



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou  
Faculté Sciences biologiques et agronomiques  
Département Biochimie-Microbiologie



**Mémoire de fin de cycle Master**

**Option : Microbiologie appliquée**

**Thème :**

**Activité des huiles essentielles seules  
et en combinaison avec des  
antibiotiques vis-à-vis des bactéries  
Gram negatives pathogènes**

**Réalisé par :**

**BEN BEKKOU Lydia**

**NOURI Myriam**

**TERRAS Taoues**

**Membres du jury :**

**Promoteur : M<sup>r</sup> Bariz Karim**

**Maître de conférences B**

**UMMTO**

**Président : M<sup>r</sup> Houali Karim**

**Professeur**

**UMMTO**

**Examineur : M<sup>lle</sup> Lahcen Souad**

**Maître de conférences B**

**UMMTO**

Année universitaire : 2021/2022



## Remerciements

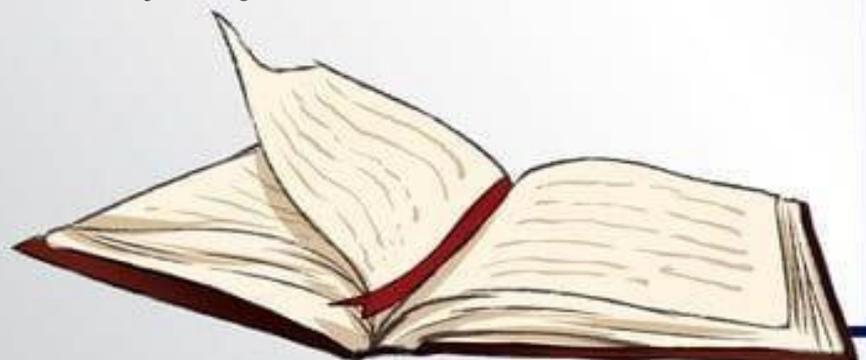
Avant toute chose nous tenons à remercier notre Bon Dieu de nous avoir accordé le savoir, la force, la patience et la chance d'avoir pu poursuivre nos études et réaliser ce modeste et passionnant travail.

Toute notre gratitude et reconnaissance est dirigée en premier lieu vers notre promoteur Mr Bariz K enseignant au département BMC à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour son excellence, sa confiance, ses nombreux conseils à la fois présents pour alimenter notre apprentissage et notre estime en nous-mêmes ainsi que de nous avoir guidés durant toute cette période de stage malgré ses nombreuses préoccupations.

Nous remercions également Mr. Kouali K, professeur à L'UNMO pour l'honneur d'avoir accepté de présider notre mémoire.

Un grand Merci également à Mlle Lahcen S, enseignante au département BMC d'avoir consenti d'examiner ce travail.

Nous tenons également à remercier le personnel du laboratoire de microbiologie et biotechnologie pour l'aide, les conseils, les encouragements apportés durant cette longue période ainsi qu'à tous nos camarades avec qui nous avons partagés de nombreux souvenirs.



## *Dédicaces*

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

*Ensuite, à mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont soutenu malgré toutes les difficultés présentes au même moment que la préparation de ce mémoire.*

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

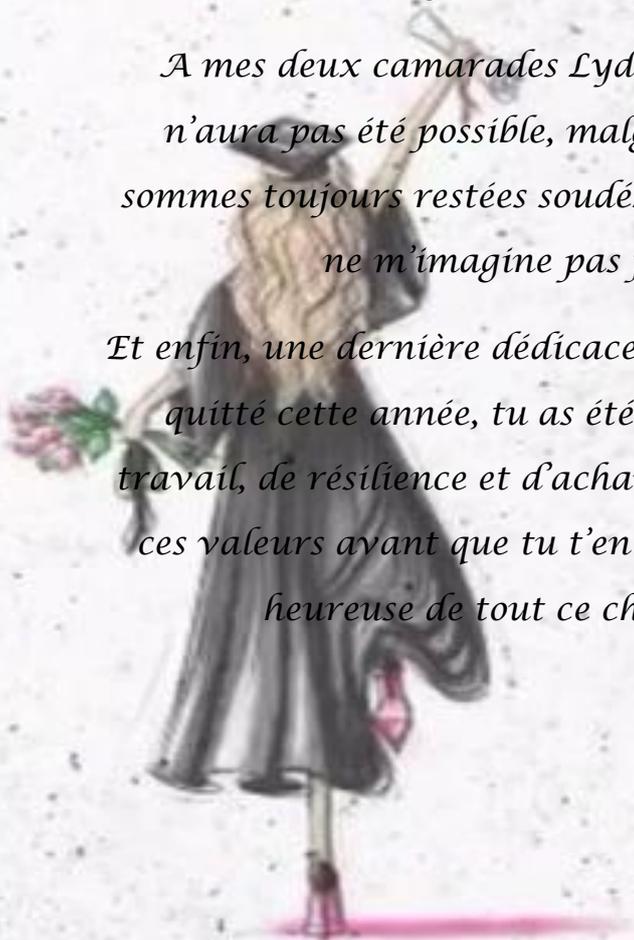
*A tous les membres de ma famille paternelle et maternelle, que j'espère seront fiers de moi.*

*A tous mes ami.es proches qui m'ont encouragé, soutenus, aidés et se sont montrés curieux quant au thème de mémoire et qui, quelque part m'a fortement aidé dans mes recherches.*

*A mes deux camarades Lydia et Taoues sans qui ce travail final n'aura pas été possible, malgré les difficultés et les tensions nous sommes toujours restées soudés et notre travaille a porté ses fruits, je ne m'imagine pas faire ce mémoire sans elles.*

*Et enfin, une dernière dédicace à ma défunte tante Karima qui nous a quitté cette année, tu as été un synonyme de bienveillance et de travail, de résilience et d'acharnement, merci de nous avoir transmis ces valeurs avant que tu t'en ailles, je suis sûre que là où tu es tu es heureuse de tout ce chemin parcouru dans le savoir.*

*Nouri Myriam*



The page is framed by a decorative border. At the top corners, there are black silhouettes of graduates wearing caps and gowns, facing each other. Below these are clusters of colorful flowers, including roses and peonies in shades of red, pink, and yellow. The border is further embellished with green leaves and pink, swirling vine-like patterns. The background is white, making the colors of the flowers and the black silhouettes stand out.

## *Dédicaces*

*C'est avec un grand plaisir que je dédie ce modeste travail.*

*A ma mère Kahina, la prunelle de mes yeux, ma raison d'être, lanterne qui éclaire mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour.*

*A mon père Mohand Amokrane en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens, les sacrifices dont il a fait preuve mon égard.*

*A mes chères frères Amar, Fodil pour leur dévouement, leur compréhension, leur grande tendresse, et pour l'amour qu'ils me réservent. Je leurs souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.*

*A mes Grands-parents, que Dieu les garde.*

*A mes tantes, cousins, cousines.*

*A mes deux chères camarades Lydia, Myriam. Pour leurs encouragements et pour les bons moments qu'on a vécus ensemble. En vous souhaitant un avenir radieux plein de bonnes promesses.*

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

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

*Jacques Terras*



## Dédicaces

*Je dédie humblement ce modeste travail à :*

**ALLAH** : le tout puissant qui m'a guidé dans le bon chemin

---

*« Si au soir de ma vie, mes enfants devaient penser de moi ce que je pense de mes parents, alors j'aurai réussi ma vie ».*      Hommage à mes parents

---

**Mon très cher père** : ton souci majeur est et demeure la réussite de tes filles. Tes conseils, ton amour, et tous les sacrifices consentis pour notre éducation m'ont guidé chaque jour dans ma vie. Merci pour ce que tu as fait et tous ce que feras pour moi. Merci de m'avoir donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Merci d'avoir toujours été là pour moi, tu m'as tenue la main durant toute ma vie, sans toi je ne serai jamais là où j'en suis. Que dieu t'accorde santé et longévité et qu'il m'aide à ce que je puisse accomplir pleinement mes devoirs envers toi.

**Ma très chère mère** : tu as consacré le meilleur de toi-même à notre éducation et à notre réussite. Ce travail est le fruit de tes efforts, de ton amour, de tes encouragements et de tes prières. Tes peines et sacrifices n'ont pas de mesure à mes yeux. Aujourd'hui j'aimerais t'offrir la récompense de tes efforts en te disant toute la fierté de t'avoir comme maman. Que dieu t'accorde longue vie auprès de nous.

J'espère que vous trouverez dans ce travail, une infime partie de ma reconnaissance.

**Ma petite sœur Zahia** : que j'estime beaucoup, tu as toujours été près de moi, tu m'as épaulé et accompagné lorsque j'en avais besoin. Que ALLAH t'accorde une vie heureuse et un avenir prospère

Tous les membres de ma famille paternelle et maternelle : MERCI !

**Tous mes ami(e)s** : Merci pour votre soutien et votre encouragement. **Taoues et Myriam** merci pour votre sérieux et tous le temps que vous avez consacré pour ce travail.

Merci pour toutes ces fois où j'ai pu compter sur vous et merci pour les fabuleux moments qu'on a passé ensemble. « *L* ».



*Lydia BEN BEKKOU*

L'antibiorésistance et l'émergence récente des bactéries multirésistantes (PDR, MDR et XDR) représentent un danger permanent pour la santé publique, de par leur diffusion rapide et la difficulté que rencontrent les médecins pour le traitement des infections provoquées par ces bactéries. L'objectif de cette étude était l'évaluation de l'action des huiles essentielles de trois plantes médicinales connues pour leur activité antibactérienne (*Thymus serpyllum*, *Eucalyptus globulus*, *Syzygium aromaticum*) vis-à-vis des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE ainsi que l'effet de la combinaison de ces huiles avec les antibiotiques.

Quatre souches cliniques multirésistantes de *Klebsiella pneumoniae* BLSE (3511, 3520, 1216 et 5111) et trois souches de références (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ont été soumises à l'effet des trois huiles essentielles sur boîte pétri gélosée et par la méthode de disques ; les résultats d'activité ont montré une forte activité pour l'huile du thym et une activité plus modérée pour les huiles d'*Eucalyptus* et clou de girofle. Quant aux tests d'interaction entre les huiles et les antibiotiques, une importante synergie est apparue entre l'huile essentielle du thym sauvage et l'amoxicilline + acide clavulanique avec une moyenne de zones d'inhibition de 36.66mm pour la souche 3511 et 38mm pour la souche 1216 ce qui correspond à une augmentation de 2 à 4 mm en comparaison avec les diamètres des disques d'antibiotiques et des huiles seuls. Tandis que les résultats des combinaisons entre les huiles de clou de girofle et d'*Eucalyptus* avec les autres antibiotiques ont montré pour la plupart un effet antagoniste.

En conclusion, il a été constaté un effet antibactérien des trois huiles essentielles étudiées ainsi que des interactions différentes avec les antibiotiques à savoir une synergie concernant deux souches de *Klebsiella pneumoniae* MDR. L'utilisation des huiles essentielles en combinaison avec les antibiotiques pourrait être de ce faite une alternative à l'utilisation excessive des antibiotiques en thérapeutique pour traiter les infections à germes MDR.

**Mots clés :** Multirésistance, *Klebsiella pneumoniae*, Huiles essentielles, *Thymus serpyllum*, antibiotique, antibiorésistance.

Antibiotic resistance and the recent emergence of multidrug-resistant bacteria (PDR, MDR and XDR) represent a permanent danger to public health because of their rapid spread and the difficulty that doctors have in the treatment of the infection caused by these bacteria. The goal of this study was the evaluation of the action of essential oils of medicinal plants known for their antibacterial activity (*Thymus serpyllum*, *Eucalyptus globulus*, *Syzygium aromaticum*) towards *Klebsiella pneumoniae* ESBL's strains as well as the effect of the combination of these oils and antibiotics.

Four multi resistant clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* ESBL (3511, 3520, 1216 and 5111) and three reference strains (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) were subjected to the effect of the three essential oils on agar petri dish and by the method of discs; the EO activity results showed a strong activity for thyme oil and moderate activity of the EO of *Eucalyptus* and Clove. Meanwhile the interaction tests between oils and antibiotics shown an important synergy between the essential oil of the wild thyme and amoxicillin + clavulanic acid with an average of inhibition zones of 36.66mm for the strain 3511 and 38mm for the strain 1216 which corresponds to an increase of 2 to 4 mm by comparison with the diameters of the essential oils and the antibiotic alone. In the other hand the results of the combinations between the oils of the clove and *Eucalyptus* with the other antibiotics showed for the most of them an antagonist effect.

In conclusion, an antibacterial effect was found for the three essential oils studied as well as different interactions with antibiotics namely a synergy concerning two strains of *Klebsiella pneumoniae* MDR. The use of essential oils in combination with antibiotics could therefore be an alternative to the excessive use of antibiotics in therapy to treat MDR germ infections.

**Keywords:** Multiresistance, *Klebsiella pneumoniae*, Essential oils, *Thymus serpyllum*, antibiotic, antibiotic resistance

تشكل المقاومة البكتيرية ضد المضادات الحيوية والظهور المؤخر للبكتيريا المقاومة لمضادات حيوية متعددة (MDR, PDR, XDR) خطراً دائماً على الصحة العامة بسبب انتشارها السريع والصعوبة التي يواجهها الأطباء في معالجة الالتهابات الناجمة عن تلك البكتيريا. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم عمل الزيوت الأساسية لنباتات طبية معروفة بنشاطها المضاد للبكتيريا (*Thymus serpyllum* و *Eucalyptus globulus* و *Syzygium aromaticum*) نحو سلالات *ESBL Klebsiella pneumoniae* بالإضافة إلى التأثير الناتج عن مزيج تلك الزيوت مع المضادات الحيوية.

تعرضت أربع سلالات سريرية متعددة المقاومة من (*ESBL5111* و *Klebsiella* 3511, 3520, 1216) و *Klebsiella pneumoniae* ثلاث سلالات مرجعية (*ATCC700603 Klebsiella pneumoniae* و *ATCC25922 Escherichia coli* و *ATCC27853 Pseudomonas aeruginosa*) لتأثير ثلاث زيوت أساسية على طبق أجار بتري و بطريفة الأقراص؛ أظهرت نتائج تأثير الزيوت نشاطاً قوياً لزيوت الزعتر و تأثير متوسط لزيوت الكاليتوس و القرنفل. بينما في اختبارات التفاعل بين الزيوت والمضادات الحيوية، ظهر تأثير تآزري مهم بين الزيت الأساسي للزعتر البريواأموكسيسيلين + حمض الكلافولانيك بمناطق تثبيط يبلغ قطرها 36.66 ملم للسلالة 3511 و 38 ملم للسلالة 1216 الذي يقابل زيادة قدرها 2 ل 4 ملم مقارنة مع اقطار أقراص المضادات الحيوية والزيوت وحدها بينما أظهرت نتائج التركيبات بين الزيوت الكاليتوس و القرنفل والمضادات الحيوية الأخرى في الغالب تأثيراً معادياً.

في الختام، تم العثور على تأثير مضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية الثلاثة التي تمت دراستها بالإضافة إلى تفاعلات مختلفة مع المضادات الحيوية وهي التآزر فيما يتعلق بسلالتيين من *Klebsiella pneumoniae* متعددة المقاومة. لذلك يمكن أن يكون استخدام الزيوت الأساسية مع المضادات الحيوية بديلاً عن الاستخدام المفرط للمضادات الحيوية في العلاج لمعالجة الالتهابات الجرثومية المتعددة المقاومة.

**الكلمات الرئيسية:** مقاومة متعددة، *Klebsiella pneumoniae*، الزيوت الأساسية *Thymus serpyllum*،

المضادات الحيوية، مقاومة المضادات الحيوية، المضادات الحيوية

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ARN** : Acide ribonucléique.

**ATB** : Antibiotique.

**ATCC** : American Type Culture Collection.

**BLSE** : Bêta-lactamases à spectre étendu.

**BMR** : Bactéries Multirésistantes.

**CAP** : peptides antimicrobiens cationiques.

**CG** : Clou de girofle.

**Cm** : Centimètre

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**COV** : Composé Organique volatile.

*E. coli* : *Escherichia coli*

**EGM** : Eléments génétiques mobiles

**FICI** : Indice de concentration inhibitrice fractionnelle

**G**: Gramme

**HE /HEs**: Huiles essentielle(s).

**HGI**: Human Genetic Information.

*K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*.

**KPC**: *Klebsiella pneumoniae* Carbapénémase

**LPS** : Lipopolysaccharide.

**MBL** : Métallo- $\beta$ -lactamases.

**MDR** : Multi-Drug Resistance (multirésistance aux médicaments).

**Mg**: Milligramme

**MH**: Mueller Hinton.

**MLST**: MultiLocus Sequencing Typing.

**Mm**: Millimètre

**NDM**: New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase.

**Nm** : Nanomètre

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*

**PLP ou PBP** : Protéine liant la pénicilline ou Penicillin-binding protein

**PDR** : Pan-Drug Resistance

**PMQR** : La résistance aux quinolones à médiation plasmidique.

**RAM** : Résistance aux antimicrobiens.

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

**SEF** : Extraction par fluide supercritique.

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

**TRI** : TEM résistantes aux inhibiteurs

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

**°C** : degré Celsius

**$\mu$ l** : Microlitre

N°	Titre	Page
Tableau 1	Mécanisme de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> vis-à-vis de différents antibiotiques.	12
Tableau 2	Classification des $\beta$ -lactamases selon Ambler et leurs mode d'action.	14
Tableau 3	Classification des $\beta$ -lactamases selon Bush Jacoby (2009) et leurs enzymes respectives.	15
Tableau 4	Les différents composants chimiques des huiles essentielles.	28
Tableau 5	Matériel utilisé.	48
Tableau 6	Origine des souches utilisées.	49
Tableau 7	Plantes utilisées pour l'extraction des huiles.	50
Tableau 8	Rendement et masse d'huile essentielle obtenue par la technique d'entraînement à la vapeur.	51
Tableau 9	Antibiogramme des souches cliniques utilisées.	52
Tableau 10	Activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis des souches cliniques et des souches de référence.	58
Tableau 11	Résultats de l'interaction de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> et des antibiotiques.	63
Tableau 12	Résultats de l'interaction de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> et des antibiotiques.	66
Tableau 13	Résultats de l'interaction de l'huile essentielle de <i>Thymus serpyllum</i> et des antibiotiques.	68

N°	Titre	Page
Figure 01	Colonies de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur MacConkey	06
Figure 02	Histogramme comparatif du taux de résistance des souches de <i>K. pneumoniae</i> et <i>E.coli</i> aux ATB	13
Figure 03	<i>Eucalyptus globulus</i>	34
Figure 04	Clou de girofle séché	38
Figure 05	<i>Thymus serpyllum</i>	40
Figure 06	Images de coloration de gram des souches utilisées	49
Figure 07	Distillateur d'huiles essentielles	50
Figure 08	Huiles essentielles extraites	51
Figure 09	Illustration de la technique de l'aromatogramme	54
Figure 10	Images de l'activité de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	58
Figure 11	Images de l'activité de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	59
Figure 12	Images de l'activité de l'huile essentielle de <i>Thymus serpyllum</i>	60
Figure 13	Images des interactions entre les ATB et l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i>	64
Figure 14	Images des interactions entre les ATB et l'HE de <i>Syzygium aromaticum</i>	66
Figure 15	Images des interactions entre les ATB et l'HE de <i>Thymus serpyllum</i>	69

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	01
Partie 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : <i>KLEBSIELLA</i> ET LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	
I)- <i>Klebsiellapneumoniae</i> .....	05
1. Dénomination.....	05
2. Classification.....	05
3. Caractères biologiques .....	06
3.1. Morphologie .....	06
3.2. Caractères cultureux.....	06
3.3. Caractères biochimiques et enzymatiques.....	07
3.4. Génétique .....	07
3.5. Structure antigénique.....	08
4. Habitat .....	08
5. Pouvoir pathogène .....	08
II)- La résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	09
1. Historique .....	09
2. Définition.....	10
3. La résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
3.1. Type de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	11
3.2. Mécanisme de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	11
4. Les $\beta$ -lactamases.....	13
4.1. Définition .....	13
4.2. Classification des $\beta$ -lactamases .....	13
5. Les BLSE .....	17
5.1. Généralité.....	17
5.2. Définition.....	18

5.3. Classes de BLSE.....	18
6. La multirésistance de <i>klebsiella pneumoniae</i> .....	21
6.1. Les pan Drug Resistant .....	22
6.2. Les Multi Drug Resistant.....	22
6.3. Les souches XDR .....	23
Chapitre II : LES HUILE ESSENTIELLES ET LEURS ACTIVITES	
I. Généralités sur les huiles essentielles .....	25
1. Historique .....	25
2. Définition.....	26
3. Caractéristiques des huiles essentielles .....	26
4. Composition chimique des huiles essentielles.....	27
5. Techniques d'extraction des huiles .....	29
5.1. Distillation.....	29
5.2. Par solvant organique.....	30
5.3. Enfleurage.....	30
5.4. Macération .....	31
5.5. Expression à froid .....	31
5.6. Extraction assisté par micro-onde.....	31
5.7. Extraction par fluide à l'état supercritique .....	32
6. Conservation des huiles.....	32
7. Activité biologique et mode d'action des huiles essentielles .....	33
II. Les huiles essentielles.....	34
1. Huile essentielle de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	34
1.1. Généralités sur la plante <i>Eucalyptus</i> .....	34
1.2. Description physiologique .....	34
1.3. Habitat.....	35
1.4. Rang taxonomique .....	35
1.5. L'huile essentielle .....	35
2. L'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> .....	37
2.1. Caractéristique de la plante .....	38
2.2. Classification systématique .....	38
2.3. Composition chimique.....	38
2.4. Activité biologique.....	39
3. Huile essentielle <i>Thymus serpyllum</i> .....	40
3.1. Description morphologique.....	40
3.2. Habitat.....	40

3.3. Classification taxonomique .....	41
3.4. Utilisation thérapeutique .....	41
3.5. Huile essentielle de <i>Thymus serpyllum</i> .....	41
III. Association Antibiotique-Huile essentielle.....	43
1. Généralité.....	43
2. Quelques exemples .....	44
3. conclusion.....	45
Partie 2 : PARTIE EXPERIMENTALE	
I. MATERIELS ET METHODES	
1. Objectif du travail.....	48
2. Matériels.....	48
2.1. Matériel de laboratoire .....	48
2.2. Matériel biologique .....	48
3. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de disques .....	53
3.1. Vérification de la pureté des souches .....	53
3.2. La réalisation des tests de l'activité des huiles essentielles.....	53
4. Détermination de types d'interaction entre les huiles et les antibiotiques .....	55
II. RESULTATS ET DISCUSSIONS	
1. Activité antibactérienne des huiles essentielles .....	58
2. Etude de types d'interactions entre les huiles essentielles et les antibiotiques .....	63
Conclusion .....	74
Références.....	76
Annexes	

# INTRODUCTION

Depuis la moitié du 20<sup>ème</sup> siècle les bactéries multirésistantes représentent un véritable danger pour la santé publique. Selon l'OMS la résistance aux antibiotiques représentent l'une des dix plus grandes menaces pour la santé publique auxquelles était confrontée l'humanité ; Le coût de la résistance aux antimicrobiens pour l'économie est également considérable à cause des durées plus longue de la maladie qui se traduisent pas des séjours prolongés à l'hôpital, le besoin de recourir à des médicaments plus onéreux et des difficultés financières pour les personnes touchées, sans oublier le nombre de personnes dont le traitement échoue ou décédées qui augmente chaque année rendant ainsi certains actes médicaux comme les interventions chirurgicales, la chimiothérapie anticancéreuse ou la transplantation d'organes plus risqués. **(OMS, 2020)**

Cette multirésistance est due à des mutations du matériel génétique bactérien ou/et acquise par une autre bactéries à partir des divers voies de transfert génétique, elle touche tous les types de bactéries et particulièrement les gram négatif chez qui ce phénomène est le plus transmissible, cette émergence rapide est initialement limitée à quelques souches cliniques ; cependant depuis les années 1980 le nombre de souches multirésistantes a connu une augmentation exponentielle et avec elle la nécessité de trouver des moyens pour contrer ce phénomène. **(Philippon, 2008)**.

*Klebsiella pneumoniae* est un bacille gram négatif responsable des infections nosocomiales et urinaires chez l'Homme qui sont pour la plus part mortelle, celle-ci est grandement concernée par la multirésistance aux antibiotiques, en effet depuis les années 1980 avec l'introduction des céphalosporines 3<sup>ème</sup> génération des genre de *Klebsiella* résistances aux  $\beta$ -lactamines virent le jour, on les appelle les BLSE pour « $\beta$ -lactamase à spectre élargi » **(Philippon, 2008)**, cette résistance pose un gros problème quant aux soins des infections à *Klebsiella* car elle touche tous les antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines. **(Nordman, 2010)**

Autre fois il était possible de soigner les infections à *Klebsiella pneumoniae* avec les nouvelles générations de céphalosporines utilisées généralement comme antibiotique de dernier recours, mais depuis l'émergence des BLSE, ce n'est plus possible à cause de la résistance.

Actuellement, la recherche s'oriente vers des alternatives moins couteuse et moins dangereuse pour la lutte des bactéries multirésistantes, pour la plupart le choix s'est porté sur l'utilisation des huiles essentielles ; celles-ci, sont des molécules naturellement présentes dans

différentes parties des plantes et obtenues par divers méthodes d'extraction, elles possèdent un nombre de molécules naturelles complexes dont le pouvoir biologique est puissant contre la propagation de différents agents microbiens notamment les bactéries, virus et mycètes. **(Bouyahya et al., 2017)**

Les HEs contiennent pour la plus part des composés terpénoïques et phénylpropanoïques qui détruisent l'intégrité des cellules bactériennes puisqu'elles agissent majoritairement sur la paroi ainsi que les membranes et permettent la destruction de celles-ci, il est donc tout à fait normal qu'elles soient utilisées pour la lutte contre l'antibiorésistance **(Bouyahya et al., 2017)** ; cependant, malgré ces importants effets, l'action des HEs est souvent restreinte et ne permet pas une destruction totale des bactéries multirésistantes, c'est pourquoi des travaux visant à combiner l'effet antimicrobien des HEs et des antibiotiques ont récemment vu le jour, la plus part dans un but d'étudier les potentiels synergiques entre les molécules d'antibiotiques et des huiles.

Dans le cadre de notre étude, nous sommes amenés à utiliser trois HEs extraites de trois plantes différentes dans l'objectif de :

- Déterminer l'activité antimicrobienne des HEs sur des souches cliniques et multirésistantes de *Klebsiella pneumoniae* ainsi que des souches de référence (*K. pneumoniae* ATCC700603, *E. coli* ATCC25922 et *P. aeruginosa* ATCC27853).
- Identifier le type d'interaction observé lors de la combinaison entre l'HEs et l'antibiotique.

PARTIE 1

SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE

# CHAPITRE I

## *KLEBSIELLA PNEUMONIAE ET LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES*

Les entérobactéries sont des bacilles Gram négatif facultatifs, retrouvés partout : dans le sol, eau et surtout dans l'intestin des animaux à sang chaud et l'homme. Elles comprennent un nombre très élevé de genres et d'espèces. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente de mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier. (Verheagen, 2017)

*Klebsiella pneumoniae* l'espèce type du genre *Klebsiella*, appartenant à la famille des entérobactéries, est caractérisé par sa multirésistance à plusieurs familles d'antibiotiques et sa virulence. D'où sa classification dans la liste OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche-développement de nouveaux ATB en 2017.

## **I. *Klebsiella pneumoniae* :**

### **1. Dénomination :**

En 1882 Carl Friedländer a décrit la première fois *Klebsiella pneumoniae* comme un bacille encapsulé après l'avoir isolé des personnes mortes de pneumonie ; la bactérie fût nommée originalement « Bacille de Friedländer » ou pneumobacilles, le genre *Klebsiella* fût nommé en 1886 par Trevisan pour honorer le microbiologiste allemand Edwin Klebs (1834-1913), l'espèce type *Klebsiella pneumoniae*.

### **2. Classification :**

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma proteobacteria*

Ordre : *Enterobacterales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Klebsiella*

Espèce : *Klebsiella pneumoniae*

Suite au séquençage de l'ARN 16S, l'espèce *Klebsiella pneumoniae* est subdivisé en 3 sous espèces : *K. pneumoniae subsp pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp ozaenae*, *K. pneumoniae subsp rhinoscleromatis*. (NCBI)

### 3. caractères biologiques :

#### 3.1. Morphologie :

*K. pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif aéro-anaérobie facultatif, de 0,3 à 0,6 µm de diamètre et 0,6 à 6µm de longueur avec extrémités arrondies (**Abbot, 2007**). Elles se présentent sous forme isolées, groupées, en diplobacilles ou en courtes chaînettes. Elles sont caractérisées par leur immobilité et elles sont non sporulées et capsulées.

Les colonies de *Klebsiella* sont de 3 à 4mm de diamètre. Elles sont grandes, rondes, lisses, bombées, brillantes et visqueuse et à aspect muqueux et parfois filante à l'anse de platine, et sont lactose positive (**Le Minor and Véron, 1989**).



**Figure 01** : Colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur MacConkey

#### 3.2. Caractères Cultureux :

Elle se cultive à la fois sur gélose et bouillon liquide.

Sur gélose elle se développe en aéro-anaérobiose, sur milieux classiques utilisés pour entérobactéries (gélose nutritive, gélose Hektoen, gélose Mac conkey, ...etc.), après incubation à 37°C pendant 18 à 24h on observe un virement de couleur du milieu dû à la fermentation du lactose.

Sur milieu liquide (bouillon nutritif) la culture est généralement rapide environ quelques heures à 30-37°C avec un dépôt muqueux et un halo visqueux en surface ; sur bouillon lactose bilié vert brillant à 44°C il y a fermentation du lactose avec production de gaz (**Le Minor and Véron, 1989**)

### 3.3. Caractères biochimique et enzymatique :

*Klebsiella pneumoniae* est du genre fermentatif, elle fermente de nombreux sucres comme le glucose par la voie du butane-2,3-diol avec production de gaz et le lactose. Elle est oxydase négatif, catalase positif, et elles sont productrices de Lysine décarboxylase donnant un résultat positif au test Voges-Proskauer (VP) qui est un caractère clé dans l'identification de cette bactérie (**Grimont et Grimont, 2005**).

### 3.4. Génétique :

Il a été démontré que le matériel génétique de *K. pneumoniae* conduit à une grande diversification du genre ainsi que ces mécanismes de défenses.

En effet le génome à une taille de 6mdp et code pour près de 6000 gènes dont 1700 présent dans tous les espèces de *Klebsiella pneumoniae* (**Henson et al, 2017**)

Ces gènes peuvent codés pour 100.000 protéines (**Holt, 2015**)

Suite à cela, de nombreux clones de *Klebsiella pneumoniae* furent identifiés, un clone cellulaire est définit comme étant un ensemble de cellules d'un même patrimoine génétique obtenu in vitro par mitose successive à partir d'une cellule somatique.

Ces groupes de clones sont définit par le cgMLST (Core genom MLST) qui représente la partie invariable de génome présente chez une population bactérienne, elle contient généralement une centaine de millier de gènes et permet dans le cas de *K. pneumoniae* de comparer un grand nombre de genre au sein d'un groupe de souches (**Dekker, 2016**).

Les clones de *K. pneumoniae* peuvent être distingués entre eux par leur patrimoine génétique (**Holt, 2015**), ceci s'explique par adaptation de niche spécifique au clone par transmission horizontale de gènes (HGI) (**McInerney, 2020**), l'adaptation de ces clones sont également un problème quant à l'émergence de clones multirésistants.

*K. pneumoniae* a été divisé en 3 phylogroupes distincts : KPI, KPII, KPIII ; ces groupes sont basés sur le séquençage d'un nombre réduit du gène (**Brisse, 2001**) (**Fevre et al, 2005**).

### 3.5. Structure antigénique :

*Klebsiella pneumoniae* possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté antigène flagellaire (H) du fait de son immobilité.

On distingue :

-Antigène O= antigène somatique : représente l'antigène de la paroi des entérobactéries caractérisé par leur : thermostabilité, deux fractions : protéinique et polysidique qui déterminent la spécificité de l'antigène ainsi qu'une fraction lipidique qui, liée au polyside responsable de la toxicité de la bactérie. L'étude de ces antigènes permet de classer en sérotype ou sérovar les bactéries appartenant à une espèce.

-Antigène K= antigène capsulaire ou d'enveloppe au moins 77 antigènes K ont été décrit chez *K. pneumoniae* de K1 à K72, K74, K79 à K82. Les souches les plus souvent pathogène pour l'homme et les animaux appartiennent aux types capsulaires 1 et 2. (**Freney et al, 2000**).

### 4. Habitat :

Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans l'environnement : Elles sont abondantes dans le sol, les eaux et sont des fixateurs d'azote atmosphérique ; elles sont fréquentes dans les selles et peuvent être un indicateur d'une contamination fécale

Elle est à la fois commensale de l'organisme, présente naturellement dans le tube digestif et les voies aériennes de l'homme et des animaux. Et pathogène responsable d'infections variées pouvant être très critiques chez des personnes âgées, fragilisés, alcooliques, hospitalisés : infections des voies respiratoires (pneumonies), septicémies, infections nosocomiales...etc. (**Baerwolf et al, 2002**)

### 5. Pouvoir pathogène :

Pathogène opportuniste important, elle cible les personnes alcooliques, immunodéprimés, malades hospitalisés sous perfusion (cathéter) et le plus souvent en soins intensifs.

*K. pneumoniae* est un pathogène commun à l'origine de pneumonies nosocomiales et plus particulièrement les abcès pulmonaires, les maladies hépatiques, septicémies, les infections urinaires et intestinales dans une moyenne allant de 4 à 20% ; mais elles peuvent aussi causer des infections plus inhabituelles tel que des endocardites, nécrose faciales et d'autres infections similaires. (**Janda, 2006**).

La transmission se fait par voie manuportée, par contact cutané par des objets ou des surfaces contaminées.

Son pouvoir pathogène et sa virulence sont liés à plusieurs facteurs :

-Sa capsule de polysaccharide ; elle confère à *K. pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose et dans une certaine mesure de certains désinfectant

-La production de sidérophores qui consiste en la capture du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) et le réduit en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). (**Podschun, 1998**)

-Production de Lipopolysaccharide (LPS)

-une production d'un complexe extracellulaire toxique pour les tissus pulmonaires, cet effet est lié à la capsule. (**Podschun, 1992**). (**Williams, 1990**)

-une production d'adhésine lui permettant de produire des biofilms. (**Sebghati et al. 1998**).

## **II. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques :**

La résistance bactérienne ou antibiorésistance n'a ni frontières nationales, ni domaine professionnel réservé, ni barrières d'espèces. Partout dans le monde, la santé des hommes comme celle des animaux est menacée par ce phénomène ; apparue rapidement après l'introduction des antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance, caractérisée par son mécanisme et son support génétique, est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multirésistantes.

### **1. Historique :**

Depuis les années 1950, l'utilisation des antibiotiques devint de plus en plus récurrente créant une situation nommée « le confort antibiotique » (**Andremont, 2016**) qui désigne l'utilisation abusive d'antibiotiques pour soigner les plus petites infections (ex : furoncles...etc). Celui-ci devenu fréquent, a créé un dangereux nombre de résistance bactérienne vis-à-vis de certaines substances.

-La première trace connue de bactérie résistante fut en 1942 en Angleterre par une épidémie de *Staphylococcus aureus* résistante à la pénicilline ; pour contrer cela les scientifiques synthétisèrent des molécules de pénicillines résistantes à la pénicillinase (**Rammrelkamp & Maxon, 1942**).

- En 1948, la première revue sur la résistance des antibiotiques fût publiée (**Bailey *et al.*,1948**).
- En 1950, Joshua Lederberg travaille sur la caractérisation des nouveaux modes de transmissions génétiques entre les bactéries et étudie la biologie des plasmides et la transduction. (**Brock, 1990**).
- En 1959 l'atteinte d'un patient japonais par une infection à *Shigella* multirésistante donne du crédit aux travaux de Lederberg sur la transmission de la résistance par les chemins plasmidiques, par le facteur de résistance nommé Facteur « R ».
- Durant les années 1970, les premières SARM furent signalées aux USA (**Chambers *et al.*, 2007**).
- Entre les années 1980 et 1990, des souches résistantes aux  $\beta$ -lactamines furent signalées en Australie et en Europe avec comme chef de fil *Streptococcus pneumoniae* ainsi que *Klebsiella pneumoniae* (**Appelbaum, 1992**).
- En fin des années 1990, la résistance aux sulfamides émerge dans les cliniques et les milieux hospitaliers.
- Pendant les années 2000, c'est *Salmonelle* qui devient résistante aux antibiotiques auxquels elle était sensible par le passé dont les  $\beta$ -lactamines, et les macrolides en 2010(**Karkey *et al.*, 2018**).
- En 2015 L'OMS lance un plan global de lutte contre l'antibiorésistance et l'utilisation anarchique des ATB, en effet la fréquence et la distribution de la résistance bactérienne est en constante augmentation donnant naissance à des souches multirésistantes et difficile à combattre. (**Ebongue *et al.*, 2015**).

## 2. Définition :

La résistance aux antibiotiques ou antibiorésistance est définie par l'inefficacité du traitement antibiotique sur l'infection bactérienne ciblée, les bactéries peuvent être résistantes à un ou plusieurs antibiotiques, on parle alors de bactéries multirésistantes (BMR) qui provoquent chez l'homme et l'animal des infections difficiles à traiter. Les BMR les plus inquiétantes sont les entérobactéries multirésistantes tel que *E. coli* et *K. pneumoniae*. Mais l'antibiorésistance n'est pas spécifique aux bactéries pathogènes uniquement, elle touche également les bactéries bénéfiques et commensales qui constituent le microbiome.

### **3. La résistance de *Klebsiella pneumoniae* :**

#### **3.1. Types de résistances de *Klebsiella pneumoniae* :**

Afin de survivre contre les antibiotiques, *Klebsiella pneumoniae* possède une résistance, celle-ci peut être définie comme la capacité d'une bactérie à résister à l'action d'un ou plusieurs antibiotiques, l'action de cet antibiotique pouvant être bactéricide ou bactériostatique.

Dans le cas de *Klebsiella pneumoniae*, on distingue deux types de résistance : une résistance naturelle ainsi qu'une résistance acquise.

##### **3.1.1. La résistance naturelle :**

Les Klebsielles présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines (Ampicilline - Amoxicilline) et aux carboxypénicillines (Ticarcilline). Cette résistance est représentée par la production d'une pénicillinase chromosomique constitutive de bas niveau. (Yala *et al*, 2001). Celle-ci se caractérise par la persistance d'un diamètre d'inhibition autour des disques d'aminopénicillines.

Egalement, *Klebsiella pneumoniae* possède une imperméabilité grâce à la présence de la membrane externe de nature hydrophobe repoussant ainsi les molécules hydrophiles des antibiotiques.

##### **3.1.2 La résistance acquise :**

Cette dernière concerne l'apparition d'une résistance à –le plus souvent- un seul antibiotique chez une bactérie auparavant sensible à ce même antibiotique, cette résistance peut survenir via différents mécanismes :

-Par diverses mutations génétiques affectant le chromosome de la bactérie, ces mutations peuvent être dû à la surconsommation et l'usage abusif d'antibiotiques.

-Par l'acquisition d'un plasmide de résistance ou d'un fragment de gène par les divers mécanismes de transfert de gènes, c'est-à-dire la conjugaison, transformation, transduction donnant ainsi une résistance plasmidique ou extra chromosomique

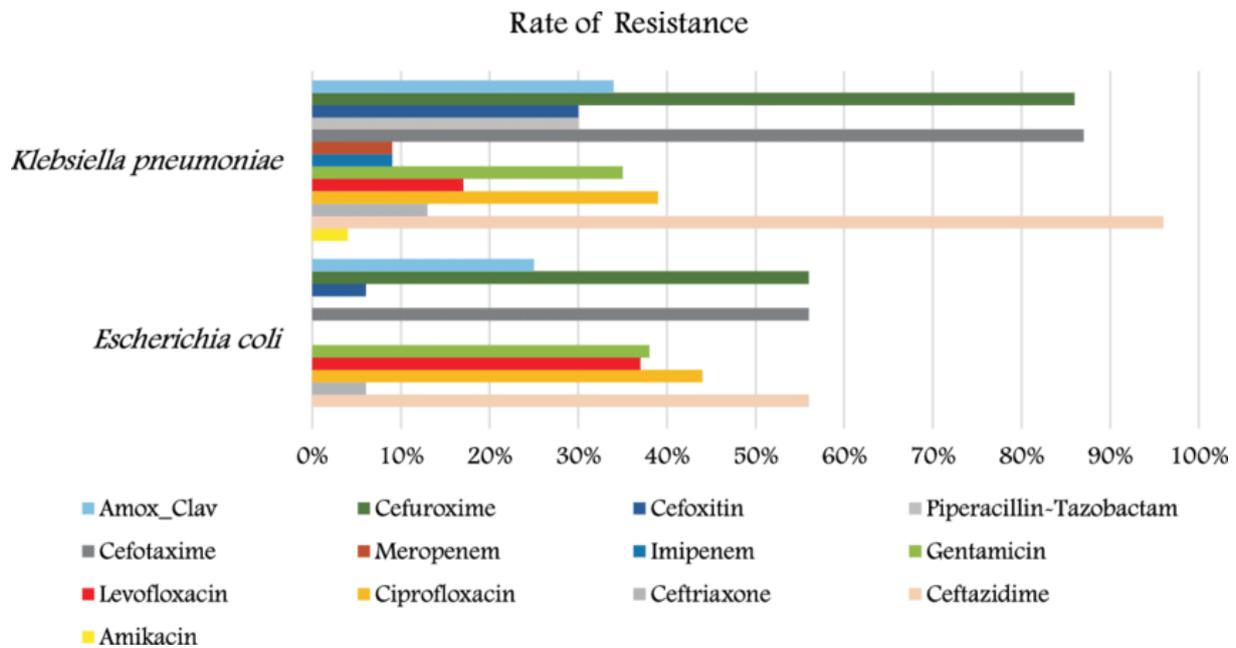
### **3.2. Mécanismes de résistance *Klebsiella pneumoniae* :**

Au fil des années, le spectre de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques s'est étendu atteignant des chiffres considérablement dangereux, ces résistances acquises sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 01** : Mécanismes de résistance de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis de différents antibiotiques

	Mécanisme	Mode d'action	ATB ciblé	Références	
<b>β-Lactamines</b>	Diminution de la perméabilité	Perte de la structure des porines	céfépime	<b>(Yvon, 2006)</b>	
	Production d'un système d'efflux	Présence d'un système d'efflux AcrAB rejetant les antibiotiques	C2G	<b>(Yvon, 2006)</b>	
	Modification des PLP	Mutation du gène codant	Imipenème	<b>(Georgopapadakou, 1993)</b>	
	Inactivation enzymatique	Carbapénémases : -Hydrolyse des céphalosporines par la présence du gène Cr-KPN -Production des β-lactamases		β-lactamines à l'exception des ceftazidimes et céphamycines	<b>(Reyes et al., 2019)</b>
		Céphalosporinases : -Céphalosporinases de bas niveau -Aminopénicillinases de haut niveau (type AmpC)		C1G, C2G, C3G	<b>(Reyes et al., 2019)</b>
		BLSE		Toutes les β-lactamines sauf les carbapénèmes	<b>Cattoir, 2008</b>
<b>Aminoglycosides</b>	Diminution de la perméabilité	Perte des porines	Tous les aminosides	<b>Wang et al., 2020)</b>	
	Altération de la cible	Codage d'une enzyme bloquant les interactions entre l'ATB et l'ARNr16s	Gentamycine, tobramycine, nétilmicine	<b>Wang et al., 2020)</b>	
	Modification enzymatique de l'ATB	-Phosphorylation -Nucléotidylation	Tobramycine, spectinomycine	<b>Wang et al., 2020)</b>	

		-acétylation		
<b>Quinolones</b>	Diminution de l'affinité de la cible (PMQR)	Mutation du gène cible (gyrA, gyrB)	Fluoroquinolone	<b>Wang et al., 2020)</b>
	Production de pompe à efflux MDR	Mutation des gènes régulateurs (QnrS1...)	Norfloxacine et ciprofloxacine	<b>Wang et al., 2020)</b>
	Modification enzymatique	Acétyltransférases	Fluoroquinolone et aminosides	<b>Wang et al., 2020)</b>
	Protéines de protection de la cible	Résistance plasmidique	Acide nalidixique et fluoroquinolone	<b>Wang et al., 2020)</b>
<b>Polymyxines</b>	Modification de la cible	-Modification du LPS par des mutations du gène IpxM. -Mutation de gènes régulateurs (inactivation mgrB)	colistine	<b>Wang et al., 2020)</b>
	Production de pompe à efflux	Surexposition des pompes à efflux AcrAB-TolC et KpnEF	Polymyxine B et colistine	<b>Wang et al., 2020)</b>



**Figure 02** : Histogramme comparatif du taux de résistance des souches *K. Pneumoniae* et *E. coli* aux Antibiotiques

#### 4. Les bêta-lactamases :

##### 4.1. Définition :

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation hydrolysant le pont amide du cycle bêta-lactame (correspondant à la structure de base des  $\beta$ -lactamines) pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. (Elhani, 2012)

Cependant, ces  $\beta$ -lactamases sont inhibées par les inhibiteurs de bêta-lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) qui restaurent en grande partie

L'activité des pénicillines auxquelles ils sont associés. Il s'agit d'un phénomène d'inhibition irréversible avec destruction de l'inhibiteur (action suicide) : l'inhibiteur sert de leurre à l'enzyme et est détruit à la place de la molécule d'antibiotique. En cas de forte production de bêta-lactamases, celles-ci peuvent ne pas être toutes détruites par l'inhibiteur, ce qui conduit à un échec thérapeutique.

La prolifération de ces résistances a souvent lieu dans les unités de soins intensifs ; cette résistance est portée dans la majorité de ces cas par des plasmides de multirésistance

##### 4.2. Classification des $\beta$ -lactamases :

Les  $\beta$ -lactamases forment une classe très diverse et hétérogène d'enzymes, elles sont classées selon deux méthodes :

- Une méthode structurale qui correspond à la classification d'Ambler et qui reste la plus utilisée.
- Une méthode fonctionnelle correspondant à la classification de Bush. **(Dr. Hamzaoui)**

#### 4.2.1. La classification des bêta-lactamases selon Ambler :

Cette classification est fondée sur la séquence primaire en acides aminés d'éléments conservés du site actif. Elle divise ces enzymes d'inactivation en 4 groupes allant de A à D **(Dr Hamzaoui)**

**Tableau 02** : Classification des  $\beta$ -lactamases selon Ambler et leurs mode d'action.

Les $\beta$ -lactamases	Classes	Types d'enzymes	Mode d'action
	Classe A	Possède les pénicillinases à étroit et large spectre TEM et BLSE	S'attaque aux $\beta$ -lactamines sauf carbapénèmes et céphamycines
	Classe B	Métallo- $\beta$ -lactamases et oxacillonases BLSE	Hydrolysent les carbapénèmes
	Classe C	Céphalosporinases AmpC (CMY, DHA, KPC)	Hydrolysent les céphalosporines
	Classe D	Possèdent les carbapénémases et céphalosporinases à large spectre	Hydrolysent les oxacillines, Cloxacilline et les carbapénémases

Les BLSE de classe A sont inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (I $\beta$ L), comme l'acide clavulanique. Au laboratoire, la détection des BLSE de classe A est classiquement basée sur l'observation d'une synergie entre l'acide clavulanique et les C3G, C4G ou l'aztréonam, et une sensibilité conservée à la céfoxitine et à l'imipénème. **(Cattoir, 2008)**

#### 4.2.2. La classification des bêta-lactamases selon Bush :

La classification de Bush Jacoby-Medeiros se repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des B-lactamases aux inhibiteurs, ils sont classés en groupes fonctionnels. **(Dr Hamzaoui)**

**Tableau 03 :** Classification des  $\beta$ -lactamases selon Bush-Jacoby (2009) et leurs enzymes représentatives

Classification d'Ambler	Bush Jacoby groupe 2009	Substrat visé	Caractéristiques	Enzymes représentatives
Classe A	2a	Pénicilline	Hydrolysent les benzylpénicillines et céphalosporines	PC1
	2b	Pénicillines, C1G et C2G	Hydrolysent les benzylpénicillines et céphalosporines	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Céphalosporines à spectre large, monobactames	Augmente l'hydrolyse des oxyimino- $\beta$ -lactames.	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
	2br	Pénicillines	Résistance à l'acide clavulanique, sulbactam et tazobactam	TEM-30, SHV-10
	2ber	Céphalosporines à spectre large, monobactames	Augmente l'hydrolyse des oxyimino- $\beta$ -lactames, Résistance aux inhibiteurs	
	2c	Carbénicilline	Augmente l'hydrolyse des Carbénicilline	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbénicilline, céfépime	Augmente l'hydrolyse des Carbénicilline.	RTG-4
	2 <sup>e</sup>	Céphalosporines à spectre large	Hydrolyse les céphalosporines	CepA
	2f	carbapénèmes	Hydrolyse des carbapénèmes, oxyimino- $\beta$ -lactames, céphamycines	KPC-2, IMI-1, SME-1
Classe B (B1)	3a	carbapénèmes	Hydrolyse à large spectre incluant les carbapénèmes mais pas monobactames	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
Classe B (B2)	3b	carbapénèmes	Hydrolyse les carbapénèmes	CphA, Sfh-1
Classe C	1	Céphalosporines	Hydrolyse les céphalosporines ainsi que les Céphamycines	E. coli AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1,
	1 <sup>e</sup>	Céphalosporines	Augmente l'hydrolyse des Ceftriaxone ainsi que d'autres $\beta$ -lactames	GC1, CMY-37
Classe D	2de	Céphalosporines à spectre élargi	Hydrolyse Cloxacilline ou oxacilline ainsi oxyimino- $\beta$ -lactames.	OXA-11, OXA-15
	2df	Carbapénèmes	Hydrolyse Cloxacilline ou oxacilline ainsi que les carbapénèmes	OXA-23, OXA-48

## 5. Les BLSE :

Dans les milieux hospitaliers les isolats de *K. pneumoniae* possédant des gènes de  $\beta$ -lactamase se sont révélés les plus virulent parmi les isolats d'autres bactéries ; les bêta lactamases à spectre élargie (BLSE) , ont émergé peu de temps après l'introduction des céphalosporines 3<sup>ème</sup> génération durant les années 80 et ont modifié leurs affinité pour les  $\beta$ -lactamines par des mutations diverses, cette résistance constitue une véritable pandémie mondiale et diffuse dans différentes souches d'entérobactéries, principalement par l'utilisation inappropriée des ATB pour la prophylaxie et la traitement humain et agricole. **(Philippon, 2013)**

### 5.1. Généralités :

Les BLSE sont caractérisées par une résistance à haut niveau aux amino-carboxyacyluréidopénicillines ainsi qu'aux céphalosporines de première et deuxième génération, et par une diminution plus ou moins franche de l'activité des C3G, C4G et de l'aztréonam, elles ont été nommées ainsi afin de les différencier de leurs enzymes parentales « les  $\beta$ -lactamases à large spectre » qui n'hydrolysent pas les C3G. **(Dr.Hamzaoui)**

La résistance BLSE des entérobactéries peut être portée de 3 manières, par :

- Présence dans la bactérie ou apportée récemment inactivant les ATB
- Une mutation de la bêta-lactamase les rendant ainsi plus efficace
- Des protéines de régulation de l'activité des porines. **(Briand, 2006)**.

Les BLSE dérivent des enzymes de type SHV et TEM qui sont les premières  $\beta$ -lactamases à avoir été décrite, bien qu'actuellement il existe plus de 300 BLSE identifiées, par exemple OXA, VIM...etc.

Bien qu'il existe d'autre type de BLSE notamment de classe A, ces derniers restent plus rares comparés aux types TEM, SHV et CTX-M, c'est pourquoi ils sont les plus étudiés **(Elhani, 2012)**

Elles dérivent par mutation ponctuelle des gènes de  $\beta$ -lactamases de type TEM-1, TEM-2 et SHV-1 entraînant la substitution de 1 à 4 acides aminés, Ces substitutions touchant moins de 2 % de la séquence protéique, sont suffisantes pour remodeler le site actif de l'enzyme et lui permettre d'être actif sur la plupart des céphalosporines aminothiazoliques en augmentant

L'affinité (Km faible) et les vitesses d'hydrolyse vis-à-vis de ces nouvelles  $\beta$ -lactamines « réputées stables » (C3G), d'où un élargissement du spectre d'inactivation. (Elhani, 2012)

## 5.2. Définition :

Les bêta lactamases à spectre élargi (BLSE) sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes découverte dans les années 80 en France, puis en Allemagne. Elles sont induites soit par des plasmides soit par la mutation du génome naturel chez *Klebsiella* spp, codant pour une bêta lactamase SHV. Les deux mécanismes confèrent aux bactéries touchées la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines. La majorité des BLSE sont le résultat de mutations génétiques de bêta lactamases naturelles, en particulier de TEM-1, TEM-2 et SHV-1. Elles sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines de première génération.

Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime et céfotaxime) et les monobactames (aztréonam). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes (imipénème) et elles sont inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam, les inhibiteurs classiques de bêta lactamases. La présence de BLSE est fréquemment associée à la résistance aux fluoroquinolones.<sup>3</sup> Pratiquement tous les germes Gram négatif possèdent un gène chromosomique qui code pour une céphalosporinase, en général de faible expression et sans hydrolyser efficacement les céphalosporines.

## 5.3. Classes des BLSE :

### 5.3.1. Les premières BLSE :

#### 5.3.1.1. Les BLSE de type TEM :

L'enzyme parentale TEM-1 est la première b-lactamase plasmidique décrite chez les bactéries à Gram négatif en 1965. Elle était produite par une souche d'*E. coli* isolé chez une patiente nommée Temoneira en Grèce, d'où la nomination. Les substitutions d'acides aminés qui ont eu lieu au niveau de l'enzyme TEM sont localisées à des positions limitées au niveau de 4 « hot spots » de la protéine (104, 164, 238 ou 240), ces mutations produisent un phénotype BLSE ; les phénotypes BLSE de type TEM possèdent plus d'une substitution leur conférant un plus large spectre d'action

Beaucoup d'enzymes de type TEM induisent une résistance plus importante à la ceftazidime et à l'aztréonam qu'au céfotaxime, cependant ceux qui possèdent une substitution d'une sérine à la position 238 induisent aussi une résistance au céfotaxime. Actuellement, plus de 160 enzymes de type TEM ont été décrites en se basant sur les différentes combinaisons de changement d'acides aminés. Il est important de noter que tous les mutants des enzymes TEM-1 et TEM-2 ne sont pas des BLSE, comme les enzymes TEM résistantes aux inhibiteurs TRI ou encore les enzymes CMT. (Elhani, 2012).

#### **5.3.1.2 Les BLSE de type SHV :**

Les BLSE de type SHV dérivent toutes de SHV-1 qui est une bêta-lactamase codée par le gène *bleSHV* chromosomique naturellement présente chez les souches appartenant au phylogroupe Kp1 de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*, l'enzyme est responsable de plus de 20% de la résistance plasmidique liée à l'ampicilline.

La désignation SHV est liée au sulfhydryle variable, en effet, les BLSE de type SHV sont caractérisées par la substitution d'acide aminé Gly238Ser, ou de Gly238Ser et Glu40Lys ; le résidu sérine à la position 238 est indispensable à l'hydrolyse de la céfotaxime et le résidu lysine est quant à lui crucial pour l'hydrolyse de la ceftazidime.

Plus de 100 variant SHV BLSE ont été détectés chez *K. pneumoniae*, cependant ces enzymes se sont disséminées chez d'autres entérobactéries tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* (Cattoir, 2008)

#### **5.3.2. Les nouvelles BLSE :**

Depuis les années 90 de nouveaux types de bêta-lactamases vivent le jour et avec elles, l'augmentation de la résistance à d'autres molécules d'antibiotiques, parmi ces nombreuses nouvelles bêta-lactamases on distingue :

##### **5.3.2.1. BLSE de type CTX-M (Céfotaximase -Munich) :**

Au niveau structural, les CTX-M ne sont pas proches des TEM et SHV (<40% d'identité), au niveau de leur spectre d'activité elles hydrolysent préférentiellement la céfotaxime, d'où leur nom de Céfotaximases.

A ce jour, de nombreux variant de CTX-M ont été décrits (>50), et sont classés en 6 groupes phylogénétiques distincts : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et CTX-M-45. Bien que certains variant (ex. CTX-M-15, CTX-M-32) avec une activité de ceftazidimase élevée ont été décrit.

En 15 ans, la diffusion mondiale des BLSE de type CTX-M chez les entérobactéries a explosé de façon extrêmement rapide, d'où le terme de « pandémie CTX-M ». Les études épidémiologiques récentes rapportent que la situation est endémique dans la plupart des pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Sud avec de forts taux de prévalence de CTX-M parmi les souches productrices de BLSE : *E. coli* (de 30 à 90%) et de *K. pneumoniae* (de 10 à 60 %).

#### 5.3.2.2. BLSE de type GES (Guyana Extended-Spectrum $\beta$ -lactamase) :

Les BLSE de type GES sont de plus en plus rapportées chez les BGN, notamment *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*. GES-1 a été initialement décrite chez une souche de *K. pneumoniae* isolée en 1998 en France puis en Argentine, au Brésil, au Portugal et aux Pays-Bas.

Contrairement à la plupart des BLSE, GES-1 n'hydrolyse pas l'aztréonam et GES-2 hydrolyse les carbapénèmes en étant moins sensible aux I $\beta$ L, par une unique mutation GES-2 est le premier exemple de BLSE avec un élargissement du spectre d'activité aux carbapénèmes.

#### 5.3.2.3. BLSE de type OXA (Oxacillinase) :

Bien que les BLSE appartiennent souvent à la classe A, plusieurs oxacillinases (classe D et classe 2d) ont des propriétés de BLSE. Les  $\beta$ -lactamases de type OXA confèrent la résistance à l'ampicilline et à la céfalotine, et sont caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (oxacilline, Cloxacilline) mais elles n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G, de plus elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique.

Les  $\beta$ -lactamases de type OXA représentent une famille phylogénétiquement très hétérogène et dérivent de OXA-10, de OXA-13, de OXA-2, la plupart des BLSE dérivées de OXA-10 confèrent une résistance plus élevée au céfotaxime

Elles sont principalement retrouvées chez *P. aeruginosa*, mais ont aussi été détectées chez d'autres BGN dont les entérobactéries. **(Cattoir, 2008)**

Actuellement, le risque couru par l'émergence des BLSE dans le traitement des pathologies bactériennes réside dans le transport du gène de mutation entre les souches bactériennes multirésistantes, le risque de transmission étant estimé à 28% pour les souches de BLSE contre 1.7% pour les souches non BLSE, et la transmission de souches de BLSE s'est avérée responsable du doublement de la prévalence de *K. pneumoniae* BLSE, qui s'est passée de 15% à >30% en moins d'un an.

## 6. La multirésistance de *Klebsiella pneumoniae* :

Le terme résistance aux antimicrobiens (RAM) est devenu un mot pour résumer l'une des questions les plus urgentes à la santé humaine mondiale ; l'émergence de pathogènes résistants à la majorité ou à la totalité des antibiotiques de première ligne prescrits. Cependant, l'antibiorésistance est une zone presque infiniment complexe, Les fonctions qui sont à l'origine de diverses résistances antimicrobiennes observées dans la nature sont vastes.

En tant que tel, nous avons choisi de nous concentrer sur ce que nous considérons comme l'un des plus grand problème d'antibiorésistance pertinents pour la santé publique mondiale, l'évolution et l'émergence d'agents pathogènes gram négatifs qui sont multirésistants aux antibiotiques (MDR). La RAM dans les bactéries gram-négatives n'est pas un nouvel événement, en effet L'émergence de clones bactériens a permis l'acquisition de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) conférant une résistance aux céphalosporines de troisième génération telles que la ceftazidime et la ceftriaxone. Ces gènes se trouvent sur les plasmides qui portent également des gènes de résistance à d'autres antibiotiques cliniquement importants n'appartenant pas à la famille des  $\beta$ -lactamines.

L'augmentation de souches MDR *K. pneumoniae* hyper virulentes ainsi que d'autres espèces sont un problème préoccupant pour la santé publique ; l'agent commun à l'émergence de tous ces clones dominants de MDR *E. coli* et *K. pneumoniae* sont les plasmides. En effet, la diffusion des BLSE tels que blaCTX-M et carbapénémases blaNDM et blaKPC sont dominés par les plasmides de la famille IncF, qui sont presque exclusivement responsable de la diffusion globale de blaCTX-M.

Il est commun pour les plasmides MDR d'avoir plusieurs copies du même gène de résistance, Ces multiplications de gènes résultent de la division indépendante de ces derniers. **(Dunn et al, 2022)**

Le nombre croissant d'infections à *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux antimicrobiens, particulièrement par les BLSE et la carbapénémases produites par les KPC, a désigné *K. pneumoniae* comme étant une « menace urgente » et un « agent pathogène prioritaire » par les organismes de santé publique. Les analyses moléculaires des isolats de *K. pneumoniae* ont mis en évidence l'émergence rapide de souches multirésistantes (MDR) attribuée à la propagation géographique de groupes clonaux (GC ; p. ex., CG15, CG101, CG147, CG258, CG307), dont certains sont porteurs de plasmides de résistance épidémique.

Pour traiter les infections à *K. pneumoniae* multirésistante, on utilise des médicaments de dernier recours comme les polymyxines (surtout la colistine) et la tigécycline.

### 6.1. Les Pan Drug Resistant (PDR) :

Une résistance est actuellement observée aux ATB de dernier recours, en particulier à la colistine, et risque d'aboutir à l'émergence et à la propagation de souches résistantes. Les souches de *K. pneumoniae* PDR (Pan Drug Resistant) laissent peu d'options thérapeutiques et sont associées à des taux de mortalité élevés. **(Rodriguez et al, 2022)**

La crise mondiale de résistance aux antimicrobiens (RAM) est l'une des trois plus grandes menaces pour la santé humaine, comme l'a souligné l'OMS. La fréquence des infections causées par ces bactéries a augmenté chaque année au cours des vingt dernières années, et on estime qu'elle est responsable d'au moins de 35000 décès chaque année aux États-Unis. Malgré les profondes conséquences cliniques et économiques causées par l'antibiorésistance, seules quelques nouvelles classes d'antibiotiques ont été approuvées pour utilisation clinique au cours des quatre dernières décennies. La diminution du nombre d'antibiotiques, conjuguée à l'augmentation de la résistance, menace le système de santé moderne. Ce qui implique la nécessité de nouvelles thérapies pour lutter contre les infections causées par ces « super bactéries » en cette ère post-antibiotique. Les pathogènes à Gram négatif comme *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* sont responsables du nombre croissant d'infections nosocomiales difficiles à traiter, car ils ont accumulé une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques. **(Hussein et al, 2022)**

### 6.2. Les Multi Drug Resistant (MDR) :

*Klebsiella pneumoniae* MDR est devenu une menace pour la santé publique ; en soi, elle a des facteurs de virulence liés à une mortalité élevée ainsi qu'une faible réponse au traitement. *Klebsiella pneumoniae* MDR a été étudiée pendant un certain temps en Amérique latine et en particulier au Pérou en 2016, où une proportion accrue d'entérobactéries portait le gène NDM (67,5%) par rapport aux bactéries productrices de carbapénémases (KPC) (31,3 %) et aux bactéries NDM de type actif-sur-imipenème (1,2 %). Sacsquispe et al ont déterminé que le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes est l'expression de la carbapénémase blaNDM. **(Arteaga- Livias et al, 2021)**

Un autre mécanisme facilitant la propagation des MDR est l'utilisation irrationnelle d'antibiotiques, qui ont été prescrit en raison de la suspicion par rapport aux infections

superposées. Des rapports internationaux indiquent que jusqu'à 70 % des patients hospitalisés pour la COVID-19 reçoivent des antibiotiques souvent à large spectre, malgré des résultats qui indiquent une faible proportion d'infections bactériennes. Pour cette raison, les recommandations thérapeutiques ne recommandent pas l'utilisation d'antibiotiques dans les patients atteints d'une maladie légère ou modérée, sauf si la suspicion à une infection bactérienne est importante. (Arteaga- Livias *et al*, 2021)

### 6.3. Les souches XDR :

Les bactéries XDR sont différentes des MDR et PDR, Le terme a d'abord été inventé en réponse à *Mycobacterium tuberculosis* qui était résistant aux agents de première génération (isoniazide et rifampicine), à une fluoroquinolone et à un ou plusieurs médicaments parentéraux de deuxième génération. (Amikacine, kanamycine et capréomycine). Elle a ensuite été étendue à d'autres bactéries qui étaient résistantes à la plupart des traitements antimicrobiens standards.

La prévalence exacte des bactéries XDR peut être difficile à estimer. Des études menées dans des hôpitaux du centre de l'Inde ont révélé que 13,8 % des souches bactériennes étaient des bactéries XDR et que 37,1 % étaient des bactéries multirésistantes. Parmi les patients, 1,6 % avaient des infections bactériennes par XDR et 4,2 % avaient des bactéries multirésistantes. Cependant, étant donné que l'étude a été réalisée dans un centre de soins tertiaire, les niveaux peuvent être plus élevés que la moyenne.

Ces études ont révélé qu'il y avait plus de souches bactériennes Gram-positives que Gram-négatives. La majorité des souches XDR trouvées dans la section chirurgicale de l'hôpital, sont pour la plupart des staphylocoques coagulés positifs ou des espèces de *Pseudomonas aeruginosa*. Une tendance similaire a été observée dans des études menées à Riyad, en Arabie saoudite. (Ryding, 2021).

# CHAPITRE II

## LES HUILES ESSENTIELLES ET LEURS ACTIVITES

## I. Généralités sur les huiles essentielles :

Les végétaux produisent des composés organiques volatiles (COV) qui peuvent être hydrophobes (l'huile essentielle), et hydrophiles qu'on récupère dans l'hydrolat. Les végétaux les produisent pour se protéger du soleil, du froid, des maladies et aussi pour permettre une communication entre eux et entre les animaux dans le but d'attirer les insectes pollinisateurs ou de repulser les nuisibles. (**Bakkali et al, 2008**). Ces COV comportent des substances odoriférantes sous forme de microgouttelettes renfermées dans des glandes de la plante à des températures plus basses que leur propre point d'ébullition. (**GARNEAU, 2004**) et sont stockées dans différentes parties de la plante : fleurs, tiges, graines, bois, bourgeons, écorces, racines et fruits. Elles seront soustraites par divers procédés afin de les rendre accessible à l'homme. (**SHIRNER, 2004**).

### 1. Historique :

L'utilisation des huiles essentielles remonte bien avant notre ère :

4500 avant JC, les égyptiens obtenaient l'HEs par macération et essorage et les utilisaient dans divers domaines : la médecine, parfumerie, cosmétique, embaumement.

En 4000 avant JC au Moyen Orient les huiles étaient essentiellement utilisées dans le domaine de la parfumerie, l'influence égyptienne dans le domaine médical les atteignit et les huiles devinrent de plus en plus communes pour soigner les problèmes cutanés ainsi que « l'esprit ».

1000 avant JC sur le nouveau continent, les différentes tribus indiennes utilisaient les plantes médicinales pour divers choses : soulagement corporel, purification, développement de l'esprit, nettoyage de maison...etc.

300 avant JC : C'est Alexandre le Grand qui importa les HEs en Grèce après sa conquête de l'Egypte et la découverte des bienfaits des plantes.

150 avant JC : la Grèce influence l'empire romains et s'intéresse rapidement à la consommation des épices pour leurs goût et parfum.

Lors de la renaissance du Moyen-Orient, Avicenne, médecin et philosophe perse a fait avancer la méthode de distillation par l'invention du serpentin.

La renaissance européenne fût l'époque créatrice des premiers diffuseurs d'huile essentielles appelés « pomanders » et sont nécessaires en période de peste pour stopper l'épidémie.

Durant les guerres, les blessures des soldats étaient pansées avec des bandes trempées dans les huiles essentielles. Ces pratiques ont démontré la faiblesse de l'antibiothérapie, les HEs sont donc également un moyen de se soigner efficacement contre les maladies. (**Théophane *et al*, 2019**)

L'aromathérapie est donc réapparue durant les années 60 partout dans le monde.

Jean Valnet développe la méthode d'évaluation d'activité antimicrobienne des HEs.

Aujourd'hui, l'aromathérapie est répandue partout dans le monde. Elle est sûrement l'une des techniques les plus naturelles possibles contre les infections microbiennes, et aussi efficace en prévention qu'en guérison.

## 2. Définitions :

### ➤ Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles ou essence aromatiques distillés sont des métabolites secondaires.

La dénomination « essentielle » reflète le caractère principal des plantes qui dégagent des odeurs agréables.

Elles sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenue dans les végétaux plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Elles sont obtenues à partir de différentes parties de la plante, suite à l'extraction de la matière végétale à la vapeur d'eau ou par d'autres procédés.

### ➤ L'aromathérapie :

L'aromathérapie est l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques, préventives ou curatives. Celles-ci sont utilisées soit par voie interne ou cutanée, soit par inhalation.

## 3. Caractéristiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont un certain nombre de propriétés physiques communes, celles-ci peuvent varier en fonction de leur composition chimique.

Sont volatiles, odorantes, inflammables, leur densité est  $<1$  sauf pour les huiles officinales qui ont une densité  $>1$ , ce sont les huiles de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), cannelle (*Cinnamomum zeylanium*) et Sassafras (*Sassafras albidum*). Les HEs forment un groupe très homogène (**BRUMETON, 1993**). Leurs principales caractéristiques sont :

-Liquide à températures ambiantes (30 à 40°C) et certaines d'entre elles se cristallisent à basses températures.

-Elles se caractérisent aussi par un pouvoir rotatoire et une viscosité.

-Facilement altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air. Elles se caractérisent aussi par leur solubilité dans alcools et la plupart des solvants organiques, cependant elles sont peu solubles dans l'eau.

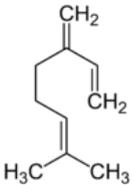
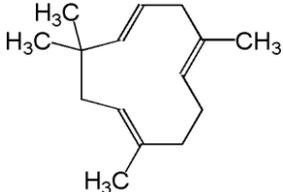
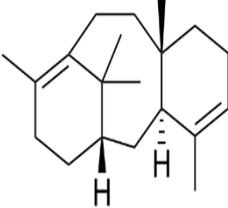
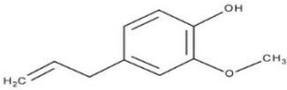
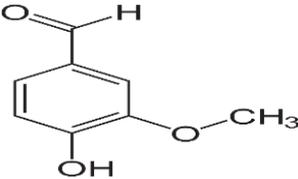
-Incolores ou peuvent avoir des couleurs différentes allant du jaune pâle au vert émeraude, bleu au rouge brunâtre foncé selon l'huile.

#### **4. Composition chimique des huiles essentielles :**

Ce sont des mélanges très complexes et variables de différents composés chimiques, qui sont dissous les uns dans les autres pour former des solutions homogènes.

Il existe environ plus de 3000 constituants qui ont été isolés à partir des huiles essentielles, appartenant de façon quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes à deux groupes : le groupe des terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. (**Kaloustian *et al*, 2012**).

**Tableau 04** : Les différents composés chimiques des huiles essentielles

Composés terpénoïdes			Composés aromatiques	Autres composés
<p>Constitue une famille de composés structurellement variée.</p> <p>Hydrocarbures volatiles à la faible masse moléculaire.</p> <p>Constitué d'une unité de 5 carbones, la formule générale est appelée « Isoprène » (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>).</p> <p>Ils sont subdivisés selon le nombre d'entité isoprène.</p> <p>(CROUTEAU <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Kaloustian <i>et al.</i>, 2012)</p>			<p>Beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes, responsables des caractères organoleptiques des HE.</p> <p>Ils sont fréquemment rencontrés dans les plantes odorantes.</p> <p>Les composés se distinguent entre eux par le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthoxyles</p> <p>(Kaloustian <i>et al.</i>, 2012)</p>	<p>Sont des composés aliphatiques de faible poids moléculaires entraînés lors de l'extraction des huiles, ils peuvent être azotés ou soufrés</p> <p>(INOVYE <i>et al.</i>, 2003)</p>
Monoterpènes	Sesquiterpènes	Diterpènes		
<p>Hydrocarbures aliphatiques volatiles entraînables à la vapeur d'eau, peuvent être saturés ou insaturés. Peuvent être acyclique, cyclique, ou aromatique.</p> <p>(Kaloustian <i>et al.</i>, 2012)</p> 	<p>Constitués de 15 atomes de carbones souvent présentés sous forme de lactones.</p> <p>Il se divise en plusieurs catégories structurelles (ex : acyclique, monocyclique...etc) et constitue la classe la plus diversifiée</p> <p>(Bretmaier, 2006)</p> 	<p>composé de quatre groupes isoprène, sont des métabolites végétaux très importants dérivés du géranyle.</p> <p>Ils sont classés en plusieurs catégories tel que l'abiétane, le guanacastène A etc...</p> 	 <p>Eugénol</p>  <p>Vanilline</p>	

## 5. Techniques d'extraction des huiles essentielles :

L'obtention des huiles essentielles fait appel à de multiples techniques d'extraction. Certaines sont plus anciennes et simples d'opération et d'autres plus récentes et performantes mais plus complexes. Ces dernières visent à optimiser la qualité de l'huile tout en maintenant un rendement intéressant. Les techniques d'extraction les plus employées sont : la distillation et l'extraction par les solvants organiques :

### 5.1. Distillation :

Le principe de la distillation se base sur la propriété qu'ont les huiles essentielles à être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile se sépare du distillat par décantation. (Boukhatem *et al*, 2019)

Il existe deux principaux modes de distillation : L'hydrodistillation et la distillation à la vapeur d'eau.

#### 5.1.1. Par hydrodistillation :

L'hydrodistillation consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un bain d'eau distillée qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité.

Cette méthode présente par contre des inconvénients liés à l'action de la vapeur d'eau, en effet certains organes végétaux tel que les fleurs sont trop fragiles et ne supportent pas ce genre de traitement d'entraînement à la vapeur et peuvent se calciner ; aussi, le contact direct de l'eau et des composés de l'huile provoque des réactions chimiques conduisant à des changements dans la composition finale de l'extrait.

A noter que la durée de la distillation influence sur le rendement de l'huile. C'est une technique limitée car le chauffage intense et long provoque la dégradation du matériel végétal ainsi que des composés aromatiques. (Boukhatem *et al*, 2019)

#### 5.1.2 Distillation à la vapeur d'eau :

C'est le procédé qui est le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des usages thérapeutiques. Dans ce cas, la matière végétale n'est pas en contact direct avec l'eau, mais est traversée par un courant de vapeur d'eau. La distillation à la vapeur s'effectue en plaçant les plantes aromatiques sur une grille perforée en dessus de la base de l'alambic. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de

la distillation se sépare donc en deux phases distinctes ; l'huile essentielle, de faible densité et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat.

Le parfum obtenu est plus délicat, et cette méthode, régulière et plus rapide fait que les notes de tête, fragrances très volatiles sont riches en ester ; ces dernières sont dues à des molécules légères qui apparaissent en premier.

Le plus souvent une demi-heure suffit à recueillir 95% des molécules volatiles ce qui suffit aux besoins de l'industrie de la parfumerie comme pour la lavande ; l'emploi en aromathérapie nécessite un prolongement de l'opération afin de récupérer la totalité des composants aromatiques volatiles. **(Boukhatem et al, 2019)**

Il existe une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau qui est l'hydro diffusion. Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15 bar). À travers la masse végétale du haut vers le bas. La composition des produits obtenu est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classique le procédé permet un gain de temps et d'énergie. **(Boukhatem et al, 2019)**

## **5.2. Par solvant organique :**

Certaines huiles essentielles ont une densité proche à celle de l'eau et le procédé de distillation ne peut être utilisé, il est donc nécessaire de recourir à une extraction par solvants organiques malgré leur faible pourcentage d'utilisation (3%).

La technique de l'extraction par solvants remplace aujourd'hui celle de l'enfleurage. Elle aboutit à l'obtention d'absolus très recherchés par les parfumeurs pour la pureté de leur puissante odeur. **(Boukhatem et al, 2019)**

### **5.2.1. Par solvant volatil :**

L'extraction par solvant volatil consiste à la mise en contact de la matière végétale avec un solvant qui dissout et extrait les constituants soluble contenus dans la plante, ces mêmes composés se retrouvent à la fin du procédé dans le solvant évacué, l'opération peut être renouvelée plusieurs fois sur la même charge de matière végétal.

Actuellement les solvants les plus utilisés dans l'industrie sont : l'hexane, l'alcool éthylique et l'eau.

## **5.3. Enfleurage :**

L'enfleurage, ou macération à saturation est un procédé d'extraction très ancien, utilisé surtout pour des fleurs délicates comme les roses et le jasmin, l'artisan dépose les pétales de la fleur sur un corps gras purifié qui s'imbibe peu à peu des parfums, lorsque le

corps gras atteint son poids de saturation et qu'il ne peut absorber davantage de parfum, l'artisan nettoie la pommade obtenue.

Puis, il ajoute de l'alcool, il laissera en suite le tout se mélanger pendant environ 24 heures, cette étape sert à séparer le corps gras et les huiles essentielles. En dépit de grande qualité des huiles essentielles obtenues par enflourage. Cette méthode n'est plus très courante, l'enflourage est en effet un procédé très laborieux et il nécessite beaucoup de temps, les huiles essentielles ainsi obtenues coûtent donc très cher.

#### **5.4. Macération :**

Dans cette méthode, les fleurs sont immergées dans des graisses fluides de nature animale ou végétale. Cette immersion est réalisée dans des fioles en cuivre tapissées à l'intérieur d'une couche de Zinc.

Ces fioles sont mises sur un bain marie à température d'ébullition pour l'obtention d'un mélange lipidique, ce mélange est ensuite centrifugé pour récupérer l'huile essentielle, alors que la couche restante est traitée à l'alcool 90%.

Après le refroidissement, le mélange est agité jusqu'à ce que l'alcool se sature d'huile essentielle ; la phase alcoolique est alors récupérée puis épuisée à une température de 30°C, et le résidu obtenu est appelé l'huile absolue.

#### **5.5. Expression à froid :**

La technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique. Elle consiste à rompre ou dilacérer les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe situé juste sous l'écorce du fruit, l'épicarpe, pour en recueillir le contenu qui n'a subi aucune modification.

Les systèmes récents, comme la « *Food Machinery Corporation-in-line* » (FMC), permettent d'extraire le jus de fruit et l'essence de manière quasi-simultanée sans contact des deux. C'est pourquoi l'expression à froid est la méthode de choix pour extraire ces essences, d'autant que la distillation n'est plus une technique très appropriée. En effet, la distillation produit des huiles aromatiques de moindre qualité principalement due à une présence importante d'aldéhydes, composés sensibles à l'oxydation et à la chaleur. (Boukhatem *et al*, 2019)

#### **5.6. Extraction assistée par micro-ondes :**

L'avantage de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et incrémenter le rendement. Toutefois, aucun développement industriel n'a été réalisé à ce jour.

La distillation assistée par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée parce qu'elle présente beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées.

L'emploi des micro-ondes constitue, par ailleurs, une méthode d'extraction à part entière en plein développement. A titre d'exemple, La SFME (Solvent Free Microwave Exatrcction) est une combinaison originale des techniques de chauffage par micro-ondes et de distillation sèche. Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant. Le chauffage interne de l'eau contenue dans la plante permet d'en dilater ses cellules et conduit à la rupture des glandes et des réceptacles oléifères. L'HE ainsi libérée est évaporée avec l'eau de la plante. Comparée à l'hydrodistillation traditionnelle, la SFME se caractérise par une diminution de la consommation énergétique et des rejets en CO<sub>2</sub> mais, surtout, par un temps d'extraction de l'ordre de 9 fois plus rapide. Les HE issues de ce procédé sont composées d'un taux plus important en composés oxygénés, de valeurs odorantes plus significatives, alors que les monoterpènes sont présents en moindre quantité (**Boukhatem et al, 2019**).

### **5.7. Extraction par fluide à l'état supercritique :**

L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique, dite SFE, provient de l'utilisation de solvants dans leur état supercritique, c'est-à-dire dans des conditions de températures et de pressions où le solvant se trouve dans un état intermédiaire aux phases liquide et gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvation accru. Si, en pratique, de nombreux solvants peuvent être employés, 90% des SFE sont réalisées avec le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), principalement pour des raisons pratiques. En plus de sa facilité d'obtention due à ses pression et température critiques relativement basses, le CO<sub>2</sub> est relativement non toxique, disponible à haute pureté et à faible prix, et il possède l'avantage d'être éliminé aisément de l'extrait. (**Boukhatem et al, 2019**)

### **6. Conservation des huiles essentielles :**

La durée de conservation des HEs varie entre 12 à 18 mois selon l'HE, à cause de la présence de leurs fonctions chimiques réactives ; les terpènes peuvent s'oxyder rapidement lorsqu'ils sont abandonnés à la lumière, à l'air et à la température ambiante et/ou élevée. Pour

éviter l'oxydation, il est primordial de conserver les HEs : à l'abri de la lumière, dans des flacons propres et secs, métalliques (aluminium ou acier inoxydable) ou en verre teinté. A froid, à +4°C. (**Kaloustian et al, 2012**)

### 7. Activité biologique et mode d'action des HEs :

Les HEs sont connues dotées de nombreuses propriétés biologiques : elles sont connues pour leurs activités antimicrobienne et possèdent un spectre plus ou moins large une action sur les G+ et les G- ainsi que les entérocoques. Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, elles sont utilisées comme agent de protection contre les champignons, les levures et les microorganismes qui envahissent les denrées alimentaires. Elles sont très intéressantes pour traiter les troubles d'origine virale, des infections respiratoires ; les HEs ont également une activité antioxydante, antiparasitaire, antiseptique et sont utilisées dans des cliniques pour leur pouvoir antiinflammatoire et antihistaminique. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses. (**Valnet, 2005**).

Les HE et leurs constituants possèdent des mécanismes d'action variés et très ciblés, touchant en particulier la membrane cellulaire et le cytoplasme, et, dans certains cas, changeant complètement la morphologie cellulaire, voire l'expression des gènes.

Selon **KALAMOUNI (2010)** l'action des HEs sur la cellule bactérienne se déroule en trois phases :

Attaque la paroi bactérienne par l'huile essentielle provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.

Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie. (**Bouyahya et al, 2017**)

## II. Huiles essentielles :

### 1. Huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* :



**Figure 03 :** *Eucalyptus globulus*

L'Eucalyptus est un arbre originaire d'Australie, le continent le plus aride bien que ce dernier contienne également un nombre de forêts humides notamment au Nord-Est du pays. Les températures élevées confèrent à la plante une grande capacité de survie et d'adaptation, le changement le plus remarquable réside dans l'adaptation des feuilles ; en effet, dans les forêts fermées et humides, la concurrence pour la lumière du soleil est beaucoup plus présente ce qui rend les feuilles plus ou moins horizontales, les tissus photosynthétiques orientés vers le haut et les stomates vers le sol. (Coppen, 2002)

### 1.2. Description physiologique :

L'arbre peut atteindre une hauteur de 80 m avec un tronc droit et large, ses branches mesurent environs la moitié de la hauteur totale de l'arbre. L'écorce inférieure, c'est-à-dire à la base, est rugueuse, grisâtre ou brunâtre ; l'écorce supérieure est lisse et pâle, souvent avec une teinte bleuâtre ou jaunâtre formant de longues bandes.

Les feuilles de semis possèdent une symétrie bilatérale, elles sont sessiles, la base fermant la tige (amplexicaule), ovoïde, 6 à 12 cm de long sur 2,5 à 7 cm de large, de couleur vert bleuâtre fortement décolorées. Les feuilles juvéniles en revanche sont sessiles avec une base embrassecaul, elliptiques-ovoïdes, de 11 à 15 cm de long sur 6 à 11 cm de large, de couleur bleu-vert, décolorées. Les tiges des semis et des feuilles juvéniles sont carrées et

### 1.1. Généralités sur la plante *Eucalyptus* :

Eucalyptus dérive du grec « *eu* » qui signifie « *bien* » et « *calyptus* » qui signifie « *couvert/recouvert* », le nom fait référence au bouchon "opercule" qui recouvre les étamines dans le bourgeon avant l'éclosion.

flanquées. Les feuilles adultes sont pétiolées, falciformes, lancéolées ou étroites-lancéolées, de 12 à 25 cm de long sur 1,7 à 3 cm de large elles sont d'un vert semblable sur les surfaces supérieure et inférieure.

L'inflorescence est simple, habituellement à une seule fleur (parfois 3), et axillaire. Les étamines sont généralement blanches ou crème. Le pédicelle est parfois absent ou très court et robuste, jusqu'à 4 mm de long. Les bourgeons vont de 1 à 2,3 cm de long sur 1,4 à 2,8 cm de large en forme de haut (turbiné) avec 4 côtes distinctes (parfois plus). Le capuchon ou opercule est aplati, très verruqueux avec un bouton central très distinct. Les capsules nervurées sont sessiles, sous-globulaires à hémisphériques avec 4 côtes distinctes (parfois plus). Les capsules ont un anneau de calycine concave distinct. (Praciak, 2019)

### 1.3. Habitat :

L'*E. globulus* a une distribution discontinue principalement le long de la côte Est de la Tasmanie, certaines populations se trouvant jusqu'à 70 km à l'intérieur des terres. On le trouve également sur les îles du détroit de Bass, y compris Flinders et King, et à l'extrême sud de Victoria, autour du cap Otway, des chaînes Strzelecki et sur le promontoire Wilsons.

*E. globulus* pousse particulièrement bien dans les régions au climat méditerranéen caractérisées par des hivers frais et humides et des étés secs et chauds, comme certaines parties de la Californie, du Chili, du Portugal, de l'Espagne et de l'Afrique du Sud. (Praciak, 2019)

### 1.4. Rang taxonomique :

**Règne :** *Plantae*

**Division :** Tracheophyta

**Sous-division :** Spermatophytina

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** Myrtaceae

**Genre :** *Eucalyptus*

**Espèce :** *Eucalyptus globulus*

**Sous-espèces :** *Eucalyptus globulus ssp. bicostata. Eucalyptus globulus spp. globulus.*

*Eucalyptus globulus spp. maidenii.* [ En ligne

[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=524065#null.](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=524065#null.))]

## **1.5. L'huile essentielle :**

### **1.5.1. Description de l'huile :**

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est d'un aspect liquide, gras, mobile et limpide, de couleur jaune pâle ou incolore ; sa densité à 20°C est de 0.905 à 0.925 g/ml, inflammable à 44°C et possède un point de rotation optique entre 0° et +10° à une température de 20°C, son indice de réfraction à 20°C varie de 1.460 à 1.466. [En ligne]

### **1.5.2. Composition chimique :**

Dans l'huile essentielle extraite des feuilles d'*E. globulus*, 25 composés ont été identifiés, correspondant à 98,7 % de l'huile essentielle totale ; l'analyse de la composition chimique a montré que l'huile essentielle contenait un mélange complexe, principalement des monoterpènes oxygénés (55,4 %), monoterpènes hydrocarbonés (35,4 %), sesquiterpènes hydrocarbonés (3,1 %) et sesquiterpènes oxygénés (4,8 %).

Le 1,8- cinéole, présent avec un pourcentage de 48,2 % fait partie des composés les plus abondants chez les monoterpènes oxygénés.  $\alpha$ -pinène,  $\gamma$ -terpinène et p-cymène avec un pourcentage respectif de 16,1%, 8,9% et 8,8%, sont les monoterpènes hydrocarbonés principaux. (Jerbi *et al*, 2017)

### **1.5.3. Activité biologique :**

L'eucalyptus étant une plante médicinale, il n'est pas inconnu que son huile essentielle possède de nombreuses propriétés permettant la lutte contre les agents externes.

#### **1.5.3.1. Activité antibactérienne :**

L'huile essentielle d'eucalyptus a des effets antimicrobiens contre de nombreuses bactéries, dont *Mycobacterium tuberculosis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline, ainsi que des virus. De nombreuses études ont rapporté que l'huile essentielle d'eucalyptus peut jouer un rôle d'appoint efficace dans le traitement des problèmes respiratoires, tels que la tuberculose, la pneumonie, la bronchite, l'asthme. (El Omari *et al*, 2019)

Certains auteurs ont signalé que les micro-organismes gram-négatifs sont légèrement plus sensibles aux huiles essentielles que les micro-organismes gram-positifs. L'activité

antibactérienne des extraits d'eucalyptus est due à des composants tels que 1,8-cinéole, citronnelle, citronellol, acétate de citronnelle, p-cymène, eucamalol, limonène, linalool,  $\beta$ -pinène,  $\gamma$ -terpinène,  $\alpha$ -terpinol, alloocimene et aromadendrene.

L'efficacité de l'huile essentielle d'*E. globulus* contre ces micro-organismes peut constituer un fondement scientifique pour l'application de la plante dans la prévention et le traitement des infections bactériennes causées par diverses bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, qui ont développé une résistance aux antibiotiques. L'incorporation de cette huile dans les préparations médicamenteuses est également recommandée. Les résultats de cette étude présentent la plante comme un bon candidat pour explorer de nouveaux agents antibactériens alternatifs pour combattre les micro-organismes pathogènes. **(Bachir *et al*, 2012)**

#### **1.5.3.2. Propriétés antioxydantes :**

Les huiles essentielles ont été qualifiées d'antioxydants naturels en raison de leur capacité à réduire la formation de radicaux libres et à les récupérer.

Essentiellement, les antioxydants réagissent avec les radicaux libres stables 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl et les convertissent à 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine il se passe alors une décoloration qui indique le radical libre. Ces propriétés antioxydantes sont liées à leur profil phytochimique, en particulier avec les polyphénols.

Il a été rapporté jadis que l'activité antioxydante de l'huile est dûe principalement à la présence du 1,8-cinéole et montre différents degrés de puissance réductrice. **(Luis *et al*, 2015)**

#### **1.5.3.3. Activité antifongique :**

Il existe peu de recherches concernant l'activité antifongique de l'huile bien que son effet fût déjà rapporté par Damjanovi c-Vratnica *et al* ; ils ont démontré l'effet important et significatif de l'eucalyptol dans l'inhibition de différentes levures et champignons. **(Boukhatem *et al*, 2020)**

## **2. Huile essentielle de *Syzygium aromaticum* :**

### **2.1. Caractéristique de la plante :**

Le giroflier est un arbre à feuilles persistantes de couleur vert foncé originaire des îles Moluque il peut atteindre 15 à 20m de hauteur, il appartient à la famille des Myrtacées.

Les clous de girofle sont en réalité des boutons floraux de l'arbre avant leur éclosion, ces fleurs sont blanches légèrement rosées, groupées en petites cymes compactes et ramifiées. Le calice rouge et long contient un bouton de fleur qui s'ouvre en révélant quatre pétales.

La récolte des boutons se fait avant qu'ils n'éclosent afin de garder leur arôme, après la récolte les boutons sont séchés au soleil et régulièrement retournés afin d'éviter qu'ils ne pourrissent. Une fois devenus secs ils prennent une couleur brun foncé et seront débarrassés de leur tiges, c'est ainsi que l'épice est produit et sera utilisé dans différents domaines : alimentaire, aromathérapie, phytothérapie...etc. (GAMBRELLA, 2021)



**Figure 04** : Clou de girofle séchés

## 2.2. Classification systématique :

La plante appartient à la famille Myrtaceae qui compte +de 3000 espèces dans 130 à 150 genres

**Règne** : *Plantae*

**Sous-règne** : *viridiaeplantae*

**Division** : *Tracheophyta*

**Classe** : *Magnoliopsida*

**Ordre** : *Myrtales*

**Famille** : *Myrtaceae*

**Genre** : *Syzygium*

**Espèce** : *Syzygium aromaticum*.

## 2.3. Composition chimique de l'huile :

La composition biochimique de l'HE de clou de girofle est susceptible de varier selon les méthodes de culture et de production adoptée.

L'Eugénol est le composé majoritaire représentant 75 à 80%, on le retrouve dans des concentrations allant de 9381.70 à 14650 mg pour 100 g de matière fraîche. L'acétate d'eugényle (dérivé phenylpropanoïde de l'eugénol), le  $\beta$ -caryophyllène et l' $\alpha$ -humulène qui sont des sesquiterpènes représentent 10 à 40% des constituants de l'huile. 10% correspondent à des composants ou des traces tels que le phtalate de diéthyle, l'oxyde de caryophyllène, le cadinène, L' $\alpha$ -copaène, le 4-(2-propényl) -phénol, le chavicol et l' $\alpha$ -cubebène. L'huile possède également des composants allergènes : Eugénol, Benzoate, linalol, isogénol, salicylate. (Haro-Gonzalez *et al*, 2021) Le clou de girofle représente l'une des principales sources végétales de composés phénolique comme les flavonoïdes, les acides hydroxibenzoïques et hydroxicinamique et les propènes hydroxyphényles.

#### 2.4. Activité biologique :

Le *S. aromaticum* est une plante médicinale connue pour ses propriétés antiseptiques et anesthésiques, les boutons floraux du girofler sont reconnus depuis fort longtemps et indiquées pour les douleurs dentaires. Parmi les activités rapportées de l'eugénol figurent les activités insecticides, antimicrobienne, anti-inflammatoire, cicatrisante, antivirale, antioxydante et anticancéreuse

L'eugénol montre aussi une activité anticancéreuse potentielle contre le cancer du côlon, de l'estomac, du sein, de la prostate et de la peau, ainsi que le mélanome et la leucémie. Il inhibe la prolifération et la formation de tumeurs, génère l'apoptose et a un effet génotoxique sur différentes cellules cancéreuses. Il montre une efficacité allergique lorsqu'il est utilisé en dentisterie.

L'acétate d'eugénol présente des activités antimicrobiennes, anticancéreuses, antimutagènes, antioxydantes et antivirulente, il montre aussi une inhibition de 94,5%, 92,1% et 100% à 200 $\mu$ g/ml respectivement contre *Fusarium moniliforme*, *Harpophora pryzae* et *Rhizoctonia solani*. Il est un puissant agent antifongique potentiellement contre *Candida* spp et empêche la formation de biofilm.

B-caryophyllène est insoluble dans l'eau mais soluble dans l'éthanol. Il démontre quasiment les mêmes effets que ceux de l'eugénol et de l'acétate d'eugénol, ce composé diminue la croissance et la prolifération cellulaires des cellules tumorales et réduit l'activité des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire, il est utilisé par les médecins comme chimiosensibilisant.

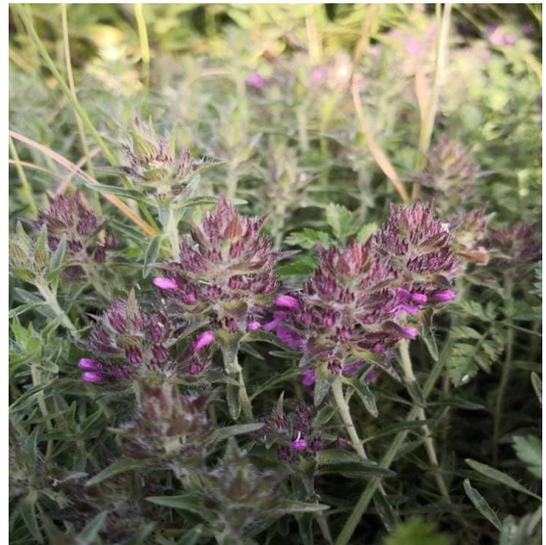
A-humulène : montre des activités anti-inflammatoires et anti-tumorales dans le cancer du poumon, du côlon, de la prostate et du sein, mais aussi une activité antiproliférative et une altération de la membrane cellulaire mitochondriale dans les cellules cancéreuses du côlon. Il peut également augmenter l'effet antiprolifératif des médicaments cytostatiques et d'autres bioactivités anticancéreuses. (Haro-Gonzalez *et al*, 2021)

### 3. Huile essentielle de *Thymus serpyllum* :

#### 3.1. Description morphologique :

Le serpolet, ou *Thymus serpyllum*, est une plante vivace et comestible potagère ornementale odorante et médicinale, il est trouvable sous forme de sous arbrisseau aux nombreuses branches ramifiées horizontalement d'environ 10 à 20 cm de hauteur, la tige est ligneuse et appuyée au sol ; certaines espèces peuvent être rampantes et atteindre 50 cm de large.

Les feuilles sont petites, opposées, oblongues allongées et ovales, elles sont de couleur verte aux reflets pourpres et dépourvus de pétioles, arrondies ou linéaires avant la période de floraison.



**Figure 05 :** *Thymus serpyllum*

Les fleurs sont mauves, petites et irrégulières, regroupées en capitules terminaux dès le mois de juin, le calice est poilu polymorphe. (Tamert *et al*, 2017). La floraison a lieu de juin à octobre et donne des fruits formés de 4 petites akènes. (Madi, 2010).

La plante est friande des sols maigres, secs et pauvres en nutriments, elle est souvent retrouvée dans les vallées et les montagnes à 2500 m d'altitude ainsi que dans les clairières de forêts, on le retrouve également au bord des routes de campagnes ; c'est une plante odorante qui attire les insectes pollinisateurs.

#### 3.2. Habitat :

Le serpolet est Très répondu en Europe, notamment dans le nord ainsi qu'au long de la méditerranée et en Asie.

Il pousse dans des sols maigres, pauvres en nutriments, bien drainés, sableux, secs, calcaires, sur les pentes ensoleillées, mais aussi dans les vallées et les montagnes allant jusqu'à 2600 mètre d'altitude.

### 3.3. Classification taxonomique :

La situation botanique de l'espèce *Thymus serpyllum* est donnée dans

**Règne :** *Plantae*

**Sous règne :** *Tracheobionta*

**Division :** *Magnoliophyta*

**Classe :** *Magnoliopsida*

**Ordre :** *Lamiales*

**Famille :** *Lamiaceae*

**Genre :** *Thymus*

**Espèce :** *Thymus serpyllum* L., 1753

**Sous-espèce :** *Thymus serpyllum* L., 1753 *subsp. serpyllum*

### 3.4. Utilisation thérapeutique :

Le serpolet est l'une des plantes sauvages les plus connues, tant il est utilisé depuis des générations. Cette lamiacée de petite taille est une bonne plante médicinale, condiment et une excellente plante d'agrément.

*Thymus serpyllum* est reconnu pour son usage dans divers remèdes traditionnels : antiseptique, antispasmodique, carminatif, digestif, diurétique, expectorant, vermifuge.

Il est utilisé dans la dentisterie et dans le traitement des maladies du système digestif et du système respiratoire (Tamert *et al*, 2017).

### 3.5. L'huile essentielle de *Thymus serpyllum* :

#### 3.5.1. Propriétés organoleptiques :

L'huile extraite à partir des fleurs est liquide mobile, fluide et limpide, sa couleur est de transparente à jaune ; son odeur est puissante, herbacée, agréable et un peu épicée. [En ligne]

#### 3.5.2. Composition chimique :

La teneur exacte en composant chimique chez *T. serpyllum* varie d'une espèce à une autre selon différents paramètres comme le lieu de cueillette, les conditions climatiques et géographiques, les conditions d'extractions ...etc. Cependant nous pouvons identifier entre autre 48 composés ; les monoterpènes oxygénés constituent la majeure partie de l'huile avec une teneur d'environ 54,4%. Vingt-neuf autres composants ont été identifiés dans l'huile ce qui équivalait à 99,9 % de l'huile totale ; le constituant principal était le thymol (56,02 %), suivi du carvacrol (14,00 %) et du p-cymène (6,2 %). En outre, des résultats d'autres études

stipulent que c'est le pinène et le carvacrol qui sont les composés principaux, c'est le cas de Sfaei-Ghomi et coll mais pour Thompson et al c'est le thymol (30 %) et le carvacrol (20 %) qui ont été signalé comme étant les composants principaux des huiles du serpolet, pour Rasooli et Mirmostafa

(2002) le thymol est le troisième composant principal avec une teneur de >18 % (Nikolic *et al*, 2013)

### **3.5.3. Activité biologique :**

Le *Thymus serpyllum* le voisin le plus proche du *Thymus vulgaris* est connu pour ses multitudes activités biologiques :

#### **3.5.3.1. Activité antimicrobienne :**

L'huile de *T. serpyllum* possède une forte activité contre les deux micro-organismes, avec une CMI 2,5-5 g/ml et une CMB 5-10 g/ml pour les bactéries et une CMI 1-2 g/ml et CMF 2-4 g/ml pour les champignons, cette activité rend l'huile bien plus efficace que certains antibiotiques.

L'huile de *T. serpyllum* montre une activité antibactérienne significative contre *S. mutans*, une espèce cariogène reconnue. Elle inhibe également la croissance de *Candida spp.*

L'HE présente une bonne activité antibactérienne contre *Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 10876 et *Proteus mirabilis* ATTC 35659. L'extrait décocté inhibe fortement la croissance d'*Escherichia coli*.

#### **3.5.3.2. Activité antioxydante :**

Dans l'essai DPPH, l'huile du *Thymus serpyllum* a montré une activité de balayage des radicaux de CE50 :0.96 g/ml, une valeur élevée en comparaison avec les huiles d'autres espèces du genre ; l'huile possède également un pouvoir de transformation de Fe<sup>3+</sup> à Fe<sup>2+</sup> avec une puissance réductrice de 0,66 g/ml.

Elle réduit également le blanchiment du carotène qui provient par l'oxydation de l'acide linoléique, ainsi l'huile garde sa couleur jaune.

#### **3.5.3.3. Activité antitumorale et cytotoxique :**

L'huile est puissante contre les cellules cancéreuses, cette efficacité peut être due à la présence du thymol en grande concentration, divers auteurs ont signalé des activités

antitumorale des huiles et de leurs constituants. Par exemple, l'huile de thym semble être la plus efficace contre les lignées cellulaires tumorales PC3, A549 et MCF-7 et inhibent la viabilité de plusieurs lignées cellulaires tumorales en fonction de la concentration de l'huile.

Si le thymol seul, ou en combinaison avec d'autres constituants de l'huile, est responsable de la cytotoxicité observée contre les cellules tumorales, il reste à le révéler, ce qui présente une importante limitation de l'étude.

À des concentrations non toxiques, l'extrait de thym a également été identifié comme antimutagène naturel avec la possibilité d'améliorer la réparation de l'ADN sans erreur. (Nikolic *et al*, 2013)

### **III. Association Antibiotique-huile essentielle :**

#### **1. Généralités :**

L'utilisation des antibiotiques aujourd'hui doit être mesurée et limitée car les agents infectieux contre lesquels ils sont sensés lutter s'avèrent de plus en plus résistants à leur action, en effet l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne. Les plus importants sont les plantes et leurs dérivés, tels que les HEs, ces dernières sont souvent utilisées dans la médecine populaire, et contiennent une grande variété de métabolites secondaires capables d'inhiber ou de ralentir la croissance des bactéries. (Bouyahya *et al*, 2017)

Ces dernières années avec l'augmentation des bactéries résistantes et l'absence de traitement efficace une approche constituant à combiner l'utilisation des HEs et des ATB est la nouvelle stratégie pour surmonter les problèmes d'antibiorésistance et les effets secondaires des médicaments, cette étude met en lumière les substances naturelles des huiles qui améliorent la sensibilité des médicaments.

Pour pallier le manque d'efficacité des médicaments antibiotiques conventionnels, le nombre de résistances croissantes des bactéries à ces molécules et aussi par ailleurs la baisse immunitaire générale des sujets sous traitement antibiotique, les huiles essentielles sont d'un intérêt évident. Ces informations sont à diffuser, c'est une mission de santé publique, comme

l'appel qu'a lancé l'OMS en 2014 pour encourager la recherche de nouveaux outils contre les bactéries résistantes.

En aromathérapie, il existe deux niveaux d'efficacité de traitements antibiotiques : les huiles essentielles fortes et les douces. Les huiles essentielles les plus forts antibiotiques ont un inconvénient : celui d'être à la fois dermocaustique et hépatotoxique, il faut donc des mesures adaptées pour leur administration sans compter aussi que les synergies entre HE existent, en effet le fait de combiner deux huiles permet d'élargir son spectre d'activité.

## 2. Quelques exemples d'association :

Les HEs peuvent représenter des adjuvants prometteurs pour les antibiotiques grâce à leurs mécanismes qui peuvent conduire à une synergie pharmacologique.

**Tripti et al (août 2011)** ont étudié l'effet combiné de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (le géranium) et de la Ciprofloxacine sur les uropathogènes suivants : *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus*.

Ces recherches révèlent une étonnante synergie entre l'antibiotique et l'HE contre ces pathogènes impliqués dans les infections urinaires. Ces auteurs ont déterminé les CMI de l'HE et de l'ATB par la méthode standard de dilution 'microbroth' et l'interaction entre ces deux agents par la méthode de 'checkerboard'. La mesure de l'effet combiné de l'HE et de l'antibiotique a été obtenue en calculant l'Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (FICI).

L'étude de Tripti et al montre que le FICI pour *K. pneumoniae* et *P. mirabilis* est égal à 0,375 et le FICI pour *S. aureus* est égal à 0,5. Les valeurs de cet indice 'FICI' sont donc  $\leq 0,5$  pour les 3 micro-organismes testés, ce qui indique que l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* et l'antibiotique ciprofloxacine ont une action antibactérienne synergique.

Pour confirmer la potentialisation de l'activité antibactérienne de la ciprofloxacine par l'HE de *Pelargonium graveolens* contre ces 3 uropathogènes, ces auteurs ont procédé à l'élaboration d'isobogrammes (représentations graphiques des phénomènes de synergie et d'inhibition). Les auteurs suggèrent la combinaison de l'HE de *Pelargonium graveolens* et la ciprofloxacine pour traiter les infections des voies urinaires, ce qui peut réduire la dose efficace de la ciprofloxacine et minimiser les effets secondaires de la ciprofloxacine.

Cette recherche nécessite cependant des tests *in vivo* pour évaluer le potentiel de cette combinaison à des fins thérapeutiques. Les HEs agissent positivement sur le microbiote intestinal, elles agissent sur la défense immunitaire et combattent les infections. (**Maillard Aude**). Un chercheur marocain a eu l'idée d'ajouter aux antibiotiques des molécules provenant d'huiles essentielles de plantes aromatiques réputées efficaces contre les micro-organismes. Une idée qui permettrait de lutter contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Origan, thym et romarin. Ce bouquet garni de plantes aromatiques pourrait représenter le nouvel espoir de la lutte contre l'antibiorésistance ainsi un nouveau complexe moléculaire visant à contourner l'antibiorésistance. Cependant, à fortes doses elles sont souvent inutilisables du fait des effets secondaires qu'elles entraînent. Remmal a donc associé ces propriétés des huiles essentielles à celles des antibiotiques, afin d'obtenir un effet synergique tout en évitant les effets indésirables. L'interaction entre les molécules naturelles "dopantes" 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.

### **3. Conclusion :**

Les huiles essentielles déstructurent et fragilisent les biofilms développés par les bactéries, elles créent des brèches par lesquelles les antibiotiques s'engouffrent pour exercer leur activité microbicide, en plus de l'activité antibactérienne de l'HE.

Il faut cependant plus de travail pour comprendre les associations HE-ATB avant de pouvoir être développés dans de nouvelles formulations antibactériennes. Cette interaction positive provoque un effet inhibiteur supérieur à la somme de leurs effets individuels des ATB ; Il a été démontré que certains composés de plantes peuvent inhiber efficacement les pompes à efflux impliqués dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Cela pourrait conduire à la restauration de la sensibilité aux antibiotiques et de réduire leurs doses. L'association des HEs aux ATB peut être employée pour augmenter le spectre antimicrobien, empêcher l'apparition des mutants résistants, réduire au minimum la toxicité et minimiser les effets secondaires de l'antibiotique. L'exploitation des HEs dans la prévention de la résistance bactérienne est considérée comme plus prometteuse parce que les huiles essentielles sont multi-composants dans la nature par rapport à de nombreux antimicrobiens conventionnels qui n'ont qu'un seul site cible. (**Yap *et al*, 2014**).

**PARTIE 2 :**

**PARTIE EXPERIMENTALE**

MATERIELS ET  
METHODES

## 1. Objectif du travail :

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau de Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Cette étude concerne dans un premier temps la détermination des effets antibactérien des huiles essentielles de trois plantes puis dans un second temps la nature des interactions entre ces huiles et les antibiotiques vis-à-vis des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE pathogènes et multirésistantes aux antibiotiques.

## 2. Matériels :

### 2.1. Matériel de laboratoire :

L'ensemble du matériel utilisé est regroupé dans le tableau ci-dessous.

**Tableau05** : Matériels utilisés

Equipements et dispositifs	Spectrophotomètre, Microscope optique, distillateur d'huile essentielle, balance analytique, étuve, réfrigérateur, bain marie, autoclave, Bec bunsen, Vortex, Agitateur magnétique.
Verreries	Pipettes pasteur, spatule, micropipettes, écouvillons, boîtes pétri, lames, béchers, tubes à vis, anse de platine, Eppendorf, disques en papier Wattman
Milieux de culture et réactifs	Gélose nutritive, MacConkey, Mueller-Hinton, Violet de gentiane, Lugol, Fushine diluée à 1/10, Huile à immersion, eau physiologique 9/1000.

### 2.2. Matériel Biologique :

#### 2.2.1. Souches bactériennes :

Nous avons utilisé 7 souches bactériennes : 4 souches de *Klebsiella pneumoniae* pathogènes et multirésistantes (3520, 3511, 1216 et 5111) issus de différents prélèvements communautaires ou hospitaliers et de différents services. Isolées en 2013 et 2014 au laboratoire de microbiologie-parasitologie au CHU Tizi-Ouzou et 3 souches de référence (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853),

Les souches multirésistantes ont été identifiées au MALDI-TOF, elles sont BLSE positives avec la présence du gène CTX-M.

**Tableau 06** : Origine des souches utilisées

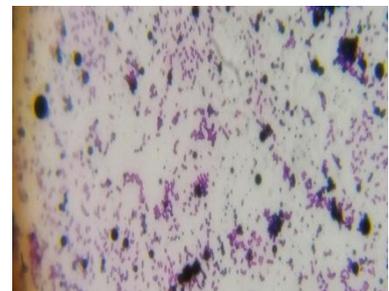
Numéro d'identification	Sexe	Service	Type de prélèvement	Origine
<i>K. pneumoniae</i> 3520	F	Maladies infectieuses	Pus	Hospitalière (Interne)
<i>K. pneumoniae</i> 3511	M	Externe	Urine	Communautaire (Externe)
<i>K. pneumoniae</i> 1216	M	Urgences de pédiatrie	Urine	Hospitalière (Interne)
<i>K. pneumoniae</i> 5111	M	Néonatalogie	Pus	Hospitalière (Interne)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603				Laboratoire
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				Laboratoire
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853				Laboratoire



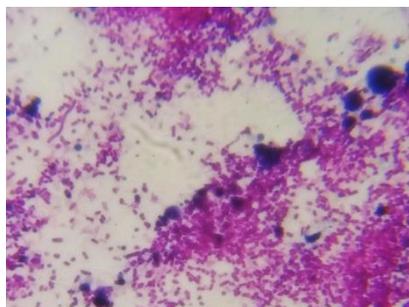
*K. pneumoniae* 1216



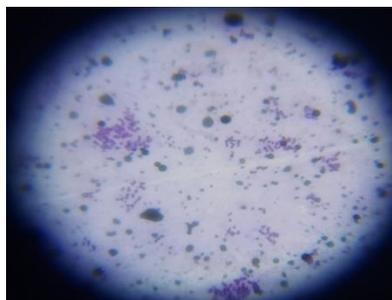
*K. pneumoniae* 3511



*K. pneumoniae* 3520



*K. pneumoniae* 5111



*E. coli* ATCC 25922



*K. pneumoniae* ATCC 700603



*Pseudomonas aeruginosa*  
ATCC 27853

**Figure 06** : Images de coloration de gram des souches utilisées

### 2.2.2. Plantes :

Trois huiles essentielles ont été utilisées durant étude, elles sont issues de plantes médicinales aromatiques récoltées en juin 2021, choisies car ce sont des plantes locales et commercialisées et aussi par rapport à leurs activité antibactérienne déjà connue. Il s'agit de :

**Tableau 07** : Plantes utilisées pour l'extraction des huiles

Plante	Famille	Partie utilisée	Région de récolte
<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	Feuilles	YAKOUREN
<i>Thymus serpyllum</i>	Lamiaceae	Partie aérienne (tige +feuille +fleurs)	AGHRIBS
<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	Fruit	Commerciale

Les huiles essentielles ont été extraites de parties différentes pour chaque plantes à cause de la richesse de ces parties en huile et en composés phénolique.

#### ➤ Technique d'extraction :

L'extraction des huiles essentielles se fait par diverses méthodes, certaines plus anciennes et simple te d'autres plus récentes et performantes. Ces dernières visent à optimiser la qualité de l'huile, tout en maintenant un rendement intéressant.



**Figure 07** : Distillateur d'huile essentielle (Photos prises au laboratoire)

L'extraction des trois huiles essentielles a été réalisée, par la technique de l'entraînement à la vapeur, la seule reconnue pour l'extraction des huiles essentielles appliquée en pharmacie. Le principe de cette méthode repose sur l'éclatement des vacuoles contenant l'huile essentielle par la vapeur d'eau générée par un générateur de vapeur. Cette dernière chargée en huile essentielle est condensée dans une colonne de réfrigération pour être ensuite collectée dans un bécher. L'huile se sépare de l'eau florale par densité et se retrouve en surface et est récupérée par une micropipette.

Le tableau ci-dessus représente les données de chaque huile essentielle :

**Tableau 08** : Rendement et masse d'huile essentielle obtenue par la technique d'entraînement à la vapeur.

	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
Rendement	1.8%	2.5%	5.2%
Quantité plante	1000g	700g	300g
Densité	0.910	0.925	1.03
Masse de l'huile obtenue	18g	17.5g	15.6g



**Figure 08** : Huiles essentielles extraites (Photos prises au laboratoire)

### 2.3. Les antibiotiques :

Pour notre étude 4 molécules d'antibiotiques ont été utilisées à savoir : la Chloramphénicol (CL), Amoxicilline+ Acide clavulanique (AMC), Ceftazidime (CAZ) et Levofloxacin (LEV) de la marque Liofilchem Italie sous forme de disques.

Le tableau 09 représente l'antibiogramme des 4 souches cliniques *Klebsiella pneumoniae* multirésistantes utilisées :

**Tableau 09** : antibiogramme des souches cliniques utilisées

	<b>1216</b>	<b>3511</b>	<b>3520</b>	<b>5111</b>
Amp	06 R	06 R	06 R	06 R
Amox+Cla	13 R	12 R	13 R	11 R
Pip+Taz	22 S	20 I	20 I	21 S
Temo	27 S	26 S	26 S	26 S
Cefoxitine	28 S	25 S	27 S	28 S
Cefuroxime	06 R	06 R	06 R	06 R
Ceftriaxone	09 R	06 R	08 R	10 R
Ceftazidime	12 R	10 R	12 R	17 R
Cefepime	16 I	11 R	16 I	16 I
Ertapenem	30 S	28 S	29 S	28 S
Meropenem	33 S	30 S	31 S	32 S
Aztreonam	15 R	11 R	13 R	16 R
Ciprofloxacine	19 I	06 R	19 I	15 R
gentamicine	23 S	06 R	22 S	06 R
amikacine	20 S	18 S	19 S	19 S
trim+sulfa	06 R	06 R	07 R	26 S
imipenem	29 S	29 S	29 S	29 S
colistine	18 S	18 S	19 S	18 S
Minocycline	21 S	16 S	19 S	19 S
tigecycline	20 S	15 I	19 S	18 S
chloramphénicol	27 S	26 S	26 S	28 S
fosfomycine	21 S	21 S	20 S	20 S

### **3. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de disques :**

#### **3.1. Vérification de la pureté des souches :**

Les souches ont été ré isolées et repiquées sur gélose nutritive à partir de tubes stériles de milieux inclinés et conservées à +4°C ; il est nécessaire de vérifier la pureté des souches avant la réalisation des tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne et des synergies. Les étapes à suivre sont :

- Repiquage des souches : cette étape consiste à réaliser des ré isolements des colonies bactériennes, à l'aide d'une pipette pasteur, étaler des stries sur gélose MacConkey préalablement préparée et coulée, puis incuber dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24h.
- Examen par coloration de Gram : l'étape permet d'observer la forme des cellules bactériennes mortes et les classer en deux groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

#### **3.2. La réalisation des tests de l'activité des huiles essentielles :**

##### **3.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien :**

- Prélèvement de colonies isolées et identiques à partir d'une culture pure à l'aide d'un écouvillon
- Déchargement dans 10 ml d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl).
- Homogénéisation des suspensions bactériennes
- Standardisation à  $10^8$  UFC/ml (avec une densité optique de 0.08 à 0.10 lue à une longueur d'onde de 625nm)

##### **3.2.2. L'ensemencement :**

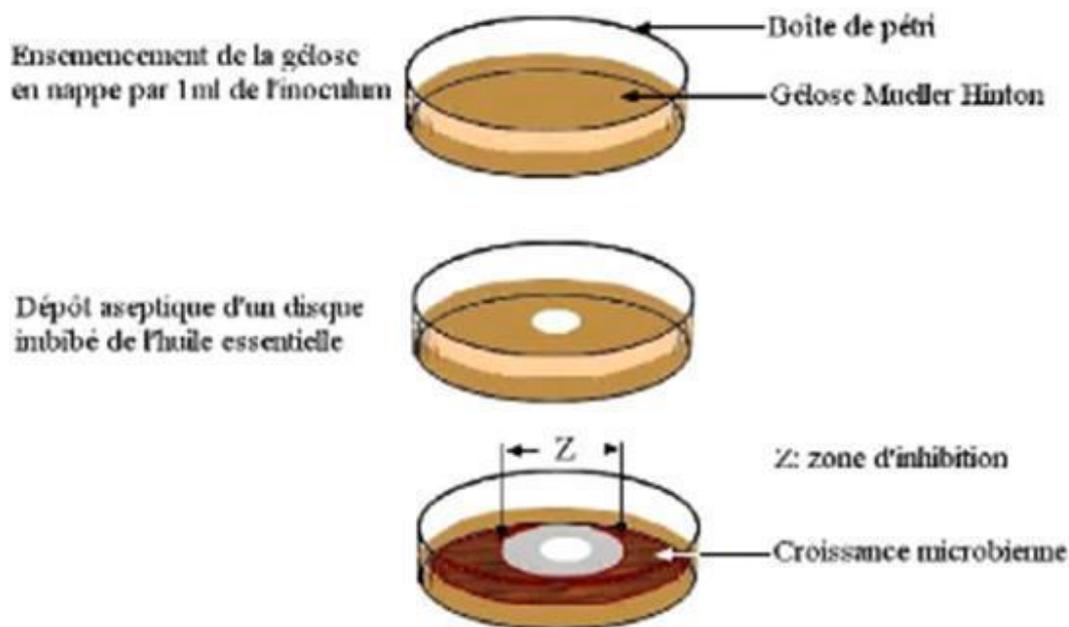
- Les boîtes de Pétri stériles sont préalablement coulées aseptiquement avec la gélose Mueller-Hinton
- Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, et pressé contre la paroi interne du tube afin de décharger au maximum
- L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface de la boîte de Pétri gélosée et séchée, de haut en bas, par des stries serrées.

- L'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, l'ensemencement se termine en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Les disques vierges et stériles sont déposés à l'aide d'une pince stérilisée au Bec bunsen, sur la surface de la gélose un espace de 3 cm entre chaque disque.
- Les disques sont imprégnés de 10 µl de chacune des trois huiles (*Eucalyptus*, clou de girofle et *Thymus*) à l'aide d'une micropipette
- Un disque d'antibiotique est laissé comme témoin positif (La chloramphénicol).

Les essais sont effectués en trois fois.

Les boîtes de pétries sont ensuite mises à +4°C pendant 3h pour la pré-diffusion de l'huile, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h.

La lecture se fait par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition en mm formée autour de chaque disque à l'aide d'une règle. Les diamètres des zones reflètent l'impact de l'huile essentielle sur les souches testées



**Figure 09** : Illustration de la technique de l'aromatogramme

Le résultat étant la moyenne de trois essais

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité :

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

- D > 20 mm : souche extrêmement sensible (+++). (El Atki *et al*, 2019)

#### 4. Détermination de types d'interaction entre les huiles et les antibiotiques :

- Les boîtes de Pétri préalablement coulées par la gélose MH sontensemencées par la suspension bactérienne à l'aide d'un écouvillon.
- A l'aide d'une pince stérile on dépose :

-1 disque imprégné de 10µl de l'huile essentielle au centre de la boîte, comme témoin positif

-3 disques de différents antibiotiques : Levofloxacin, Cefotaxime et amoxicilline + acide clavulanique. Comme témoin positif

-3 autres disques de ces antibiotiques qu'on imprègne de 10µl de l'huile essentielle.

- La distance entre chaque disque est de 3 cm et de 1 cm de la périphérie de la boîte.
- Les essais sont effectués en trois fois pour chacune des trois huiles.

Les boîtes de pétries sont ensuite fermées et sont laissées diffuser à 4°C pendant 3h, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h.

Après incubation la lecture est faite par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition en mm formée autour de chaque disque à l'aide d'une règle. Le résultat étant la moyenne de trois essais.

Les résultats sont analysés comme suit :

- Indifférence : les deux zones d'inhibition la combinaison ATB/HEs et addition du diamètre ATB+HE sont inchangées.

- Antagonisme : la zone d'inhibition de la combinaison ATB/HEs est moins importante que celle de l'addition ATB+HE.

- Synergie : la zone d'inhibition de la combinaison ATB/HEs est importante que celle de l'addition ATB+HE de 1 mm au minimum. (Kwiatkowski *et al*, 2018)

# RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 1. Activité antibactérienne des huiles :

Les tests des activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont été faits sur 4 souches de *Klebsiella pneumoniae* multirésistantes ainsi que 3 souches de références, dont *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*

Le tableau 10 montre les moyennes des zones d'inhibitions obtenues par trois répétitions :

(Le diamètre des disques -6mm- est inclus)

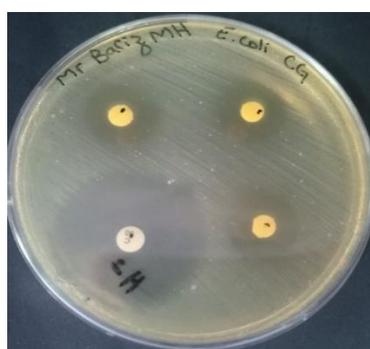
**Tableau 10** : Activité des huiles

	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Thymus serpyllum</i>
<i>K. pneumoniae</i> 3520	9,17±0,22	12,33±0,44	19,17±0,78
<i>K. pneumoniae</i> 3511	9,17±0,22	12,17±0,22	24±1,67
<i>K. pneumoniae</i> 1216	13,83±0,56	13,33±0,56	21,83±4,44
<i>K. pneumoniae</i> 5111	11,67±0,22	16,5±1,33	32±4,67
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	7,33±0,44	11,83±0,78	13,83±0,56
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	18,33±0,78	17,33±0,22	25,83±0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	8,17±0,22	0

#### Huile essentielle de *Syzygium aromaticum*



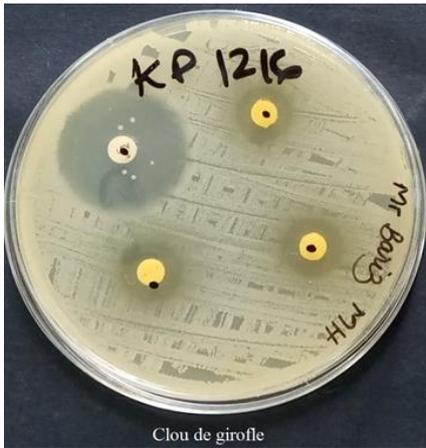
*K. pneumoniae* ATCC 700603



*Escherichia coli* ATCC 25922



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



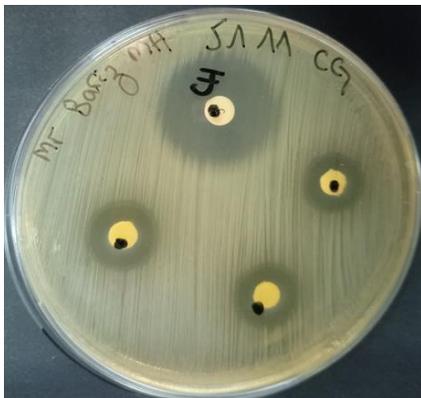
*K. pneumoniae*1216



*K. pneumoniae*3511



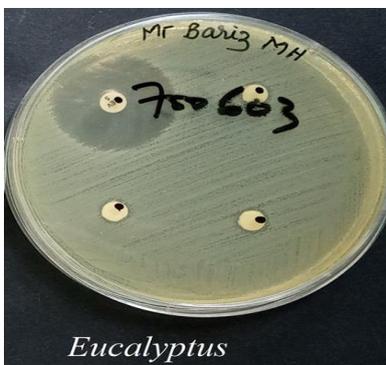
*K. pneumoniae* 3520



*K. pneumoniae*5111

**Figure10** : Images de l'activité de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (Photos prise au laboratoire)

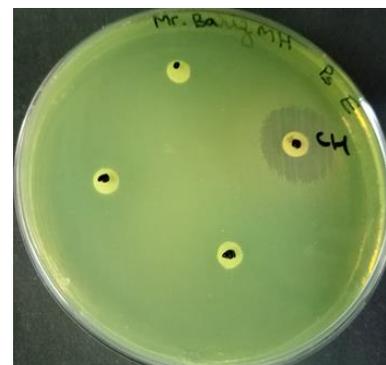
Huile essentielle d' *Eucalyptus globulus*



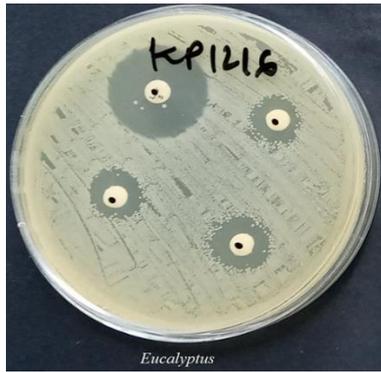
*K. pneumoniae* ATCC 700603



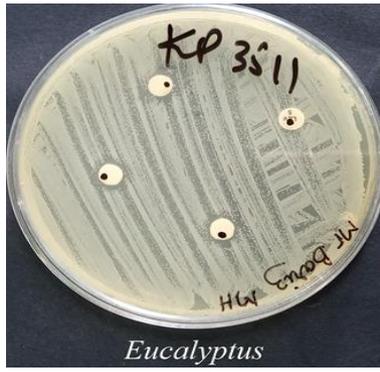
*Escherichia coli* ATCC 25922



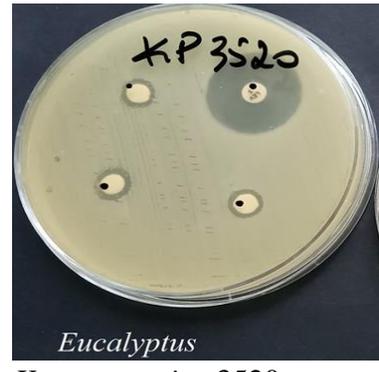
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



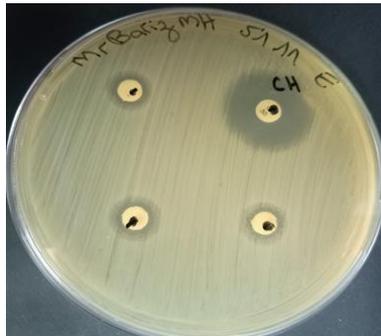
*K. pneumoniae*1216



*K. pneumoniae*3511



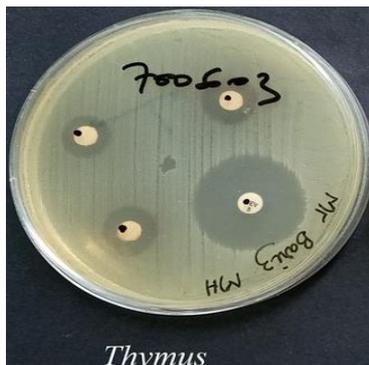
*K. pneumoniae* 3520



*K. pneumoniae*5111

**Figure 11** : Images de l'activité de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (Photos prise au laboratoire)

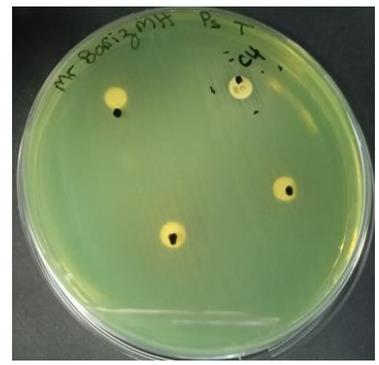
Huile essentielle de *Thymus serpyllum*



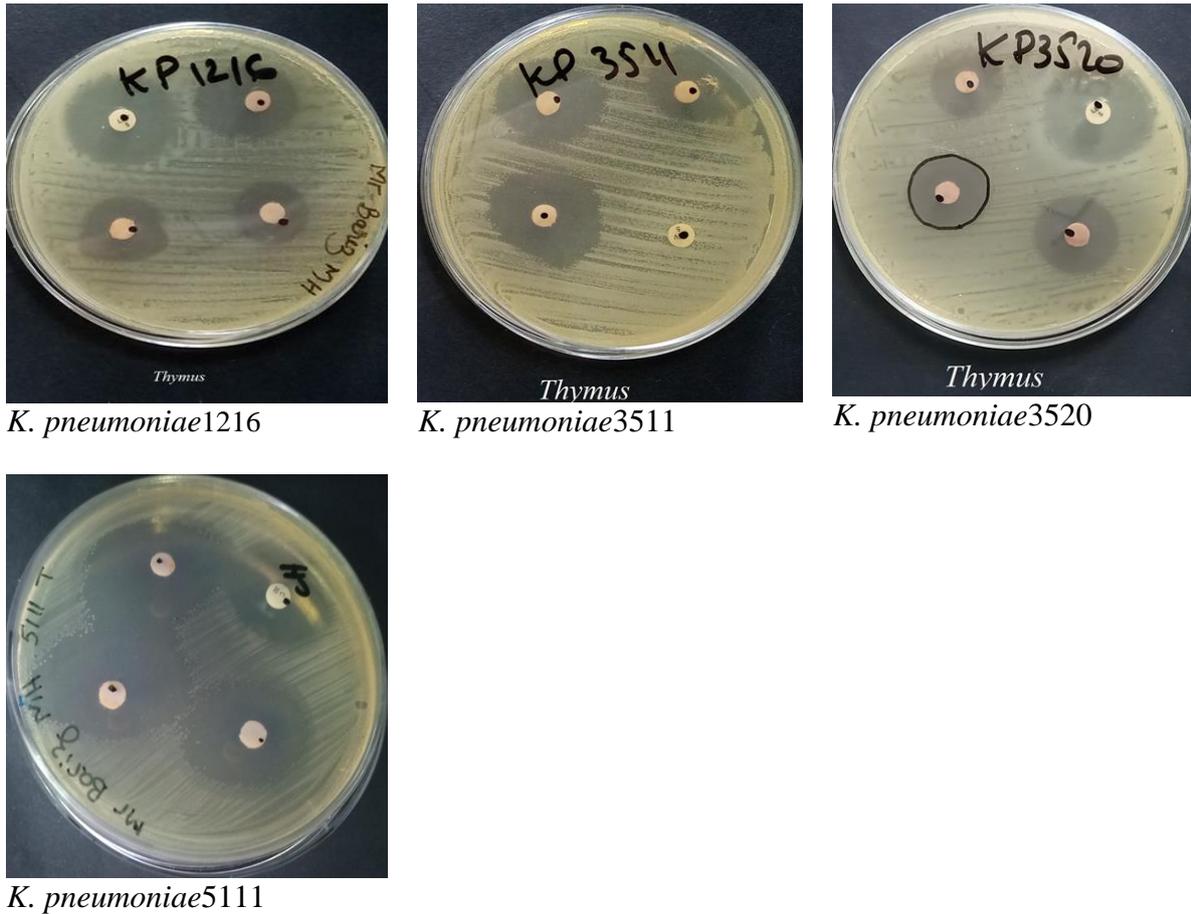
*K. pneumoniae* ATCC  
700603



*Escherichia coli* ATCC  
25922



*Pseudomonas aeruginosa*  
ATCC 27853



**Figure 12** : Images de l'activité de l'huile essentielle de *Thymus serpyllum* (Photos prise au laboratoire)

D'après les résultats obtenus lors de notre étude, les tests d'activité de l'huile d'*Eucalyptus globulus* montre des diamètres des zones d'inhibition pour les souches cliniques allant de 9.13 mm à 13.83 mm tandis que les diamètres de zones d'inhibition pour les souches de références s'étendent de 7.33 mm pour *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et 13.83 pour *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 montre quant à elle une résistance également face à l'HE.

D'autre études effectuées sur l'action de l'HE d'*Eucalyptus globulus* menées par **Bachir et Benali (2008)** ont montré une inhibition de la croissance bactérienne des souches d'E.coli avec des diamètres allant de 0 à 2 cm selon la quantité d'huile utilisée ce qui n'est pas très éloigné de nos diamètres obtenus pour E.coli, concernant la réaction de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis de l'action de l'huile de *Eucalyptus*, des travaux menés par **Damjanovic et al (2011)** ont prouvés la présence d'un diamètre de zone d'inhibition pouvant atteindre les 28 mm pour 10ul d'huile utilisé contre la souche clinique en incluant le diamètre des puits ; les

mêmes études ont montrés la présence d'une résistance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 vis-à-vis de l'HE, ce qui concorde avec les résultats de notre étude.

L'action antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* pourrait être due à la composition chimique de l'huile comme impliqué dans les travaux de **Assaggaf et al (2022)**, il est possible que l'activité antimicrobienne de l'HE soit attribuée aux monoterpènes oxygénés, comme le 1,8-cinéole, le  $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -pinène, qui sont des constituants connus pour leurs activités antimicrobiennes. **Djennan et al (2011)** a démontré que les composés monoterpènes oxygénés, notamment les cymènes et l'acide cinnamique étaient responsables de la désintégration de la membrane externe des bactéries, libérant des lipopolysaccharides et augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP ce qui accélère ainsi la lyse.

Les résultats de test d'activité de l'huile de *Syzygium aromaticum* ont montrés des diamètres allant de 12.17 mm à 16.5 mm pour les souches multirésistantes de *Klebsiella pneumoniae* et des diamètres allant de 8.17 mm à 17.33 mm pour les souches de références utilisées.

Des études menées par **El-Darier et coll (2018)** sur l'action de l'HE de clou de girofle vis-à-vis de souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* ont montrés des diamètres allant de 1.1cm jusqu'à 3.9 cm sur milieu LB solide (Lysogeny Broth) ce qui peut se rapprocher de nos résultats sur milieu MH, d'autres études menées par **Yaddes et al (2022)** ont montré une activité bactéricide considérable de l'huile de clou de girofle avec un diamètre de zone d'inhibition de 25.58 mm, légèrement supérieur aux résultats obtenus lors de notre étude.

Cette puissante activité pourrait s'expliquer par la composition chimique de l'huile riche en molécules volatiles actives dont l'Eugénol présent en grande quantité, sa présence pourrait justifier cette activité, selon les travaux de **Marchese et al (2017)** il a été démontré que l'Eugénol était une molécule active dotée d'une puissante activité antimicrobienne. Les travaux de **Bolla et al (2011)** sur l'action de l'Eugénol sur les souches bactériennes ont montré que la molécule agissait sur la membrane en inhibant l'activité des ATPase ainsi qu'un possible blocage des pompes à efflux réduisant ainsi la virulence bactérienne et empêchant le rejet de la molécule hors de la cellule.

Concernant que l'huile essentielle du *Thymus serpyllum* on remarque qu'elle est la plus active contre les souches cliniques avec une moyenne allant de 19 à 32mm pour les souches cliniques et de 13.83 à 25,83 mm pour les souches de références de *Klebsiella pneumoniae* ATCC

700603 et *E. coli* ATCC 25922 , quant à la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, celle-ci s’est montrée résistante à l’action de l’Huile essentielle

Comparativement à d’autres études menées sur l’huile nos résultats sont similaires à ceux des travaux de **Deeksha et al (2021)** menés sur différentes souches bactériennes dont des grams négatifs par la technique des puits sur gélose d’agar, ces résultats ont été exprimés par des diamètres de zones d’inhibition de 21.66mm pour *E. coli* ATCC 25922 et 13.66mm pour les souches de *K. pneumoniae* MTCC39. En revanche d’autres études menés par **Moussaoui et al(2016)** ont montré une résistance de la part des souches de pseudo vis-à-vis de l’huile essentiels des plantes du genre thymus ce qui est tout à fait semblable aux résultats obtenus lors de l’étude.

Cette activité pourrait s’expliquer par la présence du thymol en grande quantité dans l’huile du thym ; en effet d’après les travaux de **Deeksha et al (2021)** il a été établi que le thymol ainsi que les composé phénolique agissaient sur les bactéries gram positif et négatif, des études similaires menées par **Langeveld et coll (2013)** démontrent que le thymol agis sur les bactéries en désorganisant et perturbant la membrane bactérienne en s’attachant à des cibles intracellulaires potentielles provoquant ainsi la destruction des cellules.

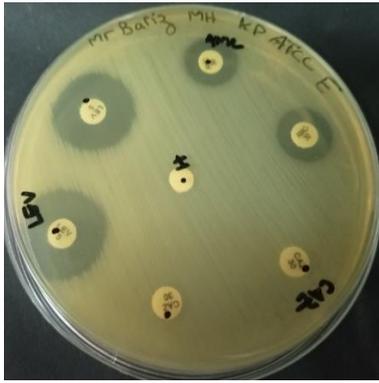
## 2.Etude des types d’interactions entre les huiles essentielles et les antibiotiques :

Dans le cadre de notre étude trois antibiotiques (LEV, AMC et CAZ) ont été utilisés en combinaison avec les trois huiles essentielles étudiées (thym, clou de girofle et eucalyptus), les résultats des tests sont présents dans les tableaux 11, 12 et 13.

**Tableau 11** : résultats de l’interaction de l’huile de *Eucalyptus globulus* et antibiotiques.

	<i>Eucalyptus globulus</i>									
	ATB seul			HE	Addition			Combinaison		
	AMC	CAZ	LEV		AMC	CAZ	LEV	AMC	CAZ	LEV
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	14	0	20	0	14	0	20	13.5	0	20
<i>K. pneumoniae</i> 3520	12	0	23	11	23	11	34	13	9.5	22
<i>K. pneumoniae</i> 3511	13	0	0	8	21	8	8	11.5	8	8
<i>K. pneumoniae</i> 1216	10	0	21	13	23	13	34	14.5	10	21
<i>K. pneumoniae</i> 5111	12	0	19	12	24	12	31	14	10.5	19
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	19	22	32	18	37	40	50	19.5	22.5	40
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	20	24	0	0	20	24	0	20	25

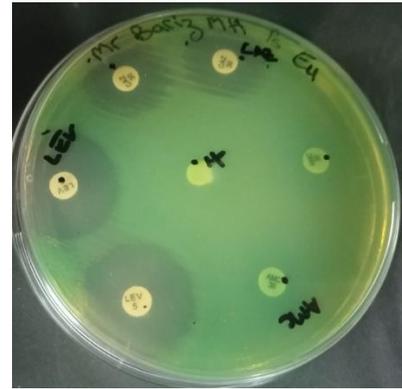
Huile essentielle de *Eucalyptus globulus*



*K. pneumoniae* ATCC 700603



*Escherichia coli* ATCC 25922



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



*K. pneumoniae* 1216



*K. pneumoniae* 3511



*K. pneumoniae* 3520



*K. pneumoniae* 5111

**Figure 13** : Images des interactions entre les ATB et l'HE de *Eucalyptus globulus* (Photos prises au laboratoire)

Le tableau 11 représente les résultats obtenus avec l'utilisation de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus*, d'après la comparaison entre les diamètres des disques d'antibiotiques combinés à l'huile essentielle ainsi que de l'addition des diamètres des disques ATB+HE, nous

constatons que le diamètre des combinés est bien inférieur à ceux des additions dans le cas des souches cliniques 3511, 3520, 1216 et 5111 pour l'antibiotique AMC avec des valeurs allant de 13mm à 14mm diamètre du disque inclus ce qui représente une différence d'une dizaine de millimètres.

Dans le cas de la CAZ en ce qui concerne les souches 5111, 3511 et 3520, nous constatons également une diminution de diamètre entre les valeurs de l'addition ATB+HE et les disques combinés avec une moyenne d'environ 10 à 20 mm de diamètre aussi ; cette diminution représente un effet antagoniste de l'huile sur l'antibiotique, ce phénomène peut s'expliquer par la composition chimique de l'huile essentielle de l'eucalyptus, en effet il a été rapporté que certains composants de l'huile peuvent inhiber les composants chimiques de l'antibiotique (et inversement) réduisant la zone d'inhibition autour du disque combiné et diminuant l'effet antibactérien des molécules.

L'interaction entre la CAZ et l'HE montre également une absence d'effet signe que les composants de l'huile n'ont pas interagit avec ceux de l'antibiotique, les diamètres des disques combinés sont les mêmes que ceux de l'huile seule ; cette absence d'interaction peut s'expliquer par la puissante résistance des souches cliniques à la CAZ, ce phénomène empêchera donc l'entrée des composantes de l'huile à travers la paroi bactérienne et donc absence d'effet. Quant aux souches de références utilisées un effet antagoniste a été observé avec une diminution du diamètre des disques combinés par rapport au diamètre de l'addition avec des valeurs dépassant les 2mm.

On constate également un effet antagoniste pour la Levofloxacin avec des diamètres de disques combinés inférieurs à ceux des diamètres de l'HE+ATB, cette différence est chiffrée à 10 mm de diamètre pour les quatre souches cliniques ainsi que les souches *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* de référence ; en ce qui concerne le cas de *Pseudomonas aeruginosa* on observe une légère synergie :

Le diamètre du disque combiné d'ATB/HE est supérieur au diamètre de l'addition avec une différence d'un mm entre les deux disques :

25mm > 24mm. C'est le premier cas de synergie dans notre étude bien qu'elle soit inférieure à 2mm.

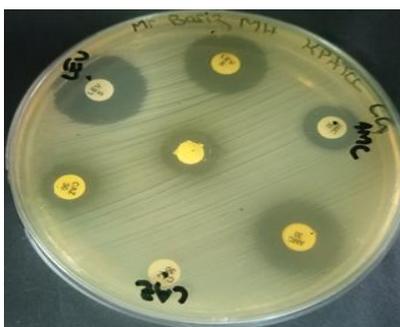
Cette synergie, bien que légère démontre que les composants de l'huile d'*Eucalyptus* ont réussi à traverser le biofilm créé par la souche, ce qui peut s'expliquer par la nature

hydrophobe des composants aromatique de l'HE, composantes responsable de la perturbation de la paroi bactérienne ce qui facilite l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie, cependant, la souche étant multirésistante et la dose d'huile administrée étant uniquement de 10ul cet effet est très faible.

**Tableau 12** : résultats de l'interaction de l'huile de *Syzygium aromaticum* et des antibiotiques

	<i>Syzygium aromaticum</i>									
	ATB seul			HEs	Addition			Combinaison		
	AMC	CAZ	LEV		AMC	CAZ	LEV	AMC	CAZ	LEV
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	13	0	21	13	26	13	34	18	12	18,5
<i>K.pneumoniae</i> 3520	10	0	24,5	12	22	12	36,5	13	12	21
<i>K.pneumoniae</i> 3511	13	0	7	15	28	15	22	17	14	14,5
<i>K.pneumoniae</i> 1216	10	0	24	14	24	14	38	16	14	20
<i>K.pneumoniae</i> 5111	11	0	22,5	14	25	14	36,5	16,5	12	17
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19	18,5	31	17	36	35,5	48	17	14	32
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	0	21	23	8	8	29	31	8	20	18

Huile essentielle de *Syzygium aromaticum*



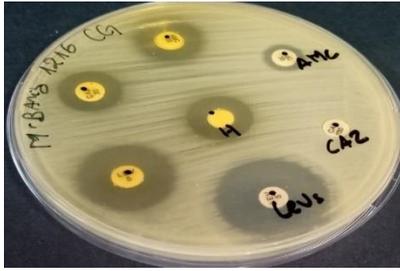
*K. pneumoniae* ATCC 700603



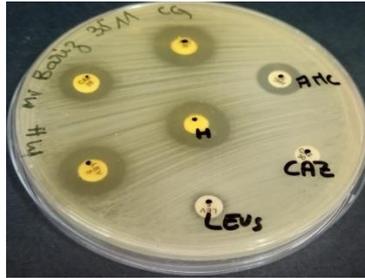
*Escherichia coli* ATCC 25922



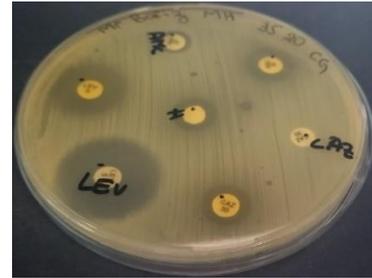
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



*K. pneumoniae*1216



*K. pneumoniae*3511



*K. pneumoniae*3520



*K. pneumoniae*5111

**Figure 14** : Images des interactions entre les ATB et l'HE de *Syzygium aromaticum* (Photos prises au laboratoire)

Le tableau 12 montre les résultats des tests effectués avec l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum*, cette fois-ci l'action de l'huile sur les souches est légèrement supérieure à celle de *Eucalyptus globulus* ce qui correspond aux résultats effectués lors des tests d'activité des huiles cependant nous ne notons aucun effet additif.

Nous remarquons en premier que les souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* sont toujours résistante à la CAZ et que l'addition des diamètres ATB et HE nous procure un diamètre identique à ceux de l'huile seule. Pour ce qui est des diamètres des combinaisons CAZ/HE, nous remarquons une diminution d'environ 1 à 2 mm de diamètre comparé à ceux de l'addition ce qui signifie probablement la présence d'un effet antagoniste.

Pour les souches *E. coli* ATCC et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, bien qu'elles soient plutôt sensibles à la CAZ il y'a absence d'effet additif entre l'ATB et l'huile, les diamètres des combinaisons sont inférieurs à ceux de l'addition avec des valeurs allant jusqu'à 9 mm

Concernant les diamètres calculés de l'AMC et de l'huile, comparé à ceux de la combinaison nous distinguons un autre effet antagoniste ; les diamètres de combinaison

calculés sont largement inférieurs à ceux des diamètres additionnés environs par la moitié de leurs valeurs.

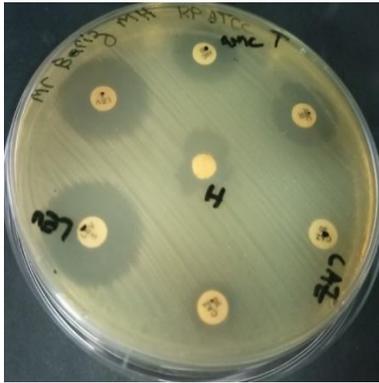
Le même effet antagoniste a été constaté avec l'antibiotique LEV avec des diamètres largement inférieurs à ceux de la combinaison.

Cet effet peut s'expliquer d'une part par la faible quantité d'huile administrée (10 µl) qui est probablement peu suffisante pour effectuer un effet plus grand sur les tapis microbiens, d'autre part cet effet peut probablement s'expliquer par un manque d'interaction entre les composés de l'HE et les antibiotiques ; il est possible aussi que la nature multirésistante des souches ait joué un rôle quant à cet effet antagoniste, en effet, l'activité antibactérienne de l'HE étudiée étant réduite il est probable que, malgré la désorganisation de la paroi bactérienne et l'entrée de l'ATB dans la souche le spectre d'action n'a pas été large, ou alors, que les molécules cibles présentes sur la paroi des souches n'ont pas été reconnus par composantes de l'huile, c'est-à-dire que les sites de reconnaissances ont été modifiés.

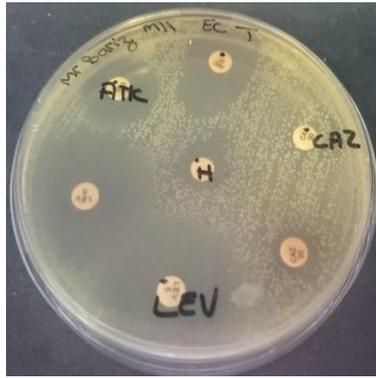
**Tableau 13** : résultats de l'interaction de l'huile de *Thymus serpyllum* et antibiotiques.

	<i>Thymus serpyllum</i>									
	ATB seul			HE	Addition			Combinaison		
	AMC	CAZ	LEV		AMC	CAZ	LEV	AMC	CAZ	LEV
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	16.5	0	22	16	32.5	16	38	17.5	10	23
<i>K. pneumoniae</i> 3520	11.5	0	24	19	30.5	19	43	19	12	22.5
<i>K. pneumoniae</i> 3511	12	0	7	22	34	22	29	36.66	18	24
<i>K. pneumoniae</i> 1216	12	0	22	22	34	22	44	38	23	22
<i>K. pneumoniae</i> 5111	10.5	0	22	32	42.5	32	54	29.5	12.5	24
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	20	0	34	25	45	25	59	20	12	29.5
<i>P. aeruginosa</i> 27853	0	21	24	0	0	21	24	0	21	24

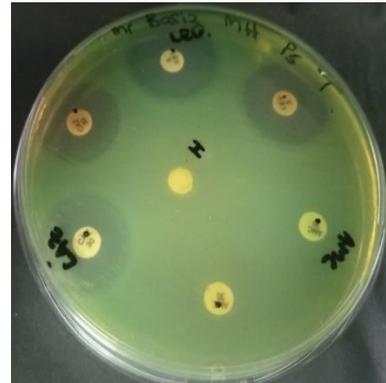
Huile essentielle de *Thymus serpyllum*



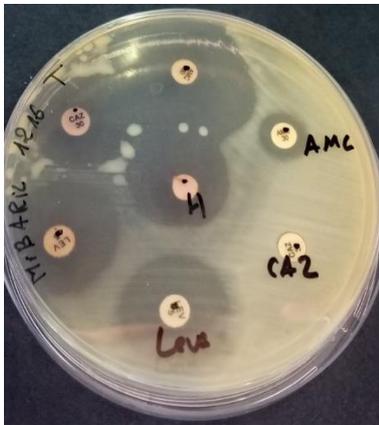
*K. pneumoniae* ATCC 700603



*Escherichia coli* ATCC 25922



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



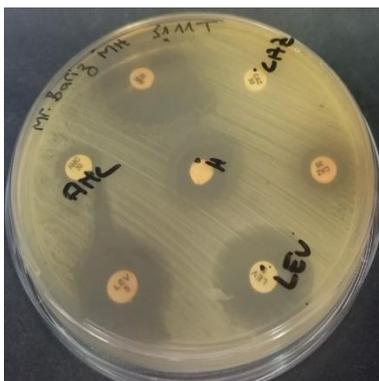
*K. pneumoniae*1216



*K. pneumoniae*3511



*K. pneumoniae*3520



*K. pneumoniae*5111

**Figure 15** : Images des interactions entre les ATB et l'HE de *Thymus serpyllum* (Photos prises au laboratoire)

Le tableau 13 désigne les résultats obtenus avec l'huile essentielle du thym, nous remarquons en premier lieu la présence d'un effet antagoniste chez les souches cliniques 3520 et 5111 ainsi que les souches de références KP, *Pseudomonas* et *E. coli*, ce type d'interaction concerne les antibiotiques AMC, CAZ et LEV avec des diamètres bien inférieurs à ceux des disques d'ATB et d'huile additionnés :

Les souches montrent toutes à l'exception de Ps une résistance à la CAZ, les diamètres des disques combinés est largement inférieur aux diamètres des additions HE+ATB avec une différence allant de 6mm à 10mm diamètre du disque compris. Concernant la Levofloxacin un effet antagoniste est observé sur l'ensemble des souches tandis que pour l'AMC cet effet concerne les souches de référence ainsi que les souches cliniques 3520 et 5111, les diamètres de combinaison HE/ATB présente des valeurs largement inférieures à celles de l'addition des disques séparés comme démontré ci-dessous :

Cet antagonisme est probable par la forte résistance des souches aux ATB notamment dans le cas de CAZ qui n'a montré aucune activité, cette forte résistance aux ATB utilisés restreint l'effet antibactérien de l'huile du thym.

On observe un important effet synergique pour les souches 1216 et 3511, cet effet s'est produit entre l'huile et l'amoxicilline + acide clavulanique avec des diamètres de zone d'inhibition des disques combinés bien supérieurs à ceux de l'addition avec une différence allant de 2 à 4 mm, ce qui est largement visible et considérable :

36.66 > 34

38 > 34

Ce large effet synergique peut s'expliquer par la présence du thymol, élément majeur de l'huile essentiel du thym, combiné aux molécules inhibitrices de bêta-lactamases présentes dans l'acide clavulanique associé à l'amoxicilline ; les souches cliniques utilisées étant multirésistantes et productrices de bêta-lactamases à spectre élargi voient leurs paroi externe désintégrée par l'action des composants de l'huile essentielle du thym, notamment le thymol mais aussi d'autres composés phénolique et aromatiques, une fois la paroi fragilisé et possiblement perforée, ceci provoque la destruction d'une partie des souches tandis que d'autres sont détruites par l'entrée facilitée de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie, l'acide

clavulanique inhibe l'action des bêta-lactamases et l'ampicilline se charge de détruire les bactéries fragilisées.

Un autre effet synergique beaucoup moins important a été observé pour la souche clinique 1216 avec l'antibiotique CAZ, le diamètre du disque combiné est supérieur par rapport au diamètre additionné du disque d'ATB et de l'huile avec une différence d'un mm :  $22\text{mm} < 23\text{mm}$ .

Ce faible effet synergique peut s'expliquer en grande partie par l'action de l'huile essentielle du thym sur les cellules bactériennes, ces dernières étant fortement résistantes à l'ATB.

L'étude des effets synergiques des huiles essentielles ainsi que des antibiotiques est devenu un facteur essentielle dans la lutte contre l'antibiorésistance ; en 2021, **Bakhtia et al.**, évaluaient l'effet synergique des antibiotiques et de l'HE d'*A. campestris* par la méthode de diffusion discale sur milieu gélosé, les résultats obtenus ont montré que l'huile montrait un important effet synergique contre cinq différentes bactéries dont des gram positif et négatif, en combinaison avec la gentamicine (CN) et la chloramphénicol (Cl) tandis que la combinaison de l'huile avec l'érythromycine (E) a conduit à une synergie sur trois des cinq bactéries testées, toutes des gram négatives (*E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. mirabilis*), dû à ces résultats importantes, il est possible que la présence de synergie avec l'HE de l'*Artemisia* soit dû à la composition de l'huile en alcools terpènes solubles en milieux aqueux ainsi qu'aux composés phénoliques connus pour leurs forte activité antibactérienne.

Dans une étude similaire en 2018, **Milenkovića et coll** ont démontré les huiles *C. sylvatica*, *C. vardarensis* et *C. nepeta* possédaient un effet synergique en combinaison avec la gentamicine et la ciprofloxacine.

Dans une étude menée en 2021 par **Ala'a Q** et **Muhsin**, à l'université des sciences en Iraq, la synergie a été testée entre 9 Huiles Essentielles avec 6 différents antibiotiques dans le but de rendre les souches bactériennes sensibles aux antimicrobiens ; l'effet synergique se traduit par l'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition en comparaison avec le diamètre de l'antibiotique seul.

L'étude a mis en évidence la présence de synergie entre les différentes HE utilisées, notamment celles du thym, de l'eucalyptus, la menthe et la cannelle pour les souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* qui présente 21 cas de synergie avec les huiles et les ATB

utilisés contre une dizaine de cas pour *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* dont le diamètre des disques atteint les 18mm de zone d'inhibition.

Cette synergie avec les huiles peut s'expliquer par la présence de composés alcoolique et phénolique dans les huiles qui facilite la désintégration des membranes bactériennes et facilite l'entrée des ATB dans la bactérie.

**Bekka-Hadji et al, 2022** a étudiée la synergie entre les HE de la menthe (*M. pulegium L.*) et l'Artémisia (*A. herba alba Asso.*) et un ensemble d'antibiotiques appartenant à différents groupes. L'étude fût menée sur deux souches multirésistantes : *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipenème (IMP), au céfotaxime (CTX), à la céfépime (FEP) et à d'autres antibiotiques, ainsi que *S. aureus* résistant à la méticilline.

La combinaison entre l'huile de *M. pulegium* et les différents antibiotiques ont montré des interactions antagonistes avec cinq d'entre eux (NA, AT, CIP, CTX, PIP et TIC) comparés à l'huile seul, alors qu'un effet synergique a été obtenu avec les autres (AK, CAZ, FEP, IMP, TCC, et TOB) fût observé. Dans le cas d'*A. herba alba*, d'une part des interactions antagonistes ont été observées pour les antibiotiques AK, AT, CIP, FEP, PIP, et TOB, alors qu'un effet indifférent a été obtenu avec CAZ et TIC contrairement à l'HE seul, d'autre part des effets synergiques ont été obtenus avec l'AN, le CTX, le PMI et la CCI

Ce qui implique que l'huile de *M. pulegium* possède un meilleur effet synergique que l'OE d'*A. herba alba*. L'étude a également démontrée la présence d'une forte synergie pour l'huile de *M. pulegium* en association avec des antibiotiques appartenant aux groupes pénicilline, céphalosporine, carbapénèmes et aminoglycosides faisant augmenter le diamètre de la zone d'inhibition de plusieurs rendant la souche *Acinetobacter* sensible ; cette étude est appuyée par les résultats de **Rosato et al., 2010** qui a souligné une forte synergie observée entre la gentamicine et *Anibarosae odora* contre *A. baumannii*.

# CONCLUSION

Cette étude a été réalisée dans l'objectif de déterminer l'étendue de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles (*Thymus*, Clou de girofle et *Eucalyptus*) sur des souches cliniques multirésistantes de *Klebsiella pneumoniae* ainsi que les types d'interaction de ces huiles en combinaison avec différents antibiotiques ; le but final étant de trouver des synergies entre les composants utilisés et permettre la recherche d'alternative aux antibiotiques pour la lutte contre l'antibiorésistance.

Trois huiles essentielles issues de plantes médicinales ont été utilisées, à savoir le *Thymus serpyllum*, *Eucalyptus globulus* et *Syzygium aromaticum* et extraites par la technique d'entraînement à la vapeur grâce à un distillateur d'huile essentielle.

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles utilisées nous a révélé que les souches cliniques y étaient sensibles et plus particulièrement à l'huile du *Thymus serpyllum* avec des diamètres importants d'activité qui peut s'expliquer par la forte teneur de la plante en thymol. Les tests d'interaction ont révélé la présence d'un antagonisme entre certains antibiotiques ainsi que les composants des huiles mais aussi une synergie entre l'huile essentielle du thym et l'antibiotique amoxicilline + acide clavulanique, ce dernier est caractérisé par la présence d'un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases et les composants de l'huile qui pourrait permettre la désintégration de la paroi bactérienne pour permettre à l'antibiotique de pénétrer plus facilement dans la souche.

Au vu de ces résultats, nous avons la confirmation de présence d'interactions synergiques entre les ATB et HE du thym, ceci nous ouvre une multitude de perspectives d'utilisation ; pour lutter contre l'antibiorésistance des souches dans les hôpitaux ; il serait intéressant de valoriser et d'utiliser des solutions à base d'HEs. Des mélanges avec des antibiotiques et les huiles ont déjà été utilisés pour doper l'effet des ATB sans nuire à la santé du patient. Se pencher davantage sur ce type de travail en utilisant les huiles d'autres plantes locales tel que la menthe ou l'origan pourrait aussi s'avérer faisable en modifiant les concentration d'huile pour minimiser les effets des antibiotiques et freiner la propagation de la résistance notamment dans les milieux hospitaliers et dans les services des soins intensifs.

# REFERENCES

- **A. Hassan**, Baydaa *Klebsiella pneumonia* growth on macconkey agar medium DOI - 10.13140/RG.2.2.12593.84329
- **Abbott, S. L. (2007)**.Klebsiella, Enterobacter, Citobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In P R. Murray, E.J. Baron, J.H.Jorgensen, M.L.Landry& M.A.Pfaller (Eds.), Manual of clinical Microbiology (9th ed., pp.698-711).Washington, USA : ASM Press.
- **Abdel Azim.Nahla Shazli, Abdullah.Maha, Ibrahim Al- Zaban .Mayasar, Youssef Nofal.Marwa, Somily. Ali Mohammed,2019**, Prevalence and Antibiotic Susceptibility Among Gram negative Bacteria isolated from intensive Care Hospital in Riyadh, Saudi Arabia, *J Pure Appl Microbiol.*, 2019 13(1) : 201-208 doi : 10.22207/JPAM.13.1.21
- **Ala'a Q. Hayder, Muhsin A. Essa(2021)** Eliminate bacterial resistance to antibiotics through synergistic effect with plant essential oils, *J.Educ. Sci. (ISSN )*
- **Applebaum PC.,(1992)**. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* :an overview *ClinInfectDis.*1992 Jul;15(1):77-83.doi: 10.1093/clinids/15.1.77.PMID:1617076
- **Arteaga-Livias K, et al. (2021)**. A multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a Peruvian hospital: Another threat from the COVID-19 pandemic. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.*<https://doi.org/10.1017/ice.2020.140>.
- **Assaggaf, H.M.; Naceiri Mrabti, H.; Rajab, B.S.; Attar, A.A.; Hamed, M.; Sheikh, R.A.; Omari, N.E.; Menyiy, N.E.; Belmehdi, O.; Mahmud, S.; Alshahrani, M.M.; Park, M.N.; Kim, B.; Zengin, G.; Bouyahya, A.** Singular and Combined Effects of Essential Oil and Honey of *Eucalyptus Globulus* on Anti-Inflammatory, Antioxidant, Dermatoprotective, and Antimicrobial Properties: In Vitro and In Vivo Findings. *Molecules* **2022**, *27*, 5121. <https://doi.org/10.3390/molecules27165121>
- **Bachir Raho Ghalem and Benali Mohamed, (2008)**. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* Vol. 2(10). pp. 211-215, December, 2008, Available online <http://www.academicjournals.org/ajpp>
- **Baerwolf S, Geffers C, Behnke M. (2002)**.Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital Shea 216.
- **Bailey J H .,J W Klimek., C J Cavallito, (1948)**.Induced Resistance of *Staphylococcus aureus* to Various Antibiotics ;DOI: 10.1128/jb.55.2.139-145.1948.
- **BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D. ET IDAOMAR M. (2008)**.Biological effects of essential oils - a review. *Food Chemistry Toxicology.*,46: 446-475.
- **Bekka-Hadji Fahima, Bombarda Isabelle, Djoudi Ferhat, Bakour Sofiane et Touati Abdelaziz, 7 February 2022**, Chemical Composition and Synergistic Potential of *Mentha pulegium* L. and *Artemisia herba alba* Asso. Essential Oils and Antibiotic against Multi-Drug Resistant Bacteria, *MDPI.Appl.Sci.* DOI :<https://doi.org/10.3390/molecules27031095>
- **Boukhatem Mohamed Nadjib, Asma Boumaiza, Hanady G. Nada, Mehdi Rajabi and Shaker A. Mousa(2020)**.*Eucalyptus globulus* Essential Oil as a Natural Food Preservative: Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Properties In Vitro and in a Real Food Matrix (Orangina Fruit Juice), *MDPI Appl Sci.* DOI : doi:10.3390/app10165581.
- **Boukhatem Mohamed Nadjib,FERHAT Amine et KAMELI Abdelkarim(2019)**. Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles :Revue de littérature. *Revus Agrobiologia* :1653-1659.

- **Bouyahya. A, Y. Bakri, A. Et-Touys A. Talbaoui, A. Khouchlaa, S. Charfi, J. Abrini, N. Dakka, 2017**, Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries, DOI : DOI 10.1007/s10298-017-1118-z
- **Bretmaier P.D.E.,(2006)**. Terpenes :Flavors,Fragrances, Pharmaca ,Pheromones. Tec &Doc, Lavoisier. Weinheim,Germany.
- **Brisse S., Verhoef J. ( 2001 )**. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. . Int J Syst Evol Microbiol 51, 915–924.
- **Brock, T. (1990)**. The Emergence of Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Brumeton J., (1993)** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec et doc,lavoisier, paris : 915.
- **Bush K, Jacoby GA. 2009**. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Mar ;54(3) : 969-76.doi : 10.1128/AAC.01009-09.Epub 2009 DEC 7. PMID :19995920 ; PMCID : PMC2825993.
- **Cattoir Vincent, (2008)**. LES NOUVELLES BETA-LACTAMASES A SPECTRE ETENDU (BLSE), MAPAR 2008, URL : Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE).pdf.
- **Chambers HF & al.,(2007)**,Deleo FR Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol 7:629-641 DOI : <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2200>.
- **Coppen. John J.W , (2002)**. Eucalyptus The Genus Eucalyptus. CRC Press. p : 3-9
- **Croteau R., Kutchan T.M. et Lewis N.G.(2000)**. Natural Products (Secondary Metabolites). Biochemistry and Molecular Biology of Plants., 24: 1250-1319.
- **Damjanović-Vratnica Biljana, Đakov Tatjana , Šuković Danijela et Damjanović Jovanka , (2011)**. Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. Czech J. Food Sci. Vol. 29, 2011, No. 3: 277–284. URL : [https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/114\\_2009-CJFS.pdf](https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/114_2009-CJFS.pdf)
- **Deeksha Salaria, Rajan Rolta, Chirag N. Patel, Kamal Dev, Anuradha Sourirajan & Vikas Kumar (2021):** *In vitro* and *in silico* analysis of *Thymus serpyllum* essential oil as bioactivity enhancer of antibacterial and antifungal agents, J.Biomol. Struct. Dyn., DOI: 10.1080/07391102.2021.1943530
- **Dekker JP, Frank KM, Youn JH, Drake SK, Weingarten RA, Lau AF**. Clinical Performance of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Detection of Certain blaKPC-Containing Plasmids. J Clin Microbiol. 2016 Jan;54(1):35-42. doi: 10.1128/JCM.01643-15.
- **Djenane D, Yangüela J, Amrouche T, Boubrit S, Boussad N, Roncalés P**. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. Food Sci Technol Int. 2011 Dec;17(6):505-15. doi: 10.1177/1082013211398803.
- **Dunn .Steven J, Connor Christopher and McNally Alan, (2019)**. The evolution and transmission of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: the complexity of clones and plasmids, Curr Opin Microbiol., 51:51–56, DOI : <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.06.004>
- **Ebongue CO, Tsiyok MD, Mefo'o JP ,Ngaba GP ,Beyiha G, Adiogo D. ,(2015)** .Evolution de la résistance aux Antibiotiques des entérobactéries isolées à l'Hôpital Général de Douala de 2005 à 2012 [Evolution of antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae isolated at the Douala General Hospital from 2005 to 2012]. Pan Afr

- Med J .2015 Mar 12 :20:227. French. Doi: 10.11604/pamj.2015.20.227.4770.PMID:26140070;PMCID: PMC 4482524.
- **Elhani .D.,( 2012).** Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accroît. Ann Biol Clin 2012 ; 70(2) : 117-40 doi:10.1684/abc.2012.0686.
  - **El Atki Y, Aouam I, El Kamari F, Taroq A, Nayme K, Timinouni M, Lyoussi B, Abdellaoui A (2019).** Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. J Adv Pharm Technol Res. 2019 Apr-Jun;10(2):63-67. doi: 10.4103/japtr.JAPTR\_366\_18.
  - **El Omari Khaled, Monzer Hamze, Saer Alwan, Marwan Osman,Charafeddine Jama, Nour-Eddine.(2019).**In-vitro evaluation of the antibacterial activity of the essential oils of *Micromeria barbata*, *Eucalyptus globulus* and *Juniperus excelsa* against strains of *Mycobacterium tuberculosis* (including MDR), *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae* J.Infect.Public Health 12, 615–618, , DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.01.058>
  - **Fevre C., Passet V., Weill F. X., Grimont P. A., Brisse S. ( 2005 ).** Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B. . Antimicrob Agents Chemother 49, 5149–5152.
  - **Freney J, R. F., Hansen W, and Bollet TC. (2000).** Précis de bactériologie clinique.
  - **Galani.Irene, Karaiskos.Ilias& Giamarellou.Helen (2021):** Multidrugresistant *Klebsiella pneumoniae*: mechanisms of resistance including updated data for novel  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations, Expert Rev .Anti-infect.Ther., DOI:10.1080/14787210.2021.1924674.
  - **GARNEAU F.X. (2004).**Le matériel végétal et les huiles essentielles . Manuel pratique. Huiles essentielles :de la plante à la commercialisation .1-16.
  - **GAMBRELLA. Fabienne,** « Clou de girofle et fleurs des girofliers », [EN LIGNE] ,22/07/2021.[<https://www.futura-sciences.com/planete/dossiers/botanique-epices-histoire-senteurs-epices-858/page/4/>] ,(MAI 2022) .
  - **Georgopapadakou N.H. (1993).** Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ - lactams. Antimicrob. Agents Chemother., 37 : 2045-2053
  - **Goja ,I. ;Ulici, A. ;Culea,M . ;Munteanu,V. ;Podea,P ,2020 ;**The influence of geographic location and enzyme- assisted extraction on essential oils composition of *Thymus serpyllum* growing wild in Transylvania .Stud .Univ. Babeş Bol. Chem. 2020,65, 135-147
  - **Grimont P et Grimont F. (2005).** GENUS XVI KLEBSIELLA. In : Brenner D. J., Krieg N.R., Stanley D.J.Bergey's Manual of systematic Bacteriology, Springer, New York, pp 685-693.
  - **Dr Hamzaoui I** Microbiologie-clinique, «Entérobactéries et résistance aux bêta-lactamines », [En ligne], <https://microbiologie-clinique.com/Enterobacteries-resistance-beta-lactamines.html>. consulté :Juin 2022 .
  - **Haro-Gonzalez,J .N;Castillo-Herrera,G.A ;Martinez-Velazquez,M . ,& Espinosa-Andrews,H .** «Huile essentielles de clou de girofle (*Syzygium aromaticum* L .Myrtaceae) :extraction ,composition chimique, application alimentation et bioactivité essentielle pour santé humaine»,MDPI 26,Octobre2021,p.01-05.
  - **Henson, S.P., et al. (2017)** Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Invasive Infections over a Decade at Kilifi County Hospital in Kenya.Int .J.Med.Microbiol, 307, 422-429. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.006>.
  - **Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S, Cao H, Wilksch J, Gorrie C, Schultz MB,**

- Edwards DJ, Nguyen KV, Nguyen TV, Dao TT, Mensink M, Minh VL, Nhu NT, Schultz C, Kuntaman K, Newton PN, Moore CE, Strugnell RA, Thomson NR. 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci USA 112:E3574–E3581.
- Hussein. Maytham, Wong. Labell J.M, Zhao. Jinxin, Vanessa E. Rees, Rafah Allobawi, Rajnikant Sharma, Gauri G. Rao, Mark Baker, Jian Li, Tony Velkov,( 25 fevrier 2022). Unique mechanistic insights into pathways associated with the synergistic activity of polymyxin B and caspofungin against multidrugresistant *Klebsiella pneumoniae*, [En ligne], DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.02.021>
  - INOUYES . ABE S. ;RZPO T.(2003). Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts .Int J of Aromatherapy. 13,33-41.
  - Janda, J. M., & Abbott, S. L.,(2006). “The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*,” The Enterobacteria, 2nd ed. 115-129. Washington, USA: ASM Press.
  - Jerbi Amel , Amal Derbali, Abdelfatteh Elfeki & Majed Kammoun,(2017). Essential Oil Composition and Biological Activities of *Eucalyptus globulus* LeavesExtracts from Tunisia, J.Essent.Oil-Bear. Plants, 20:2, 438-448, DOI:10.1080/0972060X.2017.1304832.
  - Kaloustian ,Jacques ;Hadji-Minglou,Francis.(2012).(La connaissance des huiles essentielles :qualitologie et aromathérapie)Springer ,France ,11-16 ;26 .
  - Karkey,Abhilasha;Thwaites,GuyE.;Baker,Stephen3., (2018).,The evolution of antimicrobial resistance in Salmonella Typhi Curr.Opin.Gastroenterol., Volume34 ,Number1 ,January2018,pp.25-30(6) DOI: <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000406>
  - Kwiatkowski P, Pruss A, Grygorcewicz B, Wojciuk B, Dołęgowska B, Giedrys-Kalemba S, Kochan E, Sienkiewicz M.(2018) Preliminary Study on the Antibacterial Activity of Essential Oils Alone and in Combination with Gentamicin Against Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing and New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. Microb Drug Resist. 2018 Nov;24(9):1368-1375. doi: 10.1089/mdr.2018.0051.
  - Langeveld .Wendy T, Veldhuizen.Edwin J.A. & Burt.Sara A., (2014) Synergy between essential oil components and antibiotics :a review ,Crit.Rev.Microbiol. ,40 :1,76-94,DOI :100.3109/1040841X.763219.
  - Le Minor L and Véron M. (1989). Bactériologie médicale.2eme édition, Flammarion Médecine-Science Paris 2 : 428-432.
  - Luís, Â., et al.,(2015) .Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. Ind. Crops Prod. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>
  - Madi A.,(2010). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantesmédicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Magister, Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine, 5 ; 17 ; 51 ; 5.
  - Maillard .Aude, Aromathérapie, [En ligne]. Traitement antibiotique naturel puissant avec les huiles essentielles, Consulté : Juin 2022 Disponible sur : <https://www.aude-maillard.fr/antibiotique-bacteries-huile-essentielle-microbiote>
  - Marchese Anna, Barbieri Ramona, Coppo Erika, Orhan Ilkay Erdogan, Daglia Maria, Nabavi Seyed Fazel, Izadi Morteza, Abdollahi Mohammad, Nabavi Seyed

- Mohammad & Ajami Marjan (2017)** Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint, *Crit. Rev. Microbiol.* 43:6, 668-689, DOI: 10.1080/1040841X.2017.1295225
- **Mammeri .Bakhtia, Bahri. Fouad, Kouidri. Mohamed, Boudani.Bouharaoua, Arioui.Fatiha,** EVALUATION OF CHEMICAL COMPOSITION, ANTI INFLAMMATORY, ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND SYNERGISTIC EFFECT BETWEEN ANTIBIOTICS AND THE ESSENTIAL OIL OF *ARTEMISIA CAMPESTRIS* L. *J.Appl.Biol.Sci.E-ISSN: 2146-0108 16(2): 230-247, 2021 DOI: 10.5281/zenodo.6590285*
  - **Manzar Alam, Nilofer Bano, Taufeeq Ahmad, Amit Baran Sharangi , Tarun Kumar Upadhyay , Yasser Alraey, Nadiyah M. Alabdallah, Mohd Ahmar Rauf, Mohd Saeed ;2022.** Synergistic Role of Plant Extracts and Essential Oils against Multidrug Resistance and Gram-Negative Bacterial Strains Producing Extended-Spectrum béta-Lactamases, 26 juin 2022, *Antibiotics* 2022, 11, 855. DOI : <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070855>.
  - **McInerney JO, Hall RJ, Whelan FJ, , Ou Y, Domingo-Sananes MR.** Horizontal Gene Transfer as a Source of Conflict and Cooperation in Prokaryotes. *Front Microbiol.* 2020 Jul 17;11:1569. doi: 10.3389/fmicb.2020.01569
  - **Moussaoui Fadila and Alaoui Tajelmolk,** Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants, *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; 6(1): 32–37, DOI : <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.024>
  - Myrtéa la formation essentielle [En ligne]. Monographie huile essentielle *Eucalyptus globulus*, Consulté : Juin 2022 Disponible sur : <https://www.myrtea-formations.com/index.php?mod=aromatheque&rubrique=HE&act=fiche&ind=57#:~:text=M%C3%89DIATH%C3%88QUE%20MYRT%C3%89A%20FORMATIONS&text=Originaire%20d'Australie%2C%20I,les%20plus%20grands%2>.
  - **NCBI.(s.d)** NCBI.consulté le 11 mai 2022 à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=1276653&v=3&lin=3&keep=1&srchmode=1&unlock>
  - **Nikolic.Milos, Glamoclija.Jasmina, Ferreira .Isabel C.F.R,Calhelha. Ricardo C , Fernandes.Ângela, Tatjana Markovic´, Dejan Markovic´, Giweli.Abdulhamed, Sokovic.Marina, 2013,** Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils, / *Ind Crops Prod* 52 : 183–190, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.006>
  - **Nordmann Patrice,** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif, *MEDECINE/SCIENCES, M/S n° 11, vol. 26, novembre 2010, DOI : <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/20102611950>*
  - **Philippon. A ,(2008)** Résistance bactérienne : définitions, mécanismes, évolution, *Maladies infectieuses*, 8-006-N-10, 2008, DOI : 10.1016/S1166-8598(08)26016-3
  - **Philippon A.,(2013),** Les Béta-Lactamase à Spectre Elargi ou Etendu(BLSE) Extended-spectrum Beta-lactamases, DOI : <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2013.04.006>.
  - **Podschun, R, Penner I, and U. Ullmann. (1992).**Interaction of Klebsiella capsule type 7 with human polymorpho nuclear leucocytes- *Microb pathogene-1992 ; 13 :371-379.*
  - **Praciak .Andrew,2019.** CABI Invasive Species Compendium [En ligne] *Eucalyptus globulus*(Tasmanian blue gum). UK, 2019, Consulté :Juin 2022. Disponible sur : <https://www.cabi.org/isc/datasheet/22680>

- PRANAROM Aromathérapie scientifique, [En ligne]HUILES ESSENTIELLES ET ANTIBIOTIQUES ÉGAL LA FIN DES PATHOGÈNES RÉSISTANTS ?, Consulté : Juin 2022 Disponible sur : <https://www.pranarom.fr/fr/blog/post/huiles-essentielles-antibiotiques-la-fin-des-pathogenes-resistants-.html>.
- **Rammelkamp, C. & Maxon, T. (1942)**. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. Proceedings of the Royal Society, Exp.Biol.Med., 51, 386-389.
- **Reyes.Jorge, Aguilar.Ana Cristina, Caicedo .Andrés, (Novembre 2019)**. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Microbiology Key Points for Clinical Practice, PubMed Central, DOI: <https://doi.org/10.2147%2FIJGM.S214305>
- **Rodriguez Carla, Siddhi Desai, Virginie Passet, Devarshi Gajjar, Sylvain Brisse.(12 janvier 2022)**. Genomic evolution of the globally disseminated multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal group 147, Microbial Genomic volume 8, DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000737>.
- **Ryding.Sara(2021)**, What are Extensively Drug Resistant(XDR) Bacteria?, URL: [https://www.news-medical.net/health/What-are-Extensively-Drug-Resistant-\(XDR\)-Bacteria.aspx](https://www.news-medical.net/health/What-are-Extensively-Drug-Resistant-(XDR)-Bacteria.aspx)
- **Salama M. El-Darier ·Amani M. D. El-Ahwany ·Eman T. Elkenany· Ahmed A. Abdeldaim, (Janvier 2018)**. An in vitro study on antimicrobial and anticancer potentiality of thyme and clove oils : Rend. Lincei Sci. Fis. Nat, DOI : <https://dddsoi.org/10.1007/s12210-018-0672-0>.
- **Sebghati, T. A., T. K. Korhonen, D. B. Hornick, and S. Clegg. (1998)**. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. Infect.Immun. 66 :2887-2894.
- **SHIRNER M.(2004)** .Huiles essentielles .Description et utilisation de plus de 200huiles essentielles et huiles végétales . 1èreédition, Gy Trédaniel Editeur, Paris.
- **Tamert A., Latreche A.,Aouad L., (2017)**. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Extracts of *Thymus serpyllum* and *Thymus vulgaris* from the Mount of Tessala (Western Algeria).Pharmacognosie, 15: 384-394.
- **Théophile et l'équipe de la compagnie des Sens.** « HISTOIRE DES HUILES ESSENTIELLES » ,[EN LIGNE ] ,2019.[<https://www.compagnie-des-sens.fr/histoire-des-huiles-essentielles/>]. ( MAI 2022).
- **VALNET M.,( 2005)**.Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth Int. J. Food Microbiol.85,p:73-81.
- **Verheagen.Jon, (2017)** : Les Entérobactéries.
- **Wang.Guoying, Zhao.Guo, Chao.Xiaoyu, Xie.Longxiang, Wang.Hongju, (28 août 2020)**. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*, Int. J. Environ. Res. Public Health 2020, p :6-9, doi:10.3390/ijerph1717627
- **Williams P, and Thomas JM. (1990)**.The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*.RevMed Microbiol.1990 ;1 :196-204.
- [En ligne] WHO.int, Résistance aux antimicrobiens, 26 octobre 2020, URL : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- **Yala .D , A.S Merad, D.Mohamedi, M.N Ouar Korich, 2001**, Resistance Bacterienne aux Antibiotiques, Médecine du Maghreb 2001 n°91, p : 13-14, URL : <http://www.santetropicale.com/Resume/9102.pdf>
- **Yap .Polly Soo Xi, Yiap .Beow Chin, Ping .Hu Cai, Lim .Swee Hua Erin ,( 2014)**, Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance, The Open Microbiology Journal, 8, 6-14, DOI : <https://doi.org/10.2174%2F1874285801408010006>.
- **Yeddes et al.2022** .Trends in Phytochemical Research 6(1) 2022 11-18.

- **Yvon MICHEL-BRIAND, (décembre 2006)**, La résistance aux  $\beta$ -lactamines les plus récentes : les mécanismes d'apparition et de diffusion de la résistance chez les entérobactéries, Bull. Acad. Natle Méd., 2007, 190, no 1, 35-51.
- Ajouter des huiles essentielles aux antibiotiques, l'idée de génie d'un chercheur, Consulté en juillet 2022 Disponible sur : <https://www.egora.fr/actus-medicales/infectiologie/30135-ajouter-des-huiles-essentielles-aux-antibiotiques-l-idee-de?nopaging=1>.
- <https://www.bio-enligne.com/produits/143-eucalyptus-globulus.html>
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ClovesDried.jpg>
- <http://bin.staticlocal.ch/websitecontent/9b/9bbac00207bdb77e98ccc4aff05c64c0fb3ef5e9/Aromatherapie.pdf>

# ANNEXES

**1.Composition des milieux :**

- **Milieu Muller-Hinton Agar**

Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17 g
Extrait de viande	2.0 g
Amidon	1.5 g
Calcium	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12.5 mg
Agar	15.0 g
Eau distillée	1 L
Ph	7.4±0.2

- **Milieu Gélose nutritive :**

Peptone	5.0 g
Extrait de viande de bœuf	1.0 g
Extrait de levure	2.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Agar	12.0 g
Eau distillée	1 L
Ph	7.3±0.2

- **Milieu MacConkey Agar :**

Peptone	20.0 g
Sel Billiaire N°3	1.0 g
Cristal Violet	0.001 g
Lactose	10.0 g
Rouge neutre	0.05 g
Chlorure de Sodium	5.0 g
Agar	15.0 g
Eau distillée	1L
Ph	7.1

## **2. Technique de la coloration de Gram :**

La coloration de Gram est la coloration différentielle microbiologique la plus importante et la plus largement utilisée, elle permet de différencier les bactéries selon 2 critères principaux : leur forme et leur affinité pour les colorants, les étapes sont décrites comme suit :

- 1- Préparer un frottis bactérien sur une lame et le sécher au-dessus du bec bunsen.
- 2- Fixation du frottis en passant la lame à travers la flamme trois fois.
- 3- Inonder le frottis pendant une minute de violet de gentiane
- 4- Jeter l'excès
- 5- Recouvrir la lame de Lugol pendant 45 secondes
- 6- Jeter l'excès.
- 7- Rincer la lame à l'eau claire, l'eau ne doit pas tomber directement sur le frottis mais passer sur la pince.
- 8- Recouvrir d'alcool pendant 10-15 secondes
- 9- Jeter et rincer abondamment à l'eau.
- 10- Recouvrir de Fushine pendant 1 minute, c'est un colorant de contraste
- 11- Rincer la lame à l'eau.
- 12- Sécher la lame avec du papier absorbant
- 13- Observer au microscope optique à l'huile à immersion, objectif x100