

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou  
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

**Département de Biochimie-Microbiologie**



**Mémoire de fin d'études**

**Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie**

**Option: Biotechnologie Microbienne**

**Thème**

**Etude de l'activité antibactérienne de l'association  
huile essentielle / huile essentielle et huile essentielle / antibiotique**

**Réalisé par : ABIB Anies et LAZIB Céline**

Soutenu le 11/07/2022, devant le jury composé de:

M <sup>me</sup>	ASMANI K.L.	MCA-UMMTO	Présidente
M <sup>r</sup>	BOUACEM K.	MCA-UMMTO	Promoteur
M <sup>r</sup>	SEMRI M. L.	Chef de laboratoire - IPA	Co-promoteur
M <sup>me</sup>	BENAZZOUZ K.	MCB-UMMTO	Examinatrice

Année universitaire 2021-2022

## Remerciements

Nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir accordé la volonté, la patience et le courage de mener à bon terme ce mémoire de fin d'études.

Au terme de ce travail, il nous tient à cœur d'adresser nos remerciements les plus distinguées 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 **M<sup>r</sup> BOUACEM K.**, Maître de Conférences Classes A à la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques (FSBSA) et à notre co-promoteur **M<sup>r</sup> SEMRI M. L.** pour leurs conseils, leurs disponibilités permanentes, ainsi que le suivi continué tout le long de la réalisation de ce mémoire.

À **M<sup>r</sup> TITOUCHE Y.**, Maître de Conférences Classes A à la FSBSA, UMMTO, pour nous avoir fournis la souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la pénicilline MU50.

Aux membres du jury d'avoir trouvé le temps de lire attentivement notre travail et de nous avoir honoré de leurs présences durant notre soutenance.

À nos camarades de stage: Hocine, Walid, Maria, Amina, Nafissa, Khadidja pour l'aide précieuse qu'ils n'ont cessé de nous apporter tout le long de ce travail.

Enfin, nos remerciements vont aussi à tous les enseignants de la Filière de Biotechnologie Microbienne d'UMMTO, à **M<sup>r</sup> NAIT SAADA** responsable du département de production, à **M<sup>me</sup> HOCINE A.**, **M<sup>me</sup> KERCHOUCHE**, ainsi qu'aux personnels du laboratoire des milieux de culture de l'Institut Pasteur d'Alger qui ont contribué à notre formation.

# *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes parents Madjid et Ghania, avant tout pour le magnifique modèle de labeur et de persévérance qu'ils sont, eux qui m'ont tant encouragé et donné tout l'amour, le dévouement et sur tout le soutien dont j'avais besoin.*

*Mes trois sœurs, Doria, Yasmine et Lina pour leurs amours, et encouragements indéfectibles.*

*À mes neveux, Aliyah, Imane et Sabri que Dieu vous protège.*

*À Mes oncles et Tantes, en particulier Roza et Hayet pour leur bienveillance, aide, soutien et encouragements.*

*À Tous mes amis en particulier, Roza, Essaid, Mélissa et Lyliá, que Dieu préserve notre amitié.*

*À tous mes cousins et cousines, Idir, Sarah, Alicia, Fafouche, Tinhinan et essentiellement Sabrina, puisse Dieu t'apporter toute la réussite, santé et bonheur que tu mérites tant.*

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

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

*«À vous tous, je vous souhaite: amour, bonheur, santé, joie et prospérité»*

*Anies*

## *Dédicaces*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, ainsi je dédie ce mémoire de fin d'études à :*

*Mes chers parents qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, particulièrement ma maman qui a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*À mes sœurs, pour leur soutien, leurs conseils et leur amour, qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici car elles ont toujours cru en moi.*

*À mon merveilleux neveu, à qui je souhaite un avenir radieux.*

*Sans oublier ma binôme Anies, pour sa bonne humeur, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.*

*«Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur»*

*Céline*

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Structure chimique d'un cycle bêta-lactame.....	5
<b>Figure 02:</b> Structure chimique des pénicillines .....	5
<b>Figure 03:</b> Structure des céphalosporines.....	6
<b>Figure 04:</b> Structure du carbapénème.....	7
<b>Figure 05:</b> Structure d'un macrolide .....	8
<b>Figure 06:</b> Structure de la tétracycline .....	8
<b>Figure 07:</b> Structure d'un aminoglycoside .....	9
<b>Figure 08:</b> Mécanisme de résistance aux antibiotiques.....	11
<b>Figure 09:</b> Structures chimiques des terpènes et terpénoïdes.....	16
<b>Figure 10:</b> Structures chimiques des prophanylphénol .....	16
<b>Figure 11:</b> Structures chimiques de certains composants .....	16
<b>Figure 12:</b> Sites d'actions des huiles essentielles sur la cellule bactérienne.....	20
<b>Figure 13:</b> Institut Pasteur, annexe el Hamma. ....	23
<b>Figure 14:</b> Huiles essentielles utilisées.....	25
<b>Figure 15:</b> Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Thym sur <i>P. aeruginosa</i> .....	33
<b>Figure 16:</b> Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Thym sur <i>S. aureus</i> .....	33
<b>Figure 17:</b> Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Thym sur SARM.....	34
<b>Figure 18:</b> Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Romarin sur <i>P. aeruginosa</i> .....	35
<b>Figure 19:</b> Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Romarin sur SARM.....	35
<b>Figure 20:</b> Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle d'Origan sur <i>P. aeruginosa</i> .....	36
<b>Figure 21:</b> Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle d'Origan sur SARM.....	37
<b>Figure 22:</b> Effet de l'Association des 3 huiles essentielles avec les différentes dilutions vis-à-vis de <i>S. aureus</i> .....	38
<b>Figure 23:</b> Effet de l'Association des 3 huiles essentielles avec les différentes dilutions vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> .....	38

<b>Figure 24:</b> Effet de l'Association des 3 huiles essentielles avec les différentes dilutions vis-à-vis d' <i>E. coli</i> .....	38
<b>Figure 25:</b> Effet de l'Association des 3 huiles essentielles avec les différentes dilutions vis-à-vis du SARM.....	39
<b>Figure 26:</b> Effet de l'association des 2 HEs avec les différents espacements vis-à-vis d' <i>E. coli</i> .....	39
<b>Figure 27:</b> Effet de l'association des 2 HEs avec les différents espacements vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	40
<b>Figure 28:</b> Effet de l'association des 2 HEs avec les différents espacements vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> .....	41
<b>Figure 29:</b> Effet de l'association des 2 HEs avec les différents espacements vis-à-vis du SARM .....	41
<b>Figure 30:</b> Effet de l'association des HEs avec les différents antibiotiques vis-à-vis de <i>S. aureus</i> .....	43
<b>Figure 31:</b> Effet de l'association des HEs avec les différents antibiotiques vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> .....	43
<b>Figure 32:</b> Effet de l'association des HEs avec les différents antibiotiques vis-à-vis de SARM .....	44
<b>Figure 33:</b> Effet de l'association des HEs avec les différents antibiotiques vis-à-vis d' <i>E. coli</i> .....	45

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Généralités et propriétés des trois huiles essentielles utilisées.....	25
<b>Tableau II:</b> Résumé des différentes dilutions employées .....	26
<b>Tableau III:</b> Résistance et sensibilité des bactéries vis-à-vis des huiles essentielles .....	27
<b>Tableau IV:</b> Résumé des différentes combinaisons employées pour le test de synergie sur aromatogramme.....	28
<b>Tableau V:</b> Résumé des différentes combinaisons employées pour le test de synergie sur aromatogramme.....	29
<b>Tableau VI:</b> Résumé des différentes combinaisons employées pour le test de synergie en CMI .....	29
<b>Tableau VII:</b> Résumé des différentes combinaisons employées pour le test de synergie HEs/ATB sur aromatogramme.....	30
<b>Tableau VIII:</b> Concentrations minimales inhibitrices des HEs de romarin, d'origan et de thym vis-à-vis des 4 souches bactériennes .....	32
<b>Tableau IX:</b> Résumé du test d'aromatogramme des souches testées sur l'HE de thym.....	34
<b>Tableau X:</b> Illustration du test d'aromatogramme des souches testées sur l'HE de romarin ....	36
<b>Tableau XI:</b> Illustration du test d'aromatogramme des souches testées sur l'HE d'origan.....	37
<b>Tableau XII:</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des tests de synergie HEs / HEs vis-à-vis des 4 souches bactériennes .....	42

## Liste des abréviations

**ATB** : Antibiotique

**ATCC**: American Type Culture Collection

**BLSE** :  $\beta$ -lactamases à spectre étendu

**BMR** : Bactérie multi-résistante

**C3GR** : Céphalosporines de 3ème génération

**CMI** : Concentration minimal inhibitrice

**HEs** : Huiles essentielles

**LPS** : Lipopolysaccharide

**MDR** : Multidrug résistantes

**MFP** : Membrane Fusion Protein

**MFS** : Major Facilitator Superfamily

**MH** : Mueller Hinton

**OMP** : Outer Membrane Protein

**OMS** : Organisation mondial de la santé

**RIIP** : Réseau International des Instituts Pasteur

**RND** : Resistance-Nodulation cell Division

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

**SARV** : *S. aureus* résistantes à la vancomycine

**SMR** : Small Multidrug Resistance

## Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

**Introduction** .....1

### Synthèse bibliographique

I. Maladies nosocomiales.....	3
1. Définition .....	3
2. Causes des infections nosocomiales.....	3
3. Microorganismes nosocomiaux .....	3
3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	3
3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
3.3. Staphylocoques .....	4
4. Epidémiologie des infections nosocomiale.....	4
II. Antibiotique et résistance microbienne .....	4
1. Antibiotiques.....	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Familles d'antibiotiques.....	5
1.2.1. Bêta-lactamines .....	5
1.2.1.1. Pénicillines.....	5
1.2.1.2. Céphalosporines.....	6
1.2.1.3. Carbapénèmes.....	6
1.2.2. Macrolides .....	7
1.2.3. Tétracyclines.....	8
1.2.4. Quinolones.....	9
1.2.5. Aminosides .....	9
2. Résistance aux antibiotiques .....	10
2.1. Types de résistances aux antibiotiques .....	10
2.2. Mécanismes biochimiques de résistances aux antibiotiques .....	10
2.2.1. Diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques.....	11

2.2.1.1.	Modification de la perméabilité membranaire.....	11
2.2.1.2.	Systèmes d'efflux bactériens .....	12
2.2.2.	Dégradation et modification enzymatique.....	13
2.2.3.	Altération des cibles cellulaires des antibiotiques.....	14
III.	Stratégies moléculaire de lutte contre la résistance microbienne.....	14
1.	Huiles essentielles .....	14
1.1.	Définitions des huiles essentielles .....	14
1.2.	Composition chimique des huiles essentielles.....	15
1.2.1.	Terpènes et terpénoïdes .....	15
1.2.2.	Composés aromatiques.....	16
1.2.3.	Composés d'origine diverses.....	16
1.3.	Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	17
1.3.1.	Méthodes conventionnelles d'extraction.....	17
1.3.1.1.	Entrainement à la vapeur d'eau .....	17
1.3.1.2.	Extraction mécanique à froid.....	17
1.3.1.3.	Enfleurage.....	17
1.3.1.4.	Extraction par les solvants .....	17
1.3.2.	Méthodes innovantes d'extraction .....	18
1.3.2.1.	Extraction par les gaz supercritiques.....	18
1.3.2.2.	Extraction assistée par micro-ondes .....	18
1.4.	Activité biologique des huiles essentielles .....	18
1.4.1.	Action antifongiques .....	18
1.4.2.	Activité anti-inflammatoire .....	19
1.4.3.	Activité anti-oxydantes.....	19
1.4.4.	Activité antibactérienne.....	19
1.5.	Mécanisme d'action antibactérien des HE .....	20
2.	Effet synergique des huiles avec les antibiotiques.....	20
3.	Synergie entre les huiles essentielles .....	21

### **Matériel et méthodes**

I.	Présentation de l'Institut Pasteur d'Alger.....	23
II.	Matériel.....	25
1.	Matériel biologique .....	25
1.1.	Huiles essentielles.....	25
1.2.	Souches bactériennes .....	25

2.	Matériel non biologique .....	26
II.	Méthodes .....	26
1.	Méthode de micro-dilution en milieu liquide.....	26
2.	Méthode de diffusion de disque .....	27
3.	Test de synergie entre l'huile essentielle de thym, de romarin et d'origan.....	28
3.1.	Aromatogramme .....	28
3.2.	Etude de la concentration minimale inhibitrice .....	29
4.	Etude de l'association «huiles essentielles / antibiotiques» par la méthode des disques	30
<b>Résultats et discussion</b>		
I.	Résultats .....	32
1.	Détermination de la CMI des HEs individuelles.....	32
2.	Aromatogramme .....	32
2.1.	Test des huiles essentielles individuelles.....	33
2.2.	Test de synergie entre les huiles essentielles .....	38
2.3.	Influence de l'espacement des disques sur le test de synergie entre les HEs .....	39
3.	Détermination des valeurs de CMI des tests de synergie HEs / HEs.....	42
4.	Etude de l'association «huiles essentielles / antibiotiques» par la méthode des disques	43
II.	Discussion.....	45
1.	Détermination des CMI des HEs individuelle .....	45
2.	Aromatogramme .....	45
2.1.	Test des huiles essentielles individuelles.....	45
2.2.	Test de synergie entre les huiles essentielles.....	46
2.3.	Influence de l'espacement des disques sur le test de synergie entre les HEs.....	47
3.	Confirmation des résultats de l'association des HEs / HEs sur milieu liquide .....	47
4.	Etude de l'association «huiles essentielles / antibiotiques» par la méthode des disques.	47
<b>Conclusion</b> .....		53
<b>Références bibliographiques</b> .....		55

## Annexes

## Résumé

# **Introduction**



# Introduction

Depuis la découverte de la pénicilline en 1928, l'utilisation des antibiotiques, développés à l'origine pour les soins de santé humaine, s'est étendue à la thérapeutique animale, à l'agriculture et aux applications industrielles. Avec l'émergence continue de nouvelles souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, l'efficacité des antibiotiques a chuté et la résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique mondial. L'identification de molécules antibactériennes innovantes, capables d'agir par de nouveaux modes d'action, est donc devenue indispensable

Les plantes et plus précisément, les huiles essentielles (HEs), sont souvent utilisées en médecine traditionnelle. Ils contiennent une grande variété de métabolites secondaires capables d'inhiber ou de ralentir la croissance des bactéries. Les HE et leurs composants agissent par le biais de mécanismes ciblant différentes voies, en particulier sur la membrane cellulaire et le cytoplasme, et dans certains cas, modifiant complètement la morphologie cellulaire et l'expression des gènes.

De nombreuses études, le plus souvent *in vitro*, se sont intéressées à l'étude de l'association des antibiotiques et des huiles essentielles, ainsi que la synergie entre les composants des huiles essentielles pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires associés aux médicaments. À travers notre travail nous essayerons donc d'étudier les huiles en vue d'appliquer les résultats obtenus en clinique.

De ce fait, ce travail est organisé comme suit :

Dans la première partie, un bref aperçu sera présenté sur la problématique de la résistance aux antibiotiques, suivie de l'étude des huiles essentielles et de l'activité antibactérienne de celle-ci.

La deuxième partie sera consacrée à l'expérimentation, notamment, l'évaluation de l'activité antibactérienne des trois huiles essentielles de thym, romarin et origan, vis-à-vis de quatre souches bactériennes référenciés, et leur combinaison à différentes proportions. Une étude sera également consacrée à l'activité antibactérienne des combinaisons de chaque huile avec des antibiotiques différents.

Les résultats obtenus, suivis de la discussion feront l'objet de la troisième partie. Enfin, une quatrième partie sera dédiée à une conclusion générale ainsi que quelques perspectives.

# **Synthèse bibliographique**

## I. Maladies nosocomiales

### 1. Définition

Le terme « nosocomial » est issu du grec nosos (maladie) et komein (soigner). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une infection nosocomiale ou une infection hospitalière est une infection acquise au niveau d'un établissement de soins par un patient admis pour une raison autre que cette infection.

### 2. Causes des infections nosocomiales

Lorsque l'état infectieux du patient à l'admission est inconnu, l'infection est classiquement considérée comme nosocomiale si elle apparaît après un délai de 48 heures d'hospitalisation. Ce délai est cependant assez artificiel et ne doit pas être appliqué sans réflexion. Ces infections peuvent être directement liées aux soins, par exemple l'infection d'un cathéter ou simplement survenir lors de l'hospitalisation indépendamment de tout acte médical, tels qu'une épidémie de grippe. On distingue plusieurs types d'infections nosocomiales qui relèvent de modes de transmission différents :

- **Les infections d'origine endogène:** le malade s'infecte avec ses propres germes à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière.
- **Les infections d'origine exogène:** les agents infectieux proviennent de l'environnement du patient. Dans ce cas, l'infection provient d'un autre malade, ou du personnel soignant ou encore d'un élément contaminé (système d'air, eau, alimentation,...etc.)

Il a été prouvé, que les personnes dont le système immunitaire est affaibli en raison d'une maladie ou d'un traitement chez les prématurés, les personnes âgées, les polytraumatisés et les grands brûlés, étaient plus vulnérables et présentent donc un risque de contamination plus important.

### 3. Microorganismes nosocomiaux

Beaucoup de germes, sont qualifiés de nosocomiaux étant donné leur redondance dans les surveillances épidémiologiques, parmi eux:

#### 3.1. *Escherichia coli*

Ce sont des Bacilles Gram Négatifs (BGN) aéro-anaérobies facultatifs connus aussi sous le nom de colibacille. Cette bactérie constitue la majorité de la flore intestinale aérobie; peut se retrouver également au niveau des muqueuses de l'homme et de l'animal. C'est le germe le plus isolé dans les infections urinaires. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases sont des bactéries multi-résistantes (BMR) de plus en plus retrouvées en routine.

### 3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Le bacille pyocyanique est une bactérie de l'environnement mais qui peut être commensale du tube digestif. Il est considéré comme un opportuniste majeur particulièrement redoutable chez les immunodéprimés par l'expression de ses facteurs de pathogénicité à savoir les endotoxines, exotoxines et enzymes protéolytiques favorisant sa propagation dans l'organisme. Dans l'environnement hospitalier, on le retrouve dans les milieux humides comme les lavabos, robinets, siphons, nébuliseurs, humidificateurs. Ce bacille peut parfois contaminer les solutions antiseptiques, le matériel hospitalier, et on le retrouve également dans la flore intestinale transitoire de l'homme.

### 3.3. Staphylocoques

L'espèce la plus fréquente est le *Staphylocoque* doré, qui a pour habitat les fosses nasales et les mains d'individus sains. Ce genre est responsable d'infections cutanées et muqueuses, ainsi que de septicémies. Les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, sont régulièrement surveillés et font partie des BMR qui inquiètent de plus en plus la communauté scientifique.

La majorité des souches de *Staphylococcus* résistant à la méticilline (SARM) ont la particularité d'exprimer une toxine particulière, la LPV ou leucocidine de Pantan-Valentine, dite porogène qui induit des pores au niveau des parois cellulaires et qui est capable de tuer certaines cellules du système immunitaire comme les macrophages.

## 4. Epidémiologie des infections nosocomiales

Une étude de Santé Publique France publiée, en 2018, a montré que les micro-organismes les plus impliqués étaient des bactéries de type *Escherichia coli* (23,6%) des germes isolés), *Staphylococcus aureus* (13,8%), *Enterococcus faecalis* (6,5%) et *Pseudomonas aeruginosa* (6,3%). Cependant, actuellement, en Algérie, il n'existe pas de statistiques fiables sur les infections nosocomiales et leurs conséquences.

## II. Antibiotique et résistance microbienne

### 1. Antibiotiques

#### 1.1. Définition

Les antibiotiques (du grec anti: « contre » et bios « vie ») sont des substances naturelles, hémi-synthétiques ou synthétiques qui sont capables d'inhiber la croissance bactérienne ou de tuer les bactéries. Le tout premier d'entre eux fut la pénicilline, découverte en 1928, par Alexander Fleming, médecin, biologiste et pharmacologue britannique.

Pour que l'antibiotique choisi puisse être actif sur la ou les bactéries à l'origine de l'infection, il faut (i) qu'il possède un mode d'action qui lui permette d'agir sur cette bactérie;

(ii) qu'il parvienne là où est la bactérie et à des concentrations suffisamment élevées et (iii) qu'il y reste le temps suffisant pour lui permettre soit de la détruire, c'est ce que l'on appelle la bactéricidie soit d'en arrêter la multiplication, c'est la bactériostase.

### 1.2. Familles d'antibiotiques

On distingue cinq classes principales d'antibiotiques, pour certaines, elles sont divisées en sous classes:

#### 1.2.1. Bêta-lactamines

Les membres de cette classe d'antibiotiques contiennent un cycle à 3 atomes de carbone et 1 atome d'azote qui est très réactif (Figure 01). Ils interfèrent avec les protéines essentielles à la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries et cela tue ou inhibent leur croissance. Les représentants les plus importants de la classe des bêta-lactamines sont les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes.

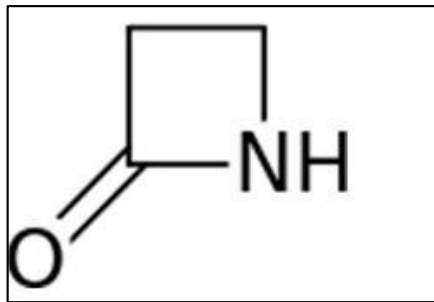


Figure 01: Structure chimique d'un cycle bêta-lactame (Tidwell, 2008)

#### 1.2.1.1. Pénicillines

Le premier antibiotique, la pénicilline a été découverte et rapporté en 1929 par Alexander Fleming. Les pénicillines font partie d'une classe de composés divers, dont la plupart se terminent par le suffixe -cilline. Ce sont des composés bêta-lactames, contenant un noyau de 6-d'acide animopénicillanique (lactame plus thiazolidine) et d'autres chaînes latérales cycliques (Zahner et Maas, 1972) (Figure 02).

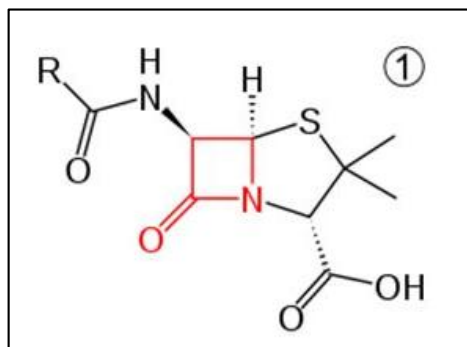


Figure 02: Structure chimique des pénicillines (Holten and Onusko, 2000)

## Synthèse bibliographique

Les membres de la classe des pénicillines incluent la pénicilline G, pénicilline V, oxacilline, méthicilline, nafcilline, ampicilline, amoxicilline, carbénicilline, pipéracilline, mezlocilline et ticarcilline (Boundless, 2016). Malheureusement, la pénicilline G a un spectre étroit, seules les bactéries à Gram positif (streptocoques) et certaines bactéries à Gram négatif telles que *Treponema pallidum*, agent responsable de la syphilis, et les méningocoques y sont sensibles (Talaro et Chess, 2008).

### 1.2.1.2. Céphalosporines

Les membres de ce groupe d'antibiotiques sont similaires à la pénicilline dans leur structure et leur mode d'action. Ils font partie des antibiotiques les plus couramment prescrits et administrés. Le premier membre connu de ce groupe d'antibiotiques a été isolé pour la première fois par Giuseppe Brotzu en 1945 à partir du champignon *Cephalosporium acremonium*. Les céphalosporines contiennent de l'acide 7-amino-céphalosporanique et une chaîne latérale contenant des cycles 3,6-dihydro-2 H-1,3- thiazane (Figure 03).

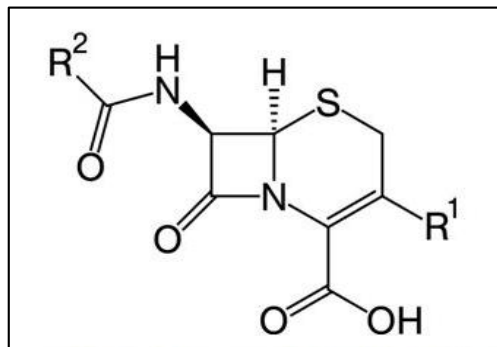


Figure 03: Structure des céphalosporines (Pegler and Healy, 2007).

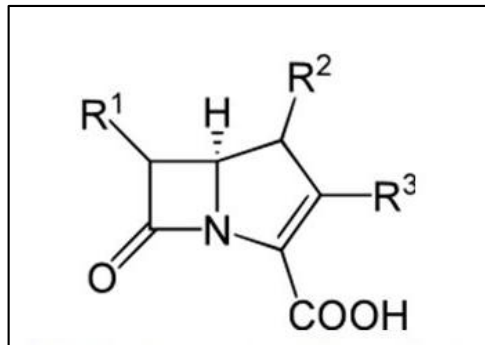
Les céphalosporines sont utilisées dans le traitement des infections bactériennes et des maladies causées par les *staphylocoques* et *streptocoques* producteurs de pénicillinases, *Proteus mirabilis*, certaines souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ...etc. (Pegler et Healy, 2007). Ils sont subdivisés en générations (1<sup>ère</sup>-5<sup>ème</sup>) en fonction de leur organisme cible, mais les versions ultérieures sont de plus en plus efficaces contre les pathogènes Gram négatif.

Les céphalosporines possèdent une variété de chaînes latérales qui leur permettent de s'attacher à différentes protéines de liaison à la pénicilline (PBP), de contourner la barrière hémato-encéphalique, de résister à la dégradation par les souches bactériennes productrices de pénicillinase et de s'ioniser pour faciliter l'entrée dans les cellules bactériennes Gram négatif (Abraham, 1987).

### 1.2.1.3. Carbapénèmes

La thiénamycine serait considérée comme le premier "carbapénème" caractérisée (Figure 04). Un bon nombre d'autres carbapénèmes ont également été identifiés (Kobayashi et al., 1982). Ces antibiotiques occupent une place très importante dans notre lutte contre les

infections bactériennes. Ceci est dû au fait qu'ils sont capables de résister à l'action hydrolytique de l'enzyme bêta-lactamase.



**Figure 04: Structure du carbapénème (Papp-Wallace et al., 2011)**

Parmi les bêta-lactamines connues, les carbapénèmes possèdent le spectre d'activité le plus large et la plus grande puissance contre les bactéries à Gram-positives et Gram négatif. C'est pourquoi on les appelle souvent "antibiotiques de dernier recours" et sont administrés lorsque les patients atteints d'infections deviennent gravement malades ou sont suspectés d'abriter des bactéries résistantes (Torres et al., 2007). Voici quelques exemples de carbapénèmes (Brink et al., 2004) :

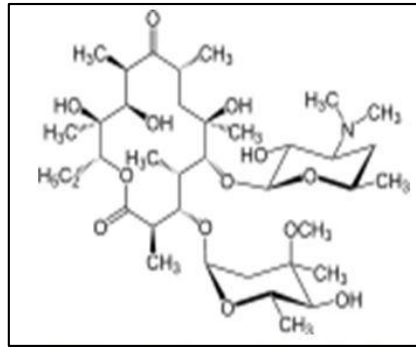
- Imipenem - un large spectre, efficace contre les pathogènes aérobie et anaérobie, généralement administré par voie orale et actif à faible concentrations, avec des effets secondaires allergiques.
- Méropénem - un large spectre, efficace contre les bacilles Gram-négatifs non fermentaires, en particulier contre les infections acquises.
- Ertapénème - un large spectre avec une activité limitée contre les bacilles Gram-négatifs non fermentaires.

### 1.2.2. Macrolides

Le premier antibiotique appartenant à cette classe a été découvert et isolé en 1952 par McGuire comme produit métabolique d'un champignon vivant dans le sol *Saccharopolyspora erythraea*. Ce champignon était autrefois connu sous le nom de *Streptomyces erythraeus*. (Moore, 2015).

Les macrolides sont caractérisés par des cycles lactose macrocycliques à 14, 15 ou 16 chaînons auxquels sont attachés des désoxy-sucres inhabituels, le L-cladinose et D-desosamine (Figure 05).

Leur spectre d'activité antibiotique est plus large que celui des pénicillines, et sont souvent administrés aux patients allergiques à la pénicilline (Moore, 2015).

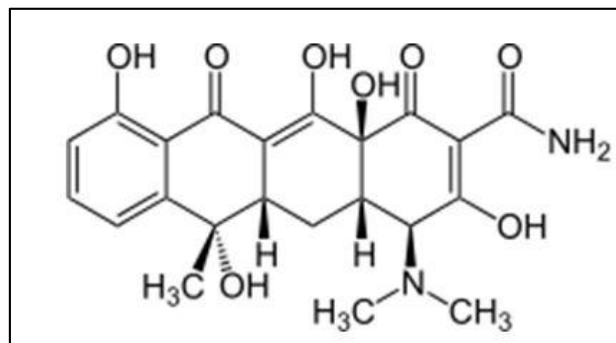


**Figure 05: Structure d'un macrolide (Hamilton-Miller, 1973)**

Les macrolides tuent ou inhibent les microorganismes en inhibant efficacement la synthèse des protéines bactériennes. Ils le font en se liant au ribosome bactérien, et ce en empêchant l'ajout d'acides aminés aux chaînes polypeptidiques pendant la synthèse des protéines. Bien que les macrolides soient généralement à large spectre, certaines espèces bactériennes telles que *Streptococcus pneumoniae* ont une résistance contre ces antibiotiques ; L'érythromycine, l'azithromycine et la clarithromycine en sont des exemples (Hamilton-Miller, 1973).

### 1.2.3. Tétracyclines

La tétracycline a été découverte en 1945 à partir d'une bactérie du sol du genre *Streptomyces* par Benjamin Duggar (Sanchez et al., 2004). Le premier membre de cette classe était la chlorotétracycline (aureomycin). Les membres de Cette classe ont quatre cycles hydrocarbonés (figure 06) et sont connus sous le suffixe "-cycline".



**Figure 06: Structure de la tétracycline (Chopra and Roberts, 2001)**

Historiquement, les membres de cette classe d'antibiotiques sont regroupés en différentes générations en fonction de leur méthode de synthèse. Ceux obtenus par biosynthèse sont dits de première génération, les membres comprennent ; la tétracycline, la chlortétracycline, l'oxytétracycline et la déméclocycline. Les membres tels que doxycycline, lymecycline, meclocycline, la méthacycline, la minocycline et la rolitétracycline sont considérés comme étant de deuxième génération car ils sont dérivés de la semi-synthèse. Ceux obtenus par

synthèse totale, comme la tigécycline, sont considérés comme étant de troisième génération (Fuoco, 2012).

Leur cible d'activité antibactérienne chez les bactéries est le ribosome. Ils perturbent l'addition des acides aminés aux chaînes polypeptidiques pendant la synthèse des protéines dans cet organite bactérien (Medical News Today).

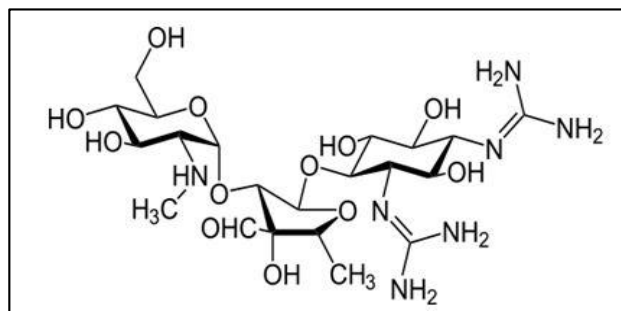
### 1.2.4. Quinolones

Cette classe d'antibiotiques a été découverte pour la première fois sous le nom d'acide nalidixique par des scientifiques impliqués dans la recherche d'un antipaludéen. Leur structure est généralement constituée de deux cycles mais les générations récentes de quinolones possèdent un anneau supplémentaire qui leur permet d'étendre leur spectre d'action. Depuis sa découverte au début des années 1960, plusieurs modifications ont été apportées à sa structure d'origine, ce qui a conduit au développement et à la synthèse de nombreux dérivés dont la puissance antibiotique a été testée.

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, la ciprofloxacine et la lévofloxacine. 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. Bien que de nombreux progrès aient été réalisés en termes d'études *in vitro* et de pharmacodynamique, la connaissance de la dynamique de la toxicité de certains antibiotiques de cette classe est encore peu concluante. (Domagala, 1994)

### 1.2.5. Aminosides

Les aminoglycosides sont des composés généralement constitués de 3-amino-sucres reliés par des liaisons glycosidiques (Figure 07). Ils sont produits par des actinomycètes.



**Figure 07: Structure d'un aminoglycoside (Mingeot-Leclercq et al., 1999)**

Les aminoglycosides ont un large spectre d'activité antibactérienne, Ils sont capables d'inhiber la synthèse des protéines dans les bactéries en se liant à l'une des sous-unités ribosomales et sont efficaces contre les bactéries aérobies à Gram négatif et certaines bactéries à Gram positif (Peterson, 2008). Le plus ancien aminoglycoside connu, est la streptomycine, qui a été utilisée à plusieurs reprises dans le traitement de la peste bubonique, la tularémie et la tuberculose (Talaro et Chess, 2008).

En dépit de son efficacité contre un large éventail d'infections, la streptomycine s'est avérée être hautement toxique. Cette caractéristique malheureuse du médicament a nécessité la recherche de nouveaux membres de la famille des aminoglycosides qui seraient encore efficaces contre les bactéries mais moins toxiques pour l'homme. Cette recherche a été fructueuse avec la découverte d'antibiotiques tels que la gentamicine, la néomycine, la tobramycine et l'amikacine. La gentamicine est moins toxique et est largement utilisée pour les infections causées par des bâtonnets à Gram négatif (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shigella* et *Salmonella*). La tobramycine, en particulier, est utilisée pour traiter les infections à *Pseudomonas* chez les patients atteints de mucoviscidose (Gilbert, 2000).

### 2. Résistance aux antibiotiques

Le mauvais usage des antibiotiques et leur utilisation accrue ont eu pour conséquence de faire apparaître certaines formes de résistances des souches microbiennes, en effet les bactéries pathogènes, grâce à leur flexibilité et plasticité génétique, sont capables de mettre en place un programme de résistance spécifique contre un antibiotique particulier, et certaines souches arrivent même à rétablir une multi résistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques à la fois donnant lieu à ce qu'on appelle les bactéries multi résistantes aux antibiotiques (multidrug resistantes ou MDR). Parmi les bactéries pathogènes qui sont devenues de vrais problèmes pour la santé humaine, on trouve des espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae*, des *Pseudomonadaceae* et des bactéries du genre *Acinetobacter* qui sont quasiment résistantes à tous les antibiotiques prescrits.

#### 2.1. Types de résistances aux antibiotiques

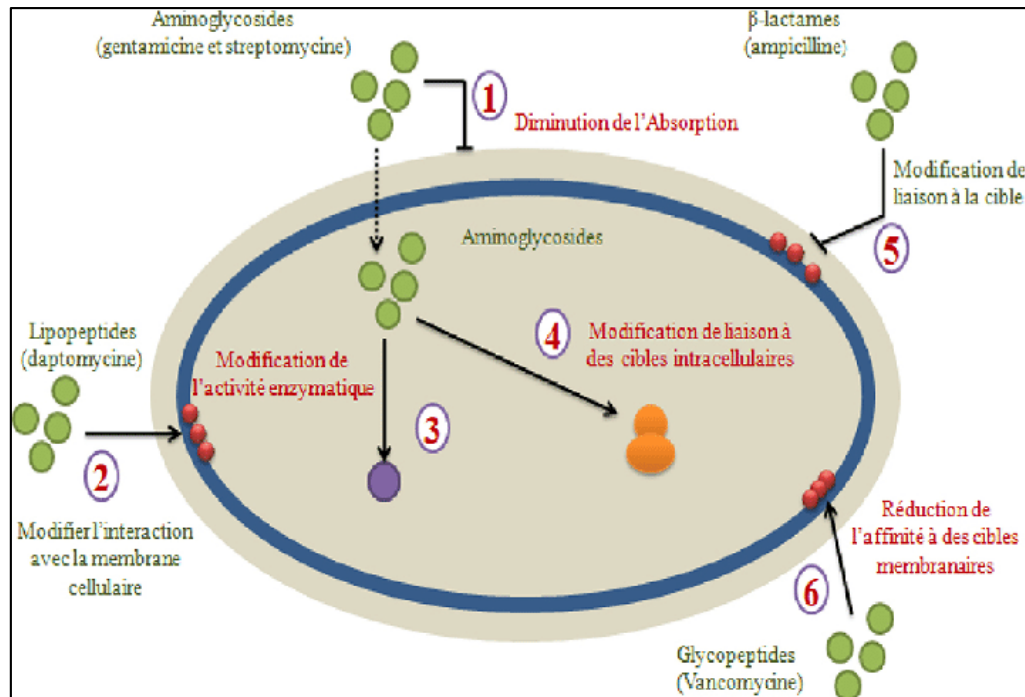
La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être d'origine naturelle ou acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique, où les bactéries sont naturellement résistantes à des antibiotiques, leur patrimoine génétique les rend insensibles à certaines familles d'antibiotiques et elles transmettent même ces résistances à leur descendance. Quant à la seconde, elle est développée en fonction des conditions métaboliques. En effet quand les bactéries sont soumises à des traitements antibiotiques, elles finissent par développer des résistances contre des antibiotiques auxquelles elles étaient auparavant sensibles: on parle de "résistances acquises". Ces résistances sont dues, soit à la mutation du patrimoine génétique de la bactérie, soit à l'acquisition par la bactérie, d'un "plasmide", matériel porteur de gènes de résistance provenant d'une autre bactérie. Ce dernier mode de résistance acquise est le plus fréquent, il représente plus de 80% des résistances acquises.

Grâce à ce processus de résistance, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent.

#### 2.2. Mécanismes biochimiques de résistances aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes (Figure

08). 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*.



**Figure 08: Mécanisme de résistance aux antibiotiques**

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances.

### 2.2.1. Diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques

Les bactéries sont capables de se protéger de l'action des antibiotiques en réduisant la concentration intracellulaire de ces derniers. Pour cela, leur absorption dans les cellules peut être limitée par une modification de la perméabilité membranaire. Pour les antibiotiques ayant pénétré dans le milieu intracellulaire les pompes d'efflux membranaires, assurent leur exportation active hors des cellules.

#### 2.2.1.1. Modification de la perméabilité membranaire

Au niveau de la paroi bactérienne, le peptidoglycane, est entouré par deux membranes. La membrane interne et la membrane externe, qui elle présente une structure asymétrique, avec une face interne constituée de phospholipides et une face externe présentant un lipopolysaccharide (LPS) (Cronan et *al.*, 1987). Ce LPS représente 75% de la surface totale de la membrane externe et est impératif au niveau des interactions spécifiques avec les protéines membranaires, telles que les porines. Le LPS est constitué d'un lipide A, qui assure son ancrage à la membrane externe, un oligosaccharide central et l'antigène O. Le LPS rend la

membrane externe des bactéries Gram négatives imperméable à la plupart des macromolécules hydrophobes, et c'est pour cela d'ailleurs qu'il est responsable de la résistance intrinsèque des entérobactéries et de *P. aeruginosa* à certains antibiotiques hydrophobes, comme les macrolides (Normak et Normak, 2002). Sa forte charge négative néanmoins facilite le passage des antibiotiques cationiques. Des modifications chimiques, visant à diminuer la charge négative nette du LPS, ont ainsi été observées dans certains cas de résistances. Aussi le transfert de groupements polaires, comme la phosphoéthanolamine ou le 4-amino-4-désoxyL-arabinose sur le lipide A, confère à certaines souches de *Salmonella enterica* une résistance accrue à la polymyxine B (Helander et al., 1994).

Certains antibiotiques, comme les  $\beta$ -lactamines, le chloramphénicol et les fluoroquinolones, traversent la membrane externe des bactéries Gram à travers les porines (Nikaido, 2003). En exerçant des changements au niveau de ces canaux protéiques, l'efficacité des antibiotiques est donc limitée. La résistance de certaines souches d'*Enterobacter aerogenes* à l'imipénème ( $\beta$ -lactame de 3<sup>ème</sup> génération) est ainsi assurée par la diminution de l'expression des gènes codant pour les porines (Chow et Shlaes, 1991).

Aussi, la modification de la taille ou la sélectivité des porines permet d'aboutir à une exclusion des antibiotiques (Nikaido et Rosenberg, 1981).

### 2.2.1.2. Systèmes d'efflux bactériens

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par l'exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire.

Les pompes « drogue-spécifiques » sont des transporteurs qui confèrent une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques, exemple des pompes Tet, qui effluent exclusivement les tétracyclines, ou les pompes Mef, spécifiques aux macrolides (Markham et Neyfakh, 2001). Par contre, la plupart de ces transporteurs ont la capacité de prendre en charge des composés de structures très différente et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MDR) des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2004). Les gènes, codant pour les pompes « drogue-spécifiques », sont généralement situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui codent pour les pompes MDR sont chromosomiques (Butaye et al., 2003).

Chez les bactéries Gram négatives, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites constitués d'une pompe transmembranaire, d'une protéine périplasmique de jonction (MFP: Membrane Fusion Protein) et d'une porine, enchâssée dans la membrane externe (OMP: Outer Membrane Protein).

La dissipation d'un gradient de protons (familles: Major Facilitator Superfamily (MFS), Small MultidrugResistance (SMR) et Resistance-Nodulation cell Division (RND)) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore l'hydrolyse de l'ATP (famille ABC), font la source d'énergie nécessaire aux pompes d'efflux pour fonctionner. La famille des MFS utilise des systèmes de transport de type uniport, symport et antiport. Les pompes MFS effluent les antibiotiques, forment des systèmes antiport antibiotique/H<sup>+</sup>. Les transporteurs de la famille

SMR eux sont de petite taille (Paulsen et *al.*, 1996) et sont constitués d'environ 110 acides aminés qui utilisent la force protomotrice a fin d'effluer les colorants, les antibiotiques et les cations. La famille des RND représente la principale cause de résistance et de multi-résistance par efflux chez les bactéries Gram négatives leurs pompes sont capable de prendre en charge différents antibiotiques mais aussi des métaux lourds, des colorants, des détergents et des solvants *via* un mécanisme antiport substrat/H<sup>+</sup>.

Les transporteurs ABC, eux sont des transporteurs complexes multi-protéiques possédant deux sous-unités cytoplasmiques ayant une activité ATPasique, nécessaire au transport. Qui cependant sont rares chez les bactéries (Kumar et Schweizer, 2005). La pompe LmrA de *Lactococcus lactis* est donc très étudiée car cette bactérie non pathogène, pourrait transférer ce gène de résistance à d'autres bactéries (Bolhuis et *al.*, 1996).

### 2.2.2. Dégradation et modification enzymatique

Les bactéries ont la capacité de synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier les antibiotiques. Les réactions enzymatiques, responsable de l'inactivation des antibiotiques, peuvent s'effectuer par hydrolyse, transfert de groupements chimiques ou oxydo-réduction (Wright, 2005).

Des enzymes du métabolisme bactérien ont évolué a fin de cliver les liaisons chimiques des antibiotiques sensible à l'hydrolyse, entraînant ainsi l'apparition de souches résistantes. 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 zinc Zn<sup>2+</sup>. Les BLSE sont des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, capable de provoquer simultanément la résistance aux  $\beta$ -lactamines de première, deuxième et troisième générations, ainsi qu'à l'aztréoname (Masterton et *al.*, 2003).

D'autres enzymes, comme certaines estérases, participent à l'inactivation des antibiotiques. Les macrolides sont cyclisés grâce à une liaison ester et sont rendus inactifs par les macrolides estérases, qui clivent cette liaison fonctionnelle (Wright, 2005). Les gènes, qui codent pour la synthèse de ces enzymes sont situés sur des éléments mobiles du génome, impliquant ainsi la diffusion de ce mode de résistance (Biskri et Mazel, 2003).

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. Les enzymes impliquées dans ce type de mécanisme nécessitent des co-substrats, tels que l'ATP ou l'acétyl-CoA, elles forment le groupe le plus vaste des enzymes de résistance. Ce n'est qu'après leur pénétration dans la bactérie que ces derniers sont inactivés, en effet les aminoglycosides acétyltransférases (AAC) ajoutent un groupement acétyle sur les fonctions amine ou hydroxyle des aminoglycosides. Cette modification diminue l'affinité de ces derniers pour leur cible, à savoir la sous-unité 30S des ribosomes.

De nouvelles voies d'inactivation des antibiotiques s'ajoutent aux modes de résistance par hydrolyse et par modification enzymatique qui sont actuellement les plus répandus, tel que l'activité d'enzymes oxydo-réductrices décelée à partir des mécanismes de résistances de certaines bactéries (Guengerich, 2001).

### 2.2.3. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques

L'altération et la modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance (Lambert, 2005). Ce phénomène est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation.

Les changements survenus inhibent l'action des antibiotiques tout en préservant la fonction cellulaire de la cible. L'acquisition d'une transpeptidase modifiée confère la résistance à la méticilline et aux autres  $\beta$ -lactamines à de nombreuses bactéries, incluant les SARMs (Enright et al., 2002). Ainsi, pour que la synthèse du peptidoglycane se déroule correctement, la composition et la structure de ce dernier doivent être légèrement modifiées (Lambert, 2005).

Les enzymes impliquées dans la réplication, comme l'ADN gyrase, et la transcription, comme l'ARN polymérase, sont respectivement prises pour cibles par les fluoroquinolones et la rifampicine. Des mutations, au niveau des gènes codant pour ces enzymes, ont été mises en évidence chez *Helicobacter pylori* et *Mycobacterium tuberculosis* (Willmott et Maxwell, 1993; Heep et al., 2000). L'épaississement de la paroi, observé chez des souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (SARV), serait responsable de l'inactivation de cet antibiotique. En effet, l'augmentation du nombre de cibles piègerait les molécules de vancomycine, les rendant ainsi inefficaces contre ce type de bactéries (Cui et al., 2003).

## III. Stratégies moléculaire de lutte contre la résistance microbienne

Face au problème de résistances aux antibiotiques, beaucoup d'études ont été réalisées pour développer des molécules alternatives efficaces contre les maladies infectieuses. Les plantes médicinales et aromatiques constituent une source importante de molécules bioactives qui pourraient être exploitées dans la thérapie des maladies infectieuses.

### 1. Huiles essentielles

#### 1.1. Définitions des huiles essentielles

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne (01-2008: 2098), une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ses composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante et au fait qu'elle soit inflammable.

### 1.2. Composition chimique des huiles essentielles

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.

#### 1.2.1. Terpènes et terpénoïdes

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (Figure 09). Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base: isoprène; hémiterpène (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20).

Les Monoterpènes représentent le groupe le plus important. Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurelles: les monoterpènes acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90 % d'HE.

Dans cette catégorie de composés, il existe de nombreuses molécules fonctionnalisées, à savoir, par exemple:

- Alcools: acyclique (géraniol, citronellol), monocycliques (menthol), bicycliques (bornéol).
- Aldéhydes: le plus souvent acycliques.
- Cétones: acycliques (tagétone), monocyclique (menthone, isomenthone, carvone, pulégone), ou bicycliques (camphre, fenchone).
- Esters: acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle), bicycliques (acétate d'isobomyle).
- Ethers: 1,8-cinéole eucalyptol mais aussi les éthers cycliques tétrahydrofuraniques ou di- et tétrahydropyraniques qui pour certains jouent un rôle majeur dans l'arôme des fruits (oxyde de linalol ou de rose).

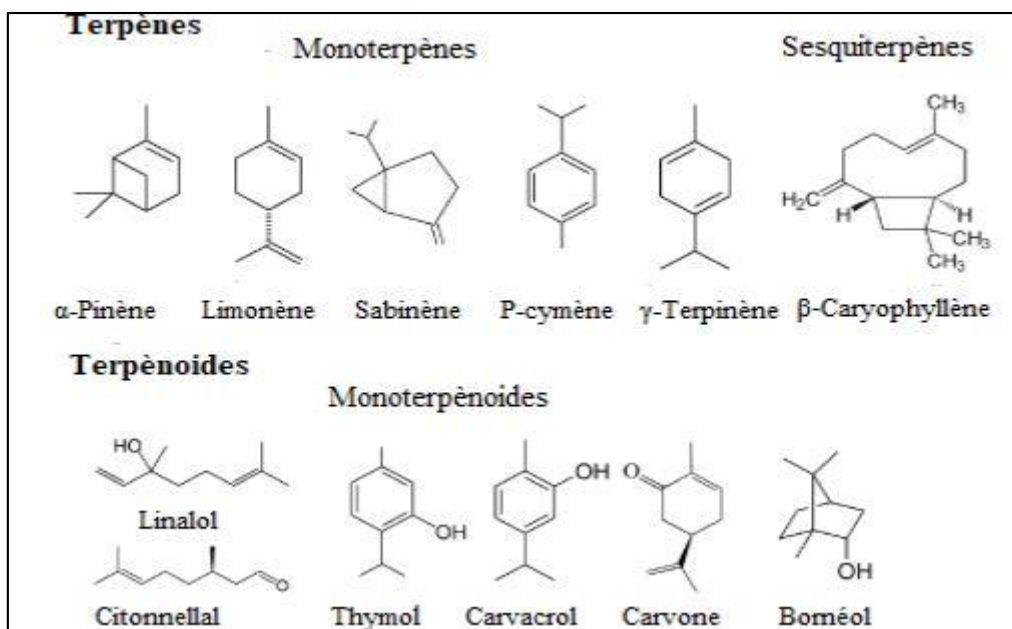


Figure 09: Structures chimiques des terpènes et terpénoïdes (Hyldgaard et al., 2012)

### 1.2.2. Composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les HE. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol (Figure 10). Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des HE. On peut citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle.

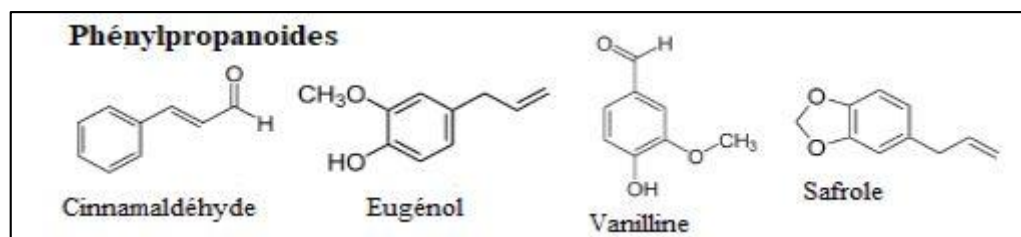


Figure 10: Structures chimiques des phénylpropanoïdes (Hyldgaard et al., 2012)

### 1.2.3. Composés d'origine diverses

En générale, ils sont de faibles poids moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation, sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions par exemple : l'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille. (Figure 11)

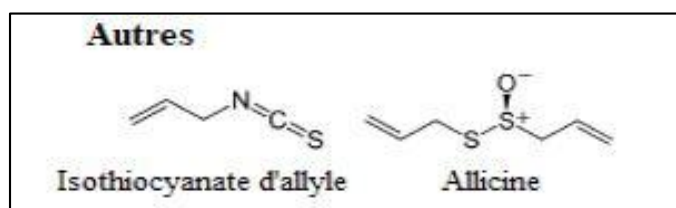


Figure 11: Structures chimiques de certains composants (Hyldgaard et al., 2012)

### 1.3. Procédés d'extraction des huiles essentielles

#### 1.3.1. Méthodes conventionnelles d'extraction

##### 1.3.1.1. Entraînement à la vapeur d'eau

Il existe trois méthodes de distillation qui reposent sur le principe d'entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau: l'hydro-distillation, la distillation à la vapeur saturée et l'hydro-diffusion. La différence entre ces trois modes réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal.

- Hydro-distillation simple : elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité.
- Distillation à vapeur saturée: Dans ce procédé, le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La vapeur fait éclater les cellules à essence. Les molécules aromatiques sont captées par la vapeur qui se charge de molécules volatiles. A la sortie de la cuve, la vapeur s'est combinée aux HE. La condensation et le refroidissement s'effectuent dans un serpent.
- Hydro-diffusion: elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale.

##### 1.3.1.2. Extraction mécanique à froid

Ce mode d'obtention particulier est réalisé uniquement pour les fruits de la famille botanique des *Rutaceae* (citron, orange, bergamote, mandarine,...etc.). C'est une méthode simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion les poches oléifères localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour en recueillir le contenu. L'huile essentielle est séparée du jus de fruit par un procédé mécanique de décantation à froid. En effet, contrairement aux HE uniquement constituées de molécules volatiles, les essences, quant à elles, renferment des composés non volatiles comme des flavonoïdes ou encore des stéroïdes.

##### 1.3.1.3. Enfleurage

Cette technique consiste à mettre les fleurs en contact avec un corps gras inodore. Le mélange est ensuite épuisé par un solvant organique, puis ce dernier est évaporé. Lorsque les fleurs sont peu fragiles à la chaleur (par exemple, les fleurs d'oranger, d'acacia, de mimosa), un enfleurage à chaud est réalisé vers 60-70°C, par leur infusion dans des graisses fondues ou des huiles.

##### 1.3.1.4. Extraction par les solvants

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne

la concrète: mélange odorant de consistance pâteuse. L'extraction de la concrète avec l'alcool conduit à l'absolue.

### 1.3.2. Méthodes innovantes d'extraction

#### 1.3.2.1. Extraction par les gaz supercritiques

Est un procédé d'extraction d'un soluté d'une substance en utilisant un fluide supercritique comme solvant d'extraction. Le CO<sub>2</sub> est le fluide le plus utilisé, il fonctionne en circuit fermé. Ce procédé comporte des organes de mise en pression (pompes) et en températures (échangeurs) afin d'amener le CO<sub>2</sub> au-dessus de son point critique. Le produit à traiter est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO<sub>2</sub> supercritiques. Le fluide se charge en composé extrait, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. Ce dernier est recueilli dans un séparateur.

#### 1.3.2.2. Extraction assistée par micro-ondes

Cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Les parties du végétal les plus riches en eau, comme les vacuoles, absorbent les ondes puis les convertissent en chaleur, engendrant une augmentation rapide et soudaine de la température au sein de ces structures. Ces dernières éclatent sous la pression régnant dans l'extracteur, libérant ainsi les molécules olfactives. Puis les vapeurs d'eau entraînent l'HE. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et il permet également le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal.

### 1.4. Activité biologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont reconnues depuis longtemps comme possédant plusieurs activités biologiques différentes. Plusieurs de ces métabolites végétaux secondaires présentent des effets antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires, etc., bien connue depuis l'Antiquité.

#### 1.4.1. Action antifongiques

L'étude de l'effet fongicide et fongistatique des huiles essentielles vis-à-vis de champignons pathogènes a fait l'objet de plusieurs travaux (Rasooli et Abyaneh, 2004; Teixeira Duarte et al., 2005). L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la cellule (Cox et al., 2000). En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des cellules (Giordani et Kaloustian, 2006). Arras et Usai (2001) ont rapporté l'effet fongitoxique du carvacrol, composé majoritaire de *Thymus capitatus* sur le champignon *Penicillium digitatum*.

### 1.4.2. Activité anti-inflammatoire

Les aldéhydes contenus dans un grand nombre d'HEs ont la propriété de combattre les inflammations. Un cas exemplaire est celui des huiles essentielles de clou de girofle qui calme les douleurs dentaires (Zahalika, 2010).

### 1.4.3. Activité anti-oxydantes

Les cellules et tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant.

Les antioxydants sont des substances capables de protéger l'organisme contre les effets de stress oxydatif. Les huiles essentielles peuvent être la source d'antioxydants naturels, et présente donc d'excellentes propriétés anti-oxydantes. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol font partie des molécules des HE présentant les plus fortes activités anti oxydantes ainsi que d'autres composés qui contribuent à cette activité tels que les mono terpènes, alcools cétones, aldéhydes, hydrocarbures et éthers (Gabriel et *al.*, 2013).

### 1.4.4. Activité antibactérienne

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1995). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004).

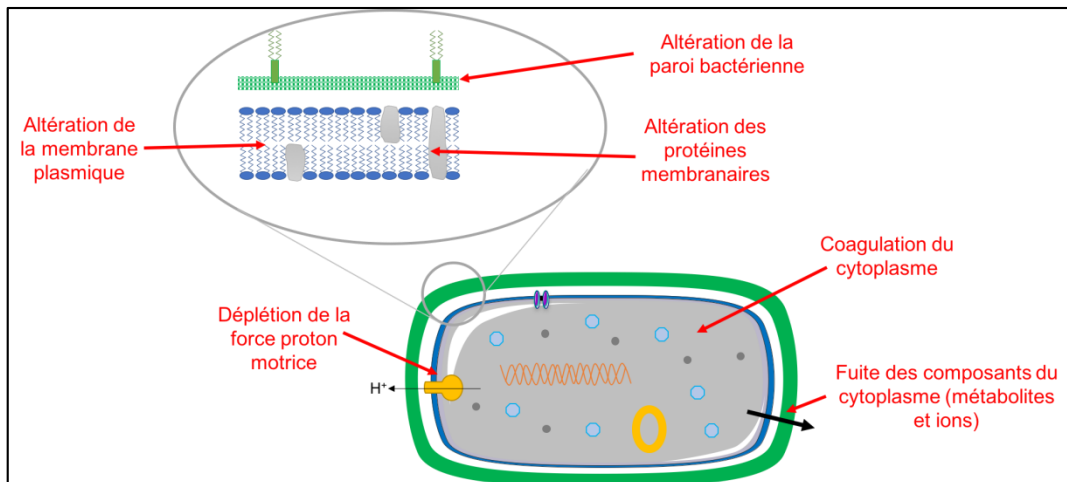
Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba, 2003; Oussou, 2009; Avlessi, 2012). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Oussou et *al.*, 2009). Leur activité antibactérienne dépend principalement de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Sipailiene et *al.*, 2006; Oussou, 2009).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Oussou en 2009 a étudié les propriétés antibactériennes de quelques huiles essentielles issues de la pharmacopée traditionnelle Ivoirienne, *Ocimum gratissimum*, *O. cimumcanum*, *Xylopi aethiopica*, *Citrus aurantifolia*, *Lippia multiflora*, et *Monanthon taxia capea*. Les huiles essentielles de ces plantes se sont révélées efficaces contre les bactéries multi-résistantes notamment les *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3GR), *E. coli* productrice de bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) et *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM).

### 1.5. Mécanisme d'action antibactérien des HE

Plus récemment, certaines études ont commencé à décortiquer spécifiquement l'action des HE et leurs composants majoritaires sur les cibles bactériennes (Figure 12). Plusieurs mécanismes sont mis en jeu:

- > La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema *et al.*, 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Carson *et al.*, 2002; Ultee *et al.*, 2002). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.
- > Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- > Destruction du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie.



**Figure 12: Sites d'actions des huiles essentielles sur la cellule bactérienne**

## 2. 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 ont de la peine à reconnaître. 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* (Gallucci *et al.*, 2006) et le carvacrol était synergiques avec la pénicilline contre *E. coli* (Palaniappan and Holley, 2010). Il a également été démontré que l'huile d'origan (*O. vulgare*) en combinaison avec la doxycycline, le florfenicol ou la sarafloxacin avait des effets synergiques contre *E. coli* productrice de BLSE isolée de poulets (FIC 0.375-0.5) (Si *et al.*, 2008).

### 3. Synergie entre les huiles essentielles

La synergie des huiles essentielles est l'association de ces derniers, dans le but d'accentuer leurs effets individuels. Dans une combinaison on peut avoir trois résultats différents, synergiques, additifs ou antagonistes. La synergie se produit lorsqu'un mélange de deux composés antibactériens a une activité antibactérienne supérieure à la somme des composants individuels. Un effet additif est obtenu lorsque la combinaison d'antimicrobiens a un effet combiné égal à la somme des composés individuels. L'antagonisme se produit lorsqu'un mélange de composés antimicrobiens a un effet combiné moindre que lorsqu'il est appliqué séparément (Davidson et Parish, 1989; Burt, 2004 ).

Diverses activités antibactériens synergiques ont été rapportées pour des constituants ou des fractions d'huiles essentielles lorsqu'elles sont testées dans des combinaisons binaires ou ternaires (Delaquis et *al.*, 2002; Pei et *al.*, 2009; García-García et *al.*, 2011; Nguefack et *al.*, 2012).

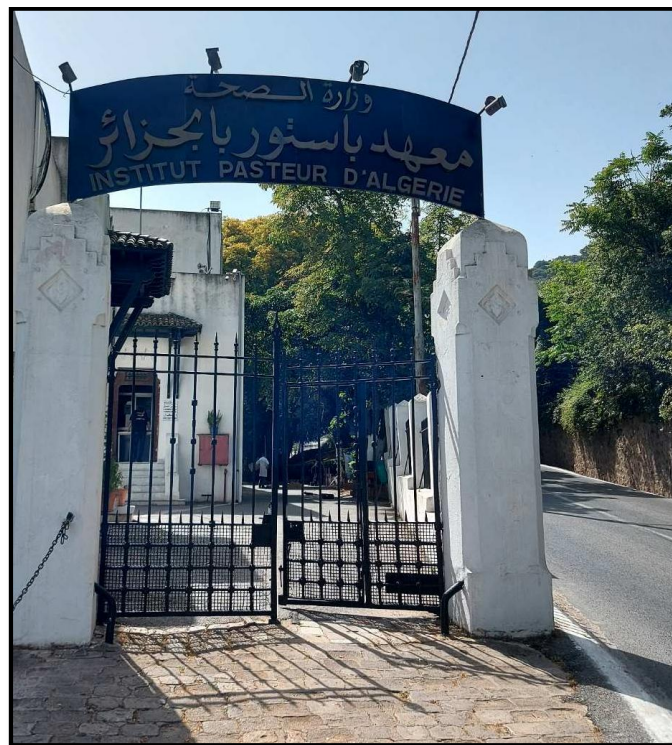
Par exemple, García-García et *al.* (2011) ont trouvé que la combinaison binaire la plus synergique contre *L. innocua* était le carvacrol et le thymol, et que la combinaison ternaire la plus active était le carvacrol, le thymol et l'eugénol.

Parmi les constituants individuels des huiles essentielles, une synergie a été observée pour le carvacrol et le *p*-cymène sur *B. cereus* (Ultee et *al.*, 2002; Rattanachaiakunsopon et Phumkhachorn, 2010 ). Il semblerait que le *p*-cymène gonfle les membranes cellulaires bactériennes, permettant probablement une entrée plus facile du carvacrol dans la membrane cellulaire où il exerce son action (Ultee et *al.*, 2002).

# **Matériel et Méthodes**

### I. Présentation de l'Institut Pasteur d'Alger

L'Institut Pasteur d'Algérie est une fondation française faisant en outre partie du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), dont la coordination est assurée par l'Institut Pasteur de Paris. Leur objectif est d'élaborer divers programmes de coopération scientifique, notamment, pour la protection de la santé publique, pour la surveillance et le contrôle épidémiologique des maladies infectieuses et parasitaires (Sida, grippe, tuberculose, paludisme, choléra, etc.) ainsi qu'à la participation aux grands programmes internationaux ou régionaux de recherche (recherches cliniques, enquêtes épidémiologiques, recherches fondamentales, etc.), mais aussi à la formation du personnel scientifique (biologistes, chercheurs et techniciens) dans le cadre de leur activité de santé publique et de recherche.

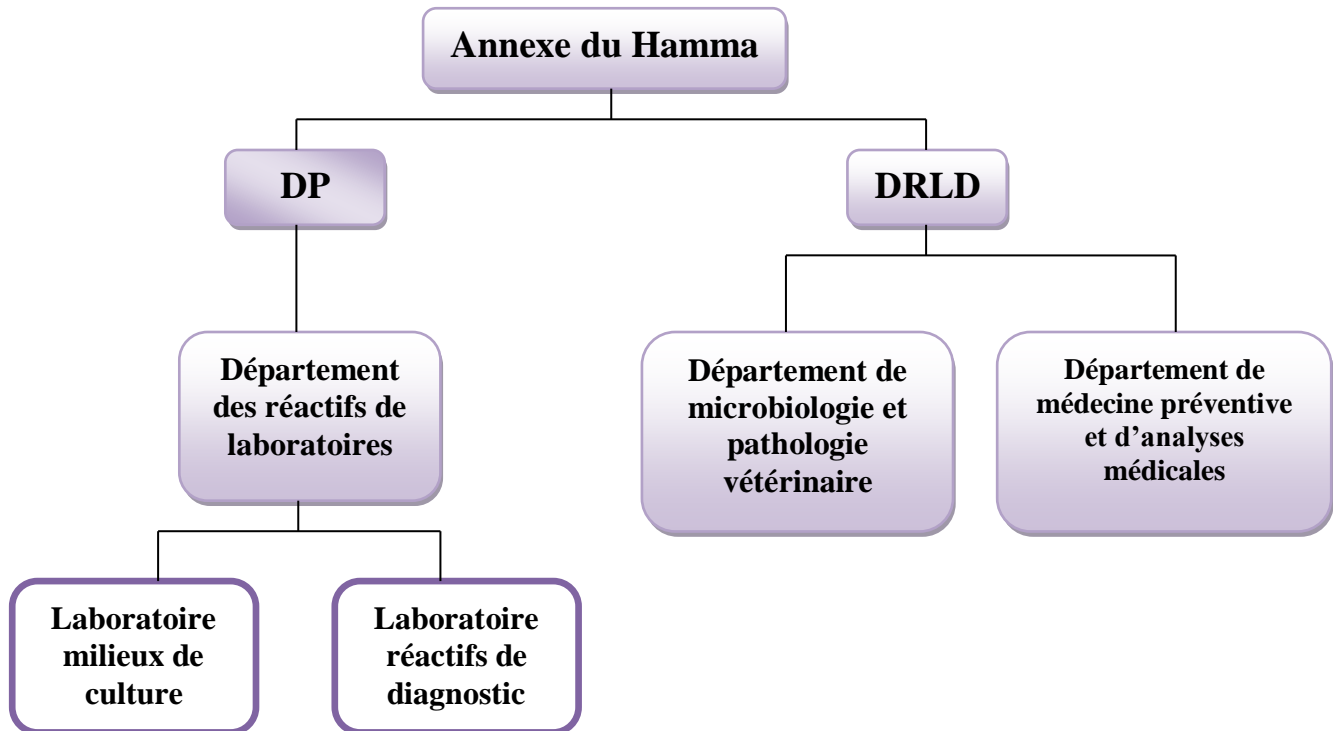


**Figure 13: Institut Pasteur, annexe el Hamma.**

L'institut pasteur de Paris fut créé en 1887 *via* une souscription publique internationale, nommé en référence à son fondateur et premier directeur Louis Pasteur, créateur du premier vaccin contre la rage.

L'Institut Pasteur d'Alger, lui fut créé en 1894, à l'initiative des docteurs Trolard Jean Baptiste Paulin et Soulie H., qui initialement avait pour mission d'assurer le traitement antirabique des personnes mordues. Afin de répondre à ses différentes missions et objectifs, l'institut Pasteur d'Algérie dispose de 5 sites sur Alger (Siège social de l'IPA à Dely Ibrahim, l'annexe de Kouba, l'annexe de Sidi Fredj, l'annexe El Hamma) ainsi que 3 sites régionaux (Site d'Oran, site de Constantine, site de Msila)

Notre projet de fin d'études, fut réalisé au niveau de l'annexe El Hamma, qui a été construite en 1910, il s'agit du premier site historique. Elle est située juste en face du jardin d'essais et s'étend à plus de deux hectares. L'annexe est constituée de deux directions, la direction des laboratoires de recherches et développements (DRLD) et la direction de la production (DP) où nous avons fait notre pratique et ce depuis le 20 mars jusqu'au 03 juillet 2022.



- **Laboratoires des milieux de culture**

Les laboratoires des milieux de cultures sont des laboratoires dont la mission principale se résume à la production, le conditionnement, le contrôle des milieux de culture hydratés (gélose et bouillons) et déshydratés (forme sèche) nécessaire pour l'étude des micro-organismes et leur identification, les recherches pharmaceutiques, le contrôle des eaux ainsi que le domaine cosmétique. Ces laboratoires se charge de la préparation de deux types de milieux de cultures qui sont les bouillons et les géloses, qui seront distribués par la suite aux hôpitaux et aux laboratoires d'analyses.

**II. Matériel**

**1. Matériel biologique**

**1.1. Huiles essentielles**

Trois huiles essentielles issues du commerce ont été testées durant notre étude (Figure 14). Il s'agit de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* et *Rosmarinus officinalis*. Un mélange de 3 marques différentes a été réalisé pour un effet plus homogène (Maison Nectar), (Zeitipharm), (Purennaissance).



**Figure 14: Huiles essentielles utilisées**

**Tableau I: Généralités et propriétés des trois huiles essentielles utilisées**

Nom commun	Nom scientifique	Famille	Propriétés thérapeutiques
<b>Thym</b>	<i>Thymus Vulgaris</i>	<i>Lamiaceae</i>	antiseptique intestinale; pulmonaire, expectorant, diurétique, stomachique, vermifuge, antispasmodique.
<b>Romarin</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Lamiaceae</i>	Anti-spasmodique, anti-inflammatoire, antibactériennes, antioxydant, anti-métastatique.
<b>Origan</b>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Lamiaceae</i>	Antiseptique, digestif, expectorant, anti-inflammatoire, antioxydant.

**1.2. Souches bactériennes**

Les tests antibactériens ont été effectués en utilisant des souches de références. La souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline MU50a été fournie par Mr TITOUCHE Y., enseignant chercheur à la FSBSA, UMMTO. Les autres souches de références ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Alger: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922.

### 2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique ainsi que les milieux de culture et les antibiotiques utilisés dans cette étude sont cités en annexes.

## II. Méthodes

Pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, deux méthodes différentes ont été utilisées: **(a)** la méthode de micro-dilution en milieu liquide pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et **(b)** la méthode de diffusion des disques.

### 1. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

Habituellement, la concentration minimale d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne est la concentration d'un antibiotique qui empêche la croissance d'une ou plusieurs bactéries.

Pour nos travaux sur HE, nous nous sommes inspirés de cette technique. Celle-ci 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.

Dans la première partie de cette expérience, nous avons mis 5 mL de bouillon nutritif dans les tubes stériles puis à l'aide d'une pipette nous avons déposé des concentrations d'huile allant de 50  $\mu$ L jusqu'à 250  $\mu$ L. 01 mL de la suspension bactérienne est rajouter dans les tubes contenant le mélange. Dans la seconde partie, deux gouttes d'huiles (correspondant à 100  $\mu$ L) sont placées dans un tube contenant 10 mL de bouillon Mueller Hinton, cette solution est divisée en deux. On obtient alors: la première qui représente la première solution contenant 50  $\mu$ L d'HEs et 5 mL de bouillon MH et une seconde dite solution mère, qui va subir des dilutions en cascade de manière à obtenir une gamme de concentration allant de 1/2 jusqu'à 1/16. La concentration de l'huile est ajustée à la concentration correcte d'intérêt en mélangeant l'antibactérien d'origine avec le milieu (Tableau II).

**Tableau II: Résumé des différentes dilutions employées**

Dilution	HE (mL)	Bouillon MH (mL)	Volume final (mL)	HE ( $\mu$ L) concentration final
<b>01</b>	05	0	05	10
<b>1/2</b>	2.5	2.5	05	05
<b>1/4</b>	1.25	3.75	05	2.5
<b>1/8</b>	0.625	4.375	05	1.25
<b>1/16</b>	0.3125	4.6875	05	0.625

Un millilitre (01 mL) de la suspension bactérienne est ensuite déposé dans chacun des tubes de la gamme, lesquels sont ensuite placés à 37°C, pendant 24 heures. Après incubation, la CMI des trois huiles essentielles testées est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvu de croissance bactérienne (standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale, 8<sup>ème</sup> édition 2020). Chaque expérience est répétée deux fois pour les 4 souches bactériennes d'intérêts.

### 2. Méthode de diffusion de disque

L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles.

À partir d'une culture pure et jeune de 24 heures, prélever quelques colonies identiques et bien isolées et les décharger dans 5 mL d'eau physiologique stériles. Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mac Farland.

Ensemencement des boîtes de MH par écouvillonnage: tromper un écouvillon stérile et sec dans la suspension bactérienne et l'essorer en le pressant fermement contre la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose MH de haut en bas en stries serrée. Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte à 60° à chaque fois. Pour la réalisation de l'aromatogramme, de petits disques de papier buvard sont imprégné de différentes huiles essentielles à tester avec une série de concentrations différentes représentées ci-dessous :

- Solution mère : représente 50 µL d'huile pure
- Dilution 1/2 : représente 50 µL d'huile + 50 µL d'eau physiologique
- Dilution 1/4 : représente 50 µL + 150 µL d'eau physiologique
- Dilution 1/8 : représente 50 µL + 350 µL d'eau physiologique
- Dilution 1/16 : représente 50 µL + 750 µL d'eau physiologique

Appliquer les disques qui sont imbibés avec l'HE à l'aide d'une pince stérile sur la face de la gélose MH et incuber pendant 24 heures à 37°C.

Les résultats sont symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'H.E (tableau III).

**Tableau III: Résistance et sensibilité des bactéries vis-à-vis des huiles essentielles**

Sensibilité de la souche	Diamètre de la zone d'inhibition
Sensible (++)	Supérieur ou égal à 15 mm
Intermédiaire (+)	Inferieur à 15 mm
Résistant (-)	Inexistant

**3. Test de synergie entre l'huile essentielle de thym, de romarin et d'origan**

Pour sa réalisation, nous avons utilisé les deux méthodes précédemment citées afin de chercher l'effet synergique entre les trois huiles essentielles.

**3.1. Aromatogramme**

Plusieurs séries d'aromatogrammes ont été réalisées en associant divers combinaisons sélectionnées selon les zones d'inhibition susceptibles de donner les résultats les plus concluants (Tableau IV).

D'après White et *al.*, (1996). Une interaction entre des antimicrobiens est additive lorsque l'effet combiné est égal à la somme des substances individuelles (Bhat et Ahangar, 2007). L'additivité est parfois appelée indifférence parce qu'il n'y a pas interaction entre les antimicrobiens testés (White et *al.*, 1996). On dit qu'un effet est synergique lorsque l'effet combiné est supérieur à la somme des effets des deux substances individuelles. Lorsque l'effet combiné est plus petit que celui de la somme des substances individuelles, il est appelé antagonisme (Bhat et Ahangar, 2007).

**Tableau IV: Résumé des différentes combinaisons employées pour le test de synergie sur aromatogramme**

Bactéries	Synergie des deux HEs (+) Thym + Origan	Synergie des deux HEs (+) Romarin + Thym	Synergie des deux HEs (+) Romarin + Origan
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1/16 + 1/16	01 + 1/16	01 + 1/16
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1/16 + 1/16	01 + 1/16	01 + 1/16
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1/16 + 1/8	1/2 + 1/16	1/2 + 1/8
<i>SARM</i> <i>MU50</i>	1/16 + 1/16	01 + 1/8	01 + 1/16

Une autre série d'aromatogrammes a été réalisée en espaçant les disques au fur et à mesure de 2 cm, 4 cm et 6 cm afin de déterminer si les résultats obtenus ne sont pas influencés par la distance entre les disques (Tableau V).

**Tableau V: Résumé des différentes combinaisons employées pour le test de synergie sur aromatoگرامme**

Bactéries	Synergie des deux HE (+) Thym + Origan
<i>S. aureus</i>	1/16 + ¼
<i>E. coli</i>	1/8 + ¼
<i>P. aeruginosa</i>	1 + 1
<i>SARM</i>	1/8 + 1/8

**3.2. Etude de la concentration minimale inhibitrice**

L'étude de l'association des HEs/HEs par micro dilution en milieu liquide sur les 4 souches bactériennes a été utilisée pour déterminer le potentiel de synergie d'association des HEs/HEs à différentes concentrations, en s'inspirant du procédé suivie pour déterminer la CMI des HEs individuels, et ceci selon le protocole suivant (Tableau VI):

- Mélanger les deux volumes d'huiles selon les dilutions associées
- Ajuster le mélange des huiles avec le milieu jusqu'à atteindre 5 mL afin que les concentrations finales soient équivalent aux concentrations d'intérêts.
- Ajouter la même quantité de suspension bactérienne dans tous les tubes, soit 01 mL.

**Tableau VI: Résumé des différentes combinaisons employées pour le test de synergie en CMI**

Dilution	SM Origan (mL)	SM Thym (mL)	Complément Bouillon MH (mL)	Volume final (mL)
1/4 Origan + 1/4 Thym	1.25	1.25	2.5	05 mL
1/4 Origan + 1/8 Thym	1.25	0.62	3.13	
1/4 Origan + 1/16 Thym	1.25	0.3	3.45	
1/8 Origan + 1/4 Thym	0.62	1.25	3.13	
1/8 Origan + 1/8 Thym	0.62	0.62	3.76	
1/8 Origan + 1/16 Thym	0.62	0.3	4.08	
1/16 Origan + 1/4 Thym	0.3	1.25	3.45	
1/16 Origan + 1/8 Thym	0.3	0.62	4.08	
1/16 Origan + 1/16 Thym	0.3	0.3	4.4	

### 4. Etude de l'association « huiles essentielles / antibiotiques » par la méthode des disques

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'association HEs/ATBs est celle de diffusion sur milieu solide. Pour cela, trois antibiotiques ont été testés, il s'agit de : kanamycine, vancomycine, gentamicine.

Un disque d'antibiotique est déposé au centre de chaque boîte MH préalablement ensemencée par la souche d'intérêts, puis deux disques d'huile de thym et deux disques d'huile d'origan de concentrations différentes sont déposés sur chaque boîte contenant l'antibiotique. Les boîtes sont laissées incubées à 37 °C pendant 24 heures (Tableau VII).

**Tableau VII: Résumé des différentes combinaisons employées pour le test de synergie HEs/ATB sur aromatoigramme**

Bactéries	Concentration choisie	
	Thym	Origan
<i>S. aureus</i>	1/4 + 1/8	1/4 + 1/16
<i>E. coli</i>	1/2 + 1/8	1/4 + 1/8
<i>P. aeruginosa</i>	1 + 1/2	1 + 1/2
<i>SARM</i>	1/4 + 1/2	1/2 + 1/8

Les données ont été analysées comme suit:

- Indifférence: les deux zones d'inhibition de l'HE seule et de l'association HEs/ATBs restent inchangées.
- Antagonisme: la zone d'inhibition de l'association HEs/ATBs est moins importante que celle de l'HE toute seule.
- Synergie : la zone d'inhibition de l'association HEs/ATBs est plus importante que celle de l'HE toute seule.

# **Résultats et discussion**

### I. Résultats

#### 1. Détermination de la CMI des HEs individuelles

Dans la première partie, relative à l'utilisation du bouillon nutritif, nous avons constaté l'apparition d'une opalescence. Celle-ci n'indique, cependant, pas une croissance bactérienne. Cela est dû aux HEs principalement, étant donné que nous avons ajouté respectivement 01 jusqu'à 5 gouttes dans chaque tube. Cette opalescence est prise en compte lors de la lecture en comparant chaque tube de culture avec son tube témoin.

Dans la seconde partie, c'est le bouillon MH qui a été utilisé, celui-ci nous a donc permis de déterminer la CMI. Le tableau ci-dessous, récapitule tous les résultats des valeurs de la CMI qui ont été enregistrées au cours des tests sur les 4 souches bactériennes par les HEs individuelles (Tableau VIII).

**Tableau VIII: Concentrations minimales inhibitrices des HEs de romarin, d'origan et de thym vis-à-vis des 4 souches bactériennes**

Souche	CMI		
	HE de thym	HE de romarin	HE d'origan
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1/4 (12.5 µL)	/	1/4 (12.5 µL)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1/8 (6.25 µL)	/	1/4 (12.5 µL)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1/4 (12.5 µL)	/	/
<i>SARM</i> MU50	1/8 (6.25 µL)	/	1/8 (6.25 µL)

- 1 goutte = 50 µL
- / Trouble (Pas de CMI)

#### 2. Aromatogramme

La sensibilité des différentes souches bactérienne se traduit par un halo autour du disque imprégné du composé testé. Le diamètre du halo est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

### 2.1. Test des huiles essentielles individuelles

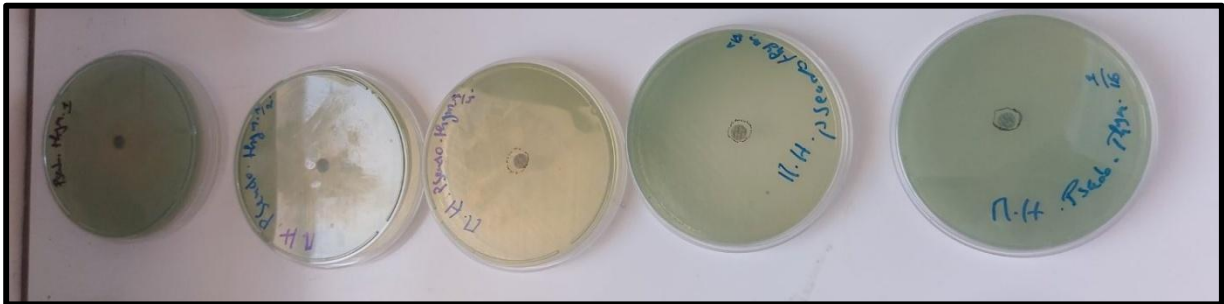
#### 2.1.1. Différentes dilutions de l'huile essentielle de Thym

- **Vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922**

L'huile de thym s'est avérée être très actif vis-à-vis de *E. coli* et ceci même au niveau de la dilution 1/16 qui représente la plus petite dilution.

- **Vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 27853**

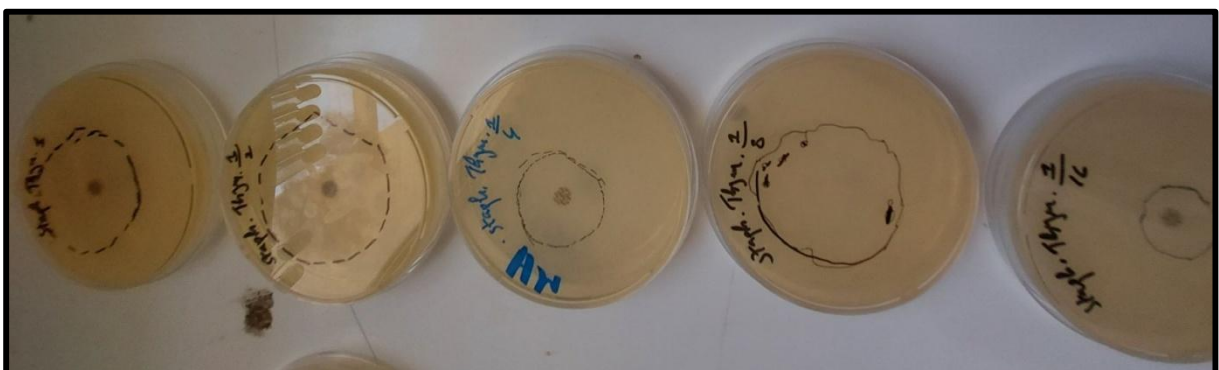
La souche *P. aeruginosa* ATCC 27853, s'est avérée posséder une résistance très élevée vis-à-vis de l'action antibactérienne de l'huile essentielle de thym.



**Figure 15: Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Thym sur *P. aeruginosa***

- **Vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

L'huile de thym s'est avérée être très actif vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, où d'importants diamètres ont été observés.



**Figure 16: Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Thym sur *S. aureus***

- **Concernant *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline MU50**

L'huile de thym s'est avérée être très efficace avec les premières dilutions vis-à-vis du SARM, néanmoins aucun résultat n'a été observé là où l'huile a été fortement diluée.

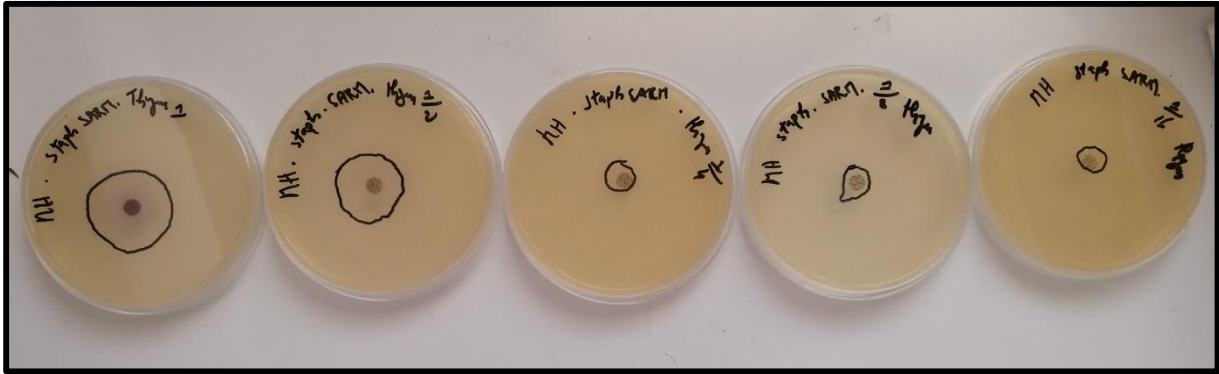


Figure 17: Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Thym sur SARM

Tableau IX: Résumé du test d'aromatogramme des souches testées sur l'HE de thym

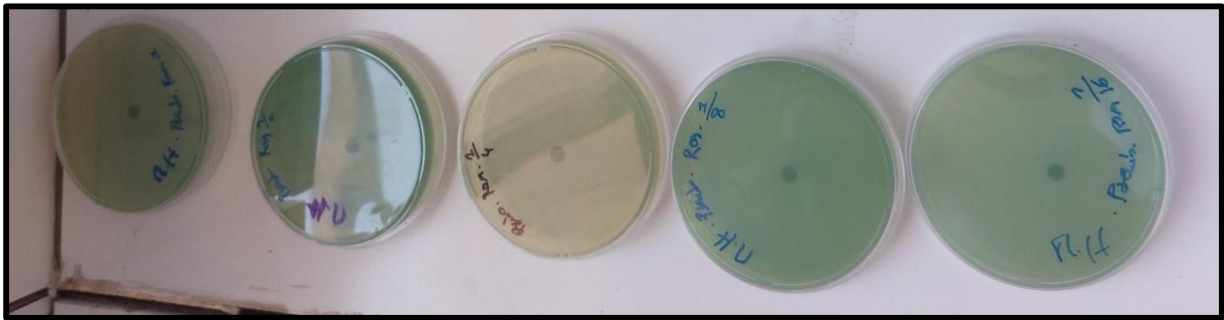
Bactéries	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	SARM
1	40 mm	12 mm	52 mm	35 mm
1/2	30 mm	10 mm	49 mm	28 mm
1/4	27 mm	09 mm	31 mm	17 mm
1/8	20 mm	09 mm	47 mm	10 mm
1/16	15 mm	08 mm	20 mm	< 06 mm

### 2.1.2. Différentes dilutions de l'huile essentielle de Romarin

- Vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922

*E. coli* s'est avérée posséder une résistance très élevée vis-à-vis de l'action antibactérienne de l'huile essentielle de romarin (Résistance contact).

- Vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 27853



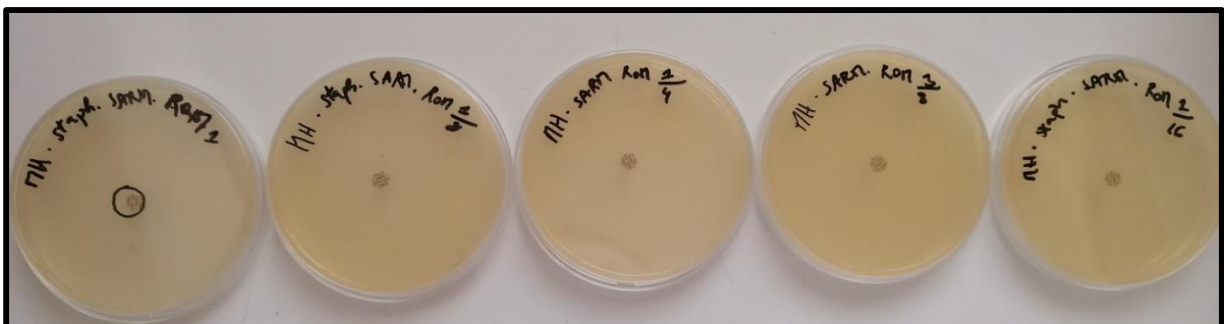
**Figure 18: Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Romarin sur *P. aeruginosa***

- Vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Staphylococcus aureus* s'est avérée posséder une résistance très élevée vis-à-vis de l'action antibactérienne de l'huile essentielle de romarin (Résistance contact).

- Concernant *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline MU50

SARM s'est avérée posséder une résistance très élevée vis-à-vis de l'action antibactérienne de l'huile essentielle de romarin (Résistance contact).



**Figure 19: Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle de Romarin sur SARM**

**Tableau X: Illustration du test d'aromatogramme des souches testées sur l'HE de romarin**

Bactéries	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	SARM
<b>1</b>	< 06 mm	15 mm	10 mm	14 mm
1/2	< 06 mm	14 mm	< 06 mm	< 06 mm
1/4	< 06 mm	< 06 mm	< 06 mm	< 06 mm
<b>1/8</b>	< 06 mm	< 06 mm	< 06 mm	< 06 mm
<b>1/16</b>	< 06 mm	< 06 mm	< 06 mm	< 06 mm

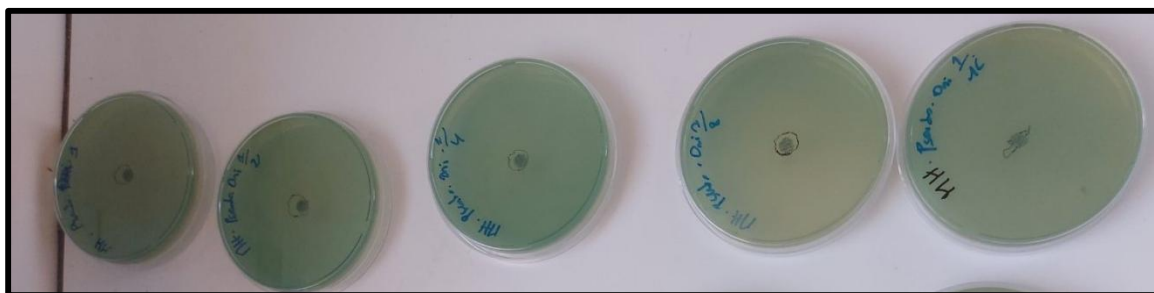
### 2.1.3. Différentes dilutions de l'huile essentielle d'Origan

- **Vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922**

L'huile d'origan s'est avérée être très efficace vis-à-vis d'*E. coli* et ceci pour toute les dilutions.

- **Vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 27853**

Selon les zones d'inhibitions observées, nous pouvons constater que l'huile d'origan est moyennement active.



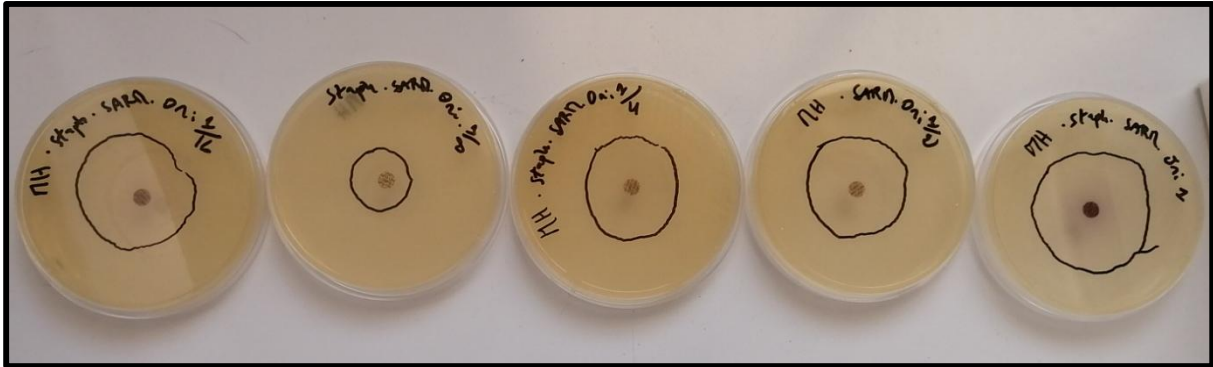
**Figure 20: Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle d'Origan sur *P. aeruginosa***

- **Vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

L'huile d'origan s'est avérée être très active vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* où d'importants diamètres ont été observés.

- Concernant *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline MU50

L'huile d'origan a présenté de très bons résultats vis-à-vis du SARM qui a manifesté une très grande sensibilité antibactérienne.



**Figure 21: Activité antibactérienne des différentes dilutions de l'huile essentielle d'Origan sur SARM**

**Tableau XI: Illustration du test d'aromatogramme des souches testées sur l'HE d'origan**

Bactéries	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	SARM
<b>1</b>	32 mm	10 mm	54 mm	55 mm
1/2	28mm	09 mm	50 mm	40 mm
1/4	22 mm	08 mm	48 mm	36 mm
<b>1/8</b>	19 mm	08 mm	31 mm	30 mm
<b>1/16</b>	15 mm	< 06 mm	15 mm	45 mm

### 2.2. Test de synergie entre les huiles essentielles

#### 2.2.1. Effet de l'association « HEs /HEs » vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Les résultats observés dans cette étude sont mentionnés dans la figure ci-dessous:



Figure 22: Effet de l'Association des 3 huiles essentielles avec les différentes dilutions vis-à-vis de *S. aureus*

#### 2.2.2. Effet de l'association « HEs /HEs » vis-à-vis de *P. aeruginosa*

Les résultats observés dans cette étude sont mentionnés dans la figure ci-dessous:

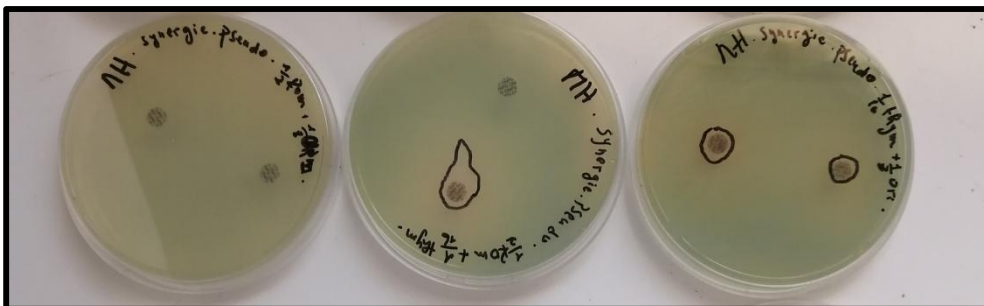


Figure 23: Effet de l'Association des 3 huiles essentielles avec les différentes dilutions vis-à-vis de *P. aeruginosa*

#### 2.2.3. Effet de l'association « HEs /HEs » vis-à-vis de *E. coli*

Les résultats observés dans cette étude sont mentionnés dans la figure ci-dessous:



Figure 24: Effet de l'Association des 3 huiles essentielles avec les différentes dilutions vis-à-vis d'*E. coli*

2.2.4. Effet de l'association « HEs /HEs » vis-à-vis du SARM

Les résultats observés dans cette étude sont mentionnés dans la figure ci-dessous:



Figure 25: Effet de l'Association des 3 huiles essentielles avec les différentes dilutions vis-à-vis du SARM

2.3. Influence de l'espacement des disques sur le test de synergie entre les HEs

- Concernant *E. coli*

Les résultats observés après espacement des disques sont mentionnés dans la figure ci-dessous:



Figure 26: Effet de l'association des 2 HEs avec les différents espacements vis-à-vis d'*E. coli*

- Concernant *Staphylococcus aureus*

Les résultats observés après espacement des disques sont mentionnés dans la figure ci-dessous:



**Figure 27: Effet de l'association des 2 HEs avec les différents espacements vis-à-vis de *Staphylococcus aureus***

- Concernant *P. aeruginosa*

Les résultats observés après espacement des disques sont mentionnés dans la figure ci-dessous:

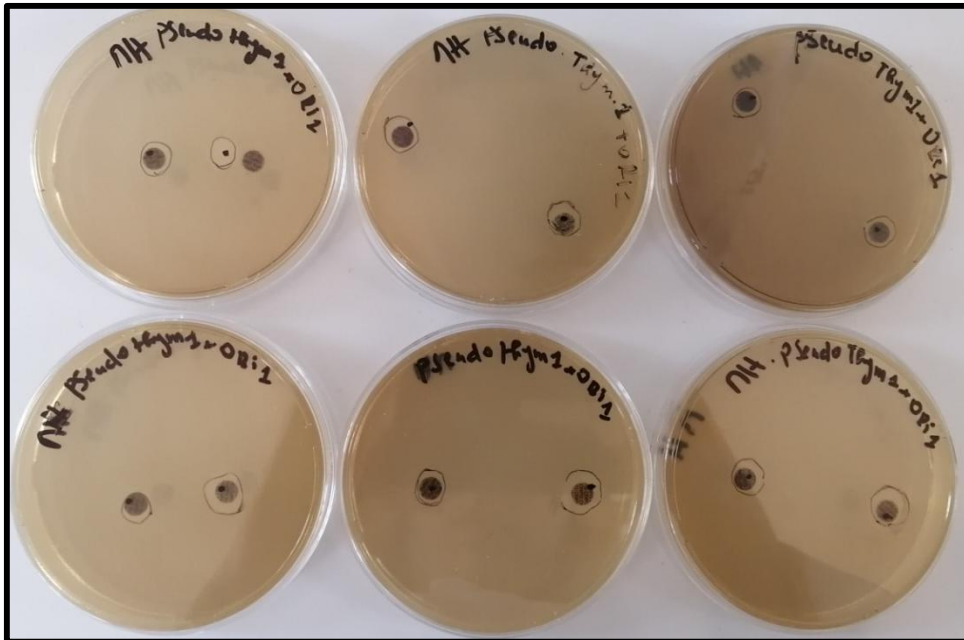


Figure 28: Effet de l'association des 2 HEs avec les différents espacements vis-à-vis de *P. aeruginosa*

- Concernant *Staphylococcus aureus* résistante à la métililline

Les résultats observés après espacement des disques sont mentionnés dans la figure ci-dessous:



Figure 29: Effet de l'association des 2 HEs avec les différents espacements vis-à-vis du SARM

3. Détermination des valeurs de CMI des tests de synergie HEs / HEs

Les résultats obtenus pour les tests de CMI en synergie sont résumés dans le tableau ci-dessous:

**Tableau XII: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des tests de synergie HEs / HEs vis-à-vis des 4 souches bactériennes**

Dilution	Croissance bactérienne			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	SARM
1/4 Origan + 1/4 Thym	+	+	-	-
1/4 Origan + 1/8 Thym	+	+	-	-
1/4 Origan + 1/16 Thym	-	+	-	-
1/8 Origan + 1/4 Thym	-	+	+	+
1/8 Origan + 1/8 Thym	-	+	-	+
1/8 Origan + 1/16 Thym	-	+	-	-
1/16 Origan + 1/4 Thym	+	+	-	-
1/16 Origan + 1/8 Thym	+	+	-	+
1/16 Origan + 1/16 Thym	-	+	-	+

+ : Présence de croissance bactérienne

- : Absence de croissance bactérienne

4. Etude de l'association « huiles essentielles / antibiotiques » par la méthode des disques

- Concernant *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous:

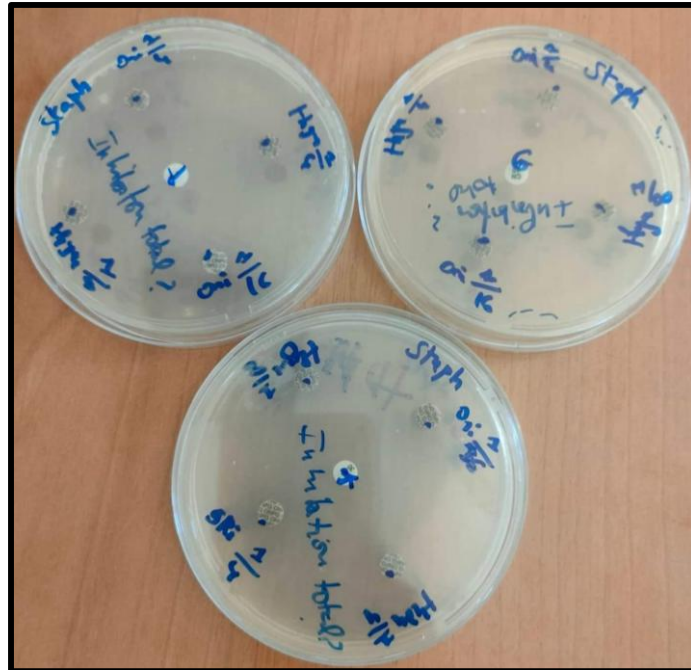


Figure 30: Effet de l'association des HEs avec les différents antibiotiques vis-à-vis de *S. aureus*

- Concernant *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

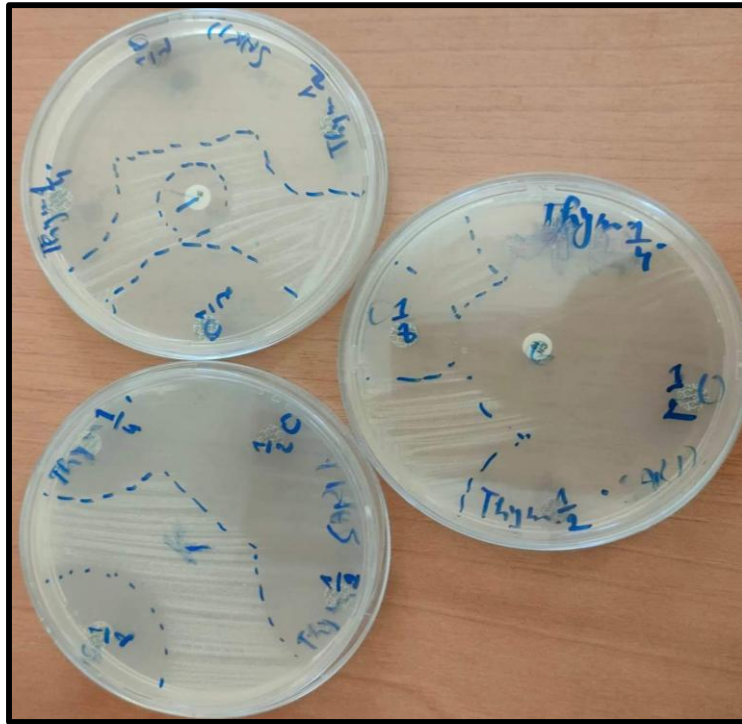
Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous:



Figure 31: Effet de l'association des HEs avec les différents antibiotiques vis-à-vis de *P. aeruginosa*

- **Concernant *staphylococcus aureus* résistante à la méticilline MU50**

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous:



**Figure 32: Effet de l'association des HEs avec les différents antibiotiques vis-à-vis de SARM**

- **Concernant *E. coli* ATCC 25922**

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous:



**Figure 33: Effet de l'association des HEs avec les différents antibiotiques vis-à-vis d'*E. coli***

### II. Discussion

#### 1. Détermination des CMI des HEs individuelle

Les résultats obtenus dans notre étude sont représentés dans le tableau VIII. Les huiles essentielles de thym et d'origan présentent des CMI jugées faibles pour presque toutes les souches étudiées.

L'huile de *Thymus vulgaris* témoigne d'une activité antibactérienne intéressante par rapport aux concentrations utilisées. Cette grande activité antibactérienne peut être reliée dans le cas de l'huile de *Thymus vulgaris* à la présence du thymol qui est majoritaire. Ce composé phénolique est, en effet, connu pour ses propriétés antibactériennes ayant un très large spectre et qui est, naturellement, présent dans les essences de la plupart des espèces de thym.

En ce qui concerne *Origanium vulgare*, le thymol et le carvacrol sont des composés phénoliques principalement responsables de son activité antibactérienne. Les effets de l'origan dans les cellules microbiennes se produisent principalement en raison de son interaction avec la membrane cellulaire, augmentant la perméabilité cellulaire et favorisant l'interférence dans la synthèse de l'ATP et des protéines, la perturbation du pH cytoplasmique et l'inhibition de la détection du quorum (Preuss et *al.*, 2005).

Le romarin a été exploré dans cette étude, malheureusement, nous n'avons pas eu de résultats concluants même avec la dose la plus importante. Les huiles essentielles de thym et d'origan sont les plus efficaces et donc retenues pour notre étude.

#### 2. Aromatogramme

##### 2.1. Test des huiles essentielles individuelles

##### 2.1.1. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'H.E de thym

Les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des HE sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées. Cette technique pose un problème de diffusion, d'homogénéité et de dispersion avec les HE, qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux.

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la sensibilité d'un même germe vis-à-vis d'une même HE diffère selon la méthode utilisée ou selon le mode de dispersion de l'HE dans le milieu de culture, ce qui rend toute comparaison inexacte et pousse les chercheurs à bien choisir et améliorer les techniques d'études.

D'après les résultats obtenus (Tableau IX), l'HE de thym semble jouir d'une activité antibactérienne acceptable en se basant sur l'aire de la zone d'inhibition autour des différents disques imbibés vis-à-vis des différents microorganismes testés. *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible à l'huile essentielle avec un diamètre d'inhibition de 52 mm au niveau de la dilution 01. Toutes les autres souches sont sensibles à l'huile essentielle à partir des dilutions supérieur ou égal à 1/2. *Pseudomonas aeruginosa*, s'est révélée être la souche la plus résistante à l'huile essentielle de thym.

### 2.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'H.E de romarin

Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques imprégnés d'HE de romarin n'a été observée vis-à-vis d'*Escherichia coli*. Cette bactérie semble posséder un potentiel de résistance très élevée contre l'action antibactérienne de l'H.E de romarin. En revanche les souches *P. aeruginosa*, *S. aureus* et SARM ont manifesté une sensibilité acceptable vis-à-vis de cette huile au niveau de la dilution 01 malgré la faible zone d'inhibition (TableauX).

Cependant contrairement aux autres HE le romarin s'est montré être le plus efficace vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, étant donné que l'on a pu observer des zones d'inhibition au niveau des deux premières concentrations.

### 2.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'H.E d'origan

Concernant l'activité d'HE d'origan, l'huile a réagi positivement sur l'ensemble des bactéries testées avec des diamètres d'inhibitions allant de 10 à 55 mm. Les souches à Gram négatives, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les moins sensibles avec des diamètres d'inhibitions de 0 à 32 mm respectivement, par rapport aux souches Gram positives : *Staphylococcus aureus* et SARM qui ont été plus sensibles avec des diamètres d'inhibitions allant de 15 mm à 55 mm respectivement (TableauXI).

Cette différence a été expliquée selon Boukhatem et *al.* (2014) par le fait que les Gram négatif possèdent une résistance intrinsèque aux agents antibactériens, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. En effet, chez les bactéries à Gram positif, la paroi a une structure qui présente un peptidoglycane très épais associé à des protéines pariétales ; la paroi des bactéries à Gram Négatif, présente quant à elle une structure avec une deuxième enveloppe externe de nature complexe définissant un espace péri plasmique rempli d'enzymes qui dégradent et inactivent les substances exogènes.

## 2.2. Test de synergie entre les huiles essentielles

Le but visé dans ce travail, est d'étudier l'effet antibactérien résultant de l'association des huiles essentielles. Des combinaisons de différentes concentrations ont été testées. L'activité antibactérienne de chacune de ces interactions est déterminée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose. En absence d'un référentiel de lecture l'appréciation se fait selon le visuel.

Les résultats portés dans les figures, montrent que l'effet antibactérien varie selon la combinaison, la concentration et selon la souche bactérienne cible. D'après la figure 22, nous constatons que les deux combinaisons testées de (1/16 de l'H.E thym et 1/16 de origan) et (1/16 de l'HE d'origan et 01 de romarin) présentent un effet synergique inhibiteur sur *S. aureus*.

Pour ce qui est des combinaisons de (01 de l'HE de romarin et 1/16 d'origan), (01 de l'HE de romarin et 1/16 de thym) et (1/16 de l'HE de thym et 1/8 d'origan), les trois

combinaisons ont montré un effet très peu actif sur *E.coli* (figure 24). L'espacement entre les disques en est donc responsable.

Concernant la souche de *Pseudomonas aeruginosa*, la combinaison (1/16 thym et 1/8 origan) a exercé une indifférence car il n'y a pas d'interaction entre les antibactériens testés. Tandis qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée vis-à-vis de la combinaison (1/2 romarin x 1/8 origan) et (1/2 romarin et 1/16 thym) qui a montré un éventuel effet antagoniste, où chaque huile inhibe l'action de l'autre, il est donc plus intéressant que chacune fonctionne séparément. Ce qui nous fait constater que l'effet des huiles seules est plus important que celui de la combinaison des deux ensembles.

Les résultats observés sur SARM ont été très encourageants, notamment au niveau des deux combinaisons d'huiles (1/8 thym et 1/16 origan) ainsi que (1/16 thym et 1/16 origan) qui ont manifesté un effet synergique. Cependant pour les combinaisons de (01 de romarin et 1/16 thym) et (1/8 thym et 01 romarin), les huiles bien qu'actives n'ont pas démontré une synergie apparente, il y a donc une indifférence constatée. On en conclue alors à une addition des effets.

### 2.3. Influence de l'espacement des disques sur le test de synergie entre les HEs

Nous avons constaté que pour le cas des trois souches bactériennes (*E. coli*, *S. aureus*, SARM), le phénomène d'addition était d'autant plus remarqué au fur et à mesure que nous rapprochions les disques imbibés d'huiles. En effet, au niveau de certaines associations il y'a eu formation d'un pont élargi qui démontre donc l'effet synergique. Concernant, *Pseudomonas aeruginosa* de base très résistante vis-à-vis des diverses combinaisons a maintenu cette résistance lors du rapprochement des disques.

### 3. Confirmation des résultats de l'association des HEs / HEs sur milieu liquide

Le tableau XII confirme et affine les résultats obtenus sur l'aromatogramme, tout en minimisant la consommation de matériels, notamment les huiles.

### 4. Etude de l'association « huiles essentielles / antibiotiques » par la méthode des disques

L'association des HEs aux différents antibiotiques présentent des effets différents selon les zones d'inhibition qui sont rapportées dans les figures 30, figure 31, figure 32, figure 33.

- **Effet de l'association « HEs /Antibiotiques » vis-à-vis de *P. aeruginosa***

Nous rappelons, que *P. aeruginosa* a une résistance naturelle vis-à-vis de la vancomycine et la kanamycine. L'analyse des données montre que l'association des différentes concentrations d'HE de thym (01 et 1/2) et origan (01 et 1/2) avec la vancomycine et la kanamycine a donné des interactions antagonistes par rapport à celle de l'huile seule. Tandis qu'une interaction indifférente est obtenu en association avec la gentamicine (Figure 31).

- **Effet de l'association « HEs /Antibiotiques » vis-à-vis de SARM**

La Figure 32, montre que l'association de l'HE de thym (1/4 et 1/2) et origan (1/2 et 1/8) avec les antibiotiques kanamycine et vancomycine n'ont montré aucun effet synergique ou additif. Cependant, une légère interaction synergique est obtenue avec la gentamicine et l'HE de (thym 1/2 et 1/4) ainsi que l'HE de (origan 1/2).

- **Effet de l'association « HEs /Antibiotiques » vis-à-vis de *S. aureus***

Avec les antibiotiques ; kanamycine, gentamicine, vancomycine combinés avec les huiles essentielles de thym et d'origan, une très importante activité apparait dans ces combinaisons. L'association des HEs présente donc un effet antibactérien remarquable vis-à-vis de *S. aureus*.

- **Effet de l'association « HEs /Antibiotiques » vis-à-vis de *E. coli***

La combinaison des HEs de thym et d'origan avec la gentamicine contre *E. coli*, est plus susceptible d'être additive que synergique. En revanche, il y'a un effet d'indifférence lors de l'association de vancomycine/ HEs.

De façon générale, le pouvoir antibactérien des différentes combinaisons des antibiotiques avec les deux huiles essentielles : *Thymus vulgaris* x *Origanium vulgare*, varie en fonction des souches testées, des types d'antibiotiques et des huiles essentielles employées.

Nos résultats ont montré que les huiles pouvaient être utilisées indépendamment entre elles et/ou en association avec des antibiotiques car nous n'avons observé aucun effet antagoniste bien clair. Des additions et parfois mêmes des synergies ont été observées. Ces résultats sont jugés donc positifs et très intéressants à exploiter.

De plus, l'association des huiles essentielles aux antibiotiques peut être employée pour augmenter le spectre antibactérien (Fadli et *al.*, 2012), empêcher l'apparition des mutants résistants, réduire au minimum la toxicité et minimiser les effets secondaires de l'antibiotique (Lv et *al.*, 2011). Cette association pourrait être une alternative à la monothérapie pour des patients présentant des infections envahissantes difficile à traiter, comme ceux dues aux espèces multi résistantes (Aiyegoro et Okoh, 2009).

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

À travers ce travail, nous avons essayé de démontrer l'intérêt de l'aromathérapie comme alternative à l'utilisation des antibiotiques mais aussi en éventuel association. En effet, de nos jours, les huiles essentielles sont de plus en plus sollicitées et cela dans divers domaines, particulièrement la thérapeutique médicale étant donné que c'est le domaine dans lequel, elles sont le plus prometteuses avec leurs activités antibactériennes, qui peut être mise à profit face aux résistances bactériennes qui ne cessent d'augmenter.

Les huiles essentielles étant des mélanges complexes de plusieurs molécules actives aux propriétés antibactériennes telles que le carvacrol et le thymol dont l'action sur les bactéries est l'effet de chaque composé individuel modulé par l'effet synergique, fait que leurs associations rendent la résistance des souches bactériennes quasiment impossible.

Nous avons également étudié leurs associations avec les antibiotiques, qui permettent de rendre de nouveau efficace certains antibiotiques qui de base sont inopérants. Cette association permet aussi de réduire la dose de ces derniers et ainsi diminuer leurs effets indésirables.

Les résultats obtenus qui sont d'autant plus encourageants, nous suggèrent de part l'efficacité qu'ont démontré les huiles essentielles, que la lutte contre les diverses infections, en mono, bi ou trithérapie serait plus qu'intéressantes. Ces résultats témoignent aussi du potentiel que présentent les huiles essentielles pour la recherche de molécules antibactériennes innovantes dans leurs modes d'actions. Des études sur la composition chimique des huiles serait donc plus que nécessaire et ce afin d'identifier et de préciser les différents principes actifs et pour mieux comprendre ces modes d'actions. De même, l'association « huiles essentielles-antibiotiques » sont recommandées afin d'aller plus loin dans la recherche concernant ce domaine, et d'arriver à la conception d'une formule médicamenteuse qui combine entre les antibiotiques et les huiles essentielles, dans le but de lutter contre les bactéries manifestant une résistance aux agents antibactériens

Toutefois, les méthodes *in vitro* utilisées pour confirmer l'activité antibactérienne des différents extraits sont insuffisantes et nécessitent d'autres tests supplémentaires plus avancés tels que l'étude de l'activité antibactérienne *in vivo*. Ainsi, la combinaison de ces stratégies de recherche devrait contribuer à élargir l'arsenal thérapeutique dont nous disposons pour lutter contre le problème récurrent de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

## Références bibliographiques

- Abraham E. (1987).** Cephalosporins. *Drugs*. 4(2):1-4.
- Arras G. & Usai M. (2001).** Fungitoxic Activity of 12 Essential Oils Against Four Post Harvest Citrus pathogens: Chemical Analysis of *Thymus capitatus* Oil and its Effect in Subatmospheric Pressure Conditions. *Journal of Food Protection*. 64: 1025-1029.
- Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T.S., Tchobo F., Yèhouénou B., Menut C. & Sohounhloué D. (2012).** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.
- Bhat A.S. & Ahangar A.A. (2007).** Methods for detecting chemical-chemical interaction in toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*.17:441–50.
- Biskri L. & Mazel D. (2003).** Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 3326-3331
- Bolhuis H., van Veen H.W., Molenaar D., Poolman B., Driessen A.J. & Konings W.N. (1996).** Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *European Molecular Biology Organization Journal* 15: 4239-4245
- Boundless. (2016).** Antibiotic Classifications. Boundless microbiology.
- Boyle W. (1955).** Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review*. 66: 25-28.
- Brink A. J., Feldman C., Grolman D. C., Muckart D., Pretorius J., Richards G.A., Senekal M. & Sieling W. (2004).** Appropriate use of the carbapenems. *South African Medical Journal*. 94(10):857-861.
- Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*. 94: 223-253.
- Butaye P., Cloeckert A. & Schwarz S. (2003).** Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22: 205-210
- Carson C.F., Mee B.J. & Riley T.V. (2002).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 1914-1920
- Chopra I. & Roberts M. (2001).** Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(2):232-260.
- Chow J.W. & Shlaes D.M. (1991).** Imipenem resistance associated with the loss of a 40kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 28: 499-504
- Cronan J.E., Gennis R.B. & Maloy S.M. (1987).** Cytoplasmic membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. American Society for Microbiology: Washington, DC, p 31-55
- Cui L., Ma X., Sato K., Okuma K., Tenover F.C., Mamizuka E.M., Gemmell C.G., Kim M.N., Ploy M.C., El-Solh N., Ferraz V. & Hiramatsu K. (2003).** Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 5-14

- Davidson, P. M. & Parish, M. E. (1989).** Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*. 43, 148–155.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B. & Mazza, G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74, 101–109.
- Domagala J.M. (1994).** Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 33:685-706
- Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H. & Spratt B.G. (2002).** The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 7687-7692
- Fuoco D. (2012).** Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs. *Antibiotics*. 1:1-13.
- Gabriel I., Alleman F., Dufourcq V., Perrin F. & Gabarrou J.F. (2013).** *INRA Productions Animales*, 26 (1), 13-24.
- García-García, R., López-Malo, A. & Palou, E. (2011).** Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*. 76, M95–M100.
- Gilbert D. (2000).** Aminoglycosides. In: Mandell G. L., Bennett J. E. & Dolin R, (eds.) *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. Pp. 307-336
- Giordani R. & Kaloustian J. (2006).** Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Journal of Phytotherapy*. 4 (3): 121-124.
- Guengerich F.P. (2001).** Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology*14: 611-650
- Hamilton-Miller J.M. (1973).** Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *American Society for Microbiology*. 37(2):166-196.
- Hamilton-Miller J.M. (1973).** Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *American Society for Microbiology*. 37(2):166-196.
- Helander I.M., Kilpelainen I. & Vaara M. (1994).** Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a <sup>31</sup>P-NMR study. *Molecular Microbiology*. 11: 481-487
- Holten K.B. & Onusko E.M. (2000).** Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American Family Physician*. 62(3): 611-620.
- Hyldgaard M., Mygind, T. & Meyer, R.L. (2012).** Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. 3: 1-24.
- Kalemba D. & Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- Kobayashi F., Sainyo Y., Koshi T., Hattori Y., Nakayama M., Iwasaki A., Mori T. & Mitsuhashi S. (1982).** Antimicrobial and Beta-lactamase inhibitory activities of carpetimycins A and B, new carbapenem antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 21:536-544.
- Kumar A. & Schweizer H.P. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1486-1513

- Lambert P.A. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1471-1485
- Ma D., Cook D.N., Alberti M., Pon N.G., Nikaido H. & Hearst J.E. (1995).** Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 16: 45-55
- Mann C. M., Cox S. D. & Markham J. L. (2000).** The Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 Contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil). *Letters in Applied Microbiology*. 30 (4): 294-297.
- Markham PN. & Neyfakh A.A. (2001).** Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 4: 509-514
- Masterton R., Drusano G., Paterson D.L. & Park G. (2003).** Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections-the clinical challenges. *Journal of Hospital Infection*. 1 1: 1-12
- Medical News Today. (2015).** Antibiotics: How do antibiotics work. MediLexicon International Limited. Bexhill-on-sea UK.
- Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y. & Tulkens P.M. (1999).** Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 43(4):727-737.
- Moore D. (2015).** Antibiotic Classification and Mechanism.
- Nguefack J., Tamgue O., Dongmo J.B.L., Dakole C.D., Leth V., Vismer H.F., Amvam Zollo P.H. & Nkengfack, A.E. (2012).** Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control* 23, 377–383
- Nikaido H. & Rosenberg E.Y. (1981).** Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of General Physiology*. 77: 121-135
- Nikaido H. (2003).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 593-656
- Normak H.B. & Normak S. (2002).** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of International Medicine*. 252: 91-106
- Oussou K.R. (2009).** Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p
- Papp-Wallace K., Endimiani A., Taracila M. & Bonomo R. (2011).** Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 55(11):4943-4960.
- Paulsen I.T., Skurray R.A., Tam R., Saier M.H., Turner R.J., Weiner J.H., Goldberg E.B. & Grinius L.L. (1996).** The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular Microbiology*. 19: 1167-1175
- Pegler S. & Healy B. (2007).** In patients allergic to penicillin, consider second and third generation cephalosporins for life threatening infections. *British Medical Journal*. 335(7627): 991.
- Pegler S. & Healy B. (2007).** In patients allergic to penicillin, consider second and third generation cephalosporins for life threatening infections. *British Medical Journal*. 335(7627): 991.

- Pei R.S., Zhou F., Ji B.P. & Xu J. (2009).** Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*. 74, M379–M383
- Peterson L.R. (2008).** Currently available antimicrobial agents and their potential for use as monotherapy. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(6):30-45.
- Poole K. (2004).** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 10: 12-26
- Preuss, H.G., Echard, B., Enig, M., Book I. & Elliot T. (2005).** Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry* 272, 29–34.
- Rasooli I. & Abyaneh M.R. (2004).** Inhibitory Effect of Thyme Oils on Growth and Afltoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*. 15 (6): 479-483.
- Rattanachaikunsopon P. & Phumkhachorn P. (2010).** Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110, 614–619.
- Sanchez A.R., Rogers R.S. & Sheridan P.J. (2004).** Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *International Journal of Dermatology*. 43(10):709-715.
- Sikkema J., de Bont J.A.M. & Poolman B. (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 8022-8028
- Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R. & Sarkinas A. (2006).** Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*. 18: 698-703.
- Talaro K.P. & Chess B. (2008).** *Foundations in microbiology*. 8th Ed. McGraw Hill, New York.
- Teixeira Duarte M.C.T., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L.G. & Delarmelina C. (2005).** Anti Candida Activity of Brazilian Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 97 (2): 305-311.
- Tidwell T.T. (2008).** Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of  $\beta$ -Lactam synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 47(6):1016-1020.
- Torres J.A., Villegas M.V. & Quinn J.P. (2007).** Current concepts in antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Expert Review. Anti-Infective Therapy*. 5:833-843.
- Ultee A., Bennik M.H. & Moezelaar R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1561-1568
- White R.L., Burgess D.S., Manduru M. & Bosso J.A. (1996).** Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40:1914–18.
- Willmott C.J. & Maxwell A. (1993).** A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37: 126-127
- Wright G.D. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1451-1470
- Zahalika, & Jean philippe. (2010).** Les huiles essentielles. Dauphin .paris. p3049.
- Zahner H. & Maas W. (1972).** *Biology of Antibiotics*. Springer-Verlag, New York.

## ANNEXES

**Annexe I :** Liste des antibiotiques utilisés.

Kanamycine ; Vancomycine ; Gentamicine

**Annexe II :** Tableau descriptif des milieux de culture utilisés.

Milieux de cultures	Utilisation
Bouillon Nutritif	Méthode de micro-dilutions en milieu liquide pour la détermination de la CMI
Bouillon Muller-Hinton	
Gélose Nutritive	Repiquage des souches bactériennes
Gélose Muller-Hinton	Aromatogramme

**Annexe III :** Appareillages utilisés.

Appareillages	
Boîtes de Petri	Seringues
Tubes à essai	Ecouvillons
Vortex	Disques de papiers vierges
Eau physiologique	Eau distillée
	Pipettes Pasteur

## Résumé

Les bactéries exposées aux antibiotiques évoluent et développent des mécanismes de défense qui leur permettent d'échapper à l'action des antibiotiques (ATB). Ces derniers deviennent ainsi inefficaces et ne peuvent plus nous soigner contre des infections à bactéries résistantes. Face à ce problème, beaucoup d'études ont été réalisées pour développer des molécules alternatives efficaces contre ces maladies infectieuses, c'est le cas des huiles essentielles (HEs).

L'aromatogramme en milieu solide (méthodes des disques) ainsi que la méthode de micro-dilution sur milieu liquide (CMI) ont été utilisées pour évaluer l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles de thym, origan et romarin, seules, en synergie ou avec des antibiotiques sur quatre souches bactériennes dont deux souches à Gram+ (*Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline et *Staphylococcus aureus*) et deux souches à Gram- (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

L'étude des huiles individuelles a révélé que *Thymus vulgaris* et *Origanium vulgare*, témoigne d'une activité antibactérienne intéressante à l'égard de toutes les souches bactériennes utilisées sauf *Pseudomonas aeruginosa*. Quant à *Rosmarinus officinalis*, la valeur de CMI n'a pas pu être déterminée même avec la dose la plus importante. Pour ce qui est de l'association HEs/HEs et HEs/ATB, l'activité antibactérienne résultante de chacune varie selon la combinaison, les types d'antibiotiques et les huiles essentielles employées, la concentration ainsi que la souche bactérienne cible.

**Mots-clés :** *Thymus vulgaris*, *Origanium vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, antibiotiques, SARM, activité antibactérienne.

## Abstract

Bacteria exposed to antibiotics evolve and develop defense mechanisms that allow them to escape the action of antibiotics. The latter thus become ineffective and can no longer treat us against infections caused by resistant bacteria. Faced with this problem, many studies have been conducted to develop alternative molecules effective against these infectious diseases, such as essential oils (EO).

The aromagram in solid medium (disc methods) as well as the micro dilution method on liquid medium (MIC) were used to evaluate the antimicrobial efficacy of essential oils of thyme, oregano and rosemary, alone, in synergy or with antibiotics on four microbial strains of which two Gram-positive bacterial strains (MRSA and *Staphylococcus aureus*) and two Gram-negative bacterial strains (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*).

The study of the individual oils revealed that *Thymus vulgaris* and *Origanium vulgare*, showed interesting antibacterial activity towards all the microbial strains used except *Pseudomonas aeruginosa*. As for *Rosmarinus officinalis*, the MIC value could not be determined even with the highest dose. As for the combination of HEs/HEs and HEs/ATB, the resulting antibacterial activity of each varies according to the combination, the types of antibiotics and essential oils used, the concentration and the target bacterial strain.

**Key words :** *Thymus vulgaris*, *Origanium vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, SARM, antibiotics, antibacterial activity.