant une activité contre les streptocoques, les staphylocoques et certains anaérobies oraux. Leur caractéristique pharmacocinétique la plus intéressante est l'importante fixation dans les tissus et dans certains liquides biologiques, notamment pour la spiramycine (Yadav & Prakash, 2017). Les macrolides ont un grand cycle lactone de 12 à 22 carbones associés à un ou plusieurs sucres,

les macrolides possèdent un noyau lactone central qui est à la base de leur classification, selon le nombre d'atomes de carbone. Ce sont des molécules lipophiles. Les macrolides agissent en inhibant la synthèse protéique bactérienne. Ils se fixent sur l'unité 50 S du ribosome et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse. Ils sont **bactériostatiques (Etebu & Arikekpar, 2016)**. Le **tableau 02** suivant résume quelques familles d'antibiotiques.

**Tableau 02:** mode d'action de quelques grandes familles d'antibiotiques

Classe	Origine	Mode d'action	Structure chimique
$\beta$ - lactamine	Pénicilum	Inhibent la synthèse du Peptidoglycane par blocage de la transpeptidation	
Macrolide	Streptomyceerythraeus	Empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	
Quinolone	Synthétique	Inhibent la gyrase bactérienne	
Tétracycline	Streptomyce	Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome	
Sulfamide	Synthétique	Inhibent la synthèse de l'acide folique	

### 3.2 La résistance bactérienne

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelles et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique, alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques (**Bouyahya et al., 2017**).

#### 3.2.1 Définition de la résistance aux antibiotiques

Il existe plusieurs définitions pour la résistance bactérienne aux antibiotiques, qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques). Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*) (**Muylaert & Mainil, 2013**).

La résistance microbiologique se traduit par la croissance ou l'absence de croissance d'une souche bactérienne en présence d'un antibiotique. Il faut bien comprendre que la résistance microbienne dont font état les rapports de laboratoires est fonction de la concentration sérique que peut atteindre un antibiotique (**Weiss, 2002**).

Classiquement, la résistance aux antibiotiques a été définie d'un point de vue opérationnel, qui classe les bactéries comme résistantes ou sensibles en se basant sur la possibilité de traiter les infections qu'elles produisent. En clinique, une bactérie résistante est celle qui peut échapper au traitement, ce qui peut se manifester par un échec thérapeutique, et inversement une bactérie est dite sensible, lorsque le traitement a une forte probabilité de succès (**Martinez, 2014**). Selon l'OMS, une souche résistante est une souche qui supporte une concentration d'antibiotiques notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce (**Mehamdia Naima, 2014**).

Un micro-organisme est considéré « résistant » lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (**Weiss, 2002**).

#### 3.2.2 Historique

La résistance aux antibiotiques n'est pas nouvelle. En effet, depuis l'introduction des premiers antimicrobiens efficaces en 1937, à savoir les sulfamides, le développement de mécanismes spécifiques de résistance ont tourmenté leur usage thérapeutique (**Davies et al., 2010**).

Ainsi, à savoir les sulfamides, le développement des mécanismes de résistance ont nui à leur utilisation thérapeutique. La résistance aux sulfamides a été initialement signalée à la fin des années 1930, et les mêmes mécanismes fonctionnent environ 70 ans plus tard. Ensuite, Alexander Fleming a sélectionné et décrit des mutants résistants à la pénicilline peu de temps après avoir découvert l'antibiotique (**Davies et al., 2010**). Aujourd'hui, certaines bactéries, se caractérisent non seulement par une résistance unique, mais aussi par une résistance à plusieurs antibiotiques (multi résistance) (**Levy & Marshall, 2004**).

### **3.2.3 Origines et causes de la résistance bactérienne**

La résistance aux antibiotiques est aussi ancienne que les antibiotiques eux-mêmes, et pour partie antérieure à leur utilisation par l'Homme. La majorité des antibiotiques est dérivée de composés naturels produits par des micro-organismes qui sont en concurrence depuis des millions d'années avec des bactéries. Il s'ensuit que les bactéries exposées à ces antibiotiques ont alors dû développer des mécanismes de résistance, parfois contre les antibiotiques qu'elles-mêmes produisent. Ces gènes de résistances sont donc aussi vieux que les bactéries elles-mêmes, dont l'expression est maintenant favorisée par l'utilisation à grande échelle des antibiotiques (**Rania et al., 2022**).

De manière générale, la résistance aux antibiotiques résulte donc d'une évolution par sélection naturelle, les bactéries résistantes transmettent alors à leur descendance leurs gènes de résistance, produisant rapidement une souche de bactéries résistantes, pouvant transmettre ces gènes de résistance de manière horizontale. Ainsi l'utilisation des antibiotiques est rapidement suivie de l'apparition des premières souches résistantes (**Rania et al., 2022**).

### **3.2.4 Les modes de résistances aux antibiotiques**

On distingue parmi les bactéries résistances aux antibiotiques : celles qui présentent une résistance naturelle, et celles dont certaines souches ont développées une résistance dite acquise, due à l'emploi massif des antibiotiques.

#### **3.2.4.1 La résistance naturelle (intrinsèque)**

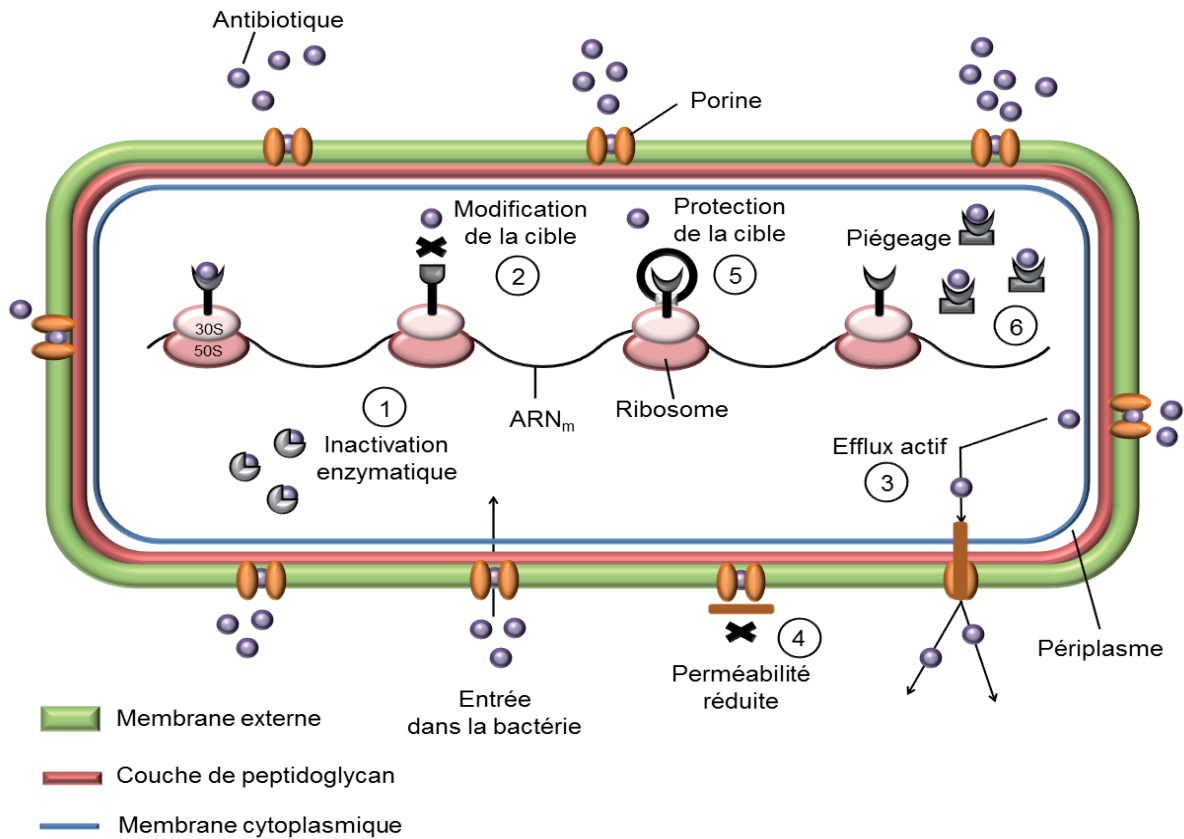
Une résistance intrinsèque se définit comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle conférant une certaine tolérance, voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries (une espèce, un genre ou parfois un groupe plus grand), vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antimicrobiens (**Muylaert & Mainil, 2013**).

La résistance naturelle d'une bactérie à un antibiotique est innée, propre à cette bactérie et se transmet de génération en génération. D'un point de vue clinique, une espèce bactérienne est considérée comme intrinsèquement résistante à un antibiotique donné si la CMI de toutes les souches est supérieure à un point critique préalablement défini (**Martinez, 2014**). Deux facteurs contribuent à cette résistance : la nature de la bactérie et celle de l'antibiotique pouvant agir sur cette bactérie. Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes sur lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. On parle d'espèces bactériennes naturellement résistantes et de mécanismes de résistance intrinsèques (**figure02**). Ceci peut être dû à l'absence de la cible (comme l'absence de paroi chez les mycoplasmes les rendant insensibles aux bêta-lactamines) ou encore à l'absence de pénétration de l'antibiotique (**Guillemot et al., 2006**).

Par ailleurs, *Klebsiella spp* produit naturellement des bêta-lactamases. Cette enzyme est alors présente dans l'espace péri-plasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne ; les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies (**Mehamdia Naima, 2014**).

#### **3.2.4.2 La résistance acquise**

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (**Moroh 2013**).



**Figure 09:** Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie gram négative, adapté de **guardabassi et Courvalin (2006)**.

### A. La résistance mutationnelle

Un sous-ensemble de cellules bactériennes dérivées d'une population sensible développe des mutations dans les gènes qui affectent l'activité du médicament, ce qui entraîne une survie cellulaire préservée en présence de la molécule antimicrobienne (**Munita & Arias, 2016**). Les changements mutationnels peuvent entraîner une réduction de l'absorption des antibiotiques, modifications des cibles antibiotiques et surexpression des pompes d'efflux et des enzymes inactivant les antibiotiques ; tout cela permet aux bactéries de survivre en présence de molécules antimicrobiennes (**Pang et al., 2019**). Pratiquement toutes les résistances cliniquement importantes aux fluoroquinolones peuvent être attribuées à des mutations au sein des cibles du médicament, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Ces complexes multi sous-unités remplissent des fonctions critiques dépendantes de l'ATP lors de la réplication de l'ADN. (**Alekshun and Levy 2007**)

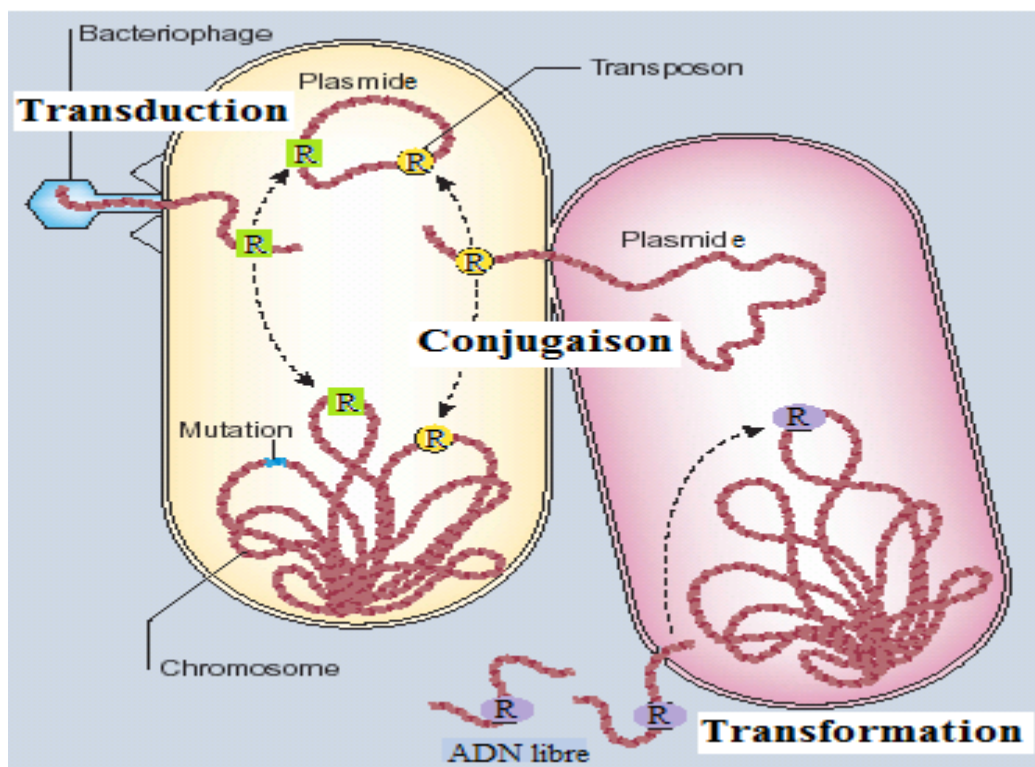
. Les mutations des éléments contribuant à la résistance intrinsèque rendent les bactéries plus sensibles aux antibiotiques ; Ces éléments pourraient donc constituer de bonnes cibles pour de nouveaux médicaments à utiliser en association avec les agents antimicrobiens actuels (**Martinez, 2014**). Une fois qu'un mutant résistant apparaît, l'antibiotique élimine la

population sensible et les bactéries résistantes prédominant. Dans de nombreux cas, les changements mutationnels conduisant à une résistance sont coûteux pour l'homéostasie cellulaire (c'est-à-dire une diminution de la condition physique et ne sont maintenus que si nécessaire en présence de l'antibiotique (Munita & Arias, 2016).

### **B. La résistance acquise par transfert horizontal des gènes**

Le transfère horizontal génétique repousse les limites liées à la transmission verticale des gènes et des mutations pendant la division cellulaire. Pour que le transfère horizontal soit efficace, plusieurs étapes sont nécessaires : l'ADN support de l'information génétique doit être transféré de la cellule donneuse à la cellule réceptrice ; la séquence ADN doit s'intégrer soit au génome (chromosome), soit sur une structure se répliquant de façon autonome (plasmide) ; les gènes apportés par ce fragment d'ADN doivent ensuite être capable de s'exprimer dans la cellule réceptrice. (Doublet, Bousquet-Mélou et al. 2012) Les principaux mécanismes du gène horizontal le transfert implique la transformation, la transduction et la conjugaison (figure 03). Acquisition de la résistance aux aminoglycosides et aux  $\beta$ -lactamines des gènes ont été signalés chez *P. aeruginosa*. (Pang, Raudonis et al. 2019)

- **La conjugaison** : il s'agit de la transmission de matériel génétique par le biais d'un « pilis sexuel », permettant le contact d'une bactérie « mâle » à « femelle ». De nombreuses espèces sont capables de conjugaison, notamment les entérobactéries telles qu'*Escherichia coli*. Ce mode de transmission transfère généralement des plasmides, le transfert est total de façon que plusieurs gènes de résistances peuvent être transmis en bloc (Pang et al., 2019).
- **La transduction** : il s'agit d'un transfert de matériel génétique après infection par un bactériophage vecteur (Bouyahya et al., 2017). Le terme général “élément transposable” désigne une séquence d'insertion, ou un transposon qu'il soit composite, complexe ou conjugatif, ou un bactériophage transposant, ou encore un intégron.



**Figure 10:** les différents modes d'acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Levy & Marshall, 2004).

Les intégrons sont des systèmes génétiques de capture, d'incorporation et de transformation en gènes fonctionnels, de fenêtres de lecture ouverte. Les intégrons ne sont pas en eux-mêmes des éléments génétiques mobiles, mais peuvent le devenir en association avec diverses fonctions de transfert et d'insertion (Bouyahya et al., 2017). Ils sont dotés d'une structure spécifique, composée de deux segments conservés encadrant une région centrale dans laquelle peuvent s'insérer les « cassettes » de gène de résistance aux antimicrobiens (Pang et al., 2019).

Les plasmides conjugatifs sont des molécules d'ADN extra-chromosomique capables d'une répllication autonome régulée par eux-mêmes, et d'échanges (répllication du plasmide suivie de son transfert) au sein de populations bactériennes grâce au phénomène de conjugaison via un appendice de transfert, le pilus, codé par le plasmide et localisé en surface de la bactérie. La transposition consiste en l'insertion, en un site du génome de la bactérie (le chromosome ou un plasmide), d'une unité discrète d'ADN (un segment), appelé transposon ou séquence d'insertion. Le mouvement effectué par le transposon est appelé transposition et les enzymes qui en sont responsables sont nommées transposases. Le transposon, également surnommé *jumping gene*, code pour ses propres transposases et conserve sa capacité à « sauter » d'une région à l'autre du génome lorsqu'il se déplace (Rania et al., 2022).

### 3.2.5 Les mécanismes de la résistance bactérienne

Les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies, pour lutter contre l'action des antibiotiques. Certaines stratégies ciblent directement les antibiotiques, tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires impliqués dans le transport de ces substances. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes. Les sites de résistance sont variables entre les espèces bactériennes, et ils sont classés en plusieurs voies. Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents. Les mécanismes de résistance ont été décrits chez plusieurs souches bactériennes telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Bouyahya et al., 2017).

#### 3.2.5.1 Modification de l'antibiotique

L'une des stratégies bactériennes les plus efficaces pour faire face à la présence de l'antibiotique est, la production d'enzymes qui inactivent l'antibiotique en lui greffant des fragments chimiques spécifiques neutralisant son effet (Munita & Arias, 2016).

#### 3.2.5.2 Dégradation de l'antibiotique

Les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier les antibiotiques. Les réactions enzymatiques, conduisant à l'inactivation des antibiotiques, peuvent s'effectuer par hydrolyse, transfert de groupements chimiques ou oxydo-réduction (Guinoiseau, 2010).

Les  $\beta$ -lactamases, qui clivent le noyau  $\beta$ -lactame des pénicillines et des céphalosporines, font partie de ces enzymes. Pour exercer leur action, les  $\beta$ -lactamases à sérine requièrent la présence d'un résidu de sérine au niveau de leur site catalytique, tandis que les métallo- $\beta$ -lactamases nécessitent l'intervention d'un ou plusieurs ions métalliques, comme le  $Zn^{2+}$ . (Guinoiseau, 2010). Le premier cas de résistance aux pénicillines (ou  $\beta$ -lactames de 1ère génération), par production de pénicillinases ( $\beta$ -lactamases), a été identifié chez *E. coli* en 1940. Certaines  $\beta$ -lactamases sont qualifiées de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) car elles provoquent simultanément la résistance aux  $\beta$ -lactames de première, deuxième et troisième générations, ainsi qu'à l'aztréoname. De plus, les  $\beta$ -lactamases peuvent être divisées en quatre classes A, B, C, et D basées sur leurs séquences d'acides aminés. Les classes A, C et D hydrolysent les  $\beta$ -lactamines via un site actif à sérine. En revanche, les  $\beta$ -lactamases de

classe B sont des métalloenzymes qui nécessitent des ions zinc divalents pour dégrader les  $\beta$ -lactame (**Pang et al., 2019**).

Comme d'autres bactéries à gram positif, le *Staphylococcus aureus* ainsi que l'entérocoque sont les pathogènes les plus susceptibles de produire des  $\beta$ -lactamases transmises par des plasmides et d'hydrolyser les pénicillines ou les céphalosporines. Les bacilles à gram négatif, en particulier les entérobactéries, produisent une grande variété de  $\beta$ -lactamases, qui sont subdivisées en plusieurs sous-groupes (**Pang et al., 2019**).

### 3.2.5.3 Modification enzymatique de la structure de l'antibiotique

Les antibiotiques peuvent également être inactivés par ajout de groupements chimiques au cours de réactions d'acétylation, de phosphorylation, de glycosylation, de nucléotidylation ou de ribosylation. Il est intéressant de noter que la plupart des antibiotiques affectés par ces modifications enzymatiques exercent leur mécanisme d'action en inhiber la synthèse des protéines au niveau des ribosomes (**Yadav & Prakash, 2017**).

C'est le mécanisme de résistance le plus fréquemment décrit. Il repose sur l'action de trois groupes d'enzymes, les aminosides-phosphotransférases (APH), les aminosidesnucléotidyl transférases (ANT), et les aminosides-acétyl transférases (AAC), qui catalysent la phosphorylation des groupements hydroxyles (OH), la nucléotidylation des groupements hydroxyle, et l'acétylation des groupements aminés (NH<sub>2</sub>), respectivement. Les aminosides dont la structure chimique est modifiée perdent leur activité antibactérienne. Les gènes de ces enzymes inactivatrices sont majoritairement acquises par des plasmides (**Mammeri & Amiens, 2013**). Les enzymes qui modifient les médicaments antibactériens sont divisées en deux classes générales : celles telles que les  $\beta$ -lactamases qui dégradent les antibiotiques et d'autres (y compris les protéines modifiant les macrolides et les aminoglycosides) qui effectuent les transformations chimiques. (**Alekshun and Levy 2007**).

### 3.2.5.4 Diminution de la pénétration et de l'efflux d'antibiotique

#### A. Diminution de la perméabilité

La diminution de la perméabilité membranaire est un mécanisme de résistance rencontré essentiellement chez les bactéries à Gram négatif. De nombreux antibiotiques utilisés en pratique clinique ont des cibles bactériennes intracellulaires ou, dans le cas des bactéries à Gram négatif, des cibles situées dans la membrane cytoplasmique (la membrane interne)

(Munita & Arias, 2016). La membrane externe des bactéries à Gram négatif contient des porines, sortes de protéines qui forment des canaux permettant le passage de plusieurs types de molécules, dont tire également profit la pénicilline. La membrane externe présente une structure asymétrique, avec une face interne constituée de phospholipides et une face externe, caractérisée par la présence du lipopolysaccharide (LPS), qui sert de barrière et protège les protéines de liaison aux pénicillines (PLP) du milieu externe (Guinoiseau, 2010). Le mécanisme de « blindage » consiste donc pour la bactérie à modifier le nombre de ses porines et/ou la spécificité de celles-ci. Par exemple, si le nombre de porines diminue, l'antibiotique aura plus de difficultés à entrer dans la cellule. Si les porines deviennent imperméables à certaines substances, cela aura comme effet d'en réduire la pénétration intracellulaire (KEMACHE & Tartar, 2021). Le passage se fait par diffusion passive à travers les canaux que forment les protéines canaliculaire nommées porines ; Les porines (Omp ou Opr) sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques. Certains antibiotiques, comme les  $\beta$ -lactames, le chloramphénicol et les fluoroquinolones, traversent la membrane externe des bactéries Gram négatives et atteignent leurs cibles grâce aux porines. Des changements au niveau de ces canaux protéiques limitent l'efficacité des antibiotiques (Martinez, 2014).

### **B. Les pompes à efflux**

Ce système est responsable de la diminution des concentrations intracellulaires des antibiotiques, il implique des composants normaux des cellules bactériennes appelés des pompes à efflux (protéines) qui rejettent l'ATB à l'extérieur de la cellule. (Carle 2009)

L'efflux actif est un mécanisme dépendant de l'énergie utilisé par les protozoaires pour l'expulsion des métabolites et les substances toxiques étrangères composées, y compris les médicaments. Les pompes à efflux peuvent être classées en fonction de la spécialité du substrat, de la source d'énergie et relation phylogénique. Certaines pompes agissent sur des médicaments spécifiques (pompe à résistance spécifique SDR), tandis que d'autres sont actifs sur plusieurs médicaments (pompes à résistance multiple aux médicaments MDR) (Guardabassi and Courvalin 2005)

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire). Les pompes à efflux bactériennes jouent un rôle important dans l'expulsion des composés toxiques hors de la cellule et peuvent être classées en cinq familles : la famille résistance-nodulation-division (RND), la super-famille des facilitateurs majeurs (MFS), la cassette de liaison à l'ATP (ABC),

superfamille, petite famille de résistance multidrogue (SMR) et extrusion de composés multidrogue et toxiques. **(Pang, Raudonis et al. 2019)**

### **3.2.5.5 Changement dans la cible de l'antibiotique**

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

#### **A. Protection de la cible**

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ainsi, on ne dénombre pas moins de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome **(Muylaert & Mainil, 2013)**. La résistance par protection de la cible du médicament a été rapportée pour les tétracyclines et plus récemment également pour les quinolones. **(Guardabassi and Courvalin 2005)**. Bien que certains des déterminants génétiques codant pour des protéines qui assurent la protection de la cible ont été trouvés dans le chromosome bactérien, la plupart des gènes cliniquement pertinents impliqués dans ce mécanisme de résistance sont portés par les MGE. Exemples de médicaments concernés le mécanisme inclut la tétracycline les fluoroquinolones et l'acide fusidique (FusB et FusC) **(Munita & Arias, 2016)**.

### **3.2.5.6 Modification de la cible**

#### **A. Mutation de la cible**

Les mutations se produisent spontanément dans n'importe quel gène dans le génome bactérien mais la fréquence des mutations peut différer selon les gènes. Par conséquent, les fréquences des mutations conduisant à la résistance aux antimicrobiens spécifiques. **(Guardabassi and Courvalin 2005)**

Exemples classiques de résistance mutationnelle est le développement d'une résistance à la rifampicine. Ces médicaments sont des antibiotiques bactériostatiques synthétiques dotés d'une large activité Gram-positive qui exercent leur mécanisme par une interaction avec le site A des ribosomes bactériens **(Munita & Arias, 2016)**.

**B. Modification de la cible**

Dans ce cas les bactéries synthétisent des enzymes spécifiques pour la modification de l'antibiotique par des réactions d'hydrolyse, transfert de groupements chimiques (Acyl, phosphoryl, nucléotidyl, ADP-ribosyl, Glycosyl) ou bien des réactions d'oxydoréductions (**Oberlé 2012**). Une cible peut être structurellement modifiée ou remplacée afin que le médicament ne puisse plus se lier et exercer son activité sur la cellule. C'est un mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules de groupe MLS chez les bactéries à Gram positif, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. (**Guardabassi and Courvalin 2005**)

**C. Remplacement complet de la cible**

Le remplacement de la cible de l'antibiotique est un mécanisme décrit pour les sulfamides, les diaminopyrimidine (triméthoprimine) et les bêta-lactames (**Nikaido 2009**). Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprimine) et les bêta-lactames dont les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ainsi qu'à toutes les bêtalactames d'usage vétérinaire sont un exemple remarquable par la synthèse d'une nouvelle PBP (*Penicillin Binding Protein*) possédant une affinité moindre pour la méthicilline. (**Muylaert and Mainil 2013**)

**3.2.6 Les bactéries multi-résistantes**

Les bactéries peuvent ainsi devenir résistantes à un ou à plusieurs antibiotiques. La définition de la multirésistance est difficile à établir. Il est couramment admis de parler de multirésistance lorsqu'une souche bactérienne a accumulé sur son profil sauvage de sensibilité aux antibiotiques des résistances acquises telles que la souche ne reste sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. Pour définir une BMR, une autre composante intervient : la capacité de diffusion de la souche et son pouvoir épidémique. Cela légitime le fait que les programmes de lutte et de prévention aient été ciblés sur des espèces bactériennes associées à des mécanismes de résistance particuliers et bien identifiés (**Cattoen, 2015**).

D'autres sont même devenues toto-résistantes, c'est-à-dire résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Ce dernier cas est heureusement rare, mais le phénomène est en augmentation. Il place alors les cliniciens dans une impasse thérapeutique : dans ce type de situation, ils ne disposent d'aucune solution pour lutter contre l'infection (**SOUM & SAIDOUNI, 2019**).

- staphylocoque aureus résistant à la méticilline, ou SARM : acquisition du gène *mecA* entraînant la production d'une PLP2a, et donc modification de la cible de l'antibiotique qui est une protéine de la paroi bactérienne, la PLP (protéine liant la pénicilline) ;

- les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, ou EBLSE : acquisition d'un gène codant pour la synthèse d'une enzyme inhibant les  $\beta$ -lactamines. (**Muller 2017**)

De nouvelles BMR ont émergé et diffusé depuis plusieurs années, mais à la différence des BMR « classiques », celles-ci ont acquis un niveau de résistance plus élevé : elles sont identifiées comme bactéries hautement résistantes émergentes, ou BHRe. (**Pagès 2004**)

Deux types de bactéries sont identifiés comme BHRe :

- Les entérobactéries productrices de carbapénémases, ou EPC : elles vont être capable de synthétiser une enzyme inhibant les carbapénèmes, classe d'antibiotiques à très large spectre considérée comme de dernière ligne thérapeutique ;

- Les entérocoques résistants aux glycopeptides, ou ERG (aussi appelés entérocoques résistants à la vanomycine ou ERV) : acquisition du gène *van* qui va entraîner une modification de la cible de l'antibiotique, en modifiant un acide aminé sur le dipeptide terminal ciblé, passant de D-alanyl-D-alanyl à D-alanyl-D-lactate. (**Muller 2017**).

# **CHAPITRE IV : LES HUILES ESSENTIELLE**

Certaines plantes, sont connues pour la production de plusieurs métabolites secondaires dotés d'une grande diversité biologique et structurale, qui leur confèrent différentes propriétés biochimiques et écologiques, dont la protection contre les microorganismes pathogènes. Par conséquent, ces plantes, constituent une source unique et renouvelable pour la recherche de nouveaux composés antibactériens, afin de combattre la résistance aux antibiotiques. L'un des métabolites les plus exploités dans ces recherches, est appelé **huile essentielle (HE)** (Belounis and Saoudi 2020).

#### 4.1 Généralités et définition

Les HEs se définissent comme étant des liquides hydrophobes, de composés odoriférants sécrétés par une plante. Elles constituent des mélanges complexes de composés organiques volatils possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses. Elles se trouvent généralement à de très faibles concentrations dans les plantes. L'HE est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Poirot 2016).

Le nom huile essentielle vient du fait qu'elle est responsable du parfum caractéristique de la plante. Les HEs sont constituées d'un mélange de différents terpènes, sesquiterpènes, et composés aromatiques tels que les phénols et les phénylpropanes (Hoffmann 2020).

#### 4.2 Localisation et lieu de synthèse

Les HEs n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par un grand nombre d'espèces qu'elles regroupent en particulier dans les familles : *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apoaceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae* (Mohammedi 2006).

La synthèse et l'accumulation des HEs sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface des *Geraniaceae*, et *Rutaceae*, ils produisent les essences dites superficielles. Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant les cellules et les poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les *Myrtaceae*, *Aurantiaceae*, ainsi que les canaux sécréteurs chez les *Ombelliferaeae*, *Apiaceae* ou *Asteraceae*.

Les essences dans les plantes peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, Eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore, gingembre), sève (encens, myrte), bourgeons (pin), fruit (badiane)

ou graines (carvi). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce, voire dans un même organe (**Bruneton 1999**).

### 4.3 Caractéristiques des huiles essentielles

#### 4.3.1 Composition chimique

Ce sont des mélanges complexes et variables de différents composés chimiques dissous l'un dans l'autre formant des solutions homogènes. Ces constituants appartiennent quasi exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes. Le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part (**Abib and Lazib 2022**).

##### 4.3.1.1 Les terpènes

Sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ ). Les tétraterpènes huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ( $(C_5H_8)_n$ ) ou n peut être de 9 à 30 (**Hernandez Ochoa 2005**).

##### 4.3.1.2 Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vaniline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les huiles essentielles d'*Apiaceae* (anis, fenouil, cannelle, basilic) (**Hellal 2011**).

#### 4.3.2 Propriétés physiques

Les HEs sont en général liquides à température ambiante, volatiles, d'odeurs très fortes, incolores, jaunes pâles ou quelques fois bleues. Leur densité est inférieure à 1 sauf pour les HEs de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), Cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et Sassafras (*Sassafras albidum*). Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants. Elles sont très altérables, elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (**Charpentier, Harlay et al. 2008**).

#### 4.3.3 Notion de chémotype

Le chémotype d'une HE est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'HE. C'est l'élément qui permet de distinguer des huiles extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique

différente. Cette classification permet de sélectionner les HEs pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les HEs à chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (**Pibiri 2006**).

#### 4.4 Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les HEs en tant que métabolites secondaires. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Les huiles essentielles peuvent avoir plusieurs effets (utiles) pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines, par protection contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables (**BAKKALI, AVERBECK et al. 2008**).

#### 4.5 Toxicité des huiles essentielles

Les HEs ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines HEs sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol, ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huile de citrus contenant des furacoumarines), d'autres HEs ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' $\alpha$ -thujone sont toxiques pour les tissus nerveux). La toxicité des huiles essentielles est assez mal connue, il manque de données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes et cancérigènes. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Il existe quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzène ou de propenylbenzène comme le safrole, l'estragole, le  $\beta$ -asarone, et le méthyl-eugénol. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs. Le safrole et l'estragole, sont métabolisés au niveau du foie des rats en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines. Ces résultats controversés, car il existe des différences chez l'homme dans le processus de métabolisation de ces composés. Le safrole par exemple est métabolisé en dihydroxysafrole et trihydroxysafrole non cancérigène (**Cuba 2001**).

#### 4.6 Précautions d'utilisation des huiles essentielles

- Chaque huile essentielle possède ses propres critères d'utilisation, notamment quant à la voie d'absorption à privilégier. Il est donc déconseillé d'utiliser des huiles essentielles sans avis médical.
- Pas d'automédication chez les sujets allergiques, lors d'affection grave, lors d'insuffisance rénale, etc.
- Jamais par les voies intramusculaires et intraveineuses.
- Tenir hors de portée des enfants.
- Toujours mélanger les huiles essentielles dans de l'huile végétale pour les applications cutanées.
- Jamais d'huiles essentielles pures dans les oreilles, le nez et les zones génito-anales.
- Attention aux paupières, contour des yeux, visage en général, dessus du crane, aisselles.
- Les huiles essentielles ne sont pas solubles dans l'eau, il est impératif de les mélanger dans un excipient avant de les verser dans le bain.
- Respecter les dates de péremption.

-Huile essentielle : 5 ans maximum (certaines HEs vieillissent plus vite que d'autres)

-Essence : 2 ans maximum si gardé au frais

-Hydrolat : 2 ans maximum

- Tenir les flacons debout afin d'éviter la destruction du bouchon.
- Les huiles essentielles sont très volatiles, bien fermer les bouchons (**Englebin 2011**).

#### 4.7 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

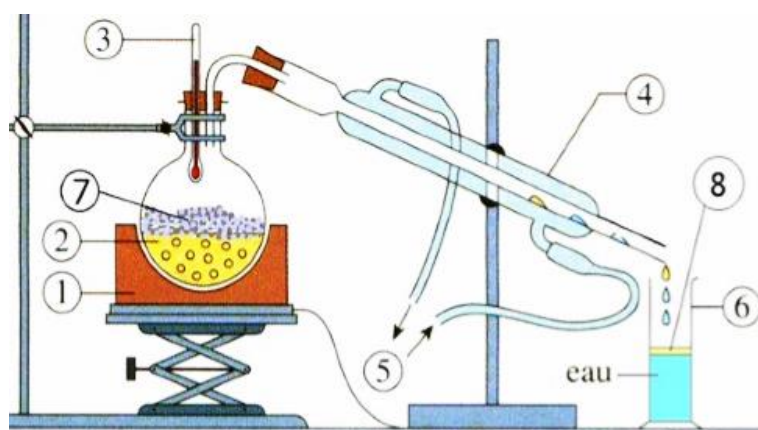
Les huiles essentielles sont obtenues à partir de matières premières végétales par plusieurs méthodes. Le choix de la technique d'extraction dépend du matériel botanique utilisé, l'état et la forme du matériel (**Starmans, Nijhuis et al. 1996**). La méthode d'extraction est l'un des principaux facteurs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

### 4.7.1 Distillation

Il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

#### 4.7.1.1 Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité. L'HE étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât (**Figure 11**). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (**Lucchesi 2005**).

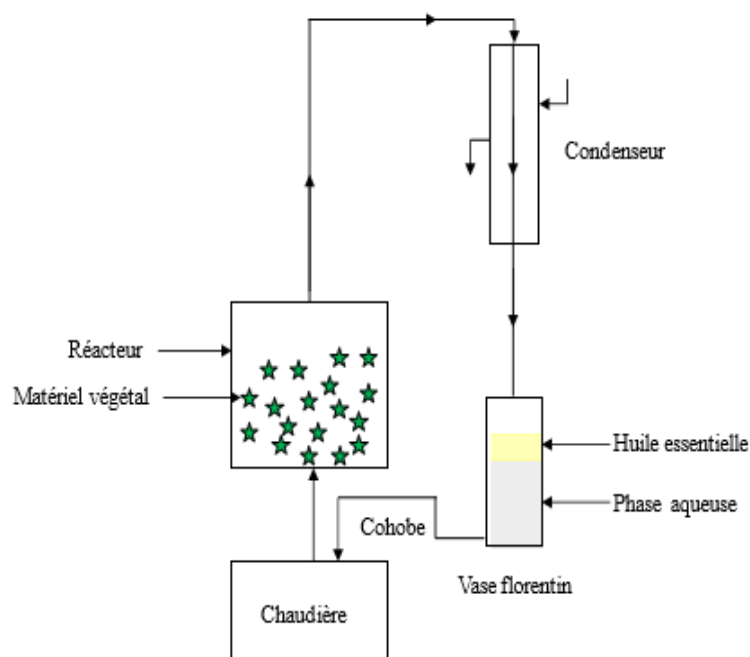


**Figure 11:** Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (**Hellal 2011**). 1 : Chauffe ballon ; 2 : Ballon ; 3 : Thermomètre ; 4 : Réfrigérant ; 5 : Entrée et sortie d'eau ; 6 : Erlenmeyer ; 7 : Matière à extraire l'essence ; 8 : La couche d'HE.

#### 4.7.1.2 Distillation par entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction les plus anciens et l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur descendant ou ascendant sans macération préalable. Le plus souvent, de la vapeur d'eau est injectée au bas d'une charge végétale. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles) (**CROUZET 1998**).

Dans le cas des huiles essentielles « superficielles » contenues dans des glandes situées à la surface du matériel végétal, la vapeur provoque la rupture d'un grand nombre de ces glandes dont le contenu se répand à l'extérieur du végétal. Dans le cas des huiles essentielles contenues à l'intérieur du matériel végétal, l'huile essentielle doit diffuser à travers le végétal pour entrer en contact avec la vapeur d'eau. Dans un premier temps, la vapeur d'eau condensée imprègne la charge. Le gradient thermique qui s'établit dans la charge est tel que la température la plus basse se situe au cœur de chaque morceau du végétal. Les molécules d'huile essentielle, qui sont légèrement solubles dans l'eau, vont diffuser lentement à l'intérieur du végétal, jusqu'à entrer en contact avec la vapeur d'eau circulant à l'extérieur. La diffusion de l'huile essentielle étant le facteur qui limite la vitesse de l'extraction, la vapeur d'eau se charge en huile essentielle mais sans atteindre la saturation. Par conséquent, l'extraction des huiles essentielles non superficielles est plus longue et exige plus de vapeur que celle des huiles essentielles superficielles (Arndt 2014).



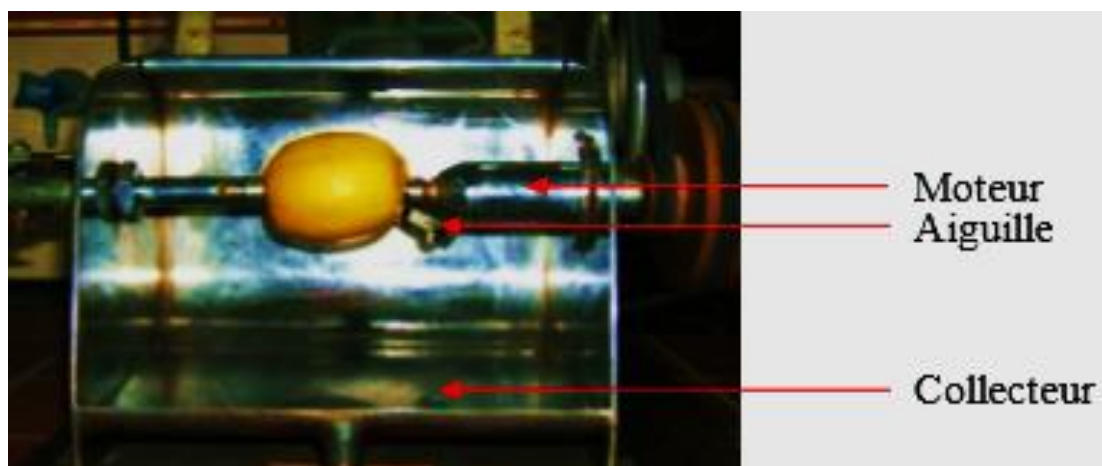
**Figure 12:** Distillation par entraînement à la vapeur (Peyron 1992).

#### 4.7.1.3 Hydro-diffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins de dommage pour les composés volatiles (Boutemtam, Boukhatem et al. 2020).

#### 4.7.2 Extraction à froid

Elle constitue la plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux, Roux-Sitruk et al.2017**).



**Figure 13:** Extraction à froid (Farhat 2010).

#### 4.7.3 Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle, les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formé à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (**Hemwimon, Pavasant et al. 2007**).

#### 4.7.4 Extraction par les solvants et les graisses

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux, mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé

(absolu), et sa composition se rapproche de celle d'une HE. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose de problèmes de toxicité et de solvants résiduels (**Hernandez Ochoa 2005**).

#### **4.7.5 Extraction par fluide supercritique**

Extraction par fluide supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y'est réduit. Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ( $P= 73,8$  bars,  $T^{\circ}= 31,1^{\circ}\text{C}$ ), le  $\text{CO}_2$  possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (**Piochon 2008**).

**CHAPITRE V : L'ACTIVITE  
ANTIBACTERIENNE DES HUILES  
ESSENTIELLES**

## 5.1 Activité antibactérienne des HEs

### 5.1.1 L'activité antibactérienne des HEs et leurs composants

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

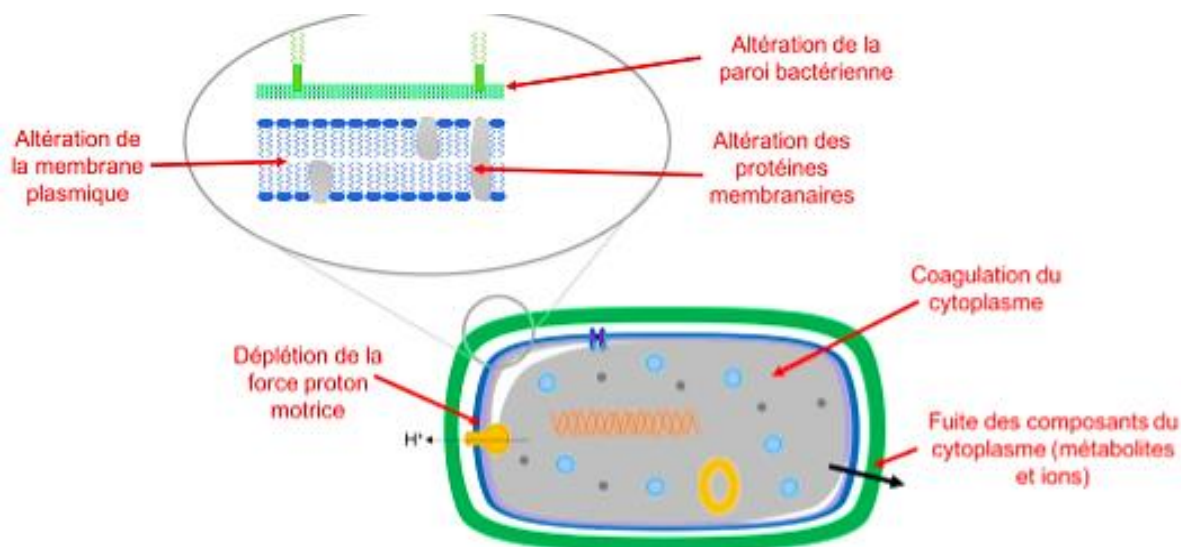
Plusieurs huiles essentielles montrent un spectre d'action très étendu. Cela a été constaté depuis longtemps, et confirmé par des études plus récentes (**Dorman and Deans 2000**). L'activité antibactérienne des HEs est strictement liée à leur composition chimique. Dans de nombreux cas, cette activité résulte de l'interaction complexe entre les différentes classes de composants présents dans l'huile essentielle (**Bassolé, Lamien-Meda et al. 2010**). Cependant, quelques études ont montré qu'un certain nombre de ces composés, présentent des propriétés antimicrobiennes significatives lorsqu'ils sont testés séparément (**Bajpai, Baek et al. 2012**), et de même que les HEs, plusieurs de ces composants individuels, inhibent une large gamme de bactéries (**Owen and Laird 2018**).

Toutes les recherches réalisées sur l'activité des HEs, ont pour but de trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes qui pourront être exploitées dans différents domaines. Dans le domaine médical par exemple, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a montré une activité contre des souches de *Streptococcus pyogenes*, isolées de la gorge des patients atteints d'une pharyngite bactérienne aigue et d'une inflammation de la gorge (**Fani, Kohanteb et al. 2017**).

### 5.1.2 Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles

Bien que les propriétés antibactériennes des HEs et leur composants ont été examinées depuis longtemps (**Koedam 1977**), le mécanisme d'action n'a pas été étudié en grand détail. Connaissant les différents groupes de composants contenus dans les HEs, il est peu probable que leur activité soit attribuable à un seul mécanisme spécifique, mais, il existe plutôt plusieurs modes de ciblage de la cellule bactérienne (**Sakkas, Papadopoulou et al. 2017**). En effet, les huiles essentielles et leurs principaux constituants inhibent les bactéries via une gamme de mécanismes tels que : la perturbation de la paroi (**Helander, Alakomi et al. 1998**), déstabilisation de la membrane plasmique, endommagement des protéines membranaires,

fuite de constituants intracellulaires tels que les métabolites et les ions, coagulation du contenu cellulaire (**Gustafson, Liew et al. 1998**).



**Figure 14:**Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (**Abib and Lazib2022**).

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

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

Les huiles essentielles et leurs composants peuvent atténuer les mécanismes de virulence et les mécanismes de résistance chez les bactéries, ce qui peut être bénéfique dans le traitement d'infection. Une étude récente a montré que, l'HE d'Eucalyptus grandis, avait un effet

inhibiteur sur les pompes à efflux de bactéries pathogènes du tractus respiratoire (Sewanu, Bongekile et al. 2015).

### 5.1.3 Facteurs influençant l'activité antibactérienne des HEs

La qualité et la quantité des constituants d'une huile essentielle ne dépend pas seulement de l'espèce de la plante mais aussi de plusieurs autres éléments incluant, la provenance de la plante, la partie utilisée de la plante, le stade de développement, les conditions de culture et de récolte de la plante, ainsi que la méthode d'extraction de l'HE (Stassi, Verykokidou et al. 1996). Il a été démontré que les HEs contenant les composés phénols ou aldéhydes (tels que le carvacrol, le cinnamaldéhyde, l'eugénol, etc) en tant que principaux composants, démontrent l'activité antibactérienne la plus élevée, suivie par celle qui contiennent des alcoolstérpéniques. D'autres huiles contenant des cétones ou les esters avaient une activité beaucoup plus faible ( $\beta$ -myrcene) (Bassolé, Lamien-Meda et al. 2010).

## 5.2 Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HEs. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des HEs dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations (Piochon, 2008).

### 5.2.1 Aromatogramme (méthode de diffusion en milieu gélosé)

Cette méthode permet de mesurer le pouvoir antibactériens et antifongiques des HEs de manière fiable et reproductible. En pratique, une suspension bactérienne est réalisée à partir d'un prélèvement sur un patient (ou d'une banque de bactéries s'il s'agit de travaux de recherche). Onensemence la surface plane d'un milieu de culture gélosé coulé en boîte de Pétri avec cette suspension, puis on dépose des disques de papier filtre imprégnés d'un volume donné de différentes HE (Tongnuanchan, 2014).

Durant l'incubation, chaque huile essentielle testée occupe donc autour de son papier une zone où la concentration en molécules aromatiques diminue progressivement du centre à la périphérie. Les germes se développent, sauf sur des zones concentriques ayant pour centre ces disques, à l'intérieur desquels la concentration en produits testés est égale ou supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire bactériostatique (Jouault 2012).

### 5.2.2 Méthode de dilutions

Ce procédé nous permet de déterminer deux paramètres fondamentaux concernant l'activité des antimicrobiens et la sensibilité des microorganismes : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactérienne (CMB).

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

### 5.2.3 Méthode de micro-atmosphère

Contrairement aux autres techniques, basée sur le contact direct de l'huile essentielle avec le microorganisme, la méthode de micro-atmosphère repose sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de la fraction volatile de l'huile, à une température d'incubation donnée, sur la croissance microbienne (Laghchimi, Majidi et al. 2014). Elle est généralement utilisée pour définir l'activité des HEs qui sont employées comme conservateurs atmosphériques. Dans ce cas un disque en papier imbibé d'huile essentielle est attaché au couvercle d'une boîte de Pétri contenant une gélose solidifiée,ensemencée par la suspension microbienne. Immédiatement la boîte est inversée et scellée par du parafilm, puis incubée (Laghchimi, Majidi et al. 2014). Les résultats sont présents comme le diamètre de la zone d'inhibition, ou comme une quantité minimale inhibitrice de l'HE qui inhibe totalement la croissance du microorganisme par rapport au témoin (López, Sánchez et al. 2007).

### 5.3 Sensibilité des bactéries aux huiles essentielles

De nombreuses études examinant l'action des HEs contre les bactéries, conviennent que généralement, les bactéries à gram négatif sont moins sensibles aux HEs et leurs composants, que les bactéries à gram positif (Mayaud, Carricajo et al. 2008). Cela, est peut être attribué au fait que les bactéries à gram négatif ont une membrane externe rigide, riche en lipopolysaccharides et plus complexe qui agit comme une barrière limitant la diffusion de composés hydrophobes vers la cellule. Cette membrane est par contre, absente chez les bactéries à gram positif, qui sont plutôt entourées d'une paroi épaisse de peptidoglycane pas

assez dense pour résister aux petites molécules antimicrobiennes. Ces dernières accèdent donc plus facilement à la membrane cellulaire (Hyldgaard, Mygind et al. 2012).

En revanche, plusieurs études ont montré que les bactéries à gram négatif peuvent avoir une sensibilité égale ou supérieure à celle des bactéries à gram positif, aux HEs (Dorman and Deans 2000). *Aeromonashydrophila* (gram négatif), par exemple semble être l'une des espèces les plus sensibles (Deans and Ritchie 1987). Selon Fisher, Phillips et al. (2008), la membrane externe ne cause qu'un retardement dans l'action des HEs, et donc les bactéries à gram négatif peuvent être aussi sensibles à ces huiles pendant une période de temps plus longue. Les composés individuels des HEs présentent différents degrés d'activité contre ces deux groupes de bactéries, et connaissant l'immense variabilité de la composition chimique entre les HEs, il est donc possible de conclure que, la sensibilité des bactéries aux HEs dépend tout d'abord, des propriétés de l'huile essentielle et de la bactérie elle-même (Kalemba and Kunicka 2003).

#### 5.4 La synergie

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

##### 5.4.1 Effet synergique des huiles avec les antibiotiques

L'interaction entre les molécules naturelles d'huiles essentielles et les antibiotiques crée des complexes moléculaires que les mécanismes de résistance mis en œuvre par les bactéries. Les bactéries peuvent alors très difficilement développer des résistances efficaces contre le traitement anti-infectieux. La bactérie redevient sensible à cet antibiotique boosté. Par exemple, le thymol, constituant de l'origan, était synergique avec la pénicilline contre *E.coli*, et le carvacrol était synergique avec la pénicilline contre *E.coli*. Il a également été démontré que l'huile d'origan en combinaison avec la doxycycline, le fléorfenicol ou la sarafloxacine avait des effets synergiques contre *E.coli* (Abib and Lazib 2022).

# **MATERIELS ET METHODES**

### 6.1. Rappels des objectifs

Le but de notre travail est l'isolement et l'identification des bactéries à partir des caries dentaires et l'étude de leur antibio-résistance. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'Ecologie, Biotechnologie et Santé de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou. Ce travail a duré 1 mois (du juin à juillet 2024). Les prélèvements ont été effectués dans un cabinet dentaire privé.

### 6.2. Matériel

Le matériel et les réactifs utilisés dans la partie expérimentale sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 03:**matériel utilisé dans notre travail

Appareillages	Les milieux de culture	Les réactifs et les colorants	Autres matériels
Etuves à 37° C	Muller Hinton MH	-L'alcool a 95°.	-Marqueur.
Autoclave	Gélose sang frais	-Fuchsine.	- Etiquettes
Réfrigérateur	Gélose sang cuit	-Lugol.	-Disque d'oxydase
Microscope optique	Gélose Chapman	-Rouge de méthylène.	- Système API staph.
Bain marie	Gélose Hektoen	- Violet de Gentiane.	-Bec Bunsen.
		-Voges-Proskauer	-Boites de pétri stériles
		-VP 1 et VP 2	- Ecouvillons
		-NIT 1 et NIT 2	-Micro pipette
		-ZYM A et ZYM B	-Lames et lamelles.
		-Bleu de méthylènes.	- Pipettes Pasteur.
		-Peroxyde d'hydrogène.	- Tubes à essai stériles
		-Disques d'antibiotiques	-DMSO
		-Huile essentiels : Thym à thymol,	
		Girofle feuille	

### 6.3. Méthodes

#### 6.3.1 Echantillonnage et techniques de prélèvements

Les prélèvements ont été effectués à l'aide des écouvillons stériles sur des dents extraites, les échantillons de dents ont été transférés avec une boîte stérile car la dent a été placée directement dans la boîte pour éviter les contaminations. Les échantillons ont été transporté au laboratoire le plus rapidement possible afin d'éviter toute croissance ultérieure de micro-organismes.

Un échantillon a été cultivé immédiatement après le prélèvement. Si cela n'est pas possible l'échantillon doit être conservé à 4°C immédiatement jusqu'à sa livraison au laboratoire et traité au plus tard 18h après le prélèvement.

#### 6.3.2 Méthode d'analyse

##### 6.3.2.1 Enrichissement

L'absence de colonies suspectes sur l'isolement sélectif ne suffit pas pour affirmer l'absence de ces bactéries dans le prélèvement. C'est pourquoi un enrichissement est mis en route en même temps que l'isolement (**Thaker, Brahmhatt et al. 2013**).

Le Bouillon nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits (**Eaton, Clesceri et al. 1995**).

Après avoir effectué les différents prélèvements, les écouvillons et les dents sont introduits dans des tubes de Bouillon BGT ou d'eau peptonée tamponnée, comme étant le milieu le plus utilisé pour l'isolement des bactéries. Les tubes et les dents sont ensuite acheminés au laboratoire, où ils sont incubés dans une étuve réglée à 37°C pendant 24h-48h jusqu'à l'apparition d'un trouble (croissance bactérienne).

##### 6.3.2.2 Isolement

Après l'observation macroscopique des différents types bactériens, nous cherchons à isoler les bactéries du mélange pour permettre de les identifier et l'obtenir des souches pures. Un isolement consiste à disperser des micro-organismes à la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri. Cela permet d'obtenir des colonies bien distinctes. La méthode utilisée est la méthode des quadrants : à partir d'un point de dépôt, les bactéries sont étalées sur les 4 quadrants successifs de la gélose (**Axelsson and Co 2000**).

A partir des milieux d'enrichissements nous avonsensemencé plusieurs milieux de culture gélosés coulés dans des boîtes de pétri afin d'isoler le maximum des bactéries présentes sur les surfaces analysées. L'ensemencement a été effectuée par la méthode des stries transversales sur les boîtes de Pétri. Ensuite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Les milieux d'isolement utilisés sont :

- **Gélose sang frais**

Est un milieu très nutritif permettant la culture et l'isolement d'une grande variété de microorganismes et plus particulièrement des germes très exigeants (tels que streptocoque et pneumocoque)

- **Gélose sang cuit**

Est le premier milieu apparu pour la culture des micro-organismes exigeants comme *Neisseria*.

- **Gélose Hektoen**

Est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes comme des *Salmonella* et *Shigella*. Bien que de nombreuses bactéries à gram négatif puissent se développer sur ce milieu.

- **Gélose Chapman**

Est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, pour l'isolement et la numération des staphylocoques. Permettant la croissance des genres halophiles. Parmi ces germes figurent des *Staphylococcus*.

### 6.3.2.3 Purification

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur gélose sang frais, sang cuit, Hektoen et Chapman jusqu'à obtenir de colonies pures bien distinctes et homogènes. La technique consiste à prélever quelques colonies à partir des géloses utilisées, à l'aide d'une pipette pasteur stérile flambée et refroidie. Qu'on dispose à la surface de la gélose et on ensemence par la méthode des stries 4 quadrants. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24h à 37°C (Hussein 2020).

### 6.3.2.4 Identification

L'identification des souches a porté sur une série de tests préliminaires (examen macroscopique et examen microscopique), tests biochimiques et un antibiogramme. On a pu identifier plusieurs souches bactériennes tels que : *Staphylococcus*, *Streptococcus*, bacille à gram négatif et des levures, mais que *Staphylococcus* qui a déterminer une sensibilité aux antibiotiques.

- **Examen macroscopique**

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. Il permet de voir l'aspect des colonies et d'effectuer une première caractérisation.

- **Examen microscopique**

Permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne elle comprend : -Examen à l'état frais,  
-Examen après coloration de Gram.

- **Examen à l'état frais**

C'est l'examen microscopique de bactéries vivantes, en milieu liquide. Il permet d'apprécier leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie.

- **Examen après coloration de gram**

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification (Moyes, Reynolds et al. 2009).

Le protocole de la coloration de gram est comme suit :

- ✓ *Faire un frottis*

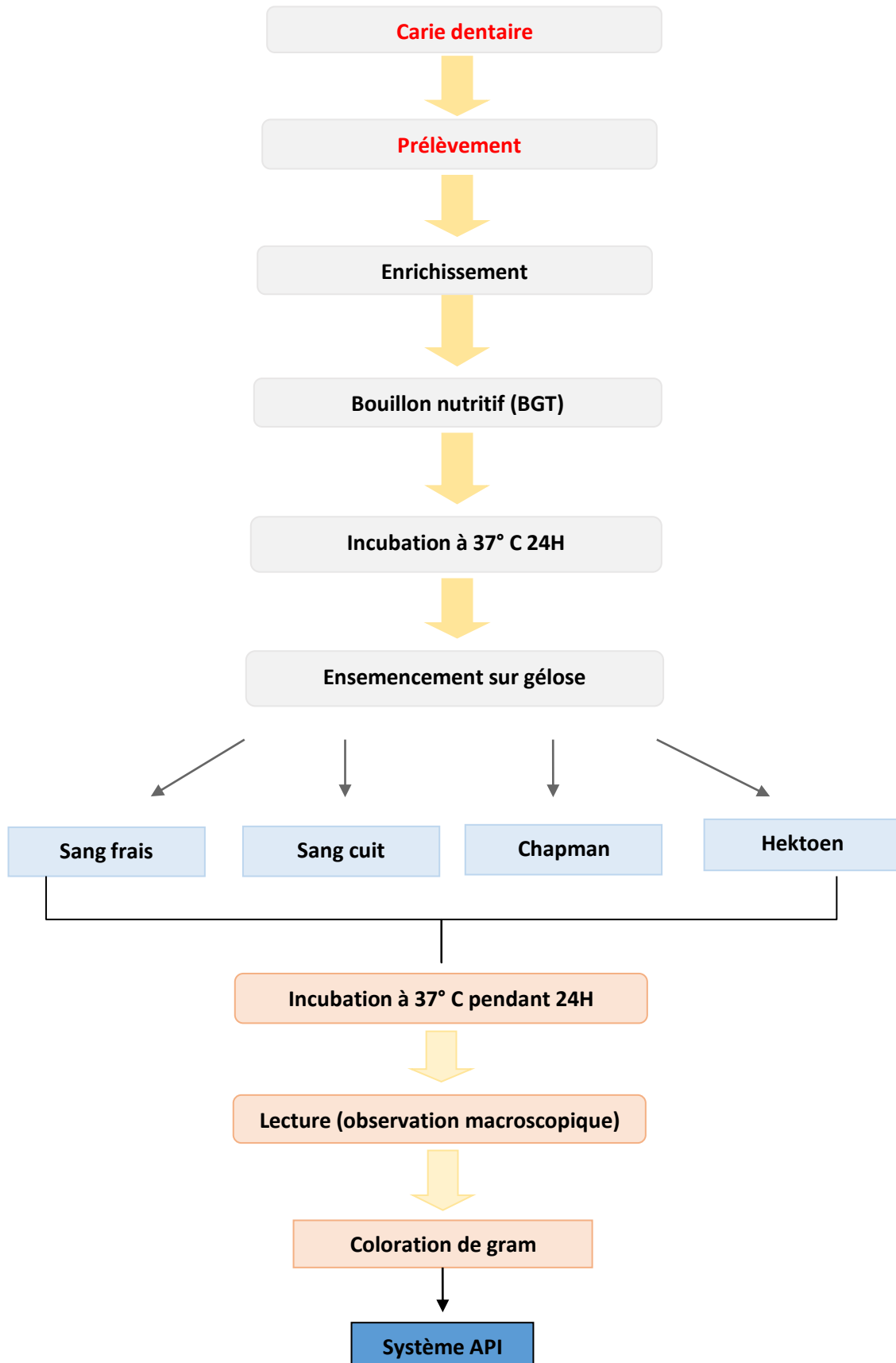
- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H<sub>2</sub>O sur la lame.
- Toucher une colonie à l'aide d'une pointe jaunie ou d'un cure-dent stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries.
- Frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

✓ *Coloration et explications*

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis.
- Laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.
- Jeter l'excès de colorant dans un bêcher.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H<sub>2</sub>O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Déposer quelques gouttes du Lugol sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.
- Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol dans un bêcher et rincer brièvement à l'H<sub>2</sub>O comme précédemment décrit.
- Décolorer en faisant couler la solution de décoloration sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes).

La solution de décoloration contient un mélange d'alcool et d'acétone. Les pores de la paroi des Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool. La paroi est alors imprévisible et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram- est dissoute par le mélange alcool-acétone. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette.

- Rincer à l'H<sub>2</sub>O.
- Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas les Gram+.
- Rincer à l'H<sub>2</sub>O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 400x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x). cette coloration permet de différencier les bactéries selon deux caractères :
- Leur forme (bacille, cocci,...etc.), leur affinité pour les colorants, en Gram positif et Gram négatif.
- Avec cette coloration double, les bactéries Gram-positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram-négatif sont colorées en rose.



**Figure 15:** Protocole d'isolement et d'identification des bactéries cariogènes.

### 6.3.3. Recherche des staphylocoques

On entend par staphylocoques à coagulase négative, les bactéries qui se présentent sous forme de cocci à gram positif, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin ou en amas, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et la coagulase. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 37°C sur un milieu sélectif Chapman au mannitol (**Thaker, Brahmhatt et al. 2013**).

Le milieu Chapman permet un isolement sélectif des staphylocoques. La fermentation du mannitol est indiquée par le virage au jaune de l'indicateur coloré « le rouge de phénol », autour des colonies (**Rodier, Legube et al. 2016**).

#### 6.3.3.1 Mode opératoire

On prépare les boîtes de Pétri avec le milieu Chapman ; à partir de la solution mère, on porte aseptiquement 0.1ml (2 gouttes) dans les boîtes de Pétri qu'on étale à l'aide d'une anse de platine stérile. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures.

#### 6.3.3.2 Lecture et interprétation

Après la période d'incubation, les staphylocoques à coagulase (-) ou plus particulièrement *Staphylococcus auricularis*, apparaissent sous forme de petites colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en jaune (fermentation du mannitol) ou en blanc (**Rodier, Legube et al. 2016**).

Le **tableau 04** suivant résume quelques caractères biochimiques de différentes espèces de staphylocoques.

**Tableau 04: les tests biochimiques du type staphylocoque auricularis**

<i>Staphylococcus auricularis</i>	
Catalase	+
Coagulase	-

### 6.3.3.3 Tests complémentaires

L'étude de quelques tests biochimiques dont : Test catalase, oxydase, coagulase.

- **Test d'oxydase**

Ce test est effectué sur un disque d'oxydase puis l'ajout de colonie suspectée, puis l'observation des changements de couleur. La colonie est oxydase positive lorsque la couleur vire au violet foncé. Si la couleur ne change pas, cela signifie négatif (**Hussein 2020**).

- **Test de la catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène gazeux qui se dégage. L'objectif de ce test est de reconnaître la présence de l'enzyme catalase. (**Hussein 2020**).

La méthode qui permet de chercher cette enzyme est performée avec des gouttes de peroxyde d'hydrogène à 3% ont été placées sur une lame microscopique propre. Avec une pipette pasteur prélever quelques colonies de la culture et les transférer dans les gouttes de peroxyde d'hydrogène. La production de bulles de gaz indique la présence de la catalase : test catalase(+) (**Hussein 2020**).

- **Test de coagulase**

Le test de détection consiste à incuber pendant 24h à 37°C un mélange de plasma oxalaté de l'homme et de la souche à tester (staphylocoques).

Les résultats incluent l'organisme à coagulase négative n'a pas provoqué un caillot alors que les bactéries à coagulase positive provoquent un caillot (**Hussein 2020**).

### 6.3.3.4 La galerie biochimique

La galerie API commercialisée, est un système standardisé pour l'identification de bactéries ; elle est composée d'un nombre variable de microtubes (10 ou 20 le plus souvent), contenant des substrats déshydratés qui permettent de réaliser des tests biochimiques (**Yves and Michel 2009**).

- **Principe**

La galerie API-Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

- **Mode opératoire**

- ✓ *Préparation de la galerie*

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillé ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation (**Yves and Michel 2009**).

- ✓ *Préparation de l'inoculum*

- Ouvrir une ampoule d'API Staph « Suspension Medium ».
- Préparer une suspension bactérienne homogène, soigneusement les bactéries dans le milieu.

- ✓ **Inoculation de la galerie**

- A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Mediumensemencé.
- Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau de tube.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.
- Renfermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 37°C pendant 24h.

- ✓ **Lecture** : Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivant :

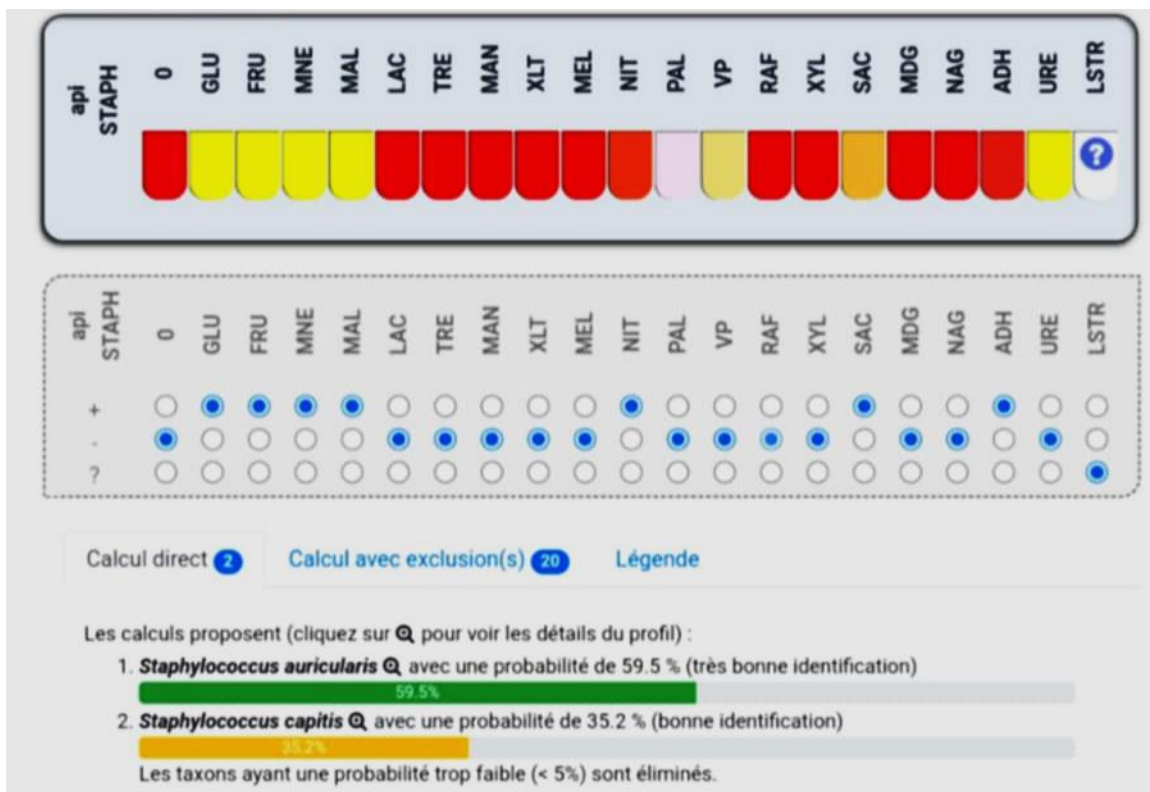
- Test VP (VP 1 et VP 2) : Attendre 10 minutes. Une couleur **rose** franche ou **violette** indique une réaction **positive**. Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée **négative**.
- Test NIT (NIT 1 et NIT 2) : Attendre 10 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive**.

- Test PAL (ZYM A et ZYM B) : Attendre 10 minutes. Une coloration **violette** indique une réaction **positive**. Une couleur beige-rosé ou violet très pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée **négative**.

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API stap (Yves and Michel 2009).



-A-



-B-

Figure 16: La galerie API-staph après incubation. A : Cas étudiée ici ; B : Cas standard

## 6.4. Antibiogramme

### 6.4.1. Principe

Nous avons testé l'efficacité d'antibiotiques sur la souche identifiée (*Staphylococcus auricularis*). Pour cela nous avons coulé une gélose Muller Hinton (MH) dans des boîtes de Pétri et qui sont ensemencées par l'utilisation de l'écouvillon de la suspension obtenue (3 à 5 colonies sont prélevées et dissociées dans 5ml d'eau physiologique). On assure la disposition de culture sur toute la boîte (**Genné and Hans 2003**).

Des disques d'antibiotiques pré-imprégnés à tester sont déposés sur un milieu gélosé. Chaque ATB diffuse sur la gélose et y détermine des distances inversement proportionnelles à la résistance de la souche. Après 24heures d'incubation à 37°C à l'étuve, les disques sont entourés d'une zone d'inhibition circulaire dont le diamètre permet de dire du germe qu'il soit sensible ou résistant à l'antibiotique testé (**Genné and Hans 2003**).

### 6.4.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 20 à 24h sur gélose MH, des colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une pipette pasteur stérile et déposées dans un tube de 9 ml d'eau physiologique stérile. L'ensemencement se fait dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum (**Genné and Hans 2003**).

### 6.4.3. Ensemencement

A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne et déchargé au maximum, frotter la totalité de la surface gélosée sèche en haut et en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en entourant la boîte à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Les boîtes sont laissées ouvertes, dans la zone de stérilité du bec Bunsen, à température ambiante environ 15 minutes pour sécher puis les disques sont déposés à la surface de la boîte en appuyant légèrement à l'aide d'une pince stérile. L'incubation se fait dans l'étuve pendant 24 heures à 37°C (**Genné and Hans 2003**).

**Tableau 05:**liste des antibiotiques utilisés

	<b>Antibiotique</b>
<b>Staphylocoque</b>	Céfoxitine <b>FOX</b>
	Chloramphénicol <b>C</b>
	Ciprofloxacine <b>CIP</b>
	Erythromycine <b>E</b>
	Triméthoprime <b>COT</b>

### 6.5. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HEs, nous avons adopté la **méthode de diffusion sur disque** en utilisant des disques stériles : appelée aromatogramme.

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le micro-organisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, ou résistante (**Maidi and Dahia**).

#### 6.5.1. Protocole expérimental

Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé MH en surfusion dans des boîtes de Pétri. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

- **Préparation des disques**

Les antibiotiques habituellement testés existent sous forme de disque de 6mm de diamètre. Pour reproduire les mêmes conditions, nous avons utilisé le papier Wattman, coupé en disques. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Ensuite, les disques sont stérilisés par autoclave à 120°C pendant 20 min.

- **Préparation de la suspension bactérienne**

La suspension bactérienne est préparée à partir d'une pré-culture de 18 heures à 37°C sur gélose MH. Quelques colonies sont prélevées à l'anse de platine et maintenues dans une eau physiologique (9ml). Ensemencer par un écouvillon sur une gélose MH.

### 6.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

- **Méthode de dilution en milieu liquide**

Cette technique consiste à inoculer, par un *inoculum* standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne (Caillet and Lacroix 2007).

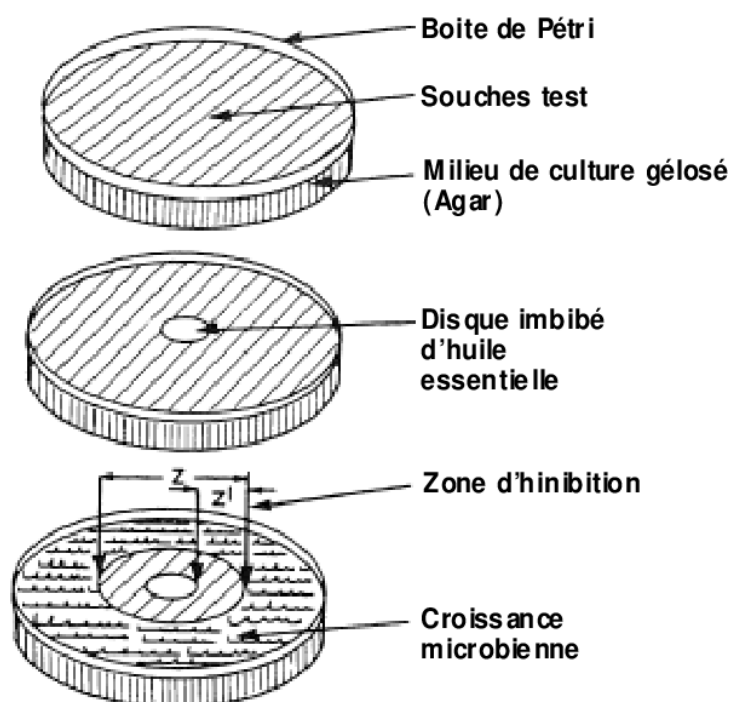
- **Préparation de la gamme de dilutions**

La détermination de la CMI est réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé. Des dilutions<sup>1/2</sup> sont préparées. Une solution mère a été préparée préalablement, en faisant dissoudre 400 µL/ml d'H.E à tester sont placés dans un tube stérile contenant 500µL d'eau supplémentée en 500µL DMSO. L'H.E est d'abord diluée dans du DMSO selon les proportions 1/6 (Emulsifiant/H.E).

- **Ensemencement sur milieu solide et dépôt de disques**

Sur gélose MH, ensemencer par un écouvillon à l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de cellulose (disque référence : papier filtre de 6 mm) déposer sur la surface de la gélose. Homogénéiser chaque tube de dilution, prélever 10µL à l'aide d'une micropipette et l'imbiber avec l'H.E de chaque dilution à tester en mettant seulement en contact le bout du disque. Celui-ci va absorber progressivement l'H.E jusqu'à l'imprégnation totale du disque. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 mn et mise à l'étuve à la température de 37°C pendant 24h (Bekhechi, Atik-Bekkara et al. 2008).

L'expérience est répétée trois fois pour chaque H.E.



**Figure 17:** illustration de la méthode de aromatogrammes sur boîte de pétri (Pibiri 2006).

- **Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). La sensibilité aux différentes huiles essentielles est mesurée en fonction des diamètres des zones d'inhibitions comme suit (Ponce, Fritz et al. 2003):

- $D < 8$  mm : souche résistante (-)
- $8\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$  : souche sensible (+)
- $14\text{mm} \leq D \leq 20$  mm : souche très sensible (++)

Après avoir déterminé la CMI, nous avons procédé à examiner la synergie ATB/HE.

### 6.6. La synergie ATB/HE

La synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques pour surmonter la résistance antimicrobienne est un domaine de recherche prometteur. Les huiles essentielles, extraites de diverses plantes, possèdent des propriétés antimicrobiennes naturelles. Lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques, elles peuvent potentiellement renforcer l'efficacité des traitements antibactériens et aider à surmonter la résistance bactérienne (Kellal and Lacete 2018).

Des études ont montré que certaines huiles essentielles peuvent perturber les membranes cellulaires des bactéries, augmentant ainsi la perméabilité aux antibiotiques. De plus, elles

peuvent inhiber des mécanismes spécifiques de résistance, tels que les pompes à efflux, qui sont des systèmes que les bactéries utilisent pour expulser les antibiotiques de leurs cellules. Cette inhibition permet aux antibiotiques de rester plus longtemps à des concentrations efficaces à l'intérieur des cellules bactériennes (**Toure 2015**).

Par ailleurs, certaines huiles essentielles possèdent des composants actifs qui peuvent interférer avec la synthèse des parois cellulaires bactériennes ou avec la réplication de l'ADN bactérien, amplifiant ainsi l'effet des antibiotiques. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier les combinaisons les plus efficaces et pour comprendre les mécanismes exacts de cette synergie (**Lydia, Nouri et al.**).

L'application clinique de cette stratégie pourrait conduire à une diminution des doses d'antibiotiques nécessaires pour traiter les infections, réduisant ainsi les effets secondaires et ralentissant le développement de la résistance bactérienne. Cette approche pourrait également ouvrir la voie à de nouvelles formulations thérapeutiques et à des traitements plus efficaces contre les infections résistantes aux médicaments (**Abib and Lazib 2022**).

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'association ATB/HE est celle de diffusion sur milieu solide préconisée par (**Halawani 2009**).

L'objectif de ce test est l'obtention d'un spectre antibactérien le plus large possible de la souche bactérienne envers l'antibiotique testé. Sur milieu MH, des boîtes de Pétri préalablementensemencées par un écouvillon, des disques d'antibiotiques de 6mm de diamètre (Erythromycine) sont déposés au centre. A l'aide d'une micropipette, 10 $\mu$ L d'HE ont été déposés sur l'un de chaque antibiotique (**Mandal, DebMandal et al. 2010**).

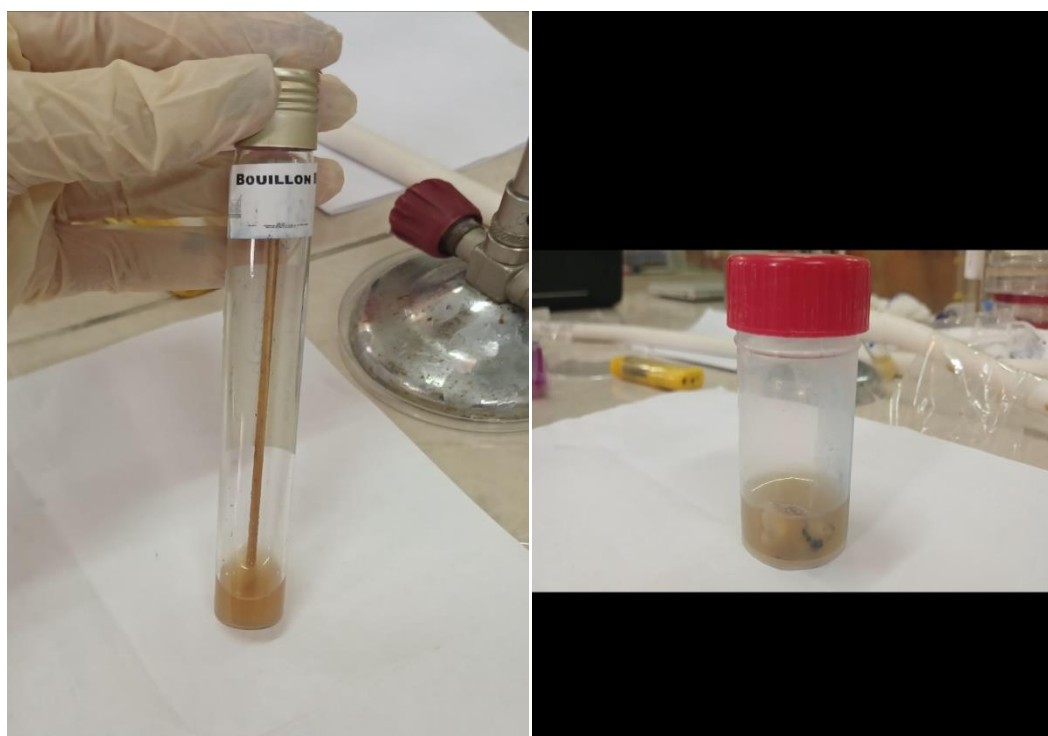
Les boîtes sont laissées diffuser et incubées pendant 24h à 37°C. Après incubation, les diamètres d'inhibition ont été mesurés en millimètres.

# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### 7.1. Résultats de l'enrichissement

Après la réalisation des différents prélèvements, les échantillons, qu'il s'agisse d'écouvillons ou de dents, sont soigneusement déposés dans des tubes contenant du bouillon BGT ou de l'eau peptonée tamponnée. Ces milieux de culture sont particulièrement adaptés et largement utilisés pour l'isolement des bactéries en raison de leur capacité à favoriser la croissance microbienne. Une fois les échantillons préparés, ils sont transportés au laboratoire, où ils sont soumis à une incubation dans une étuve maintenue à une température constante de 37°C. Cette incubation, qui dure entre 24 et 48 heures, permet aux bactéries présentes de se multiplier et de former un trouble visible dans le milieu de culture, indiquant ainsi une croissance bactérienne. Cette étape est cruciale pour l'identification et l'analyse ultérieure des micro-organismes.

Après incubation pendant 24h, un trouble a été observé dans les tubes inoculés (**Figure 18**).



**Figure 18:**Résultats de l'enrichissement (présence de troubles) (Photo personnelle).

### 7.2 Aspect macroscopique après l'isolement

La bactérie lors de l'ensemencement est invisible à l'œil nu. Toutefois, elle se divise à un rythme assez important pour former une colonie qui est visible à l'œil nu. Chacune de ces colonies est formée par des millions de bactéries identiques. Ces colonies possèdent des caractéristiques propres à l'espèce bactérienne.

Après isolement et purification des souches bactériennes sur les différents milieux utilisés, les principaux caractères culturels sont résumés dans le **Tableau 06**.

**Tableau 6: Résultats de l'isolement des différents prélèvements.**

Prélèvement	Gélose Chapman	Gélose sang frais	Gélose sang cuit	Gélose Hektoen
1	Colonies jaunes, dorées, orangées de différentes tailles plates bombées opaques	Colonies blanches de différentes tailles, lisses, bombées, claires et présentant une forme irrégulière ou régulière	Colonies grises crémees, présentant une forme de nappe confluente	Absence de colonie

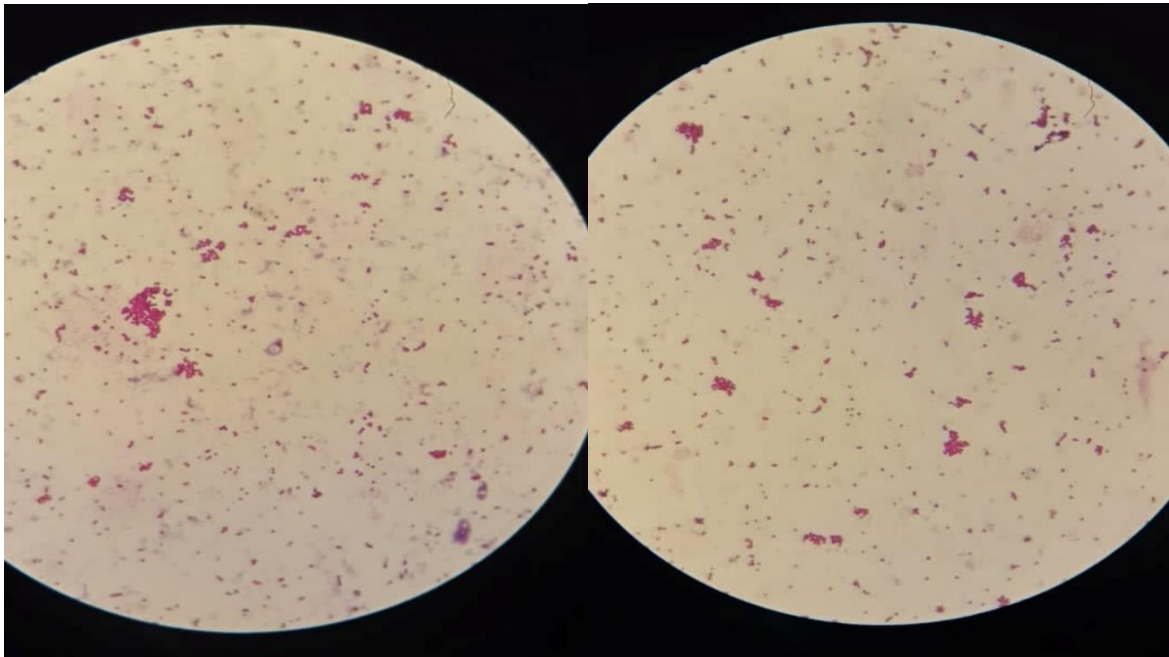
La majorité des prélèvements sont poly-microbiens. Plusieurs colonies ont poussées sur les quatresmilieux (**Figure 19**). Sur une même boîte de Pétri, on peut trouver plusieurs colonies différentes. Les photos suivantes montrent quelques aspects des colonies isolées sur les milieux de culture :



**Figure 19:**Aspects macroscopique des colonies isolées.

### 7.3. Aspect microscopique des cellules bactériennes (objectif X100)

L'examen microscopique, après coloration de Gram, nous a permis de voir un aspect de couleur violette (**Figure 20**), c'est une bactérie Gram positive. Les photos suivantes montrent l'aspect microscopique de quelques colonies isolées sur le milieu de culture utilisé.



**Figure 20:**Aspect microscopique des bactéries après coloration de Gram.

#### 7.4. Tests biochimiques

On a effectué les tests (catalase, oxydase et coagulase) sur la souche staphylocoque, ces figures représentent les caractères Oxydase, Catalase chez les bactéries isolées.

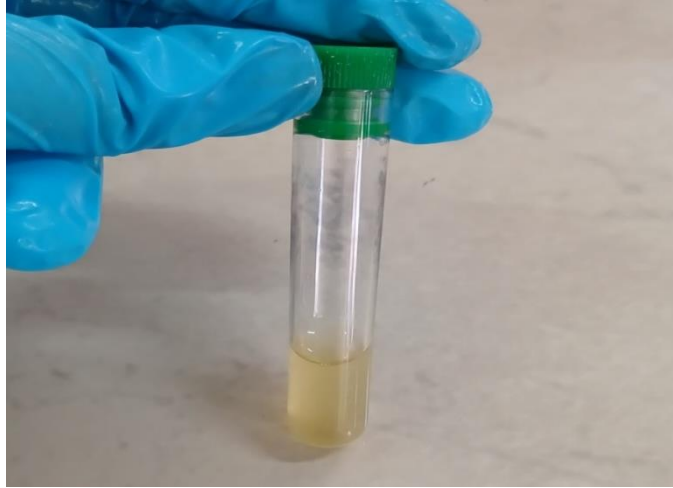


**Figure 21:**catalase (+)



**Figure 22 :**oxydase (-)

Les staphylocoques à coagulase négative, sont les bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram<sup>+</sup>, sphériques, isolées ou regroupées, formant ainsi des grappes. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et coagulase. La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*.



**Figure 23:**coagulase (-).

### 7.5. Résultat de l'enrichissement et la purification (repiquage)

Dans le but d'obtenir des souches pures, car dans la plupart cas on trouve un mélange de bacilles et de cocci et de Gram<sup>+</sup>, on fait une série de repiquage dans le même milieu. Aussi pour la réalisation de la galerie API il faut avoir une culture pure d'au moins de 24 h.

#### Dans la gélose Chapman

On note la présence des colonies rondes, jaunes et blanches, après coloration de Gram on note la présence de cocci Gram positif entassées en amas.

#### Dans la gélose MullerHinton

On note la présence de petites colonies toutes fines, jaunes et blanches. Après coloration de Gram on note la présence de cocci Gram positif entassées en grappe.

### 7.6. Identification biochimique

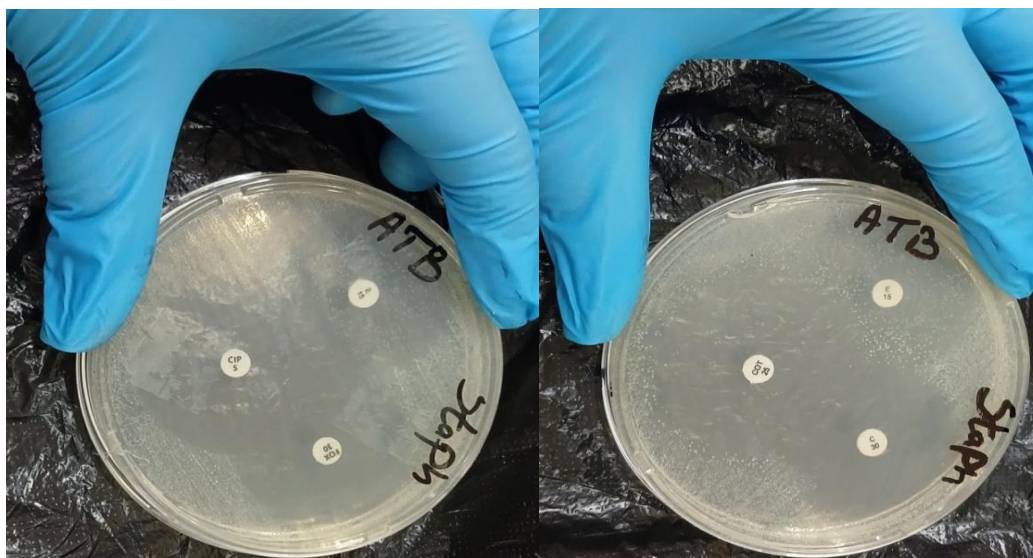
Nous avons utilisés la galerie API-Staph. Après la préparation et l'incubation des galeries, nous avons observé plusieurs cellules bactériennes différentes (**Figure 24**).



**Figure 24:** Galerie API-Staph après incubation

### 7.7. Détermination de la sensibilité des antibiotiques

Après incubation sur milieu Muller Hinton à 37°C pendant 24h, nous avons obtenu les résultats de l'antibiogramme résumé sur la **figure 25** suivante :



**Figure 25:**Sensibilité de la souche staphylococcus auricularis aux antibiotiques (Erythromycine).

Les profils de résistance obtenus montrent que la souche étudiée est résistante à un seul antibiotique Erythromycine **E**.

**Tableau 7:**Sensibilité de staphylococcus auricularis vis-à-vis des antibiotiques testés.

Antibiotiques	Sensibilité de la souche
Céfoxitine FOX	<i>S</i>
Chloramphénicol C	<i>S</i>
Ciprofloxacine CIP	<i>S</i>
Erythromycine E	<i>R</i>
Triméthoprime COT	<i>S</i>

*S* : sensible, *R* : résistant

**Tableau 8:**Résultats de l'identification de la bactérie isolée.

Prélèvement	Etat frais	Coloration de gram	Milieu d'isolement sélectif	Tests biochimiques			Type respiratoire	Galerie utilisé	Identification biochimique
				oxydase	Catalase	Coagulase			
1	Immobile	Cocci gram+	Muller Hinton	-	+	-	Aero-anaerobie facultative	API Staph	<i>Staphylococcus auricularis</i>

Nous nous sommes basés sur l'isolement et l'identification des micro-organismes responsables de la carie dentaire sur des dents obtenues dans les cabinets de chirurgie dentaire privés dans la ville de Tizi-Ouzou.

L'analyse macroscopique des bactéries isolée a montré une grande variété de formes et d'aspects des colonies qui ont poussés sur les cinq géloses utilisées pour l'isolement (la gélose Chapman, sang cuit, sang frais, Hektoen et Muller Hinton). Ce dernier n'as permis la pousse que d'une souche *Staphylocoque auricularis*.

L'analyse microscopique de tous les prélèvements de caries dentaires révèle aussi un polymorphisme de la flore bactérienne. La coloration de Gram a montré la présence des Gram positifs et négatifs et de multiples formes allant des cocci, en amas ou grappe de raisin.

Les bactéries ont été cultivées, repiquées et identifiées grâce à l'étude de leurs arsenaux enzymatiques et biochimiques. L'étude de leurs sensibilités aux différents antibiotiques utilisés est considérée comme un critère ultime d'identification pour les bactéries aérobies et anaérobies facultatives. Les résultats des études microscopiques par coloration de Gram, des tests biochimiques (catalase, oxydase, des plaques API et Galerie biochimique classique).

Les Cocci Gram positif aérobies et aéro-anaérobies facultatifs ont été isolés après mise en culture des prélèvements en aérobiose sur gélose au sang (pour les staphylocoques) à 37°C pendant 24 heures. Les bactéries ont subi un test de catalase. Les cocciGram(+) à catalase (-) ont été identifiés par le biais des galeries API 20 Staph.

L'identification biochimique par l'utilisation du test complémentaire (catalase, oxydase et coagulase) a pour but de confirmer quel type de staphylocoque s'agit-il.

Les résultats de notre étude ont montré l'abondance des cocci à Gram positif aéroanaérobie facultatif dans la carie avec une prédominance du genre *Staphylococcus auricularis*.

Les antibiotiques testés dans notre étude sont au nombre 5 : Céfoxitine **FOX**,

Chloramphénicol **C**, Ciprofloxacin **CIP**, Erythromycine **E**, Triméthoprime **COT**.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a confirmé que l'espèce bactérienne isolée, exhibe une sensibilité aux différents antibiotiques utilisés.

## 7.8. Activité antibactérienne d'huile essentielle

### 7.8.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque

Nous avons déterminé la CMI uniquement pour les HEs des feuilles de girofle et du thym à thymol qui ont présenté une activité antibactérienne importante vis-à-vis de *staphylococcus auricularis* (**Tableau 09**).

**Tableau 9:**valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.

Rapport de dilution (H.E/H <sub>2</sub> O)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
%	50	25	12.5	6.25	3.12	1.5	0.78
µL H.E/ml	400	200	100	50	25	12.5	6.251

Nous avons testé l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus Vulgaris* et *Eugenia caryophyllata* par la méthode de diffusion sur disque vis-à-vis la souche bactérienne *staphylocoque auricularis* (**Tableau 10**).

**Tableau 10:** Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus Vulgaris* et *Eugenia caryophyllata* réalisée par la méthode de diffusion sur disque.

<i>Thymus Vulgaris (T)</i>		<i>Eugenia caryophyllata (G)</i>	
Concentration mg/ml	Diamètre (mm)	Concentration mg/ml	Diamètre (mm)
6.251	0	6.251	0
12.5	0	12.5	0
25	0	25	0
50	6	50	7
100	10	100	8
200	0	200	10
400	0	400	14

Les résultats montrent une inhibition de la croissance bactérienne proportionnelle au diamètre de la zone d'inhibition. La différence des diamètres d'inhibition pourrait être due principalement à la composition chimique des huiles essentielles et l'activité antibactérienne de ces dernières pourrait principalement être due aux composées majoritaires (**LALAMI, Fouad et al. 2013**).

Nos huiles ont montré une moyenne activité sur la souche bactérienne. Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que l'espèce bactérienne étudiée présente des degrés de sensibilité différentes vis-à-vis de la concentration de l'huile essentielle testée dans laquelle on a remarqué une certaine sensibilité variable à ces huiles essentielles.

L'HE des feuilles de girofle (*Eugenia caryophyllata*) a montré l'activité antibactérienne la plus forte par rapport à celle de *Thymus Vulgaris*, avec un diamètre d'inhibition de 14 mm. L'HE de *Thymus Vulgaris* a présenté une activité bactérienne modérée dont le diamètre de la zone d'inhibition est situé à 10mm. Il est à noter que l'activité antimicrobienne la plus élevée a été enregistrée avec l'HE des feuilles de girofle.

Dans son étude, (**Rhayour 2002**) a montré que l'huile essentielle de clou de Girofle exerce son effet bactéricide principalement grâce à son composant principal l'eugénol.

Selon (Cheurfa, Allem et al. 2013), l'huile de thymus vulgaris montre une activité antibactérienne intéressante contre les bactéries Gram+ ainsi que contre les bactéries Gram – cependant, une étude réalisée par (Yakhlef, Laroui et al. 2011) montre que les souches staphylococcus aureus à Gram positif sont plus sensible au thymus vulgaris que les autres souches bactériennes à Gram – testées.

D'après (Nazzaro, Fratianni et al. 2013) le thymol est le principal constituant des huiles essentielles de thym et possède une activité antimicrobienne capable d'affecter la membrane des bactéries Gram +.

Des résultats obtenue par (Berrada, Bennani et al. 2016) montrent que l'HE de thymus vulgaris a présenté une efficacité maximale et un large spectre d'action aussi bien que sur les bactéries Gram positif que celles à Gram négatif.

Les résultats de (Hsouna, Hamdi et al. 2012) ont montré que l'huile essentielle de clou de Girofle a un grand potentiel d'activité antimicrobienne contre les micro-organismes.

### 7.8.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

- Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de *Thymus Vulgaris* et *Eugenia caryophyllata* par la méthode **de dilution en milieu liquide**. Les résultats des CMI d'HE vis-à-vis la souche bactérienne sont présents dans le (Tableau09) suivant :

**Tableau 11:** Les valeurs des CMI des H.Es testées sur *S. auricularisen* ( $\mu$ l/ml)

Huile essentielle	CMI		Pourcentage %	
<i>Girofle feuille</i>	200	400	25	50
<i>Thym à thymol</i>	50	100	6.25	12.5

Les huiles essentielles représentent une activité antimicrobienne moyenne vis-à-vis la souche bactérienne. Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que l'espèce bactérienne étudiée présente des degrés de sensibilité différents vis-à-vis des concentrations de l'huile essentielle testée. L'HE de Girofle feuille a montré des effets inhibiteurs à des dilutions de (25-50%) correspondent à des concentrations équivalentes à (200-400 $\mu$ L /ml) respectivement, par contre pour l'HE de Thym à thymol les effets inhibiteurs ont été observé à la dilution de (6.25-12.5%) correspondent à des concentrations de (50-100  $\mu$ L /ml).

D'après les valeurs des CMI obtenues l'HE de Girofle feuille a montré une meilleure performance antimicrobienne par rapport à l'HE de Thym à thymol vis-à-vis de *Staphylocoque auricularis*.

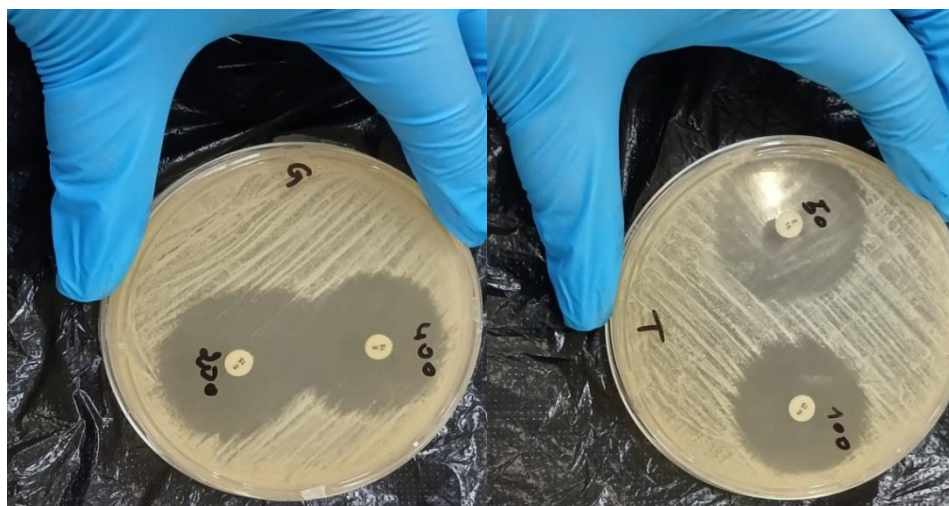
Les études mettant en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles à la fois sur les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> ont été effectuées. En effet, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* testée in vitro a inhibé la prolifération d'*Hélicobacter pylori* (Haristoy, Angioi-Duprez et al. 2003). L'huile de *Thymus vulgaris* témoigne d'une activité antibactérienne intéressante sur les bactéries Gram<sup>+</sup> comme sur les bactéries Gram<sup>-</sup> (Cheurfa, Allem et al. 2013), ont montrés que la plante *Thymus hirtus* démontra une activité antibactérienne importante vis-à-vis de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp et *Proteus vulgaris*.

Selon Carmen and Hancu (2014), l'intensité de l'effet de l'huile essentielle du feuille de girofle est variable selon les souches étudiées toutes les bactéries Gram- sont sensibles elles ont montrées le plus grand diamètre de zone d'inhibition qui est 19.5.

(Yakhlef, Laroui et al. 2011) qui ont montré que l'activité de l'huile de thym a été plus efficace contre les bactéries Gram positives (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* et *Staphylococcus pneumoniae*) que les Gram négatifs (*Escherichia coli*).

### 7.8.3. Synergie entre HE/ATB

Nous avons réalisé le test synergique de deux huiles essentielles *Thymus Vulgaris* et *Eugenia caryophyllata* avec un antibiotique érythromycine E. La synergie a été testée par la méthode de diffusion sur disque (Figure 26).



**Figure 26:** Effet des huiles essentielles de *Thymus Vulgaris* et *Eugenia caryophyllata* sur *S. auricularis* avec Erythromycine E.

Dans le cadre de notre étude un antibiotique (Erythromycine E) a été utilisé en combinaison avec les deux huiles essentielles (tableau 12), la souche bactérienne est sensible pour l'antibiotique testé.

**Tableau 12:** Résultats de l'interaction entre huiles essentielles avec Erythromycine

<i>Thymus Vulgaris</i>		<i>Eugenia caryophyllata</i>	
Concentration (mg/ml)	Diamètre (mm)	Concentration (mg/ml)	Diamètre (mm)
100	21	400	22
50	20	200	23

A partir de la figure précédente (figure 26), on constate que la sensibilité ou la résistance des souches aux ATB et ce en fonction de la souche et de l'huile utilisé : par exemple la souche bactérienne est extrêmement sensible à Erythromycine E. D'après les résultats on peut tirer que les composants des huiles ont interagit avec ceux de l'antibiotique qui ont permis la suppression de la résistance vis-à-vis l'ATB testé.

Les résultats de test de la synergie, montrent que l'association de l'huile essentielle de *Thymus Vulgaris* ou *Eugenia caryophyllata* avec l'antibiotique Erythromycine E sur *S. auricularis*, a donné des interactions synergiques par rapport à celle de l'antibiotique seul. Un effet synergique positif est traduit par un élargissement de zone d'inhibition de l'antibiotique.

D'après Le (**tableau 12**), l'association d'HE/ATB a montré une forte activité synergétique contre *S. auricularis* avec des diamètres de zone d'inhibition (pour girofle feuille : 23 ; 22mm et pour le thym : 20 ; 21mm respectivement). Cette synergie avec les huiles essentielles peut s'expliquer par la présence de composés bioactifs terpéniques ou phénoliques des huiles qui ont réussi à traverser le biofilm créé par la souche, ce qui s'explique la nature hydrophobe des composants aromatiques de l'HE, composants responsable de la perturbation de la paroi bactérienne ce qui facilite l'entrée de l'ATB et fragilisent les cellules bactériennes et permettant de supprimer la résistance remarquée vis-à-vis de l'ATB testé seul.

Le travail de **Fadli, Saad et al. (2012)**, qui ont testé l'effet de l'association de deux huiles essentielles de Thym avec vingt-sept antibiotiques sur un ensemble de bactéries Gram positif et Gram négatif, ont rapporté 57/80 associations synergiques. Ils montrent aussi que la synergie se manifeste plus souvent chez les Gram positif que chez Gram négatif.

De même **Amarti, Satrani et al. (2010)** prouvent que *S. aureus* était plus sensible aux extraits du Thym même à des faibles concentrations.

Des études récentes, ont démontré que l'huile essentielle des feuilles de girofle est fortement antibactérienne. Cette activité pourrait être attribuée à son composé majoritaire qui est « l'eugénol ». Les travaux de **Valero and Giner (2006)** ont prouvé que l'eugénol est parmi les molécules les plus inhibitrices de la croissance des bactéries.

L'étude de **Ghannadi, Bagherinejad et al. (2012)** a montré que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle de feuille de girofle. Toutes les études effectuées par ses auteurs concordent avec nos résultats, les résultats de **Hsouma, Hamdi et al. (2012)** ont montré que l'huile essentielle des feuilles de girofle a un grand potentiel d'activité antimicrobienne contre les micro-organismes. Le maximum de diamètre de zone d'inhibition pour les souches bactériennes qui étaient sensibles se trouve dans la gamme de (10.5mm et 22mm) ce qui est en concordance parfaite avec nos résultats.

# **Conclusion**

La carie dentaire est considérée comme une maladie courante et coûteuse dans le monde, susceptible d'affecter considérablement la santé et la qualité de vie.

Cette étude a été réalisée dans l'objectif de déterminer l'étendue de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles (*Thymus vulgaris* et *Eugenia caryophyllata*) sur la souche bactérienne *Staphylocoque auricularis* isolée à partir des dents cariées, ainsi que les types d'interaction synergique en combinaison avec différents antibiotiques auxquels la bactérie est résistante ; le but final étant de trouver des synergies entre les composants utilisés et permettre la recherche d'alternative aux antibiotiques pour la lutte contre l'antibiorésistance.

Les résultats obtenus indiquent que les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Eugenia caryophyllata* ont une activité importante sur les bactéries cariogènes et que cette activité augmente en fonction de la concentration.

Ces recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer avec précision les concentrations minimales inhibitrices des huiles étudiées, ainsi que pour identifier, isoler et purifier les constituants bioactifs des feuilles de girofle et du thym à thymol. Ces recherches permettront de les intégrer efficacement dans la formulation de solutions de bain de bouche et de pâtes dentifrices.

Notre étude a révélé que l'huile essentielle de feuilles de girofle possède une activité antibactérienne significative, en particulier contre la souche clinique étudiée, avec des diamètres d'inhibition notables. De plus, les tests d'interaction ont mis en évidence une synergie entre les huiles essentielles utilisées et l'antibiotique érythromycine. Cette synergie pourrait s'expliquer par la présence de molécules bioactives terpéniques et/ou phénoliques dans les huiles, qui fragilisent les cellules bactériennes, permettant ainsi à l'antibiotique de retrouver son efficacité.

Ces résultats confirment l'existence d'interactions synergiques entre les antibiotiques et les huiles essentielles, ouvrant la voie à de nouvelles perspectives d'utilisation pour lutter contre l'antibiorésistance. Il serait intéressant de valoriser et d'utiliser des solutions à base d'huiles essentielles pour renforcer l'effet des antibiotiques sans nuire à la santé des patients. Poursuivre des recherches similaires en explorant d'autres plantes comme la sauge ou la menthe, tout en ajustant les concentrations d'huile, pourrait également s'avérer prometteur pour réduire les effets secondaires des antibiotiques et freiner la propagation de la résistance, notamment dans les milieux hospitaliers.

## Résumé

Ce travail vise à isoler et identifier les bactéries responsables des infections carieuses dans la cavité buccale à partir de prélèvements effectués dans des cabinets dentaires de Tizi-Ouzou. Les bactéries les plus courantes trouvées sont les staphylocoques, streptocoques et entérobactéries, avec *Staphylococcus auricularis* montrant une résistance confirmée aux antibiotiques. L'étude se concentre sur l'évaluation de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Eugenia caryophyllata* (girofle feuille) contre cette souche bactérienne, ainsi que sur l'analyse de leur interaction avec les antibiotiques. Les résultats montrent une forte activité antibactérienne pour l'huile de girofle feuille et une activité modérée pour l'huile de thymus. De plus, une synergie significative est observée entre ces huiles essentielles et l'antibiotique érythromycine, augmentant l'effet inhibiteur contre la bactérie. En conclusion, les huiles essentielles étudiées montrent un potentiel antibactérien, particulièrement lorsqu'elles sont combinées avec des antibiotiques, ce qui pourrait offrir une alternative à l'utilisation excessive des antibiotiques pour traiter les infections carieuses.

## Abstract

This work aims to isolate and identify the bacteria responsible for carious infections in the oral cavity from samples taken in dental offices in Tizi-Ouzou. The most commonly found bacteria are staphylococci, streptococci, and enterobacteria, with *Staphylococcus auricularis* showing confirmed resistance to antibiotics. The study focuses on evaluating the antibacterial effect of essential oils from *Thymus vulgaris* and *Eugenia caryophyllata* (clove leaf) against this bacterial strain, as well as analyzing their interaction with antibiotics. The results show strong antibacterial activity for clove leaf oil and moderate activity for thyme oil. Additionally, significant synergy is observed between these essential oils and the antibiotic erythromycin, increasing the inhibitory effect against the bacteria. In conclusion, the essential oils studied demonstrate notable antibacterial potential, particularly when combined with antibiotics, which could offer an alternative to the excessive use of antibiotics in treating carious infections.

## تلخيص

يهدف هذا العمل إلى عزل وتحديد البكتيريا المسؤولة عن العدوى السنية في تجويف الفم من العينات المأخوذة من العيادات السنية في تيزي وزو. البكتيريا الأكثر شيوعًا التي تم العثور عليها هي المكورات العنقودية، المكورات العقدية، والبكتيريا المعوية، مع إظهار *Staphylococcus auricularis* مقاومة مؤكدة للمضادات الحيوية. تركز الدراسة على تقييم التأثير المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية من *Thymus vulgaris* و *Eugenia caryophyllata* (ورقة القرنفل) ضد هذه السلالة البكتيرية، وكذلك تحليل تفاعلها مع المضادات الحيوية. أظهرت النتائج نشاطًا قويًا مضادًا للبكتيريا لزيوت ورق القرنفل، ونشاطًا معتدلًا لزيوت الزعتر. بالإضافة إلى ذلك، لوحظ تآزر كبير بين هذه الزيوت العطرية والمضاد الحيوي إريثروميسين، مما يزيد من التأثير المثبط ضد البكتيريا. في الختام، أظهرت الزيوت العطرية المدروسة إمكانات ملحوظة كمضادات للبكتيريا، خصوصًا عند دمجها مع المضادات الحيوية، مما قد يوفر بديلاً للاستخدام المفرط للمضادات الحيوية في علاج العدوى السنية.

# **Références Bibliographiques**

- Abib, A. and C. Lazib (2022).** Etude de l'activité antibactérienne de l'association huile essentielle/huile essentielle et huile essentielle/antibiotique, Université Mouloud Mammeri.
- Abib, A. and C. Lazib (2022).** Etude de l'activité antibactérienne de l'association huile essentielle/huile essentielle et huile essentielle/antibiotique, Université Mouloud Mammeri.
- Acree, B. (2012).** Toxicity and drug testing, BoD–Books on Demand.
- AFIRI, O., N. ATTAf, H. BENGHERABI, R. BOUKHACHEBA, K. RABAHI, S. MATI and I. LAIB (2022).** "Concepts actuels de préparation des cavités en dentisterie adhésive."
- Alekshun, M. N. and S. B. J. C. Levy (2007).** "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance." 128(6): 1037-1050.
- Amarti, F., et al. (2010).** "Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc."
- Aouni, M., et al. (2013).** "Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles (Spray 41 de Puressentiel®) et domaines d'application."
- Arndt, B. L. (2014).** "reStill: rethinking distillation."
- Avril, J. L. (1991).** Dictionnaire pratique de bactériologie clinique, Ellipses.
- Axelsson, P. J. D. and R. P. o. D. C. n. e. C. Q. P. Co (2000).** "Prediction of caries risk and risk profiles." 249-280.
- Bajpai, V. K., et al. (2012).** "Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review." 45(2): 722-734.
- BAKKALI, F., et al. (2008).** Biological effectis of essential oils. Food and Chemical Toxilology, Oxford.
- Bassolé, I. H. N., et al. (2010).** "Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination." 15(11): 7825-7839.
- Bekhechi, C., et al. (2008).** "Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie." 3(6): 153-159.
- Belounis, Y. and B. Saoudi (2020).** Les huiles essentielles et leurs effets synergiques: lutte contre les bactéries multirésistantes, Université Mouloud Mammeri.
- Bennani, M. J. P. d. F. d. É. U. S. M. B. A. (2014).** "Recherche d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu isolées dans les selles."
- Bentley, R. and J. J. A. i. a. m. Bennett (2003).** "What is an antibiotic? Revisited." 52: 303-332.
- Berrada, S., et al. (2016).** "Effet antibactérien de deux huiles essentielles (*Thymus vulgaris* et *Lavandula officinalis*) sur des souches isolées d'un centre d'hémodialyse de la ville de Fès

[Antibacterial effect of two essential oils (*Thymus vulgaris* and *Lavandula officinalis*) on the isolated strains from Fez city's hemodialysis center]." 17(2): 639-645.

**Boutemtam, L., et al. (2020).** "Understanding the phenomena of extraction of essential oils by the microwave accelerated distillation process: case of the Washington Navel variety." 10(3): 167-181.

**Bouyahya, A., et al. (2017).** "Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries." 16(S1): 173-183.

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales, Éditions médicales internationales Editions Technique & Documentation\*.

**Burt, S. J. I. j. o. f. m. (2004).** "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review." 94(3): 223-253.

**Caillet, S. and M. J. I.-I. A.-F. Lacroix, RESALA (2007).** "Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire." 1(8).

**Carle, S. J. P. (2009).** "La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important." 42(2): 6-21.

**Carmen, G. and G. J. A. p. b. Hancu (2014).** "Antimicrobial and antifungal activity of *Pelargonium roseum* essential oils." 4(Suppl 2): 511.

**Cattoen, C. J. M. I. R. (2015).** "Persistance du portage de bactéries multirésistantes après la réanimation." 24(3): 249-255.

**Cavallo, J.-D., et al. (2004).** "Bêtalactamines." 1(3): 129-202.

**Charpentier, B., et al. (2008).** Guide du préparateur en pharmacie, Elsevier Masson.

**Cheurfa, M., et al. (2013).** "Effect of essential oil of *Thymus vulgaris* on bacterial pathogens responsible for gastroenteritis." 11: 154-160.

**Colon, P. and L. J. C. p.-d. R.-M. F. C. JJ (2009).** "Odontologie conservatrice et restauratrice: Tome 1: Une approche médicale globale."

**CROUZET, J. (1998).** Arômes alimentaires, Ed. Techniques Ingénieur.

**Cuba, R. J. I. J. o. A. (2001).** "Toxicity myths essential oils and their carcinogenic potential." 11(2): 76-83.

**Davies, J., et al. (2010).** "Origins and evolution of antibiotic resistance." 74(3): 417-433.

**Deans, S. and G. J. I. j. o. f. m. Ritchie (1987).** "Antibacterial properties of plant essential oils." 5(2): 165-180.

**Devi, K. P., et al. (2010).** "Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane." 130(1): 107-115.

**Di Pasqua, R., et al. (2010).** "Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol." 10(5): 1040-1049.

- Domagala, J. M. J. J. o. A. C. (1994).** "Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials." 33(4): 685-706.
- Dorman, H. D. and S. G. J. J. o. a. m. Deans (2000).** "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." 88(2): 308-316.
- Doublet, B., et al. (2012).** "Le concept «One Health» en antibiorésistance et les flux de gènes." 24: 79-90.
- Dubois, M., et al. (2024).** "Microbiote oral et santé bucco-dentaire des sportifs : revue narrative." Cahiers de Nutrition et de Diététique.
- Eaton, A., et al. (1995).** "Méthodes normalisées d'examen des eaux et eaux usées."
- Eloff, J. N. J. P. m. (1998).** "A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria." 64(08): 711-713.
- Englebin, M. J. C. d. f. e. a. (2011).** "Essences et huiles essentielles: précaution d'emplois et conseils d'utilisation." 60.
- Etebu, E. and I. J. I. J. A. M. B. R. Ariekpar (2016).** "Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives." 4(2016): 90-101.
- Fadli, M., et al. (2012).** "Antibacterial activity of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics." 19(5): 464-471.
- Fani, M., et al. (2017).** "In vitro antimicrobial activity of Thymus vulgaris essential oil against major oral pathogens." 22(4): 660-666.
- Farhat, A. (2010).** Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application, Université d'Avignon.
- Fisher, K., et al. (2008).** "Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?" 19(3): 156-164.
- Genné, D. and H. Hans (2003).** De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. Forum Med Suisse.
- Ghannadi, A., et al. (2012).** "Antibacterial activity and composition of essential oils from Pelargonium graveolens L'Her and Vitex agnus-castus L." 4(4): 171.
- GOUGIAH, L., K. HAOUS, A. REZKI and C. BENSADI (2020).** "RESTAURATIONS CORONAIRES AU COMPOSITE."
- Guardabassi, L. and P. J. A. r. i. b. o. a. o. Courvalin (2005).** "Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance." 1-18.
- Guillemot, D., et al. (2006).** "Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine."
- Guinoiseau, E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action, Université de Corse.
- Gustafson, et al. (1998).** "Effects of tea tree oil on Escherichia coli." 26(3): 194-198.

- Halawani, E. J. A. B. R. (2009).** "Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics." 3(5-6): 148-152.
- Haristoy, X., et al. (2003).** "Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice." 47(12): 3982-3984.
- Hashimoto, K., T. Sato, H. Shimauchi and N. Takahashi (2010).** Profiling of dental plaque microflora on root caries lesions and the protein-degrading activity of these bacteria. *Interface Oral Health Science* 2009, Springer.
- Helander, I. M., et al. (1998).** "Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria." 46(9): 3590-3595.
- Hellal, Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Université Mouloud Mammeri.
- Hemwimon, S., et al. (2007).** "Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*." 54(1): 44-50.
- Hernandez Ochoa, L. R. (2005).** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné «solvant/actif» d'origine végétale.
- HINSCHBERGER, C. (1997).** Quelle place des produits de nettoyage probiotiques dans la pratique dentaire?, UNIVERSITE DE STRASBOURG.
- Hitz Lindenmüller, I. and J. T. Lambrecht (2011).** "Oral care." *Curr Probl Dermatol* 40: 107-115.
- Hoffmann, K. H. J. Z. f. N. C. (2020).** Essential oils, De Gruyter. 75: 177-177.
- Hojo, K., S. Nagaoka, T. Ohshima and N. J. J. o. d. r. Maeda (2009).** "Bacterial interactions in dental biofilm development." 88(11): 982-990.
- Hsouna, A. B., et al. (2012).** "Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia." 11: 1-7.
- Hussein, S. N. J. E. J. o. B. (2020).** "Study of the diagnosis and isolation of bacteria associated with dental caries in pregnant women in Baghdad province." 14(1): 2221-2227.
- Hyldgaard, M., et al. (2012).** "Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components." 3: 12.
- Jablonski-Momeni, A., J. Lange, S. Schmidt-Schäfer, P. Petrakakis, M. Heinzl-Gutenbrunner and K. J. G. Pieper (2013).** "Dental health in 12-year-old children including initial lesions and dentine caries." 76(2): 103-107.
- Jouault, S. J. U. d. L., Nancy (2012).** "La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité."
- Kadri Ekade Hannatou-Sacko Aissata, T. A. O. (2011).** "Les résidus d'antibiotique dans les viandes."

- Kaibouche, I., A. Brighen and S. E. Akroum (2013).** Microorganismes responsables des caries dentaires et méthodes de traitements actuels, université de jijel.
- Kalemba, D. and A. J. C. m. c. Kunicka (2003).** "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." 10(10): 813-829.
- Karpiński, T. M. and A. K. J. J. B. E. S. Szkaradkiewicz (2013).** "Microbiology of dental caries." 3(1): M21-24.
- Kellal, C. and D. Lacete (2018).** Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Origanum compactum* et *Cedrus atlantica*: Application pour la conservation des fruits de pomme, Université Mouloud Mammeri.
- KEMACHE, N. and H. Tartar (2021).** Utilisation des antibiotiques en élevage et impact sur la santé publique, Université laarbi tebessi tebessa.
- Kierszenbaum, A. L. and A. P. do Nascimento (2008).** Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia, Elsevier.
- Koedam, A. J. R. R., Aromen, Kosmetica (1977).** "Antimikrobielle Wirksamkeit atherischer Ole (eine Literaturarbeit 1960-1976). i."
- Laghchimi, Z., et al. (2014).** "Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme." 5(6): 1770-1780.
- LALAMI, A. E. O., et al. (2013).** "Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*." 8(31).
- Leja, K., et al. (2020).** "Comparative evaluation of *Piper nigrum*, *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus* and *Juniperus communis* L. essential oils of different origin as functional antimicrobials in foods." 9(2): 141.
- Leme, A. P., H. Koo, C. Bellato, G. Bedi and J. J. J. o. d. r. Cury (2006).** "The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight." 85(10): 878-887.
- LES AMINOSIDES, O. A.** "CLASSIFICATION ET MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES."
- Levy, S. B. and B. J. N. m. Marshall (2004).** "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses." 10(Suppl 12): S122-S129.
- Lopez, I., et al. (2007).** "Prévention et hygiène buccodentaire chez l'enfant: conseils pratiques." *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 20(2): 63-69.
- López, P., et al. (2007).** "Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms." 55(11): 4348-4356.
- Louvié, A. (2023).** Les 110 fiches outils incontournables de l'infirmier, Elsevier Health Sciences.
- Lucchesi, M.-E. (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles, Université de la Réunion.

**Lüllmann-Rauch, R. and P. Sprumont (2008).** Histologie, De Boeck Supérieur.

Lydia, B. B., et al. "Activité des huiles essentielles seules et en combinaison avec des antibiotiques vis-à-vis des bactéries Gram négatives pathogènes."

**Maidi, L. and M. Dahia** "Mise en évidence des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de *Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae) de la région d'El Assafia (W. de Laghouat) Algérie."

**Mammeri, H. and C. J. S. d. b. Amiens, CHU Amiens. P (2013).** "Mode d'action des antibiotiques." 2.

**Mandal, S., et al. (2010).** "Synergistic anti-*Staphylococcus aureus* activity of amoxicillin in combination with *Emblica officinalis* and *Nymphae odorata* extracts." 3(9): 711-714.

**Marsh, P. J. C. r. (2004).** "Dental plaque as a microbial biofilm." 38(3): 204-211.

**Martinez, J. L. (2014).** "General principles of antibiotic resistance in bacteria." *Drug Discov Today Technol* 11: 33-39.

**Matsui, R. and D. J. F. m. Cvitkovitch (2010).** "Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*." 5(3): 403-417.

**Mayaud, L., et al. (2008).** "Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics." 47(3): 167-173.

**Mehamdia Naima, M. S. (2014).** "Mécanismes de la résistance aux antibiotiques."

Mézl, Z. (1977). *Abrégé de pathologie dentaire*, Masson.

**Mohammedi, Z. J. P. n., activité biologique (2006).** "Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen." 59.

**Moroh, J.-L. A. (2013).** Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*, Université de Bretagne occidentale-Brest.

**Mouton, C., et al. (1994).** *Bactériologie bucco-dentaire*, Masson.

**Moyes, R. B., et al. (2009).** "Differential staining of bacteria: gram stain." *Curr Protoc Microbiol* Appendix 3: Appendix 3C.

**Muller, A. (2017).** Bon usage des antibiotiques: résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé, Université Bourgogne Franche-Comté.

**Munita, J. M. and C. A. Arias (2016).** "Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Microbiol Spectr* 4(2).

**Muylaert, A. and J. Mainil (2013).** Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur "contagiosité". *Annales de Médecine vétérinaire*, ULg-Université de Liège, Liège, Belgium.

**Nazzaro, F., et al. (2013).** "Effect of essential oils on pathogenic bacteria." 6(12): 1451-1474.

Nikaido, H. J. A. r. o. b. (2009). "Multidrug resistance in bacteria." 78(1): 119-146.

- Oberlé, K. (2012).** Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. dans les hydrosystèmes de surface, Université de Rouen.
- Owen, L. and K. J. C. r. i. m. Laird (2018).** "Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance." 44(4): 414-435.
- Pagès, J.-M. J. m. s. (2004).** "Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques." 20(3): 346-351.
- Palo, R., I. Bonetti-Filho, M. Valera, C. Camargo, S. Camargo, C. Moura-Netto and C. J. O. D. Pameijer (2012).** "Quantification of peroxide ion passage in dentin, enamel, and cementum after internal bleaching with hydrogen peroxide." 37(6): 660-664.
- Pang, Z., et al. (2019).** "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies." *Biotechnol Adv*37(1): 177-192.
- Peyron, L. (1992).** "Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques."
- Pibiri, M.-C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, EPFL.
- Pibiri, M.-C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, EPFL.
- Pillon, F. (2010).** "Les bains de bouche, savoir les conseiller." *Actualités Pharmaceutiques* 49(495): 28.
- Pillon, F. and G. Pillot (2015).** "Bien utiliser les bains de bouche." *Actualités Pharmaceutiques* 54(544): 37-39.
- Piochon, M. (2008).** Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse, Université du Québec à Chicoutimi.
- Poirot, T. J. M. d. t., UNIVERSITE DE LORRAINE, Faculté de pharmacie (2016).** "Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie." 97.
- Ponce, A., et al. (2003).** "Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard." 36(7): 679-684.
- Rada, R. E. J. D. t. (2013).** "New options for restoring a deep carious lesion." 32(3): 102, 104-105.
- Rania, A., et al. (2022).** "Les bactériocines comme substituts aux traitements antibiotiques."
- Rhayour, K. (2002).** "Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*."
- Rodier, J., et al. (2016).** L'analyse de l'eau-10e éd, Dunod.
- Rouabhia, M. J. C. J. o. I. D. and M. Microbiology (2002).** "Interactions between host and oral commensal microorganisms are key events in health and disease status." 13: 47-51.

- Roux, D., et al. (2017).** Conseil en aromathérapie, Le Moniteur des pharmacies.
- Sabrae, A. (2023).** "Le rôle du pharmacien d'officine dans le traitement et la prise en charge des pathologies bucco-dentaires."
- Sakkas, H., et al. (2017).** "Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils." 27(3): 429-438.
- Samaranayake, L. and V. H. J. D. C. Matsubara (2017).** "Normal oral flora and the oral ecosystem." 61(2): 199-215.
- Sánchez, A. R., et al. (2004).** "Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity." 43(10): 709-715.
- Sewanu, S. O., et al. (2015).** "Antimicrobial and efflux pumps inhibitory activities of Eucalyptus grandis essential oil against respiratory tract infectious bacteria." 9(10): 343-348.
- Singh, S. B. and J. F. J. B. p. Barrett (2006).** "Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products." 71(7): 1006-1015.
- Sixou, M., et al. (2007).** "Biofilm buccal et pathologies buccodentaires." Antibiotiques 9(3): 181-188.
- SOUM, N. and M. SAIDOUNI (2019).** ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES ANTIBIOTIQUES CHEZ L'ESPECE ANIMALE, université ibn khaldoun TIARET.
- Starmans, D. A., et al. (1996).** "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." 7(6): 191-197.
- Stassi, V., et al. (1996).** "The antimicrobial activity of the essential oils of four Juniperus species growing wild in Greece." 11(1): 71-74.
- Stringer, A. M., et al. (2015).** "The role of oral flora in the development of chemotherapy-induced oral mucositis." 44(2): 81-87.
- Takahashi, N. and B. J. J. o. d. r. Nyvad (2011).** "The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives." 90(3): 294-303.
- Taylor, S. D., et al. (2016).** "The action mechanism of daptomycin." 24(24): 6253-6268.
- Thaker, H., et al. (2013).** "Isolation and identification of Staphylococcus aureus from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat." 6(1): 10-13.
- Tongnuanchan, P. and S. J. J. o. f. s. Benjakul (2014).** "Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation." 79(7): R1231-R1249.
- Toure, D. (2015).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire, Université Felix Houphoët Boigny, Côte d'Ivoire.
- Ultee, A., et al. (2002).** "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus." 68(4): 1561-1568.
- Valero, M. and M. J. I. j. o. f. m. Giner (2006).** "Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of Bacillus cereus INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth." 106(1): 90-94.

**Wang, S. K., A. C. Samann, J. C. C. Hu and J. P. Simmer (2013).** FAM20C functions intracellularly within both ameloblasts and odontoblasts in vivo, John Wiley and Sons and The American Society for Bone and Mineral Research ....

**Weiss, K. J. L. m. d. q. (2002).** "La résistance bactérienne: la nouvelle guerre froide." 37(3): 41-49.

**Yadav, K. and S. J. J. C. I. D. P. Prakash (2017).** "Dental caries: A microbiological approach." 2(1): 1-15.

**Yakhlef, G., et al. (2011).** "Évaluation de l'activité antimicrobienne de Thymus vulgaris et de Laurus nobilis, plantes utilisées en médecine traditionnelle." 9(4): 209-218.

**Yonghong, L., G. Lihong and C. J. W. C. J. o. S. Huizhen (2013).** "Comparative study on the penetration abilities of resin infiltration into proximal initial caries lesions in primary molars and permanent posterior teeth." 31(2).

**Young, B., G. O'Dowd and P. Woodford (2015).** Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater, De Boeck Supérieur.

**Yves, L. L. and G. Michel (2009).** Staphylococcus aureus, Lavoisier.

**ZEGHOUF, C., et al. (2020).** "Etude des protozoaires de la cavité buccale."

**Zitoun-Sztainman, A. (2007).** La santé bucco-dentaire, Editions Alpen.