

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

En Vue de l'Obtention de Diplôme d'Ingénieur d'Etat

En Génie Biologique

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne de quelques
huiles essentielles et l'effet de leurs associations avec
les antibiotiques*

Présenté par :

LAOUAR Samiya

SIFER Halima

Membre de jury

Présidente : M^{me} MESSOUADI K.

Examinatrice : M^{lle} DJINNI I.

Examinatrice : M^{lle} TIGHIDET S.

Promotrice : M^{lle} BEKKA F.

-Année Universitaire : 2012/2013 -



Remerciements



*En toute simplicité, nous tenons à remercier Allah de nous avoir guidé,
aidé et éclairé notre chemin.*

*Au terme de ce travail nous tenons à remercier en premier lieu notre promotrice
M^{lle} BEKKA F. de nous avoir accompagné durant cette recherche, pour ses
orientations, ses encouragements et surtout pour ses précieux conseils.*

*Nous tenons à remercier les membres de jury d'avoir accepté d'examiner notre
travail.*

*Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance et notre sincère
gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés durant ce cursus
Universitaire.*

*Finalement, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous ceux qui
ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*





Dédicaces

*A Mes très chers parents qui m'ont aidé, soutenu et Encouragé
dans toutes les épreuves de ma vie, qu'ils trouvent
ici tous signe de ma gratitude pour leurs sacrifices ;*

A Mon très cher bouboul

A Mon très cher frère adorable Abdessamed ;

A Mes chères sœurs Khadidja, Nabila, Razika et leurs maris;

A ma binôme et amie Samia

A tous mes amies sans exception

*A tous les gens de ma promotion enseignants
et étudiants*

Halima



Dédicaces

*J'ai le plaisir de dédier ce travail à :
Mes chers parents qui m'ont tout donné.*

A mes frères et mes Sœurs.

A tous mes amis : Nawal, Halima, Naima, Mounia, Mamin.

A ma très chère amie vida.

Et à toute la promotion de Génie biologique.

SAMIYA

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Glossaire

Introduction 01

Synthèse bibliographique

I. La résistance bactérienne aux antibiotiques 03

I.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline 03

I.2. *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème 04

II. Les huiles essentielles 06

II.1. Généralités sur les huiles essentielles 06

II.2. Composition chimique des huiles essentielles 07

II.3. Activité antibactérienne et mécanismes d'action des huiles essentielles 09

III. La synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques 10

Matériels et méthodes

I. Matériels 11

I.1. Huiles essentielles 11

I.2. Souches bactériennes cibles 12

II. Méthodes 13

II.1. Préparation de la suspension bactérienne 13

II.2. Antibiogrammes des souches cibles 13

II.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode des disques « aromatoigramme sur milieu solide ».....	13
II.4. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide	14
II.5. Etude de l'association « huile essentielle/antibiotique» par la méthode des disques.....	14
II.6. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles et des antibiotiques.....	15
II.6.1. Détermination des CMI des huiles essentielles et des antibiotiques par la méthode de microdilution en milieu liquide	15
II.6.2. Etude de l'association «huiles essentielle/antibiotique» par la méthode de microdilution en milieu liquide.....	15
III. Etude statistique.....	16

Résultats et discussion

I. Antibiogramme des souches cibles	17
II. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Artemisia herba Alba</i> Asso., <i>Lavendula stoechas</i> L. et <i>Mentha pulegium</i> L.....	17
II.1. Effet des huiles essentielles d' <i>Artemisia herba Alba</i> Asso., <i>Lavendula stoechas</i> L. et <i>Mentha pulegium</i> L. vis-à-vis d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
II.2. Effet des huiles essentielles d' <i>Artemisia herba Alba</i> Asso., <i>Lavendula stoechas</i> L. et <i>Mentha pulegium</i> L. vis-à-vis de SARM.....	18
II.3. Comparaison de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Artemisia herba Alba</i> Asso., <i>Lavendula stoechas</i> L. et <i>Mentha pulegium</i> L. vis-à-vis des deux souches <i>Acinetobacter baumannii</i> et SARM.....	20
II.4. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide des huiles essentielles et des antibiotiques.....	21
III. Etude de l'association « huile essentielle/antibiotique ».....	22
III.1. Effet de l'association « huile essentielle/antibiotique » vis-à-vis d' <i>A. baumannii</i>	22
III.2. Effet de l'association « huile essentielle/antibiotique » vis-à-vis de SARM.....	25
IV. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices	28

IV.1. Les CMI des antibiotiques et des huiles.....	28
IV.2. Etude de l'association « huile essentielle/Antibiotique » par la méthode de microdilution sur milieu liquide.	29
Conclusion	31
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

Figure 1: Diversité de structures de sécrétion des huiles essentielles	07
Figure 2: Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	09
Figure 3: Effet des différentes huiles essentielles vis-à-vis d' <i>A. baumannii</i>	17
Figure 4: Effet des différentes huiles essentielles vis-à-vis de SARM	19
Figure 5: Etude comparative de l'effet des HEs vis-à-vis d' <i>A. baumannii</i> et de SARM.....	20
Figure 6: Effet de l'association de l'huile essentielle de <i>M. pulegium</i> avec les différents antibiotiques vis-à-vis d' <i>A. baumannii</i>	23
Figure 7: Effet de l'association de l'huile essentielle d' <i>A. herba Alba</i> Asso. avec les différents antibiotiques vis-à-vis d' <i>A. baumannii</i>	23
Figure 8: Effet de l'association de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> avec les différents antibiotiques vis-à-vis d' <i>A. baumannii</i>	24
Figure 9: Effet de l'association de l'huile essentielle de <i>M. pulegium</i> avec les différents antibiotiques vis-à-vis de SARM.....	26
Figure 10: Effet de l'association de l'huile essentielle de d' <i>A. herba Alba</i> Asso. avec les différents antibiotiques vis-à-vis de SARM	26
Figure 11: Effet de l'association de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> avec les différents antibiotiques vis-à-vis de SARM.....	27

Liste des tableaux

Tableau I: Présentation des plantes employées pour l'extraction des huiles essentielles	11
Tableau II: Caractéristiques et origine des souches bactériennes cibles	12
Tableau III: Effet des huiles essentielles vis-à-vis SARM et <i>A.baumannii</i>	21
Tableau IV: Effet des antibiotiques sur SARM et <i>A.baumannii</i>	22
Tableau V: Les Concentration Minimales Inhibitrices des HEs et des ATBs	28
Tableau VI: Effet de l'association « huile de <i>M. pulegium</i> L./Amikacine » vis-à-vis <i>A. baumannii</i>	30

Liste des abréviations

ABRI : *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème

Abs : Absorbance

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

ATB : Antibiotique

ATPase: Adenosine Triphosphate Synthétase

ATCC: American Type Culture Collection

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AH : *Artemisia herba alba* Asso.

BLSE : B-Lactamases à Spectre Elargi

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

ERV : Entérocoques Résistants à la Vancomycine

FICI : Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire

HE : Huile Essentielle

IN: Infections Nosocomiales

LS: *Lavendula stoechas* L.

LSD: Least Significant Difference

MH: Mueller-Hinton

MP: *Mentha pulegium* L.

PLP : Protéine Liant Pénicilline

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SM : Spectrométrie de Masse

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

UFC: Unité Formant Colonie

CA-MRSA: Community Associated -MRSA

Glossaire

Glossaire

L'acide mévalonique : Est un composé organique clé en biochimie. C'est le précurseur dans la voie métabolique, qui produit les terpènes et les stéroïdes.

L'acide shikimique : Intermédiaire biochimique important dans les plantes et les microorganismes. L'acide shikimique est le précurseur de la phénylalanine, tyrosine, et des acides aminés aromatiques.

Badiane : Arbuste de la famille des *Magnoliacées* qui porte des fruits appelés anis étoilé.

Cannelier : Arbre dont l'écorce fournit la cannelle.

Camphrier : Arbre de la famille des *Lauracées* dont on extrait le camphre.

Citronnelle : Plante herbacée tropicale de la famille des *Poacées* (*Graminées*), cultivée pour ses tiges et feuilles aux qualités aromatiques (à goût de citron). Elle contient du citronellol.

Curcuma : plante herbacée rhizomateuse vivace de la famille des *Zingibéracées* originaire du sud de l'Asie. Appelée aussi safran des Indes, elle fournit une teinture jaune, la curcumine.

Endocardite : Inflammation de l'endocarde (Membrane couvrant la surface interne du cœur). C'est une maladie assez rare mais souvent grave.

Eucalyptus : Grande arbre d'origine exotique aux feuilles bleuâtre longues et minces, très odorantes, aux branches pendantes, aux fleurs très petites disposées en ombelles.

Laurier noble : Arbre aromatique de la région méditerranéenne, à feuilles persistantes, lisses et luisantes, appartenant à la famille des *Lauracées*.

Méningites : Inflammation des méninges (la membrane enveloppant le cerveau et la moelle épinière), aiguë ou chronique, le plus souvent d'origine infectieuse, avec ou sans réaction purulente du liquide céphalo-rachidien.

Muscade : Graine aromatique de fruit du muscadier, de la grosseur d'une très petite noix, ovoïde, un peu ridée, de couleur brune et marbrée intérieurement, que l'on emploie comme épice.

Ostéomyélite : Inflammation de la corticale d'un os.

Phlegmon périnéphrétique : Abscess dû à une infection bactérienne se développant dans l'espace périrénal. Il est exceptionnellement primitif, évoluant dans le cadre d'une infection généralisée septicémique, notamment à staphylocoque.

Pneumonie : Inflammation aiguë d'un lobe pulmonaire, due au pneumocoque.

Rhizome : Tige souterraine vivace plus ou moins allongée, ramifiée ou non, pourvue de feuilles réduites à l'état de très petites écailles, émettant chaque année des racines adventives et un bourgeon apical qui donne naissance à une tige aérienne, légèrement enfouie dans le sol dans lequel elle pousse horizontalement ou affleurant la surface.

Santal : Arbre de petite taille, à feuilles opposées, à fleurs hermaphrodites, qui poussent en Extrême-Orient. Le bois de cet arbre contient des essences balsamiques.

Septicémie : Toute manifestation morbide générale due au développement de germes pathogènes et de leurs toxines dans le sang.

Trichome glandulaire : Projections microscopiques spécialisées se retrouvant sur plusieurs surfaces des plantes, leur fonction primaire est d'augmenter les chances de survie de la plante. Elles contiennent les huiles volatiles et d'autres sécrétions recouvrant la surface des feuilles et des pétales.

Vétiver : Plante tropicale, de la famille des *Graminacées*, originaire de l'Inde, caractérisée par des racines odorantes, des tiges droites hautes de un à trois mètres, utilisée en droguerie et parfumerie.

Introduction

Introduction

Le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ATB) augmente régulièrement que ce soit en milieu communautaire ou hospitalier et constitue un véritable problème de santé publique. Les bactéries développent, de plus en plus, de la résistance en s'adaptant aux thérapeutiques antibactériennes et de ce fait l'échec de traitement (Philippon, 2008 ; Kempf et *al.*, 2011). Environ 90-95% de souches de *Staphylococcus aureus* dans le monde sont résistantes à la pénicilline et dans la plupart des pays asiatiques 70-80% des mêmes souches sont résistantes à la méticilline (Hemaiswarya et *al.*, 2008). De même, les infections à *Acinetobacter baumannii* multirésistant aux ATBs et notamment à l'imipénème ont émergé depuis une dizaine d'années conduisant à des impasses thérapeutiques. En France, l'enquête nationale menée sur la prévalence des infections nosocomiales en 2006 indique que 12 % de ces dernières étaient résistantes à l'imipénème (ABRI), ce qui rend de plus en plus difficile, voire impossible, de traiter ce pathogène en raison de l'arsenal pharmaceutique et thérapeutique restreint (Shakouri et *al.*, 2010; Punpanich et *al.*, 2012). Il est donc important d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et de revenir à des solutions alternatives, notamment des médecines dites douces, basées sur les propriétés des plantes médicinales notamment des huiles essentielles (Oussou et *al.*, 2010).

Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants présentent un important potentiel en tant qu'agents antimicrobiens et dans plusieurs domaines industriels et médicaux. La diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés, ainsi qu'une utilisation moins dommageable, car ils n'ont pas d'effets secondaires (Amarti et *al.*, 2008; Mazari et *al.*, 2010 ; Goetz et Ghedira, 2012). Pour la même raison, aucune résistance particulière vis-à-vis des huiles essentielles n'a été décrite et il est important de souligner que certaines d'entre elles constituent des alternatives efficaces ou des compléments aux antibiotiques sans montrer le même effet secondaire (Amarti et *al.*, 2010; Rosato et *al.*, 2010).

De nombreuses études le plus souvent *in vitro* se sont intéressées à l'étude de l'association des antibiotiques et des huiles essentielles pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires associés aux médicaments. Ces recherches révèlent une synergie intéressante entre les antibiotiques et les huiles essentielles étudiées (Rosato et *al.*, 2010 ; Zafar et *al.*, 2010).

De ce fait, l'objectif de notre étude est de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso., *Lavendula stoechas* L. et *Mentha pulegium* L. contre deux souches bactériennes multirésistantes ; *Staphylococcus aureus*

Introduction

résistant à la métiline (SARM) et *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème (ABRI) et leurs associations aux antibiotiques auxquelles elles sont résistantes.

Pour cela nous optons pour la méthodologie suivante :

- Mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode des disques vis-à-vis *A. baumannii* et SARM;
- Détermination de l'activité bactériostatique ou bactéricide de ces huiles essentielles vis-à-vis des souches cibles;
- Etude de l'association huiles essentielles/antibiotiques par la méthode des disques;
- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles et des antibiotiques par la méthode de microdilution en milieu liquide;
- Etude de l'association huiles essentielles/antibiotiques par la méthode de microdilution en milieu liquide.

Synthèse Bibliographique

I. La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes. Parmi les bactéries multirésistantes, les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (EBLSE) sont les plus préoccupants à cause de leur pouvoir pathogène élevé, leur prévalence au sein des hôpitaux ainsi que dans le milieu communautaire (Philippon, 2008; Arnaud *et al.*, 2012).

I.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, sphériques, immobiles, de 0,5-1,5 μm de diamètre, pouvant être isolés, ou organisés en diplocoques, en chaînettes ou en grappes. Ce sont des aéroanaérobies facultatifs.

La production d'une coagulase, d'un pigment caroténoïde jaune doré, et la présence d'une protéine A de paroi caractérisent *Staphylococcus aureus* (Batard *et al.*, 2007).

S. aureus est l'un des principaux agents pathogènes pour l'homme, il colonise un quart à un tiers de la population en bonne santé faisant partie de la flore indigène de la peau et des cavités nasales et possède un arsenal impressionnant de facteurs de virulence impliquant dans les septicémies, bactériémies, endocardites aiguës, ostéomyélites, phlegmon périnéphrétique et des infections non suppuratives d'origine toxinique appelées toxémies staphylococciques (Lagier *et al.*, 2008; Vincenot *et al.*, 2008; Sibanda *et al.*, 2010; Tattevin, 2011).

Selon la dernière enquête de prévalence des infections nosocomiales de l'année 2006 en France, 19 % des infections nosocomiales étaient dues à *S. aureus*. Il représente le deuxième agent pathogène responsable de ce type d'infections après *Escherichia coli*, mais également son isolement en milieu communautaire est de plus en plus fréquent, ce qui émerge une nouvelle forme de SARM, connu sous le nom «SARM d'origine communautaire» (CA-MRSA), porte une virulence qui le rend plus contagieux et dangereux même pour les personnes en bonne santé (Lepelletier *et al.*, 2008; Vincenot *et al.*, 2008; Grohs, 2009).

À l'heure actuelle ces souches sont fréquentes et sont pratiquement résistantes à tous les antibiotiques β -lactamines disponibles. Deux principaux mécanismes sont impliqués dans cette résistance (Nour *et al.*, 2005; Sibanda *et al.*, 2010)

La production de β -lactamase: la β -lactamase est une enzyme inductible codée par le gène *blaZ* porté par un plasmide. Cette enzyme hydrolyse la pénicilline G et ses analogues

de structure. L'expression du *blaZ* est régulée par deux gènes, *blaR1-blaI* situés en amont et transcrits en direction opposée à *blaZ* (Nour et al., 2005).

La modification de la cible des antibiotiques (résistance intrinsèque): par la synthèse d'une protéine de liaison à la pénicilline, la PLP2a, qui entraîne une résistance à l'ensemble des β -lactamines. La PLP2a est codée par le gène *mecA*, porté sur un grand élément génétique appelé chromosome cassettes staphylococcique *mec* (SCC *mec*), acquis par un transfert parasexuel horizontal avec une souche de *Staphylococcus sp* à coagulase négative en présence des gènes intitulés *cassette chromosome recombinase* (*ccRA/ccRB* ou *ccRC*) bordé, à ses deux extrémités. La PLP2a est une peptidoglycane-transpeptidase qui n'a qu'une faible affinité pour les β -lactamines et permet la poursuite de la synthèse de la paroi bactérienne, même lorsque les quatre PLP classiques (1, 2, 3 et 4) sont inactivées par les β -lactamines. L'expression du gène *mecA* dépend au moins de deux systèmes régulateurs agissant au niveau transcriptionnel, gènes *mecI-mecR1* et *blaI-blaR*, le gène *mecR1*, agirait comme transducteur de signal: MecRI détecte la présence de β -lactamine grâce à son domaine extracellulaire (Nour et al., 2005; Hemaiswarya et al., 2008; Tattevin, 2011).

Des tendances récentes montrent que les souches résistantes à la vancomycine ont également vu le jour, indiquant un besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques (Sibanda et al., 2010).

I.2. *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème

A. baumannii est un bacille à Gram négatif ubiquiste, pathogène opportuniste, largement répandus dans la nature, le sol, les eaux douces, ainsi que chez l'animal et dans l'alimentation (produits laitiers, viandes...), émerge dans le monde ces dernières décennies comme un des principaux germes responsables d'infections nosocomiales. Sa capacité de survivre dans les milieux hospitaliers, et sur des surfaces sèches, aide dans sa transmission chez les patients hospitalisés. Ces infections englobent les bactériémies, les pneumonies, les infections du tractus urinaire et des parties molles, celle du système nerveux central et enfin les méningites (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010; Chiu et al., 2010; Kulah et al., 2010; Consales et al., 2011; Dhabaan et al., 2011; Zohoun et al., 2011; Karah et al., 2012).

A.baumannii semble avoir une tendance très rapide pour le développement de la résistance aux antimicrobiens particulièrement au carbapénème. Aujourd'hui ces souches sont résistantes aux différents principaux antibiotiques à travers le monde causant de graves problèmes thérapeutiques. La faible perméabilité de sa membrane externe à certains antibiotiques, l'expression constitutive de certaines pompes à efflux ainsi que sa capacité à

Synthèse bibliographique

accepter l'ADN étranger pourrait être l'une des raisons derrière cette résistance (Baran et *al.*, 2008; Kulah et *al.*, 2010; Dhabaan et *al.*, 2011; Neonakis et *al.*, 2011).

Un large éventail de mécanismes de résistance aux antimicrobiens est présenté par *A.baumannii*. L'analyse des séquences du génome d'un nombre des isolats multirésistants a révélé la présence de plusieurs îlots génomiques (AbaR1, R2, R3 et R5) contenant des gènes de résistance multiples probablement acquis à partir d'autres espèces Gram-négatif (Gordon et Wareham, 2010; Neonakis et *al.*, 2011).

A.baumannii possède une classe intrinsèque D-oxacillinase et une céphalosporinase chromosomique AmpC non inductible, ces oxacillinases appartiennent au groupe d'enzymes OXA-51- capables d'hydrolyser les pénicillines (benzylpénicilline, l'ampicilline, ticarcilline et pipéracilline) et carbapénèmes (imipénème et meropenem), mais ils ne le font que très faiblement. Une contribution importante à la résistance au β -Lactamines par des enzymes OXA-51- nécessite donc la présence d'un élément d'insertion ISAba1 en amont du gène, capable d'agir comme un fort promoteur transcriptionnel (Gordon et Wareham, 2010)

En outre, la résistance aux carbapénèmes est attribué principalement à la production de carbapénémase et la dégradation enzymatique par β -Lactamases, y compris les métallo- β -Lactamases et les oxacillinases de sérine codées par des gènes de la lignée *bla*OXA-23, *bla*OXA-40 et *bla*OXA-58, qu'il peut se localiser au niveau du plasmide ou du chromosome (Gordon et Wareham, 2010; Kulah et *al.*, 2010; Lee et *al.*, 2011).

Une séquence adjacente au gène AmpC est probablement responsable de la surexpression de gène β -lactamase-AmpC en combinaison avec d'autres mécanismes qui conduisent à augmenter le profil de résistance des isolats qui contient l'élément mobile. D'autres études moléculaires sont nécessaires pour clarifier les mécanismes bactériens de développement rapide de cette résistance (Dhabaan et *al.*, 2011).

II. Les huiles essentielles

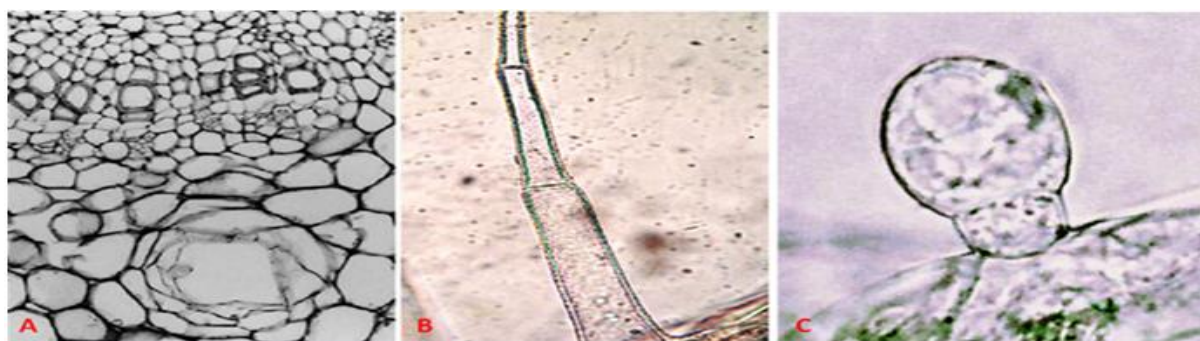
II.1. Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide (Couic-Marinier et Lobstein, 2013a). Elles sont synthétisées par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires (Bakkali et *al.*, 2008). La plupart des végétaux renferment des HE, mais habituellement en quantité infime. Seules les plantes dites « aromatiques » en produisent en quantité suffisante (Lardry et Haberkorn, 2007). Ces dernières fabriquent les huiles essentielles pour se protéger, se soigner, se réparer : elles leur servent à séduire les insectes pollinisateurs, se protéger des brûlures du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, et enfin à guérir (blessures, maladies, attaques diverses...) (Festy, 2011).

Les HEs peuvent être accumulées dans tous les types d'organes végétaux par exemple des fleurs (oranger, rose, lavande) mais aussi des feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier noble) et bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, camphrier, santal), des racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits secs (anis, badiane, persil), des graines (muscade) (AFSSAPS, 2008).

La biosynthèse et l'accumulation des molécules aromatiques sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées. Ces structures, sont souvent situées sur, ou à proximité de la surface de la plante et elles varient selon les familles botaniques, poils sécréteurs externes dans le cas des *Labiées* et des *Géraniacées*, cellules sécrétrices dans le cas des *Lauracées*, des *Magnoliacées* et des *Pipéracées*, poches sécrétrices dans le cas des *Myrtacées* et des *Aurantiacées* et canaux sécréteurs pour les *Ombellifères* et les *Conifères* (figure 1) (Haddouchi et Benmansour, 2008).

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ces substances. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau, est le procédé le plus pratiqué dans l'industrie des arômes. Le choix de la technique dépend principalement de la matière première. Ce choix conditionne les caractéristiques de l'HE, en particulier: viscosité, couleur, solubilité, volatilité, enrichissement ou appauvrissement en certains constituants (Haddouchi et Benmansour, 2008; AFSSAPS, 2008).



A: Coupe transversale du pétiole avec deux cavités de sécrétions dans le parenchyme (*Rustia formosa*)
B: Poil sécréteur (*Mentha pulegium*)
C: Trichome glandulaire (*Mentha pulegium*)

Figure 1 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles par les plantes aromatiques (Vieira et *al.*,2001; Karray-Bouraoui et *al.*,2009).

II.2. Composition chimique des huiles essentielles

La composition des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (Merghache et *al.*, 2009 ; Boukhatem et *al.*,2010 ;Sui et *al.*,2012; Karamanos et Sotiropoulou ,2013; Zaouali et *al.*, 2013 ; Wu et *al.* ,2013).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par la spectrométrie de masse (SM). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Boukhebti et *al.*, 2011 ; Darriet-Giudicelli, 2011).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants aux concentrations différentes. Elles sont cependant caractérisées par 2 à 3 composés majoritaires présents relativement en forte concentration, de 20 à 70% par rapport aux autres constituants présents parfois sous forme de traces et qui confèrent aux HES leurs propriétés thérapeutiques (Bakkali et *al.*, 2008).

La plupart des composants des HES sont inclus dans deux groupes selon la voie métabolique empruntée: les composés terpéniques (hydrocarbures) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (composés oxygénés), les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées: la voie métabolique secondaire de l'acide

Synthèse bibliographique

mévalonique pour les terpènes et la voie de l'acide shikimique pour les dérivés du phénylpropane (Amlan, 2011 ; Djilani et Dicko, 2012).

Les terpénoïdes : Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, végétaux, plus de 15000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C₅H₈), communément appelée isoprène. Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en: monoterpénoïdes (C₁₀), sesquiterpénoïdes (C₁₅) et diterpénoïdes (C₂₀).

Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes C₁₀ et les sesquiterpénoïdes C₁₅ forment la majeure partie et qui peut être extraite par distillation. Les autres terpènes (diterpènes C₂₀ et triterpènes C₃₀) n'étant pas entraînés par la vapeur d'eau (Calsamiglia et al., 2007 ; Amlan, 2011 ; Couic-Marinier et Lobstein, 2013b). Ils sont classés selon :

- Leurs fonctions : alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole) ;
- Leurs structures : linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulol, viridiflorol).

Les phénylpropanoïdes : Ils sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives. Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine. Ils sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (Calsamiglia et al., 2007 ; Bakkali et al., 2008).

II.3. Activité antibactérienne et mécanismes d'action des huiles essentielles

Les HEs ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Ces dernières attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM), les β -Lactamases à spectre élargi (BLSE) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Tohidpour *et al.*, 2010 ; Warnke *et al.*, 2013).

Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HEs, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (figure 2).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases (Calsamiglia *et al.*, 2007 ; Djilani et Dicko, 2012; Goetz et Ghedira , 2012) :

- ✓ Attaque de la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- ✓ Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- ✓ Destruction du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie.

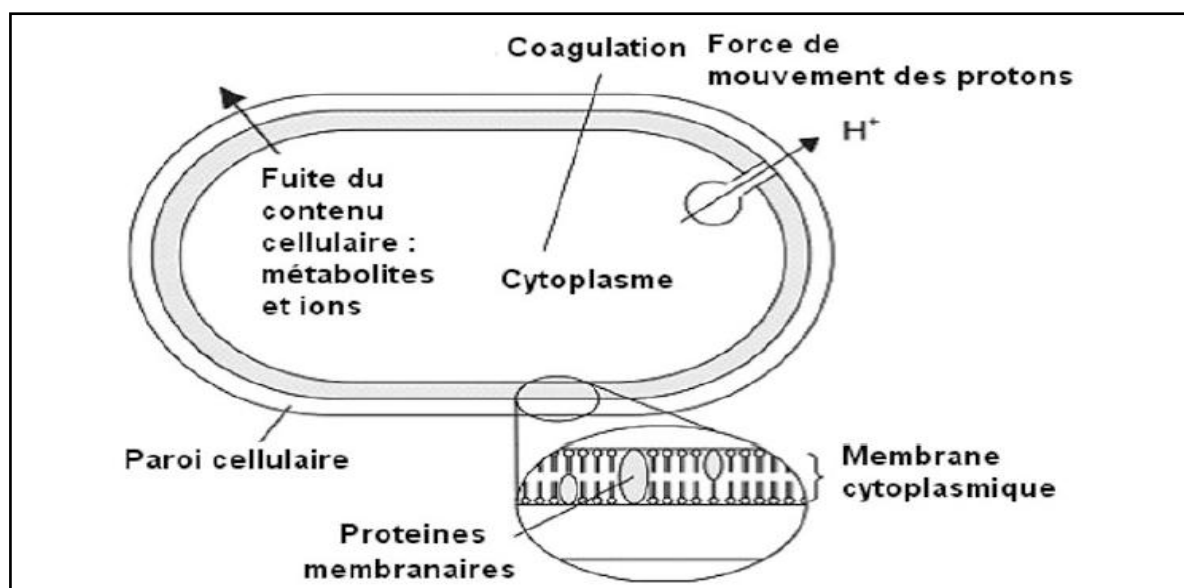


Figure 2 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

III. La synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques

Le synergisme entre les huiles essentielles et les antibiotiques a été rapporté dans plusieurs études. C'est une interaction positive créée quand l'association des deux agents, provoquent un effet inhibiteur supérieur à la somme de leurs effets individuels. En effet les huiles essentielles peuvent sensibiliser le microbe pathogène à un antibiotique précédemment inefficace (Aiyegoro et Okoh, 2009).

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 (Fadli et *al.*, 2012).

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

Matériel et méthodes

I. Matériels

I.1. Huiles essentielles

Trois HES ont été testées durant notre étude, qui sont issues de plantes médicinales aromatiques locales de la région de Bejaïa, Il s'agit de : *Artemisia herba alba* Asso., *Lavendula stoechas* L. et *Mentha pulegium* L. (Tableau I, Annexe II).

L'extraction des HES a été effectuée par hydrodistillation, la conservation de ces dernières s'est faite à 4°C dans de petits flacons en verre opaque ou entourés du papier aluminium et fermé hermétiquement, pour une utilisation ultérieure.

Tableau I : Présentation des plantes employées pour l'extraction des huiles essentielles

Nom botanique	Nom vernaculaire	Famille	Organes utilisés
<i>Artemisia herba alba</i> Asso. (AH)	Arabe: Chih Français : Armoise blanche	<i>Asteraceae</i>	Feuilles et tiges
<i>Lavendula stoechas</i> L. (LS)	Arabe: Halhal Français : Lavande papillon	<i>Lamiaceae</i>	Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges)
<i>Mentha pulegium</i> L. (MP)	Arabe : Fliou Français : Menthe pouliot	<i>Lamiaceae</i>	les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges)

I.2. Souches bactériennes cibles

Notre étude a porté sur deux souches bactériennes multirésistantes, qui sont: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (S19) et *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème (3310). Les caractéristiques et l'origine de ces souches sont reportées dans le tableau II.

Tableau II : Caractéristiques et origine des souches bactériennes cibles

Souches testées	Type de résistance	Caractère bactériologique	Origine
<i>S. aureus</i>	Résistance à la méticilline	Gram ⁺ , Mec A, PVL ⁺ , SCC mecIV _c	Communautaire (externe) Pus d'un enfant de 6 ans
<i>A. baumannii</i>	Résistance à la l'imipénème	Gram ⁻ , Oxa-23	Hospitalière Hôpital : Tizi Ouzou Service : Neuro-chirurgie Cathéter

Mec A,
PVL⁺,
SCC mec IV_c
Oxa-23



Gènes de résistance

II. Méthodes

II.1. Préparation de la suspension bactérienne

- A l'aide d'une pipette Pasteur, quelques colonies des souches cibles, bien isolées ont été prélevées à partir d'une culture fraîche de 18 à 24 h sur milieu gélosé Mueller Hinton (MH);
- Puis déchargées dans de l'eau physiologique et homogénéisées à l'aide d'un vortex ; la suspension bactérienne est standardisée à 10^8 UFC/mL (Mondello *et al.*, 2009) (Abs = 0,6 ; $\lambda=580$ nm) ;
- Cet inoculum sert à ensemercer par écouvillonnage des boîtes de Pétri stériles préalablement coulées par la gélose MH (Annexe I), sur une épaisseur de 4 mm et séchées 30 min à température ambiante avant emploi.

II.2. Antibiogrammes des souches cibles

La sensibilité de ces deux souches aux ATBs a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose MH suivant les recommandations de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010).

- Des disques d'ATB de différentes familles (Annexe III) sont disposés sur la gélose MH préalablementensemencée avec la souche teste par la méthode d'écouvillonnage.
- Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en mm, l'interprétation des résultats obtenus se réfère aux critères définis par le CLSI (2010) (Annexe IV).

II.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de disque « Aromatogramme sur milieu solide »

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HEs est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide préconisée par Rasooli et Mirmostafa (2003), Vardar-Ünlü *et al.* (2003), Zouari *et al.* (2010), Toroglu (2011), Abu-Darwish *et al.* (2012).

- Des disques de papier Wattman N°1 de 6 mm de diamètre ont été préparés, stérilisés puis déposés à la surface des boîtesensemencées (un disque par boîte) ;
- Les disques sont par la suite chargés avec 10 µl de chaque HE ;
- Les boîtes sont laissées diffusées pendant 2 heures à 4°C, puis incubées à 37°C pendant 18-24h. Trois essais sont réalisés pour chaque test;
- Les diamètres sont mesurés en mm et le résultat étant la moyenne des trois essais.

II.4. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

L'activité bactéricide ou bactériostatique des huiles essentielles et des antibiotiques (Vancomycine (VA), Céfoxitine (CX), Oxacilline (OX), Tobramycine (TOB), Ciprofloxacine (CIP), Amikacine (AK), Aztréonam (ATM)) est évaluée en utilisant la méthode préconisée par Laouer *et al.* (2008).

- Un prélèvement de la zone d'inhibition est transféré dans un tube contenant un bouillon MH (Annexe I), puis incubé à 37 °C.
- La lecture se fait après 24-48 h à l'œil nu, la présence d'un trouble ou d'un dépôt indique un effet bactériostatique.

II.5. Etude de l'association « huile essentielle / antibiotique » par la méthode des disques

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'association HEs/ATBs est celle de diffusion sur milieu solide préconisée par Halawani (2009) ; Mandal *et al.* (2010); Toroglu, (2011).

- Un disque d'antibiotique de 6 mm de diamètre est déposé au centre de chaque boîte MH préalablementensemencée (un disque par boîte);
- A l'aide d'une micropipette, 10 µl d'HE sont déposés sur chaque disque d'ATB;
- Les boîtes sont laissées diffuser à 4°C pendant 2 h puis incubées à 37°C pendant 24 h;
- Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm. Le résultat étant la moyenne de trois essais ;

Les données ont été analysées comme suit:

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

II.6. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles et des antibiotiques

II.6.1. Détermination des CMI des huiles essentielles et des Antibiotiques par la méthode de microdilution en milieu liquide

Les CMI sont déterminées en milieu liquide dans un bouillon MH à 0,5 % de tween 80 dans un volume final de 200 µl, en utilisant des micro-plaques de 96 puits. Des dilutions des HES étudiées sont effectuées en raison de 1/2, de telle façon à obtenir une gamme de concentrations finales comprises entre 300 et 0,30 µL/mL. À la fin, la microplaque sera inoculée avec de la suspension bactérienne (la charge finale dans la micro-plaque est de 5×10^5 UFC/mL). Un contrôle positif de croissance contenant seulement le milieu MH et la souche teste, est utilisé.

Après 24 h d'incubation à 37°C, la lecture se fait par observation de la microplaque à l'œil nu. La CMI du composé testé est déduite à partir du premier puits de la gamme ne présentant pas de dépôt ou trouble.

De même les CMI des ATBs (AK et CIP testés sur ABRI et VAN, OX, CX testés sur SARM respectivement) ont été déterminées. *Escherichia coli* (ATCC25922), *S.aureus* (ATCC25923) ont été prises comme des témoins positifs (Vardar-Ünlü et al., 2003; Mahboubi et GhazianBidgoli, 2010; Mulyaningsih et al., 2010; Rosato et al., 2010; Pavlović et al., 2012).

II.6.2. Etude de l'association « huile essentielle/antibiotique » par la méthode de microdilution en milieu liquide

La méthode de microdilution modifiée a été utilisée pour déterminer le potentiel de synergie des associations HES/ATBs à différentes concentrations suivant la même procédure utilisée pour évaluer la CMI (Rosato et al., 2010; Mahboubi et GhazianBidgoli, 2010; Mulyaningsih et al., 2010; D'Arrigo et al., 2010; Moon et al., 2011).

La dilution de l'HE est effectuée dans le sens horizontal (de CMI $\times 8$ à CMI $\times 1/32$) et l'ajout des différentes concentrations d'antibiotiques est fait verticalement avec une gamme de concentration allant de 600 à 2,34 µg/mL, une série de combinaisons de concentration différente en HE/ATB sera obtenue.

L'HE et l'ATB sont également testés séparément sur la même microplaque pour la comparaison (témoin positif). Par la suite, la microplaque est inoculée avec une suspension bactérienne de telle façon à obtenir une charge finale qui est de 5×10^5 UFC/ mL, puis incubée à 37°C pendant 24 h.

La mesure de l'effet association HE/ATB a été obtenue en calculant l'Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (FICI) selon la formule ci-dessous.

$$FICI = \frac{\text{CMI de l'ATB en combinaison}}{\text{CMI de l'ATB seul}} + \frac{\text{CMI de l'HE en combinaison}}{\text{CMI de l'HE seul}}$$

La combinaison des deux composés est considérée selon Mulyaningsih et *al* (2010) comme :

Synergique : lorsque la valeur FICI est $\leq 0,5$

Additif : quand $0,5 < FICI < 1$

Indifférent : quand $1 < FICI < 4$

Antagonistes : quand $FICI > 4$

III. Etude statistique

Les méthodes classiques de statistiques ont été utilisées pour calculer les moyennes et les écarts-types. Toutes les mesures ont été reproduites trois fois et les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type et sont analysés par le test ANOVA (test LSD : Least Significant Difference) suivi du test de DUNNET pour les comparaisons multiples. Une probabilité de p inférieur à 0.05 a été adoptée comme critère de différences significatives (Mulyaningsih et *al.*, 2010).

Résultats et discussion

I. Antibiogrammes des souches cibles

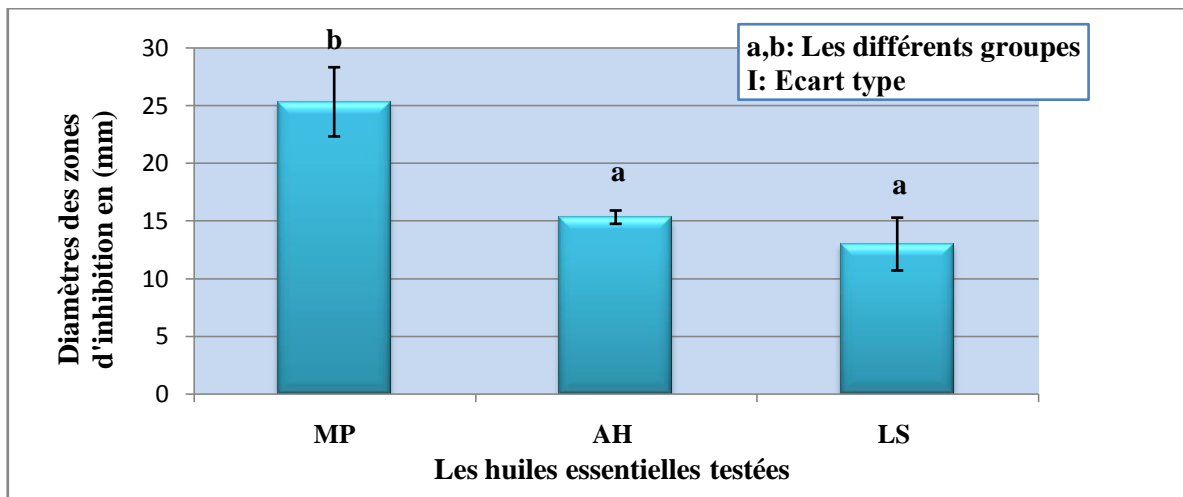
L'antibiogramme de vérification des souches testées montre qu'elles résistent à plusieurs ATBs appartenant à différentes familles résumé dans les tableaux I et II en Annexe III.

II. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba Alba* Asso., *Lavendula stoechas* L. et *Mentha pulegium* L.

II.1. Effet des huiles essentielles d'*Artemisia herba Alba* Asso., *Lavendula stoechas* L. et *Mentha pulegium* L. vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii*

L'analyse statistique de la variance (ANOVA: test LSD) révèle un effet antibactérien similaire pour les deux HEs d'*A. herba alba* et *L. stoechas* L. Cependant, l'effet diffère significativement pour l'huile de *M. pulegium* L.

L'HE de *M. pulegium* L. s'est avérée la plus active sur cette souche avec la production d'une zone d'inhibition de $25,33 \pm 3$ mm. Par ailleurs les deux HEs d'*A. herba Alba* Asso. et *L. stoechas* L. apparaissent moins actives, avec des zones d'inhibition de $15,33 \pm 0,57$ mm et $13 \pm 2,29$ mm respectivement (figure 3).



MP: *Mentha pulegium* L., AH: *Artemisia herba Alba* Asso, LS: *Lavendula stoechas* L.



Figure 3: Effet des différentes huiles essentielles vis-à-vis d'*A. baumannii*

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les trois HEs inhibent la croissance d'*A.baumannii* avec des degrés de sensibilité différents. Cette sensibilité est attribuée principalement à l'activité antibactérienne des molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, entraînant alors un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire (Calsamiglia et al., 2007).

Notre résultat indique que l'huile de *M. pulegium* L. a une activité puissante sur cette souche, plusieurs auteurs ont ainsi rapporté dans leurs études l'activité de cette huile sur d'autres espèces Gram négatif, particulièrement sur *Escherichia coli* (Teixeira et al., 2012). Hajlaoui et al. (2009) ont révélé une zone d'inhibition de $13,66 \pm 0,57$ mm en utilisant 10 μ l d'HE brute, cependant, Ait-Ouazzou et al. (2012) ont obtenus une zone de $12,6 \pm 0,5$ mm avec 15 μ l d'HE brute.

L'activité antibactérienne de cette HE est potentiellement attribuée à sa composition chimique très varié et principalement à la présence de pulégone, menthone et néo-menthol (Teixeira et al., 2012; Kamkar et al., 2010). Duru et al. (2004) ont démontré la haute activité antibactérienne du pulégone testé séparément sur plusieurs souches bactériennes.

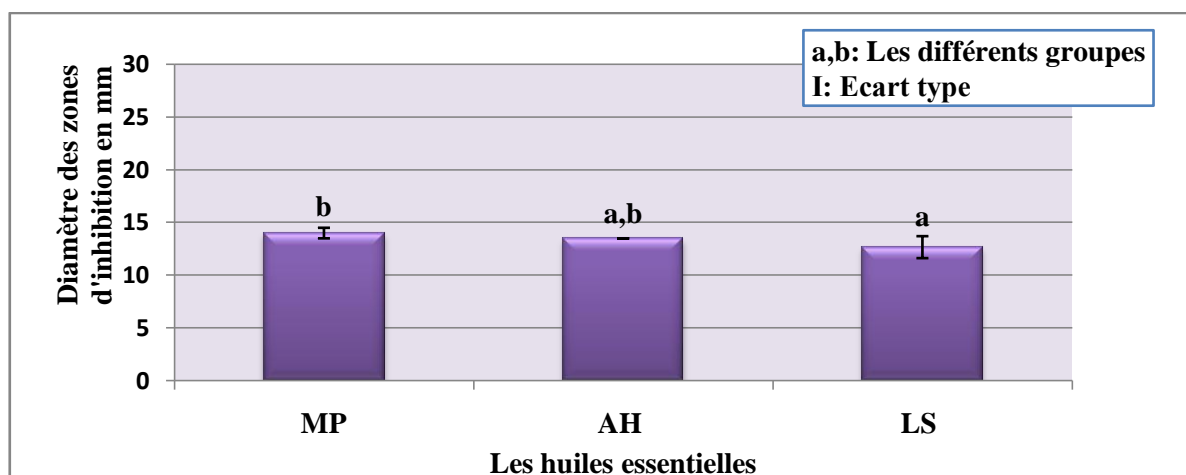
Toutefois, l'HE d'*A.herba Alba* présente une activité antibactérienne considérable à l'égard de cette souche, cette activité peut être expliquée par leurs richesses en composés oxygénés (chrysonthénone, camphre, α -terpin-7-al et trans- β -terpinéol) (Ghanmi et al, 2010).

Zouari et al. (2010) ont testé l'activité de cette huile vis-à-vis de différentes souches Gram négatif, notamment sur *E. coli* qui a révélé une zone d'inhibition de $11,33 \pm 0,6$ mm sachant qu'ils ont utilisé 10 μ l de l'HE brute. Ce qui correspond à notre résultat obtenu sur *A.baumannii*.

Par ailleurs, l'huile de *L. stoechas* L. a montré l'activité la plus faible par rapport aux deux autres huiles, notre résultat concorde avec les travaux de Kaloustian et al. (2008). En revanche, elle ne correspond pas à ceux de Gören et al. (2002), qui ont constaté que cette huile possède une très bonne activité antibactérienne contre *E. coli* avec une zone d'inhibition de 23 mm (l'huile est diluée dans l'hexane).

II.2. Effet des huiles essentielles d'*Artemisia herba Alba* Asso., *Lavendula stoechas* L. et *Mentha pulegium* L. vis-à-vis de SARM

Le test ANOVA ne montre pas une différence significative de l'effet antibactérien des HEs de *M. pulegium* L., d'*A. herba alba* Asso. et *L. stoechas* L. à l'égard de cette souche, les zones d'inhibition enregistrées ont été respectivement de $14 \pm 0,5$ mm, $13,5 \pm 0$ mm et $12,66 \pm 1,04$ mm (figure 4).



MP: *Mentha pulegium* L., **AH:** *Artemisia herba Alba* Asso, **LS:** *Lavendula stoechas* L.

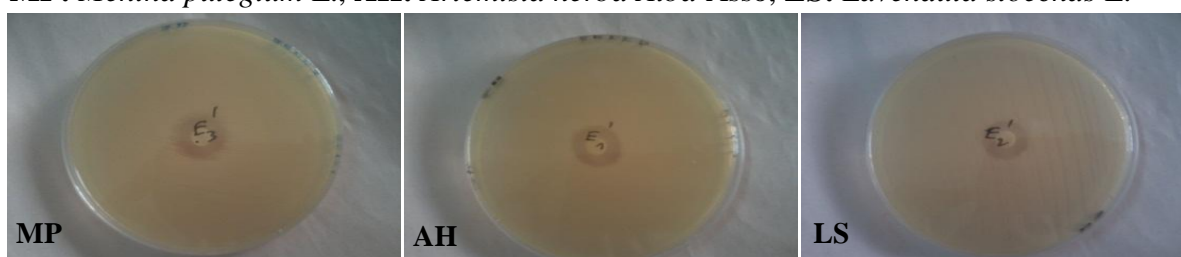


Figure 4: Effet des différentes huiles essentielles vis-à-vis de SARM

Les résultats obtenus montrent que les trois huiles sont actives sur le SARM. Ces résultats sont en concordance avec les travaux ayant mis en évidence la sensibilité de cette souche aux extraits de différentes plantes (Di Pasqua et *al.*, 2005 et ceux d'Alexopoulos et *al.*, 2011).

Ait-Ouazzou et *al.* (2012) ont montré l'activité de l'extrait de *M. pulegium* (Maroc) vis-à-vis *S. aureus* avec une zone importante de $21,4 \pm 0,8$ mm obtenue avec 15 μ l d'extrait brut. Ce qui confirme notre résultat. Par ailleurs, une activité plus importante est enregistrée par Mahboubi et Haghi (2008) avec une zone de 21 mm en utilisant 1 μ l d'extrait brut, cette différence peut être due à sa composition chimique qui varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Boukhebt et *al.*, 2011).

D'après les résultats obtenus, l'HE d'*A. herba alba* Asso. présente un effet antibactérien particulièrement considérable sur cette souche, les mêmes résultats ont été observés et prouvés par les travaux de Benouda et *al.* (1988) ainsi que ceux de Ghanmi et *al.* (2010).

En outre, SARM apparaît moins sensible vis-à-vis de l'HE de *L. stoechas* L. ce qui correspond aux résultats obtenus par Kaloustian et *al.* (2008). Par contre, ceux obtenus par

Djenane et *al.* (2012) étant l'inverse avec une grande sensibilité donnant une zone de 19.45 ± 1.37 mm.

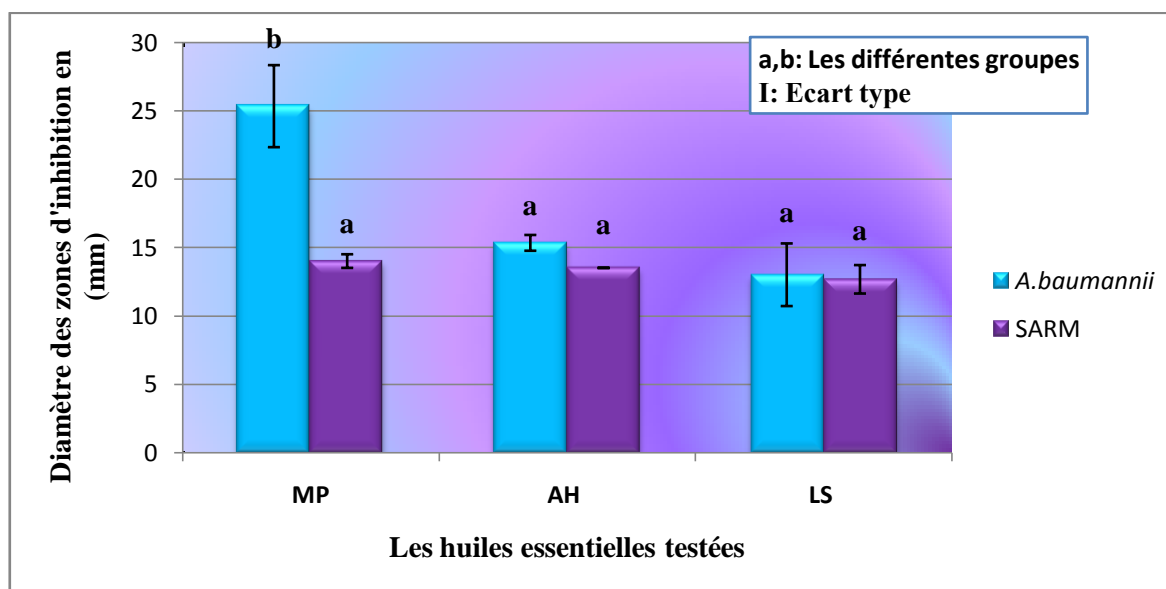
II.3. Comparaison de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba Alba Asso.*, *Lavendula stoechas* L. et *Mentha pulegium* L. vis-à-vis des deux souches *A. baumannii* et SARM

D'après les résultats obtenus, nous constatons que toutes les HEs se sont montrées actives vis-à-vis les deux souches étudiées, mais il est bien claire que l'effet de *M. pulegium* est significativement plus important sur *A. baumannii*, et les deux autres HEs ont presque le même effet vis-à-vis de ces dernières (test ANOVA) (figure 5).

L'étude faite par Ait-Ouazzou et *al.* (2012) sur l'activité antibactérienne de l'HE de *M. pulegium* révèle que cette dernière possède un large spectre d'action sur toutes les souches bactériennes étudiées (Gram- et Gram+) avec des diamètres des zones d'inhibition de $12,6 \pm 0,5$ mm à $35,6 \pm 0,6$ mm. A l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est montré résistant, ce même résultat est confirmé par Teixeira et *al.* (2012).

D'autre part, Djenane et *al.*(2012) ont montré que *Lavendula sp* et *Mentha sp* sont plus actives vis-à-vis *S.aureus* ($18,39 \pm 2,35$ et $19,45 \pm 1,37$ respectivement) que sur *E.coli*.

L'étude de Zouari et *al* (2011) sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Artemisia herba Alba Asso.* a montré que cette dernière est plus efficace sur les Gram+.



MP: *Mentha pulegium* L., **AH:** *Artemisia herba Alba Asso*, **LS:** *Lavendula stoechas* L.

Figure 5 : Etude comparative de l'effet des HEs vis-à-vis d'*A.baumannii* et de SARM

La plupart des études ayant abordé l'activité des HEs entières sur la détérioration des micro-organismes et agents pathogènes ont conclu que, généralement, les HEs sont légèrement plus actives contre les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif (Lei et al., 2008 ; Mahboubi et Haghi, 2008 ; Morteza-Semnani *et al.*, 2011). Ceci semblerait prévisible, car ces germes sont dotés d'une membrane externe entourant la paroi cellulaire, ce qui limite la diffusion des composés hydrophobes à travers sa couche lipopolysaccharidique. Tandis que, certaines études ont montré que les germes Gram positifs ne sont pas les plus sensibles, exemple d'*Aeromonas hydrophila* (bactérie Gram-), qui s'est avéré le plus sensible à l'action des HEs (Goetz et Ghedira, 2012).

La comparaison des résultats est assez difficile pour diverses raisons :

- ✚ Les souches bactériennes utilisées ne sont pas toujours les mêmes ;
- ✚ Les échantillons de plantes utilisés sont d'origines géographiques différentes, ce qui fait intervenir le phénomène de polymorphisme chimique ;
- ✚ Les conditions et les méthodes utilisées ne sont pas toujours les mêmes.

II.4. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide des huiles essentielles et des antibiotiques

- **Effet des huiles essentielles sur les souches cibles**

Les résultats obtenus après 24 h d'incubation à 37°C, ne montrent aucune croissance bactérienne. Les mêmes résultats sont obtenus après 48 h. Ce qui signifie que l'effet exercé par les trois HEs sur les deux souches est bactéricide (tableau III).

Tableau III : Effet des huiles essentielles vis-à-vis SARM et *A.baumannii*

	<i>Mentha pulegium L.</i>		<i>Artemisia herba Alba</i> Asso.		<i>Lavendula stoechasL.</i>	
	Après 24 h	Après 48 h	Après 24 h	Après 48 h	Après 24 h	Après 48 h
SARM	-	-	-	-	-	-
<i>A.baumannii</i>	-	-	-	-	-	-

- : Effet bactéricide

- **Effet des antibiotiques sur les souches cibles**

Nos résultats montrent que l'effet des antibiotiques testés est bactéricide après 24 h d'incubation, le même effet est observé après 48 h à l'exception pour l'OX et l'ATM qui ont montré une activité bactériostatique (tableau IV).

Tableau IV: Effet des antibiotiques sur SARM et *A.baumannii*

	SARM			<i>A.baumannii</i>			
	VA	CX	OX	TOB	CIP	AK	ATM
Après 24 h	-	-	-	-	-	-	-
Après 48 h	-	-	+	-	-	-	+

+ : Effet bactériostatique

- : Effet bactéricide

III. Etude de l'association « huile essentielle/antibiotique »

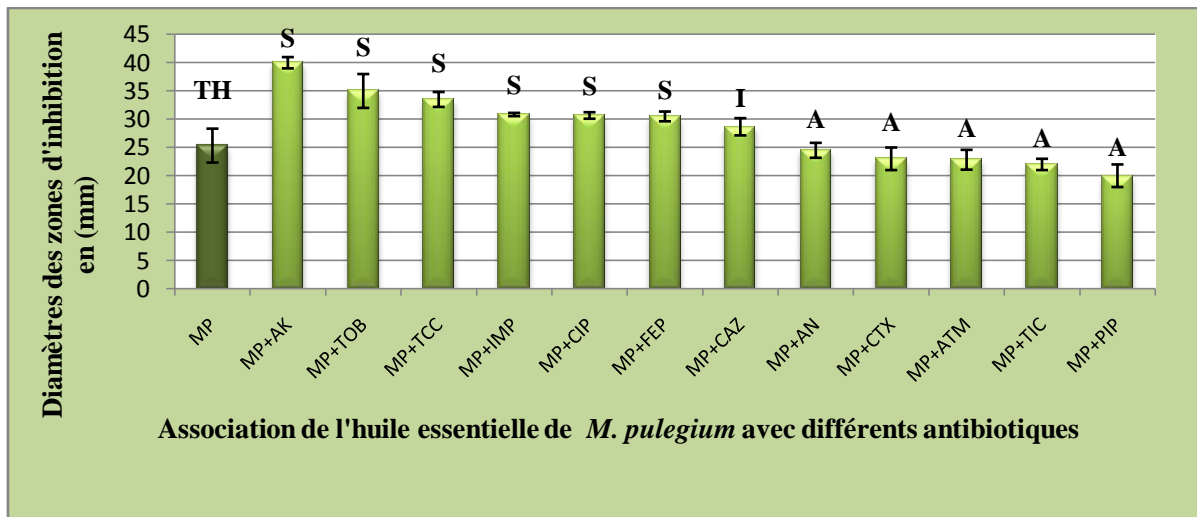
III.1. Effet de l'association « huile essentielle/antibiotique » vis-à-vis d'*A. baumannii*

L'association des HEs aux différents antibiotiques présentent des effets qui sont statistiquement différents, les diamètres des zones d'inhibition des HEs et de leurs associations sont rapportés dans les figures (6, 7 et 8). Les différentes lettres attribuées aux différents groupes homogènes désignent :

- ✓ TH : L'huile témoin.
- ✓ A : Antagoniste.
- ✓ I: Indifférent.
- ✓ S : Synergie.

- **Effet de l'association « *M.pulegium*/Antibiotiques » vis-à-vis d'*A.baumannii***

L'analyse des données avec le test DUNNETT montre que l'association de l'HE de *M.pulegium* avec la PIP, la TIC, l'ATM, la CTX et l'AN a donné des interactions antagonistes par rapport à celle de l'huile seule, une interaction indifférente en association avec la CAZ, tandis qu'un effet synergique est obtenu et ce en association avec la FEP, la CIP, l'IMP, TCC, la TOB et l'AK, avec des diamètres des zones d'inhibition de $25,33 \pm 0,86$ mm pour l'huile seule et $30,5 \pm 0,86$ mm, $30,66 \pm 0,57$ mm, $30,38 \pm 0,25$ mm, $33,5 \pm 1,32$ mm et 35 ± 3 mm pour ces mêmes associations (figure 6).

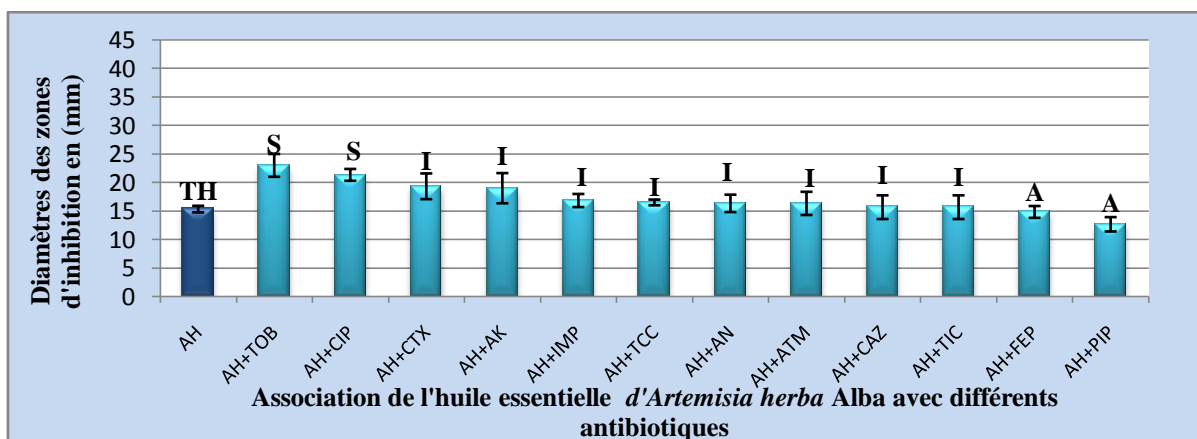


TH : L'huile témoin/ S : Synergie/ I : Indifférent/ A : Antagoniste

Figure 6 : Effet de l'association de l'huile essentielle de *M. pulegium* avec différents antibiotiques vis-à-vis *A.baumannii*

- Effet de l'association « *Artemisia herba alba* Asso./Antibiotiques » vis-à-vis d'*A.baumannii*

Le test statistique DUNNETT montre que l'association de l'HE d'*A. herba Alba* avec les antibiotiques CAZ, TIC, AN, ATM, TCC, IMP et AK n'a aucun effet, une interaction antagoniste est observée lors de son association avec la PIP et la FEP, cependant, l'interaction synergique est obtenue avec la CIP et la TOB avec des zones d'inhibition de $15,33 \pm 0,57$ mm pour l'huile seule et $21,33 \pm 1,04$ mm et 23 ± 2 mm pour les deux associations respectivement (figure7).

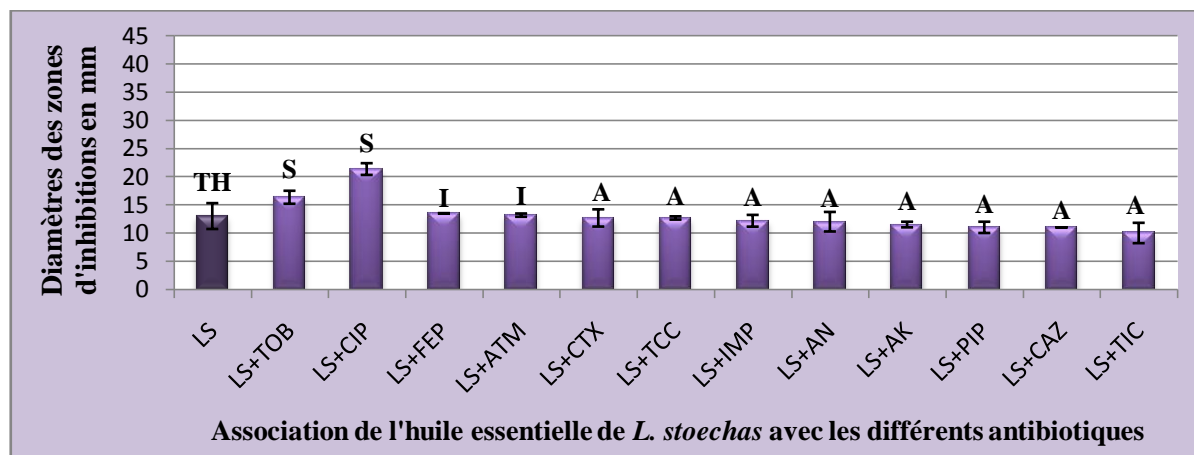


TH : L'huile témoin/ S : Synergie/ I : Indifférent/ A : Antagoniste

Figure 7: Effet de l'Association de l'huile essentielle d'*A. herba Alba* Asso. avec différents antibiotiques vis-à-vis *A.baumannii*

- **Effet de l'association « *L. stoechas*/Antibiotiques » vis-à-vis *A.baumannii***

Selon l'analyse statistique DUNNETT l'effet d'association de l'HE de *L. stoechas* avec la CIP et la TOB est synergique ceci se montre par une augmentation des zones d'inhibitions de $13 \pm 2,29$ mm pour l'huile seule à $16,33 \pm 1,15$ mm et $33 \pm 1,04$ mm pour l'association huile essentielle/antibiotique respectivement. Par contre son association à l'ATM ainsi qu'à la FEP révèle un effet indifférent. L'effet antagoniste est obtenu en association avec TIC, CAZ, PIP, AN, IMP, CTX et TCC (figure8).



TH : L'huile témoin/ S : Synergie/ I : Indifférent/ A : Antagoniste

Figure 8 : Effet de l'Association de l'huile essentielle *L. stoechas* avec différents antibiotiques vis-à-vis *A.baumannii*

D'après les résultats cités précédemment, nous avons constaté que la sensibilité d'*A.baumannii* vis-à-vis les associations HEs/ATB testées, diffère selon l'huile essentielle et l'antibiotique utilisés en association. L'huile essentielle de *M. pulegium* était la plus active en la combinant aux différents antibiotiques (6 combinaisons synergiques); leur combinaison aux ATBs donne souvent un effet synergique. L'activité est toutefois moins importante pour les deux autres HEs (2 combinaisons synergiques pour chaque HE observées notamment avec la CIP et la TOB).

L'effet synergique des combinaisons HEs/ATB contre les bactéries Gram- a été rapporté par Durate et *al.* (2012), qui ont montré que l'essence de coriandre exerce une activité synergique contre *A.baumannii*, lorsqu'elle est associée avec des antibiotiques conventionnels (gentamicine, ciprofloxacine et tétracycline).

D'autre part, D'Arrigo et *al.* (2010) ont montré que l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* exerce une activité synergique contre *E. coli* lorsqu'elle est associée avec la Tobramycine.

Une autre étude réalisée par Halwani (2009) a montré aussi que l'utilisation de Thymoquinone et de thymohydroquinone de *Nigella sativa*, associées à la cephalexine donne des interactions synergiques contre *E. coli* (Gram-), ces mêmes composés ont montré des effets antagonistes et indifférents en association avec d'autres antibiotiques.

La combinaison de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de Turquie avec la cephalexine et le ceftriaxone étudiée par Toroglu (2011) a montré également des effets antagonistes sur *E. coli*.

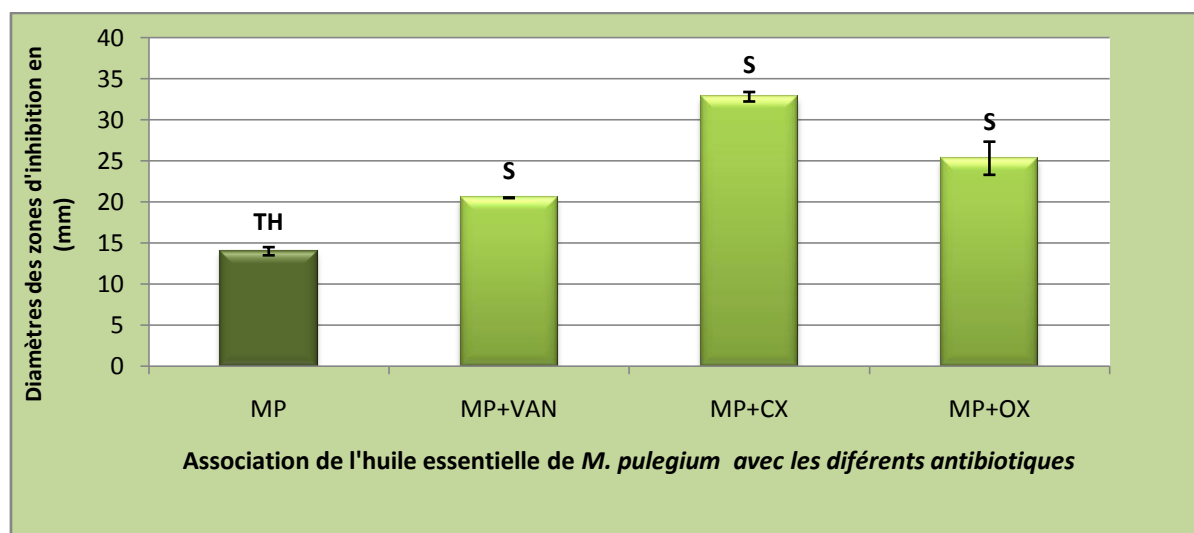
Les activités variables observées avec les différentes huiles (synergie, antagonisme et indifférence), peuvent être expliquées par le mode d'action des composés des HEs, les composés des différentes HEs ne réagissent pas de la même manière en les combinant avec les antibiotiques testés. Gallucci et al. (2006) ont rapporté dans leur étude que l'utilisation des terpènes combinés avec la pénicilline a pu augmenter l'activité de ces dernières contre des souches bactériennes à Gram négatif en leur conférant une meilleure capacité de transport à l'intérieur de la cellule bactérienne cible. D'une autre part, Rosato et al. (2010) ont attribué l'activité synergique entre la gentamicine et les huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* et d'*Aniba rosaeodora* contre les Gram négatif aux alcools terpéniques, qui sont les composants majoritaires de ces deux huiles et qui interagissent avec la membrane cytoplasmique bactérienne ce qui facilite la pénétration de la gentamicine à l'intérieur de la cellule et sa fixation à la sous unité 30 S du ribosome.

III.2. Effet de l'association « huile essentielle / antibiotique » vis-à-vis de SARM

L'analyse statistique (test DUNNETT) montre que l'association des HEs de *M. pulegium*, *A. herba Alba*, *L. stoechas* avec les différents ATBs testés donne des effets synergiques avec des degrés de sensibilité différents (figures 9, 10,11).

- **Effet de l'association « *M. pulegium*/Antibiotiques » vis-à-vis de SARM**

Le SARM est plus sensible à l'action de l'huile essentielle de *M. pulegium* associée à la CX. Ceci se montre par une augmentation des zones d'inhibitions de $14 \pm 0,5$ mm pour l'huile seule à $32,83 \pm 0,57$ mm pour l'association. L'inhibition de la croissance de cette souche multi-résistante est toutefois du même ordre pour les deux autres associations (avec OX et VAN).

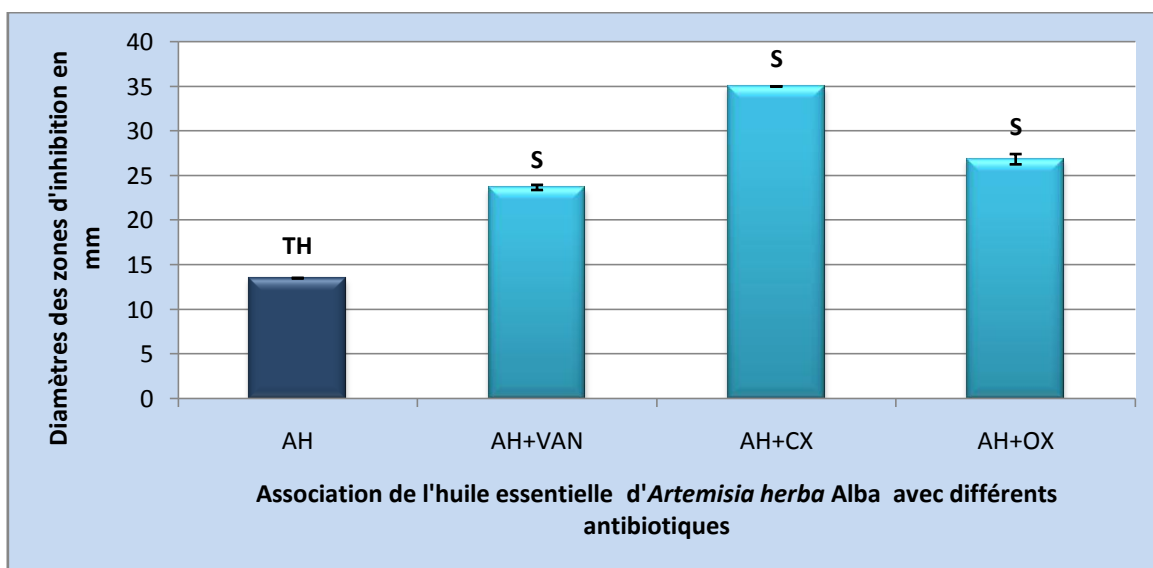


TH : L'huile témoin/ S : Synergie/ MP : *M. pulegium*

Figure 9 : Effet de l'Association de l'huile essentielle *M. pulegium* avec les différents antibiotiques vis-à-vis de *SARM*

- Effet de l'association « *A. herba alba*/Antibiotiques » vis-à-vis de *SARM*

Selon l'analyse statistique DUNNETT, l'effet De l'association HE d'*A. herba Alba* avec trois antibiotiques, CX, OX, VAN est synergique, ceci se traduit par une augmentation des zones d'inhibition de $13,5 \pm 0$ mm pour l'huile seule à 35 ± 0 mm, $26,83 \pm 0,57$ mm et $23,66 \pm 0,28$ mm pour l'association huile essentielle/antibiotique respectivement.

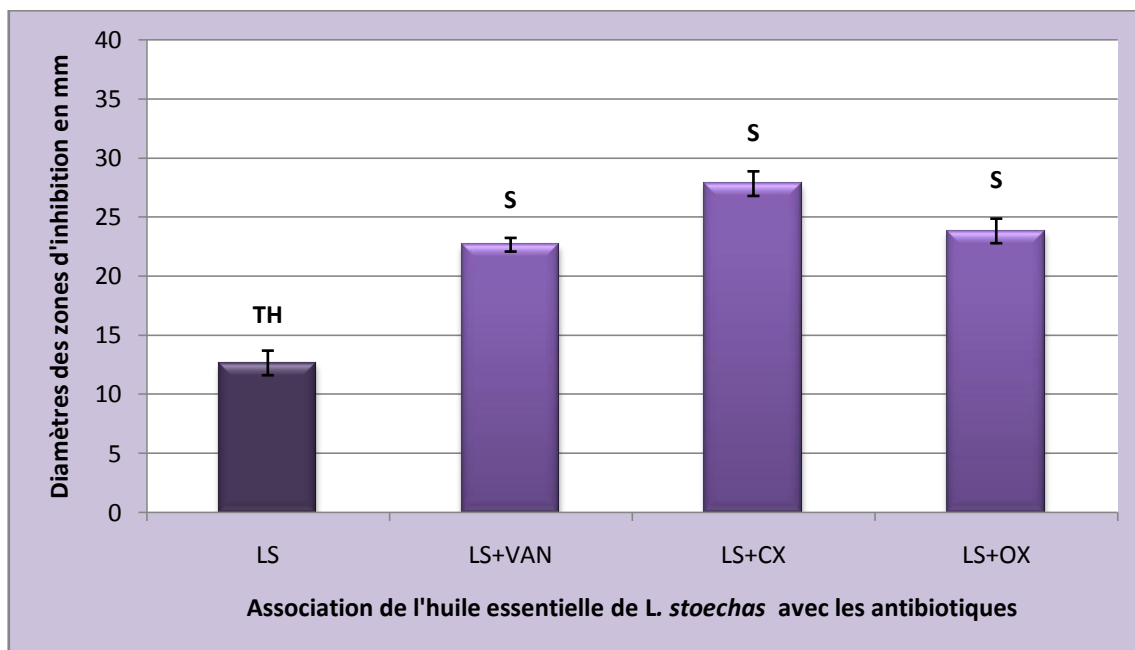


TH : L'huile témoin/ S : Synergie/ AH : *A. herba Alba*

Figure 10 : Effet de l'Association de l'huile essentielle d'*A. herba Alba* Asso. avec différents antibiotiques vis-à-vis de *SARM*

- **Effet de l'association « *L. stoechas*/Antibiotiques » vis-à-vis de SARM**

Les résultats obtenus révèlent que le SARM est sensible aux différentes associations HEs/ATBs, ces dernières développent des zones d'inhibition importantes, la plus grande zone d'inhibition est observée avec la CX ($27,83 \pm 1,04$ mm) (figure 11).



TH : L'huile témoin/ S : Synergie/ LS : *L. stoechas*

Figure 11: Effet de l'Association de l'huile essentielle *L. stoechas* avec les différents antibiotiques vis-à-vis de SARM

Les résultats obtenus montrent que le SARM est sensible vis-à-vis de toutes les associations HEs/ATB testées, l'effet de l'association de l'huile essentielle de *M. pulegium* avec la CX était le plus important.

L'effet synergique des combinaisons HEs/ATBs contre les bactéries Gram+ a été rapporté par Betoni et al. (2006) qui ont observé des interactions synergiques entre les extraits de quelques plantes médicinales brésiliennes et huit antibiotiques sur *S. aureus*. De même Darwish et al. (2002) ont démontré que l'efficacité de la gentamycine et du chloramphénicol contre les staphylocoques dorés a été considérablement améliorée en association avec les huiles essentielles.

Gallucci et al. (2006) ont montré également dans leur étude que l'utilisation des terpènes combinés avec la pénicilline a augmenté l'activité de cette dernière contre les staphylocoques résistants à la méticilline, l'interaction entre le carvone et la pénicilline a donné une interaction synergétique très intéressante.

IV. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices

IV.1. Les CMI des antibiotiques et des huiles

Les CMI des antibiotiques (AK, IMP et CIP pour *A. baumannii*, OX, CX et VAN pour le SARM) et des huiles ont été déterminé. La sensibilité des souches aux antibiotiques est évaluée en comparant les concentrations obtenues par rapport aux valeurs rapportées par le CLSI (2010) (Annexe IV).

D'après les résultats obtenus, il apparaît que *A.baumannii* était résistant aux ATB testés avec une CMI > 300 µg/mL pour l'IMP et l'AK et une CMI de 75µg/mL pour la CIP. Concernant le SARM, les CMI enregistrées étant de 150 et 18,75µg/mL pour la VAN et la CX respectivement, cependant, celle de l'OX est supérieure à 300 µg/mL (tableau V).

Les deux souches ont été inhibées sous l'action des trois huiles à des concentrations comprise entre 1,17 et 4,68µL/mL.

La plus faible CMI a été obtenue avec l'HE de *L. stoechas* L. avec une concentration de 1,17 µL/mL sur le SARM tandis que celle 4,68µL/MI sur *A.baumannii*. L'HE d'*A. herba Alba* Asso. montre une CMI de 2,34 µL/mL pour les deux souches. De même, les CMI obtenues par *M. pulegium* L. sont de 4,68µL/mL.

Tableau V: Les Concentrations Minimales Inhibitrices des HEs et des ATBs

ATBs/HEs	<i>A.baumannii</i>		<i>E. coli</i> ATCC (25922)		SARM		<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	
	DZ (mm)	CMI	DZ (mm)	CMI	DZ (mm)	CMI	DZ (mm)	CMI
AH	15,33	2,34	/	/	13,5	2,34	/	/
LS	13	4,68	/	/	12,66	1,17	/	/
MP	25,33	4,68	/	/	14	4,68	/	/
CIP	14	75	36	< 0,3	/	/	/	/
AK	14	>300	20	4,68	/	/	/	/
IMP	6	/	26	/	/	/	/	/
CX	/	/	/	/	19,5	18,75	26	2,34
OX	/	/	/	/	19	>300	26	0,58
VAN	/	/	/	/	17,5	150	20,5	1,17

DZ : Diamètres des zones d'inhibition

Les résultats des CMI obtenus par la méthode de microdilution montrent qu'ils ne sont pas corrélés avec ceux obtenus par la méthode des disques ; l'activité de l'HE de *L. stoechas* L. s'avère plus efficace en milieu liquide, contrairement à celle de *M. pulegium* L. qui se montre moins efficace. Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Djenane *et al.* (2012), cela peut s'expliquer par la diversité moléculaire des huiles qui ne réagissent pas de la même manière, la composition et la concentration de l'HE et sa solubilité dans le milieu utilisé (propriété hydrophobe des huiles).

Par ailleurs, ces faibles CMI montrées sur les deux souches peuvent être avantageuses dans certaines applications thérapeutiques telles que les inhalations ou les applications caractéristiques en ce qui concerne la toxicité et la stabilité des formulations (Mulyaningsih *et al.*, 2010)

IV.2. Etude de l'association « huile essentielle/antibiotique » par la méthode de microdilution sur milieu liquide

- **Association « Huile de *M. pulegium* L. /Amikacine » vis-à-vis d'*A. baumannii***

Dans la présente étude, il a été démontré que les combinaisons de MP/AK testés sur *A.baumannii* apparemment présentent des propriétés antimicrobiennes antagonistes avec toutes les concentrations HE/ATB produites, à l'exception des deux combinaisons de 9,37/300 et 4,68/9,37 qui ont donné des interactions indifférentes. Par contre aucune interaction synergique n'a été démontrée.

Les résultats de ces interactions sont présentés dans le tableau IV.

Résultats et discussions

Tableau VI: Effet de l'association « huile de *M. pulegium* L./Amikacine » vis-à-vis d'*A. baumannii*

CMI d'association MP/AK ($\mu\text{L}/\text{mL}$. $\mu\text{g}/\text{mL}$)	L'indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (FICI)	Interprétation
18,75/600	5,006	Antagoniste
9,37/300	2,502	Indifférent
18,75/150	4,254	Antagoniste
18,75/75	4,131	Antagoniste
18,75/37,5	4,068	Antagoniste
18,75/18,75	4,031	Antagoniste
4,68/9,37	1,015	Indifférent
18,75/4,68	4,013	Antagoniste
18,75/2,34	4,006	Antagoniste

L'absence de l'effet synergique lors de l'association « *M. pulegium* L./Amikacine » sur milieu liquide, peut s'expliquer par l'interaction entre les différents composés qui peut conduire à des changements de conformation structurelle au niveau de la paroi cellulaire des bactéries, conduisant ainsi à la réduction de l'activité inhibitrice (D'Arrigo et *al.*, 2010).

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur milieu solide, Cela peut être expliqué par le fait que les molécules présentes dans l'huile ne réagissent pas de la même manière sur les deux milieux liquide et solide.

Conclusion

Conclusion et perspective

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Avec la prévalence des microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, nous notons un regain d'intérêt pour les molécules naturelles extraites à partir de ces dernières. L'Algérie par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse.

La présente étude nous a permis d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes médicinales aromatiques locales de la région de Bejaia qui sont *Artemisia herba alba* Asso., *Lavendula stoechas* L. et *Mentha pulegium* L. sur deux souches bactériennes multirésistantes (*A. baumannii* résistant à l'imipénème et *S. aureus* résistant à la méticilline) et l'effet de leur association avec les antibiotiques.

Les trois huiles essentielles se sont montrées bactéricides contre les souches testées, cependant, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. a manifesté le plus grand pouvoir antibactérien avec des zones d'inhibition de $25,33 \pm 3$ mm pour *A. baumannii* et de $14 \pm 0,5$ mm pour *S. aureus*. Les deux autres huiles essentielles montrent presque le même effet avec des zones d'inhibitions allant de $12,66 \pm 1,04$ à $15,33 \pm 0,57$ mm. Ce qui peut s'expliquer par leur profil chimique riche en composés connus pour leur pouvoir antibactérien tels que les cétones.

Les résultats de l'association des huiles essentielles étudiées avec les différents antibiotiques ont donné diverses interactions contre *A. baumannii* (10 interactions synergiques, 9 interactions indifférentes et 16 interactions antagonistes). Cependant, nous n'avons observé que des interactions synergiques contre *S. aureus* (SARM). Ces résultats témoignent du grand potentiel que présentent les huiles essentielles pour accéder aux différentes cibles cellulaires de ce fait, la résistance aux antibiotiques sera limitée.

En ce qui concerne la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices par la méthode de microdilution en milieu liquide, les deux souches ont été inhibées sous l'action des trois huiles avec des concentrations variant de 2,34 à 4,68 $\mu\text{L/mL}$.

Ces résultats préliminaires obtenus s'avèrent prometteurs dans l'élargissement de l'arsenal thérapeutique des plantes dotées de propriétés antibactériennes. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

Toutefois, les méthodes *in vitro* utilisées pour confirmer l'activité antibactérienne des différents extraits sont insuffisantes et nécessitent d'autres tests supplémentaires plus avancées tels que l'étude de l'activité antibactérienne *in vivo*.

Conclusion et perspective

De plus, une étude de la composition chimique des huiles est nécessaire et ce afin d'identifier et de préciser les différents principes actifs et pour mieux comprendre leur mode d'action.

De même d'autres études de l'association « huiles essentielles/antibiotiques » sont recommandées afin d'aller plus loin dans la recherche concernant ce domaine.

Nous recommandons également une étude de conception d'une formule médicamenteuse qui combine entre les antibiotiques et les huiles essentielles présentant des effets synergiques en association et ce dans le but de lutter contre les bactéries manifestant une résistance aux agents antibactériens.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abu-Darwish MS, Al-Ramamneh EM, Kyslychenko VS et Karpiuk UV. (2012). The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region – South of Jordan. *Pak. J. Pharm. Sci.* **25(1)**, 239-246.
- Abou El-Hamd HM, El-Sayed MA, Hegazy ME, Helaly SE, Abeer ME et Naglaa SM. (2010). Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba alba*. *Records Natural Products.* **4 (1)**, 1-25.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS). (2008). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. France. Pp11-12.
- Ait-Ouazzou A, Lorán S, Arakrak A, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, Pagán R et Conchello P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Menthapulegium*, *Juniperusphoenicea*, and *Cyperuslongus* essential oils from Morocco. *Food Research International.* **45**, 313–319.
- Aiyegoro OA et Okoh AI. (2009). Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research.* **3(13)**, 1147-1152.
- Alexopoulos A, Kimbaris AC, Plessas S, Mantzourani I, Theodoridou I, Stavropoulou E, Polissiou MG et Bezirtzoglou E. (2011). Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe.* **17(6)**, 399-402.
- Amarti F, Satrani B, Aafi A, Ghanmi M, Farah A, Aberchane M, El Ajjouri M, El Antry S et Chaouch A. (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie.* **6**, 342–347.
- Amlan KP. (2011). Effets of Essentiel oils on Rumen Fermentation, Microbial Ecology and Ruminant Production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* **6 (5)**, 416-428.
- Arnaud I, Jarlier V, Carbonne-Berger A, Maugat S, Bajolet O, Dumartin C, Marty N, Savey A, Sénéchal H, Coignard B et Astagneau P. (2012). Bactéries multirésistantes (BMR) en milieu hospitalier: entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) et *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (Sarm), Réseau BMR-Raisin, 2002-2010. 21p.

B

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*. **46**,446- 475.
- Baran G, Erbay A, Bodur H, Öngürü P, Akıncı E, Balaban N et Çevik M.(2008). Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *International Journal of Infectious Diseases*. **12**, 16-21.
- Batard E, El Kouri D et Potel G. (2007). Infection à staphylocoques : aspects clinique bactériologiques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), maladies infectieuses, 8-007-A-10.
- Beghidja N, Bouslimani N, Benayache F, Benayache S, et Chalchat JC.(2007). Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the east of Algeria. *Chem. Natur. Compounds*. **43 (4)**, 481-483.
- Benouda A, Benjlali B et Hassar M. (1988). Les Propriétés Antiseptiques des Huiles Essentielles *in vitro*, testées Contre des Germes Pathogènes Hospitaliers. **59**, 115-119.
- Ben Haj Khalifa A et Khedher M. (2010). Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées dans la région de Mahdia. *Lettre à la rédaction /Médecine et maladies infectieuses*. **40**, 126–128.
- Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC et Fernandes A J . (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*, **101**, 387-390.
- Boukhatem MN, Hamaidi M S, Saidi F et Hakim Y. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue « Nature et Technologie »*. N° 03. Pp 37- 45.
- Boukhebti H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H et Harzallah D. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*. **3 (4)**, 267-275.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int.J.Food Microbiol*. **94**, 223-253.

C

- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L et Ferret A. (2007). Invited Review : Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. **90**, 2580-259.
- Chiu CH, Lee HY, Tseng LY, Chen CL, Chia JH, Su LH et Liu SY. (2010). Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipénème in *Acinetobacter baumannii*. clinical isolates in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **35**, 382–386.
- Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards.M100-S20, Vol. 30 No. 1 remplace M100-S19, Vol. 29 No. 3.
- Consales G, Gramigni E, Zamidei L, Bettocchi D et Raffaele De Gaudio A. (2011). A multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in intensive care unit: Antimicrobial and organizational strategies. *Journal of Critical Care*. **26(5)**, 453-9.
- Couic-Marinier F et Lobstein A. (2013 a). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*. N° 525. 3 p.
- Couic-Marinier F et Lobstein A. (2013 b). Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*. N° 525. 1 p.

D

- D'Arrigo M, Ginestra G, Mandalari G, Furneri PM, et Bisignano G. (2011). Synergism and post antibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine*. **17**,317–322.
- Darwish RM, Aburjai T, Al-Khalil S, Mahafzah A. (2002). Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. **79**, 359-364.
- Darriet-Giudicelli F. (2011). Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum Corse-Sardaigne: *Chamaemelum Mixtum*, *Anthemis Maritima* et *Eryngium maritimum*. Thèse de Doctorat de chimie organique et analytique. Université de Corse-Pascal Paoli. Ecole doctorale environnement et société. 234 p.
- Dhabaan GN, Hamimah H et Shorman MA. (2011). Emergence of extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in North of Jordan. *African Journal of Microbiology Research*. **5(9)**, 1070-1075.
- Di Pasqua R, DeFeo V, Villani F et Mauriello G. (2005). In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against foodborne pathogen and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*. **55 (2)**, 139-143.
- Djenane D, Aïder M, Yangüela J, Idir L, Gómez D, Roncalés P. (2012). Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated

with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science*. **92**, 667–674.

Djilani A et Dicko A.(2012). The Therapeutic Benefits of Essential Oils. Nutrition, Well Being and Health, Dr. Jaouad Bouayed (Ed.), ISBN: 978-953-51-0125-3, In Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the-therapeutic-benefits-of-essential-oils>.

Durate A, Silva F, Ferreira S et Domingues FC. (2012). Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*.**19**, 236-8

Duru ME, Öztürk M, Ugur A et Ceylan Ö.(2004). The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J. Ethnopharmacol*. **94**, 43–48.

F

Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui N, Pagès J.M et Hassani L. (2012). Antibacterial Activity of *Thymus Maroccanus* and *Thymus Broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*. **19**, 464–471.

Festy D. (2011). Les huiles essentielles ça marche. A propos de l'aromathérapie. Editions: Leduc.s .Paris. 9 p.

G

Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygodlo J et Demo M. (2006). Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Molecular Medicinal Chemistry*. **10**, 30-32.

Gamisans J, Jeanmonod D. (1993). Catalogue des plantes vasculaires de la Corse (seconde édition). Edition des conservatoires et jardin botaniques de la ville de Genève, Chambésy. 258 p.

Gausсен H, Leroy JF et Ozenda P. (1982). Précis de botanique; végétaux supérieurs. 2^{ème} édition. Tome II. Masson, Paris. 579 p.

Goetz P et Ghedira K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. Edition : Springer-Verlag France, Paris. Pp 4-194.

Gordon NC et Wareham D.W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **35**, 219–226.

Gören AC, Topçu G, Bilsela G, Bilsela M, Aydoğmuş Z et Pezzuto JM, (2002). The chemical Constituents and biological Activity of Essential Oil of *Lavandulastoechas* ssp. *Stoechas*. *Z. Naturforsch*. **57c**, 797-800.

- Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Isamili M.R, Houti H, El Monfalouti H, Benchakroun K.H, Aberchane M, Harki L, Boukir A, Chaouch A et Charrouf Z. (2010). Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental). *Phytothérapie*. **8**, 295–301.
- Ghrabi Z et Al-Rowaily SLR. (2008). *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa. **117**, 49-49.
- Grohs P. (2009). Évolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques : la méticilline est-elle encore un marqueur de multirésistance ?. *Pathologie Biologie*. **57**, 1-8.

H

- Halawani E. (2009). Antibacterial Activity of Thymoquinone and Thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and Their Interaction with Some Antibiotics. *Advan. Biol. Res.* **3 (5-6)**, 148-152.
- Haddouchi F et Benmansour A. (2008). Huiles essentielles, utilisation et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire*. N°08. 8 p.
- Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, Snoussi M, Fallah H, Ksouri R et Bakhrouf A. (2009) Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J Microbiol Biotechnol.* **25**, 2227–2238.
- Haouari M; Ferchichi A. (2009). Essential Oil Composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia. *Molécules*. **14**, 1585-1594.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi K. A et Doble M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. **15**, 639–652.
- Hmamouchi M. (2001). *Les plantes médicinales et aromatiques marocaines*, 2^{ème} éd., Rabat, Maroc, 390 p.

K

- Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, M.-F. Vergnes. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*. **6**, 160–164.
- Kamkar A, Javan A. J, Asadi F et Kamalinejad M. (2010). The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology*. **48**, 1796–1800.

- Karah N, Sundsfjord A, Towner K et Samuelsen Ø. (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. Drug Resistance Updates. **15**, 237–247.
- Karamanos AJ et Sotiropoulou DEK. (2013). Field studies of nitrogen application on Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) Iets waart) essential oil during two cultivation seasons. Industrial Crops and Products. **46**, 246–252.
- Karray-Bouraoui N, Rabhi M, Neffati M, Baldan B, Ranieri A, Marzouk B, Lachaâl M et Smaoui A. (2009). Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichomemorphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. Industrial Crops and Products. **30**, 338–343.
- Kempf M, Eveillard M, Kowalczyk F, Rossines E, Panhelleux G et Joly-Guillou M.L.(2011). Etude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composés JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche. Aroma Technologies Pathologie Biologie. **59**, 39–43.
- Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N, Rijnsburger MC et Savelkoul PHM. (2010). Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. International Journal of Antimicrobial Agents. **36**, 114–118.

L

- Lagier JC, Letranchant L, Selton-Suty C, Nloga J, Aissa N, Alauzet C, Carteaux JP, May T et Doco-Lecompte T. (2008). Bactériémies et endocardites à *Staphylococcus aureus*. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie. **57**, 71–77.
- Lahlou N, Mounchid K, Aboussaouira T, Habti N, Belghazi L, Fellat-Zarrouk K, Tantaoui-Elaraki A, Rachidai A et Ismaili-Alaoui MM. (2005). Étude de la cytotoxicité de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* : essais biologiques variés. Les cahiers de la recherche, série A. **(6)**, 7-16.
- Laouer H, Boulaacheb N, Akkal S, Singh G, Marimuthu P, Heluani C, Catalan C et Baldovini N.(2008). Composition and Antibacterial Activity of The Essential Oil of *Ammoides atlantica* (Coss. et Dur.) Wolf. Journal of Essential Oil Research. **(3)**, 266-269.
- Lardry JM et Haberkorn V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither Rev; volume. **61**, 14-7.
- Lee H, Chen C, Wang S, Su L, Chen S, Liu S, Wu T, Lin T et Chiu C. (2011). Imipenem hetero resistance induced by imipenem in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanism and clinical implications. International Journal of Antimicrobial Agents. **37**, 302–308.
- Lei J, Yu J, Yu H et Liao Z. (2008). Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. Food Chemistry. **107**, 1205-1209.
- Lepelletier D, Caillon J, Corvec S, Rozé JC et Gras C. (2008). Investigation d'une épidémie à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) dans une Unité de Soins Intensifs de Néonatalogie. Médecine et maladies infectieuses. **38**, S100–S102.

Lv F, Liang H, Yuan Q et Li C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*. **44**, 3057–3064.

M

- Mahboubi M et Ghazian Bidgoli F. (2010). Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine*. **17**, 548–550.
- Mahboubi M et Haghi G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*. **119**, 325–327
- Mandal S, DebMandal M, Pal N.K et Saha K. (2010) Synergistic anti *Staphylococcus aureus* activity of amoxicillin in combination with *Emblica officinalis* and *Nymphae odorata* extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 711-714.
- Mazari K, Bendimerad N, Bekhechi C et Fernandez X. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. **4(10)**, 959-964, 18.
- Merghache S, Hamza M et Tabti B. (2009). Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. *Afrique SCIENCE*. **05 (1)**, 67 – 81.
- Mohammedi Z ; Atik F. (2012). Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Revue « Nature & Technologie »*. N° 06. Pp 34-39.
- Mondello A, Scaturro M, Ricci M.L. (2009). Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. *Journal of Microbiological Methods*. **77**, 243-248.
- Moon S, Kim H et Cha J. (2011). Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*. **56(9)**, 907-16.
- Morteza-Semnani K, SaediM etAkbarzadeh M. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Menthapulegium* L, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. **14(2)**, 208-213.
- Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J et Wink M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*. **17**, 1061–1066.

N

- Neonakis I, Spandidos D et Petinaki E. (2011) Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **37**, 102–109.
- Nour M, Mastouri M et Ben Nejma M. (2005). Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et bases moléculaires de la résistance. *Pathologie Biologie*. **53**, 334–340.

O

- Oussou K, Yolou S, Tue B, Kanko Bi C, Boti J, Ahibo C et Casanova J. (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimum Gratissimum* (*Lamiaceae*) Euro Journals Publishing, Inc. Pp 51.
- Ozenda P. (2004). Flore et Végétation du Sahara. 3^{ème} édition: *Centre National de la Recherche Scientifique*, Paris, 662 p.

P

- Pavlović I, Petrović S, Radenković M, Milenković M, Couladis M, Branković S, Drobac P.M et Niketić M. (2012). Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb.ex Heuffel (*Apiaceae*) essential oil. *Food Chemistry*. **130**, 310–315.
- Philippon A. (2008). Résistance bactérienne: définition, mécanisme, évolution. EMC. (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladie infectieuse. 8-006-N-10.
- Punpanich W, Nithitamsakun N, Treeratweeraphong V et Suntarattiwong P.(2012). Risk factors for carbapenem non-susceptibility and mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia in children. *International Journal of Infectious Disease*. **16**, e811–e815.

Q

- Quezel P et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition: *Centre National de la Recherche Scientifique*. Tome II. Paris. 600 p.

R

- Rasooli I, Mirmostafa S.A. (2003). Bacterial Susceptibility to and Chemical Composition of Essential Oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *J. Agric. Food Chem.* **51(8)**, 2200-2205.
- Rosato A, Piarulli M, Corbo F, Muraglia M, Carone A, Vitali M E et Vitali C.(2010). *In Vitro* Synergistic Action of Certain Combinations of Gentamicin and Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. **17**, 3289-3295.

S

- Shakouri Kh et Azanowsky J-M. (2010). Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques importées en France par des patients rapatriés ou ayant des antécédents d'hospitalisation à l'étranger. *Haut Conseil de la santé publique*. Pp 38.
- Sibanda T., Olaniran and A. O et Okoh I.(2010). *In vitro* antibacterial activities of crude extracts of *Garcinia kola* seeds against wound sepsis associated *Staphylococcus* strains. *Journal of Medicinal Plants Research*. **4(8)**, 710-716.

Sui X, Liu T, Ma C, Yang L, Zu Y, Zhang L et Wang H. (2012) .Microwave irradiation to pretreat rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) for maintaining antioxidant content during storage and to extract essential oils imultaneously. Food Chemistry. **131**, 1399–1405.

T

Tastekin D, Atasever M, Adigüzel G, Keles M et Tastekin A. (2006). Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba alba* in experimental hyperglycaemic rats. Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy. **50**, 235-238.

Tattevin P. (2011). Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'acquisition communautaire. Médecine et maladies infectieuses. **41**, 167–175.

Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, Neng N.R.,Nogueira J.M.F, Saraiva J.A, Nunes M.L. (2012).European pennyroyal (*Menthapulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Industrial Crops and Products. **36**, 81–87.

Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A et Nazemi J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) . Phytomedicine. **17**, 142-145.

Toroglu S. (2011). *In-vitro* antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils. Journal of Environmental Biology. **32 (1)**, 23-29.

V

Vardar- Ünlü G, Candan F,Kmen A, Daferera D,Polissiou M,Sökmen, Dönmez E, et Tepe B. (2003). Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus*Fisch.et Mey. Var *pectinatus* (*Lamiaceae*).J. Agric. Food Chem. **51 (1)**, 63-67.

Vieira R C, Delprete P G, Leitão S G, et Leitão G G . (2001). Anatomical and Chemical Analyses of Leaf Secretory Cavities of *Rustia formosa* (*Rubiaceae*).American Journal of Botany. **88 (12)**, 2151–2156.

Vincenot F, Saleh M et Prévost G .(2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Revue Francophone des Laboratoires :N°407. Pp 61-69.

W

Warnke P H, Lott A J S, Sherry E, Wiltfang J et Podschun R. (2013). The ongoing battle against multi-resistant strains: *In-vitro* inhibition of hospital-acquired MRSA, VRE, *Pseudomonas*,

ESBL *E.coli* and *Klebsiella* species in the presence of plant-derived antiseptic oils. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. **41**, 321-326.

Wu Z, Li H, Yang Y, Zhan Y, Tu D. (2013). Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. **(46)**, 311– 316.

Z

Zafar A, Shaikat S, Mahnaaz Kh, Arshiya T et Zahoor A.(2010).Synergistic Effect of *Salvadora persica* Extracts, Tetracycline and Penicillin Against *Staphylococcus aureus*. African Journal of Basic & Applied Sciences. **2 (1-2)**, 25-29.

Zaouali Y, Chograni H, Trimech R et Boussaid M. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *.Typicus Batt.*organs during growth and incidence on the antioxidant activity. Industrial corps and Products. **43**, 412-419.

Zouari S, Zouari N, Fakhfakh N, Bougatef A, Ayadi M. A et Neffati M. (2010). Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herbaalba*Asso. Journal of Medicinal Plants Research. **4(10)**, 871-880.

Zohoun A, Dao I, Karfo R, Essayagh T, Sekhsokh Y, Bousta M et ElHamzaoui S. (2011).Méningite nosocomiale postopératoire à *Acinetobacter baumannii* multirésistant en neurochirurgie: à propos d'un cas. Pathologie Biologie **60**, e6–e8.

Annexes

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture (pour 1 litre d'eau distillée)

Gélose Mueller-Hinton (MH)

Infusion de viande de bœuf déshydratée 3 g/L

Hydrolysate acide de caséine 17,5 g/L

Amidon 1,5 g/L

Agar 1,5 g/L

pH 7,3 ± 0,2

Autoclaver à 120°C/20 min

Bouillon Mueller-Hinton

Extrait de viande de bœuf 2 g/L

Hydrolysate acide de caséine 17,5 g/L

Amidon soluble 1,5 g/L

pH 7,3 ± 0,2

Autoclaver à 120°C/20 min

Diluant (Eau physiologique stérile)

Chlorure de sodium 9 g

Eau distillée 1L

pH 7,3 ± 0,2

Autoclaver à 120°C/20 min

Annexes

Annexe II : Monographie des plantes

Artemisia herba alba Asso.



Règne: végétal

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement: Spermaphytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Sous classe: Astéridae

Ordre : Astérales

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Artemisia*

Espèce: *Artemisia herba alba* Asso.

(Quezel et Santa, 1963 ; Gaussen et *al.*, 1982 ; Abou El-Hamd et *al.*,2010)

Description de l'espèce

C'est une plante odorante vivace dressée, suffrutescentes à tiges nombreuses, tomenteuses, rigides et droites de 30 à 50 cm de long. Les feuilles sont coutres, généralement pubescentes, argentées. Les fleurs sont hermaphrodites emballées dans des petites capitules (comprenant chacun de 3 à 8 fleurs) sessiles et en bottes.

La croissance végétative d'*Artemisia herba alba* Asso. à lieu en automne, la floraison commence en Juin et se développe essentiellement en fin d'été (Ghrabi et Al-Rowaily, 2008).

Habitat

L'armoise blanche se développe dans les zones bioclimatiques qui vont de la partie supérieure semi-arides à la partie inférieure subsaharienne. En Algérie, elle est particulièrement répandue dans les secteurs des hauts-plataux et de Sahara Septentrional (Quezel et Santa 1963 ; Ozenda, 2004 ; Ghrabi et Al-Rowaily, 2008).

Utilisation thérapeutique

L'armoise blanche est utilisée en médecine traditionnelle pour soigner le diabète, la bronchite, les abcès, la diarrhée, les ulcères et les mycoses. Elle est très utilisée au moyene-Orient et en Afrique du Nord contre plusieurs maladies y compris l'entérite et les troubles intestinaux. L'huile essentielle de cette plante a montré une activité antibactérienne

Annexes

intéressante contre plusieurs bactéries (Tastekin et *al.*, 2006 ; Ghrabi et Al-Rowaily, 2008 ; Haouari et Ferchichi, 2009).

Lavandula stoechas L.



Règne: Plantes

Sous règne: Plantes vasculaires

Embranchement: Spermaphytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe : Dicotyledones

Sous classe: Dialypétales

Ordre : Lamiales (labiales)

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Lavandula*

Espèce: *Lavandula stoechas* L.

(Quezel et Santa, 1963 ; Gaussen et *al.*, 1982)

Description de l'espèce

Sous-arbrisseau à tige et feuilles persistantes, il peut atteindre une longueur de 1 mètre, étroit vert pâle, s'étend du gris bleuâtre profond au vert à brun pâle, fleurs de couleur bleu – violet. D'autres variétés sont à fleurs blanches et roses. *L. stoechas* est une plante tendre, qui préfère les endroits ensoleillés et les sols riches, les tiges étroites sont quadrangulaires à feuilles opposées, à son extrémité une inflorescence terminée par un toupet de longues bractées violettes (Mohammedi et Atik, 2012).

Habitat

Largement distribuée dans les îles canari, Islande et à travers tout le tell méditerranéen, l'Afrique du Nord, Sud ouest de l'Asie, Afrique tropicale avec une disjonction vers l'Inde (Mohammedi et Atik, 2011).

Utilisation thérapeutique

La Lavande a une longue histoire en usage médicinal, elle est employée comme expectorant, antispasmodique, carminative, désinfection des plaies, contre les problèmes dermatiques, psoriasis. Elle possède également des propriétés antimicrobiennes et anti-carcinogènes, sédatif, antidépresseur, antioxydant, anti-inflammatoire et insecticide (Mohammedi et Atik, 2011).

Mentha pulegium L.



Règne : Plantae

Sous règne: Plantes vasculaires

Embranchement: Spermaphytes

Sous Embranchement: *Magnoliophyta*

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Mentha*

Espèce: *Mentha pulegium* L.

(Quezel et Santa, 1963 ; Gausсен et *al.*, 1982 ;)

Description de l'espèce

Plante vivace à feuilles, opposées, petites, sont ovales presque entières (légèrement dentelées) et munies d'un court pétiole. Les fleurs, qui apparaissent à l'été, de juillet à fin septembre, sont rose lilas, parfois blanches échelonnées le long de la tige (Gamisans et Jeanmonod, 1993).

Habitat

Elle pousse dans l'ensemble du bassin méditerranéen, la majorité de l'Europe et certaines régions d'Asie (Beghidja *et al.*, 2007).

Utilisation thérapeutique

Elle possède des effets analgésique, antibactériens et antifongiques dus à son huile essentielle (Lahlou *et al.*, 2005). *M. pulegium* est aussi utilisée en médecine traditionnelle comme antiseptique pulmonaire et pour traiter les affections gastriques (Hmamouchi, 2001).

Annexe

Annexe III : Antibiogrammes des souches testées

Tableau I : Antibiogramme de SARM et *S. aureus*

Familles	Antibiotiques	SARM	<i>S. aureus</i>
Penicilline	Oxacilline (OX)	19 (S)	26 (S)
	Céfoxitine (CX)	19.5 (R)	26 (S)
Glycopeptides	Vancomycine (VA)	17.5 (ND)	20.5 (ND)

S : Sensible

R : Résistant

ND : Non déterminé

Tableau II : Antibiogramme d'*A.baumannii* et d'*E.coli*

Familles	Antibiotiques	<i>A.baumannii</i>	<i>E.coli</i>
Pénicilline	Ticarcilline (TIC)	6 (R)	28.5 (S)
	Pipéracilline (PIP)	6 (R)	24 (S)
β-lactamase	Ticarcilline-acide clavulanique (TCC)	6 (R)	27 (S)
Céphalosporine	Céfotaxime (CTX)	6 (R)	31(S)
	Céftazidime (CAZ)	6 (R)	24 (S)
	Céfèpime (FEP)	6 (R)	31 (S)
Carbapénème	Imipénème (IMP)	6 (R)	26 (S)
Aminoglycoside	Tobramycine (TOB)	15 (R)	24 (S)
	Amikacine (AK)	12 (R)	20 (S)
Fluoroquinolone	Ciproflaxacine (CIP)	14 (R)	36(S)
Quinolones	Acide nalidixique (AN)	6 (R)	26 (S)
Monobactame	Aztréonam (ATM)	10 (R)	23 (S)

S : Sensible

R : Résistant

Annexes

Annexe IV : Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *A. baumannii* et *S. aureus* (CLSI, 2010).

Agent antimicrobien	Charge de disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Interprétation standard des CMI (µg/mL)		
		S	I	R	S	I	R
PI	100	≥21	18-20	≤17	≤16	32-60	≥128
TI	75	≥20	15-19	≤14	≤16	32-60	≥128
TCC	75/10	≥20	15-19	≤14	≤16/2	32/2-64/2	≥128/2
CTX	30	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
CAZ	30	≥18	15-17	≤8	≤8	16	≥32
FEP	30	≥23	15-22	≤8	≤8	16-32	≥64
IMP	10	≥16	14-15	≤13	≤4	8	≥16
TOB	10	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
AK	30	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64
CIP	5	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4
AN	30	-	-	-	-	-	-
AT	-	-	-	-	-	-	-
CX	30	≥22	-	≤21	≤4	-	-
OX	1	≥13	11-12	≤10	≤2	-	≤4
VA	-	-	-	-	≤4	8-16	≥32

- : Non déterminé

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles issues de trois plantes aromatiques locales (*Artemisia herba alba* Asso., *Lavendula stoechas* L. et *Mentha pulegium* L.) et leur associations avec des antibiotiques de différentes familles sur des souches multirésistantes (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème). L'aromatogramme en milieu solide (méthodes des disques) a été utilisé pour évaluer l'activité de ces huiles essentielles ainsi que les associations huiles essentielles /antibiotiques.

Toutes les huiles essentielles testées ont montré des effets plus ou moins importants sur les deux souches, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. s'avère la plus efficace avec une activité plus prononcée sur *A.baumannii*. Trois types d'interactions sont observés lors de l'association HES/ATBs (antagonistes, indifférentes et synergiques), les interactions synergiques concernent beaucoup plus le SARM.

La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices à été effectuée par la méthode de microdilution en milieu liquide, les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles donnent des effets antibactériens à de faibles concentrations.

Mots clés : Activité antibactérienne, huile essentielle, *Artemisia herba alba* Asso., *Lavendula stoechas* L., *Mentha pulegium* L., aromatoigramme, association HES/ATBs, *A.baumannii*, SARM.

Abstract

The aim of this study is to evaluate the antibacterial activity of essential oils from three local aromatics plants (*Artemisia herba alba* Asso., *Lavendula stoechas* L. and *Mentha pulegium* L.) and their association with different family of antibiotics against multidrug-resistant strains (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*). The aromatoigram (disks methods) was used to evaluate the activity of these essential oils and their associations essential oils / antibiotics.

All essential oils tested have showed effects more or less important against both strains, essential oil of *Mentha pulegium* L. were proved the highest effect against *A.baumannii*. Three types of interactions were observed (antagonistic, indifferent and synergetic) while the association EOs/ATBs, concerning the synergetic effects, they were observed mainly against MRSA.

The determination of Minimal Inhibitory Concentration was performed by micro-dilution broth methods, the results show that essential oils provide antibacterial effects at low concentrations.

Key words: Antibacterial activity, Essentiel oil, *Artemisia herba alba* Asso., *Lavendula stoechas* L., *Mentha pulegium* L., aromatoigram, association EOs/ATBs, *A.baumannii*, MRSA.