

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 du Diplôme de Master II
En Microbiologie Moléculaire et Médicale

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne de quelques huiles
essentiels et l'effet de leurs associations avec les antibiotiques
par la méthode en micro-atmosphère*

Présenté par:

MERABET Amal

MOUHOUBI Naima

Membre de jury

Présidente : M^{me} YAHIAOUI H.

Examineur : M^f MOUSSAOUI B.

Examinatrice : M^{lle} YANAT B.

Promotrice : M^{lle} BEKKA F.

-Année Universitaire : 2012/2013 -

Remerciements

Merci à M^{lle} BEKKA F., notre promotrice, d'avoir accepté de nous encadrer, de nous avoir prodigué les conseils nécessaires par sa pédagogie fructueuse, ayant permis la concrétisation de l'objectif dévolu, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nos vifs remerciements à M^r BAKOUR S., M^r DJOUDI F. et M^{lle} TAFOUKT R. pour leurs aides, orientations et du temps qu'ils nous ont consacré.

A M^r TOUATI A/A, nous lui exprimons nos remerciements pour ses recommandations et la mise à disposition des utilités indispensables.

A M^{me} YAHIAOUI H., qui nous a fait l'honneur de présider la commission du jury, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde considération.

A M^r MOUSSAOUI B. et M^{elle} YANAT B., ayant accepté d'examiner et juger notre travail nous leur exprimons nos sincères remerciements.

Que tous, trouvent ici nos parfaites salutations.

Dédicaces

Au deux personnes qui comptent le plus pour moi, mes très chers parents.

A mon frère Amine.

A Toute ma famille.

A tous mes amis.

A Naima, Warda et Djamila.

Amel.

Dédicaces

Un rêve qui se réalise grâce à Dieu le tout puissant, ce mémoire est enfin achevé, je le dédie aux personnes qui me sont très chères :

- ✓ À la mémoire de mon très cher papa, que son âme repose bien au paradis, ce travail est le fruit de ses conseils qui resteront à jamais gravés dans mon cœur et mon esprit.
- ✓ À ma très chère maman, que dieu la protège, je la remercie infiniment pour son amour, son soutien et ses sacrifices, tout pour mon bonheur, je lui serais toujours reconnaissante.
- ✓ À mon mari Sofiane, pour ses encouragements, sa confiance et son amour.
- ✓ À mon adorable frère Lamine, mes sœurs Souad, Fassadit et Khokha, ce travail est également leur travail pour leurs encouragements, assistances et disponibilités pour moi à n'importe quel moment.
- ✓ À mes neveux Ali et Aksil et leurs papa.
- ✓ À mes grands parents, que dieu protège, je leur souhaite beaucoup de santé.
- ✓ À mes tantes, oncles, cousins et cousines spécialement Nabila et Zahra.
- ✓ À ma belle famille.
- ✓ À mes amies : Lydia et Lila pour tous les moments passés.
- ✓ À tous mes amis (es).
- ✓ À mon amie, sœur d'abord puis binôme après ces 5ans : Amel pour tous les moments durs et agréables passés ensemble, ainsi qu'à toute sa famille

Naima.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Synthèse bibliographique

Introduction 1

Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Matériel | 6 |
| 1.1. Matériel végétal..... | 6 |
| 1.2. Souches bactériennes..... | 6 |
| 2. Méthodes | 6 |
| 2.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles | 6 |
| 2.1.1. Contrôle de la stérilité des huiles essentielles | 6 |
| 2.1.2. Préparation des suspensions bactériennes et ensemencement | 7 |
| 2.1.3. Antibiogramme des souches testées | 7 |
| 2.1.4. Aromatogramme en micro-atmosphère | 7 |
| 2.2. Etude de l'association huile essentielle/antibiotique..... | 8 |
| 2.3. Effet bactéricide ou bactériostatique des antibiotiques et des huiles essentielles | 9 |
| 2.4. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices par micro-dilution en milieu liquide (CMI) | 9 |
| 2.5. Etude statistique | 10 |

Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| 1. Résultat du contrôle de la stérilité des huiles | 11 |
| 2. Résultat des antibiogrammes | 11 |
| 3. Résultat de l'aromatogramme en micro-atmosphère | 11 |
| 3.1. Effet des huiles essentielles sur SARM..... | 11 |
| 3.2. Effet des huiles essentielles sur <i>A.baumannii</i> | 13 |
| 3.3. Comparaison de l'effet des huiles sur SARM et <i>A.baumannii</i> | 14 |

| | |
|---|----|
| 4. Effet de l'association huiles/antibiotiques..... | 16 |
| 4.1. Effet de l'association huiles/ antibiotiques sur SARM | 16 |
| 4.1.1. Effet de l'association de l'huile d' <i>Origanum glandulosum</i> Desf. (OG) avec les antibiotiques | 16 |
| 4.1.2. Effet de l'association de l'huile de <i>Thymus fontanesii</i> Boiss. et Reut. (TH1) avec les antibiotiques | 17 |
| 4.1.3. Effet de l'association de l'huile de <i>Thymus numidicus</i> Poiret. (TH2) avec les antibiotiques | 19 |
| 4.2. Effet de l'association huiles/ antibiotiques sur <i>A.baumannii</i> | 20 |
| 4.2.1. Effet de l'association de l'huile d' <i>Origanum glandulosum</i> Desf. (OG) avec les antibiotiques | 20 |
| 4.2.2. Effet de l'association de l'huile de <i>Thymus fontanesii</i> Boiss. et Reut. (TH1) avec les antibiotiques | 21 |
| 4.2.3. Effet de l'association de l'huile de <i>Thymus numidicus</i> Poiret. (TH2) avec les antibiotiques | 22 |
| 5. Résultat de l'effet bactéricide ou bactériostatique des antibiotiques et des huiles essentielles..... | 24 |
| 6. Résultat de la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles et antibiotiques | 25 |
| 7. Résultat de l'étude de l'association huiles/antibiotiques par la méthode de micro-dilution en milieu liquide..... | 26 |
| Conclusion..... | 27 |

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

| Numéro du tableau | Titre du tableau | Pages |
|--------------------------|---|-------------------|
| I | Caractéristiques et origines des souches testées | Annexe II |
| II | Résultats de l'antibiogramme de vérification de 10^8 UFC/mL | Annexe III |
| III | Résultats de l'antibiogramme de 10^6 UFC/mL | Annexe III |
| IV | Effet bactéricide ou bactériostatique des antibiotiques sur les souches testées | Annexe III |
| V | Effet bactericide ou bacteriostatique des huiles sur les souches testées | Annexe III |
| VI | Diamètres des zones d'inhibition (mm) et Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles (μ L/mL) et des antibiotiques (μ g/mL) | 25 |
| VII | Concentrations de l'antibiotique (AK) et de l'huile (OG) combinés et nature de l'interaction obtenue. | 26 |
| VIII | Concentrations de l'antibiotique (CX) et de l'huile (TH1) combinés et nature de l'interaction obtenue. | 27 |
| IX | Marque, concentration, diamètre critique et lecture interprétative des antibiotiques utilisés (CLSI, 2010) | Annexe IV |

Liste des figures

| Numéro de la figure | Titre de la figure | Numéro de la page |
|---------------------|--|-------------------|
| 1 | Illustration de la méthode en micro-atmosphère | 8 |
| 2 | Etude comparative de l'effet des HEs sur SARM en fonction du temps d'incubation. | 11 |
| 3 | Photos représentant l'effet des huiles essentielles en micro-atmosphère sur SARM. | 12 |
| 4 | Etude comparative de l'effet des HEs sur <i>A. baumannii</i> en fonction du temps d'incubation. | 13 |
| 5 | photos représentant l'effet des huiles essentielles en micro-atmosphère sur <i>A.baumannii</i> . | 14 |
| 6 | Etude comparative de l'effet des HEs sur les deux souches testées. | 15 |
| 7 | Effet de l'association de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> Desf. (OG) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur SARM. | 17 |
| 8 | Effet de l'association de l'huile essentielle de <i>T.fontanesii</i> Boiss. et Reut. (TH1) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur SARM. | 18 |
| 9 | Effet de l'association de l'huile essentielle de <i>T.numidicus</i> Poiret. (TH2) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur SARM. | 19 |
| 10 | Effet de l'association de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> Desf. (OG) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur <i>A.baumannii</i> . | 21 |
| 11 | Effet de l'association de l'huile essentielle de <i>T.fontanesii</i> Boiss. et Reut. (TH1) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur <i>A.baumannii</i> . | 22 |
| 12 | Effet de l'association de l'huile essentielle de <i>T.numidicus</i> Poiret. (TH2) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur <i>A.baumannii</i> . | 23 |

Liste des abréviations

ADN : **A**cide **D**ésoxyribo Nucléique

AFNOR : **A**ssociation **F**rançaise de **N**ormalisation

AmpC : Céphalosporinase Chromosomique

ANOVA: **A**nalysis **O**f **V**ariance

ATB : antibiotique

ATCC: **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection

BLSE : **B**éta-**L**actamase à **S**pectre **E**largi

BMR : **B**actérie **M**ulti-**R**ésistante

CLSI: **C**linical and **L**aboratory **S**tandards **I**nstitute

CMI : **C**oncentration **M**inimale **I**nhibitrice

DZI : **D**iamètres des **Z**ones d'**I**nhibition

FICI : **F**ractional **I**nhibitory **C**oncentration **I**ndex

HEs : **H**uiles **E**ssentielles

INRA : **I**nstitut **N**ational de **R**echerche **A**gronomique

LSD: **L**east **S**ignificant **D**ifference

LPS: **L**ipo **P**oly **S**accharide

MH : **M**ueller-**H**inton

OG : *Origanum glandulosum* Desf.

PLP : **P**rotéine **L**iant **P**énicilline

PVL : **P**anton **V**alentine **L**eukocidin

SARM : *Staphylococcus aureus* **R**ésistant à la **M**éticilline

TH1: *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut.

TH2: *Thymus numidicus* Poiret.

UFC: **U**nité **F**ormant **C**olonie

Glossaire

Carminatif : Se dit des substances qui ont la propriété d'expulser les gaz intestinaux.

Endémique : Ce qui est particulier à une localité ou une région donnée :

- En médecine, une maladie est dite endémique d'une région si elle y sévit de manière permanente.
- En biologie, une espèce est dite endémique d'une région déterminée si elle n'existe que là.

Gène inductible : gène qui s'exprime uniquement en présence d'un métabolite spécifique, l'inducteur.

Métabolites secondaires : est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire. Ils ne participent pas directement aux processus vitaux de la cellule, mais assurent néanmoins des fonctions écologiques importantes. Chez les plantes, les métabolites secondaires sont importants à la survie et à la propagation de l'espèce. Il joue chez celles-ci différents rôles, comme des phéromones ou des signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à l'environnement et de moyens de défense. D'autres protègent la plante des radiations solaires ou encore facilitent la dispersion du pollen et des graines.

Pompes d'efflux : Ce sont des mécanismes de transport membranaire universellement répandus chez des organismes vivants; ils ont un rôle clé dans la physiologie bactérienne tel que : la préservation de l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques , le transport de substances nutritives et l'export de substances toxiques.

Porines : Ce sont des protéines membranaires formant des canaux permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles à travers la membrane des cellules. On les trouve dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Les porines permettent le passage d'ions et de petites molécules organiques dans les deux sens : de l'extérieur vers l'intérieur pour l'arrivée des nutriments, et de l'intérieur vers l'extérieur pour la détoxification du cytoplasme ou la sécrétion de protéines ou de molécules organiques. Sans elles, la bicouche lipidique membranaire rendrait impossible le passage des composés polaires. Les porines sont plus ou moins sélectives et laissent passer seulement certaines classes de composés.

Résistance intrinsèque : ou résistance naturelle, est celle que développe un agent infectieux contre un médicament donné sans jamais avoir été en contact avec celui-ci. Elle concerne toutes les souches d'une même espèce et constitue une caractéristique génétique de cette espèce.

Vermifuge : Le vermifuge est un médicament pour humain ou pour animaux de compagnie . Il permet d'éradiquer les parasites intestinaux, vers ou larves.

Introduction

Les antibiotiques représentent l'un des groupes de médicaments les plus employés en médecine. Cependant, l'usage massif et parfois abusif de ces derniers a contribué à l'émergence de bactéries multi-résistantes (BMR), qui représentent un problème clinique mondial, parmi ces bactéries, *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii* sont considérés comme étant les pathogènes multi-résistant les plus redoutés dans les infections nosocomiales et communautaires (Chambers, 1997 ; Cavallo et al., 2004; Nour et al., 2005 ; Schelz, 2006 ; Gordon et Wareham, 2010; Fadli et al., 2012).

Le coccobacille *A.baumannii* est un Gram négatif impliqué dans diverses infections telles que l'infection du système respiratoire, cutanée, urinaire et septicémie, etc. Il résiste naturellement par production d'une céphalosporinase chromosomique non inductible (AmpC) ainsi que d'une oxacillinase de classe D appartenant au groupe OXA-51-like. De plus, il présente peu de porines comparé aux autres bactéries Gram négatif, ce qui augmente sa résistance intrinsèque. Il est également capable d'acquérir des résistances à de multiples classes d'antibiotiques telles que, la résistance aux bêta-lactamines qui est assurée par des mécanismes enzymatiques (oxacillinases, métallobêta-lactamases et des Bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE)) et /ou des défauts de perméabilité, la résistance aux aminosides par des méthylases, la résistance aux fluoroquinolones résultant des mutations dans les gènes codant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV et la surexpression de pompes d'efflux engendrant une multirésistance à la fois aux bêtalactamines, aminosides, chloramphénicol, érythromycines et tétracyclines. Des pompes d'efflux spécifiques ont été également caractérisées chez *A.baumannii*, ce sont AdeABC et AdeIJK, et la plus récemment décrite est la pompe AbeS (Gordon et Wareham, 2010 ; Karah et al., 2012).

S.aureus est un cocci Gram positif commensal de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires qui se distingue par la production d'une coagulase ainsi que de nombreux facteurs de virulence, il est considéré comme l'un des principaux agents d'infection suppurative superficielle ou profonde. Deux principaux mécanismes sont impliqués dans la résistance acquise de *S. aureus* aux β -lactamines :

- la production de β -lactamase inductible codée par le gène *blaZ* porté par un plasmide ; cette enzyme hydrolyse la pénicilline G et ses analogues de structure ;
- la modification de la cible des antibiotiques ; elle confère la résistance à la méticilline, qui est due à la production d'une nouvelle PLP appelée PLP2a présentant peu d'affinité pour la méticilline et toutes les autres β -lactamines. Elle est codée par le gène *mecA* véhiculé par un

élément génétique mobile appelé «Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* » (SCC*mec*) qui peut aussi porter le gène *ermA* codant la résistance aux macrolides. Ce germe résiste souvent aux fluoroquinolones par des mutations touchant le gène de la topoisomérase IV, ce qui limite leur utilisation en monothérapie, mais aussi aux aminosides par la production d'enzymes modifiant l'antibiotique (Chambers, 1997; Nour et *al.*, 2005).

Face à ces problèmes, les scientifiques se sont orientés vers la recherche de solutions alternatives, notamment des médecines dites douces, basées sur les propriétés des plantes médicinales de façon générale et des plantes aromatiques en particulier, et qui constituent un arsenal thérapeutique et une source d'agents antimicrobiens très importants grâce à leur richesse en métabolites secondaires (alcaloïdes, composés phénoliques, huiles essentielles, etc.) et sans apparition de résistance à long terme (Haddouchi et Benmansour, 2008 ; Girard, 2010). L'utilisation des huiles essentielles en médecine traditionnelle a donné naissance à une nouvelle thérapie dite « aromathérapie » qui utilise l'essence ou l'échantillon aromatique volatile pour soigner, calmer ou prévenir les maladies, les infections et les difficultés respiratoires (Lahlou, 2004; Alexopoulos et *al.*, 2011).

Le terme « huile essentielle » est un terme générique qui désigne les composants liquides et hautement volatiles des plantes, marqués par une forte odeur caractéristique. Ce sont des métabolites secondaires que les plantes aromatiques produisent habituellement pour résister aux infections, aux parasites et aux conditions de stress (Koroch et *al.*, 2007 ; Bastien, 2008). Selon la Norme AFNOR NFT 75-006 (Association Française de Normalisation), les huiles essentielles sont définies suivant le procédé d'extraction comme étant « le produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles, ex. : *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae* et *Zingiberaceae*...etc, souvent localisées dans des régions chaudes ou tempérées telles que les pays tropicaux et méditerranéens. Ces huiles peuvent être synthétisées par plusieurs organes végétatifs (bourgeons, fleurs, feuilles, tiges, brindilles, graines, fruits, racines, bois ou écorces) et sont stockées dans des structures histologiques spécialisées telles que les cellules sécrétrices, les cavités, les canaux, les poches, les glandes et les poils sécréteurs (Bruneton, 1999 ; Lahlou, 2004; Bakkali et *al.*, 2008).

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants avec différentes concentrations. Elles sont caractérisées par deux ou trois composants majeurs (20 à 70%) comparées à d'autres composants mineurs. Ces composants sont regroupés dans deux groupes d'origine biosynthétique distincte : le groupe principal c'est les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés de phénylpropane. Cette composition chimique (chemotype) est fortement liée aux divers facteurs tels que les conditions climatiques et géographiques, la récolte et les techniques d'isolement et de stockage (Dorman et Deans, 2000 ; Piichersky et *al.*, 2006 ; Bakkali et *al.*, 2008 ; Alexopoulos et *al.*, 2011).

Les huiles essentielles sont utilisées dans différents domaines, principalement en parfumerie et cosmétique, dans le domaine alimentaire (comme arôme et conservateur) et dans l'industrie pharmaceutique. Ce sont d'excellents agents antiseptiques, désinfectants et antimicrobiens, utilisées en aromathérapie contre les maladies bactériennes ou fongiques et comme insecticide pour la préservation des cultures ou des stocks de nourriture. Leur caractère volatil permet d'envisager leur utilisation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment en milieu hospitalier (De Billerbeck et *al.*, 2002 ; Koroch et *al.*, 2007 ; Bakkali et *al.*, 2008).

Plusieurs études ont prouvé que les huiles essentielles ont un spectre d'activité très large car elles inhibent la croissance des bactéries, l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* augmente la perméabilité de la membrane cytoplasmique d'*Escherichia coli* et de *S.aureus*, celle d'*Origanum onites* et de *Thymus capitalus* sont actives sur *Bacillus subtilis*, *E.coli*, *Proteus vulgaris*, *S.aureus*, (Ibrahim et *al.*, 2001; Calsamiglia et *al.*, 2007 ; Fadli et *al.*, 2012). Bien que les effets antibactériens des huiles essentielles soient bien établis, le mécanisme d'action de tels composés est mal compris, du fait de la complexité de la composition chimique des huiles essentielles, leur activité antibactérienne n'est pas attribuable à un mécanisme spécifique, mais à plusieurs (Lambert et *al.*, 2001 ; Burt, 2004 ; Carson et *al.*, 2006). Quelques études suggèrent que l'action des huiles essentielles est en relation avec leurs propriétés lipophiles, leurs structures chimiques, la proportion des différents composants, ainsi que les possibles effets synergiques entre eux (Rhayour, 2002 ; Pibiri, 2005). De façon générale, une diversité d'action des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, la fuite d'électrons et la précipitation du contenu protéique des cellules a été observée. Egalement, les propriétés hydrophobes des huiles essentielles leur permettent de traverser la paroi et la membrane cellulaire. Cela peut induire un changement de conformation de

la membrane, l'altération de cette dernière et notamment sa perméabilité qui peut entraîner des pertes anormales d'ions (K^+) voire de macromolécules (Cox et *al.*, 2000 ; Carson et *al.*, 2002 ; Degryse et *al.*, 2008). Les huiles essentielles semblent aussi agir sur les protéines se trouvant dans la membrane plasmique, telles que les ATPases, mais peuvent aussi coaguler certains constituants cellulaires. En outre, des études récentes ont démontré que certains composés de plantes peuvent inhiber efficacement les pompes à efflux impliquées dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques (Burt, 2004 ; Calsamiglia et *al.*, 2007 ; Fadli et *al.*, 2012).

Les techniques utilisées pour déterminer le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles ont une grande influence sur les résultats. Les principales techniques sont :

- la méthode de diffusion sur milieu solide (méthode des disques ou méthode de Vincent) : la méthode des disques ou l'aromatogramme est basée sur le principe de l'antibiogramme. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel une quantité donnée d'huile essentielle est déposée.

- la méthode en micro-atmosphère : cette méthode permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatiles des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Elle consiste à déposer un disque imbibé d'une quantité déterminée d'huile essentielle au milieu du couvercle de la boîte de Pétri (Bendjilali, 1984 ; Inouye et *al.*, 2001).

- la méthode en milieu liquide : elle consiste à déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'agent antimicrobien. C'est une technique dans laquelle une suspension bactérienne est testée contre des concentrations variables d'un agent antibactérien. Cette technique pose un problème de diffusion et d'homogénéité en raison de la très faible solubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, pour cela des agents dispersants sont utilisés : des solvants, tel que l'éthanol, ou des émulsionnants tel que le tween 20 ou tween 80 (Hulin et *al.*, 1998 ; El Kalamouni, 2010).

Des études récentes ont rapporté que les huiles essentielles constituent une alternative ou un complément efficace à l'antibiothérapie, ainsi plusieurs programmes de recherche sont lancés afin de développer de nouvelles combinaisons thérapeutiques antibactériennes actives des huiles essentielles et des antibiotiques pour lutter contre les diverses infections causées par des germes résistants. Plusieurs extraits de plantes ont ainsi montré une activité synergique contre des micro-organismes testés, l'effet de l'association diffère significativement de celui de l'antibiotique seul (Hemaiswarya et *al.*, 2008 ; Rosato et *al.*, 2010).

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité, Méditerranéenne et Saharienne estimée à plus de 3000 espèces de différentes familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec plusieurs espèces endémiques. Les genres *Origanum* et *Thymus* sont des membres d'une grande variété de plantes appartenant à la famille des *Lamiaceae* (Quezel et Santa, 1963 ; Benkiki, 2006). L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles semble d'autant plus intéressante que la flore Algérienne est extrêmement riche en plantes aromatiques. L'aromatogramme semble être la méthode la plus utilisée pour l'étude de leur activité mais le caractère hydrophobe des huiles pose des problèmes de diffusion. En revanche, plusieurs tentatives d'utiliser la nature volatile des huiles essentielles, en phase vapeur ont été initiées (Delaquis et *al.*, 1999 ; Mondello et *al.*, 2009)

Nous nous sommes proposé dans ce travail : d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes aromatiques locales de la famille de *Lamiaceae* ; pour lesquelles peu de travaux ont été réalisés ; et cela par la méthode en micro-atmosphère ce qui n'a jamais été fait , ainsi que la détermination de l'effet de leur association avec les antibiotiques sur deux souches bactériennes multi-résistantes : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème. Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode en micro-atmosphère ;
- Détermination de l'effet bactéricide/bactériostatique des huiles essentielles ;
- Etude de l'association huiles essentielles / antibiotiques en micro-atmosphère ;
- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles et des antibiotiques par la méthode de micro-dilution en milieu liquide ;
- Etude de l'association huiles/antibiotiques par la méthode de micro-dilution en milieu liquide.

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur trois huiles essentielles extraites à partir de plantes médicinales aromatiques de la région de Bejaia, qui sont : *Origanum glandulosum* Desf., *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. et *Thymus numidicus* Poiret (Annexe I).

La récolte des plantes et l'extraction des huiles essentielles ont été effectuées par Mlle BEKKA F.

Les parties aériennes des trois plantes aromatiques ont été cueillies dans la région de Bejaia puis identifiées à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA). Après séchage, l'extraction des huiles essentielles a été effectuée au Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM), Université de Bejaia, par hydro-distillation, selon le protocole de Derwich et *al.* (2010). Les huiles essentielles ainsi obtenues sont conservées à l'obscurité dans des flacons opaques à 4° C pour une utilisation ultérieure.

1.2. Souches bactériennes

Afin d'étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles obtenues, deux souches bactériennes, *Acinetobacter baumannii* et *Staphylococcus aureus* ont été choisies pour leur pouvoir pathogène pour l'Homme ainsi que leur résistance aux antibiotiques. Ces dernières appartiennent à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Université de Bejaia.

Les caractéristiques et l'origine de ces souches sont rapportées dans le tableau I (AnnexeII).

2. Méthodes

2.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles

2.1.1. Contrôle de la stérilité des huiles essentielles (Derwich et *al.*, 2010 ; Zouari et *al.*, 2010)

Afin de contrôler la stérilité des huiles essentielles étudiées, des disques de papier Wattman N°01 stériles sont déposés sur une boîte de Pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton (Annexe V) stérile puis chargés de 10 µl de chaque huile essentielle. Après 24 heures d'incubation à 37° C, l'absence de contaminants dans la boîte indique la stérilité des huiles essentielles.

2.1.2. Préparation des suspensions bactériennes et ensemencement

- Quelques colonies d'une culture de bactéries de 18 à 24h ont été raclées à l'aide d'une pipette Pasteur, puis déchargées dans un tube d'eau physiologique (Annexe V) ;
- Après homogénéisation, la suspension obtenue est standardisée à 10^8 UFC/ml (Absorbance= 0,6 ; $\lambda= 580$ nm,) avec un spectrophotomètre (Shimadzu), et deux dilutions décimales sont effectuées afin d'obtenir un inoculum bactérien de 10^6 UFC/ml ;
- Cet inoculum est utilisé pour ensemercer la gélose Mueller-Hinton coulée dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm, et qui sont séchées à l'étuve à 37° C avant emploi ;
- L'ensemencement des boîtes se fait par écouvillonnage, qui consiste à imbiber un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, retirer l'excédent de liquide en l'essorant contre la paroi du tube puis le faire passer trois fois sur toute la surface de la gélose en tournant la boîte de 60° à chaque fois pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum (Rasooli et Mirmostafa, 2003 ; Mazari et al., 2010).

2.1.3. Antibiogramme des souches testées

La sensibilité des deux souches testées vis-à-vis des antibiotiques de différentes familles (Annexe IV), a été déterminée par la méthode de diffusion suivant les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). Des disques d'antibiotiques sont déposés sur des boîtes contenant de la gélose Mueller Hinton ensemencées préalablement par les suspensions bactériennes adéquates (10^8 UFC/ml pour les antibiogrammes de vérification et 10^6 UFC/ml pour les boîtes utilisées comme témoin pour l'étude de l'association huile/antibiotique).

Deux autres souches de référence (*S.aureus* ATCC 25923 ; *E.coli* ATCC 25922), prises comme souches de contrôle, ont fait également l'objet d'un antibiogramme.

Après incubation à 37° C pendant 24 h, les diamètres des zones d'inhibition sont déterminés et l'interprétation des résultats s'est faite selon le CLSI (2010).

2.1.4. Aromatogramme en micro atmosphère (Bendjilali, 1984 ; Mondello et al., 2009)

L'activité antibactérienne des composants volatiles, contenus dans les huiles essentielles, contre *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii* est mise en évidence selon la technique en micro-atmosphère.

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier Wattman N°01 stériles de 6 mm de diamètre au centre du couvercle d'une boîte de Pétri, puis chargé avec 10 μ l de l'huile

essentielle, sans que cette dernière entre en contact avec la gélose ensemencée auparavant par la souche test (10^6 UFC/ml). La boîte est incubée à 37°C pendant 6 jours. Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et la croissance des cellules bactériennes sensibles de l'inoculum est inhibée (Figure 1).

L'observation et la mesure des diamètres d'inhibition en mm se font les 2^{èmes}, 3^{èmes}, 4^{èmes} et 6^{èmes} jours d'incubation. Trois essais pour chaque test sont réalisés, le résultat étant la moyenne des trois.

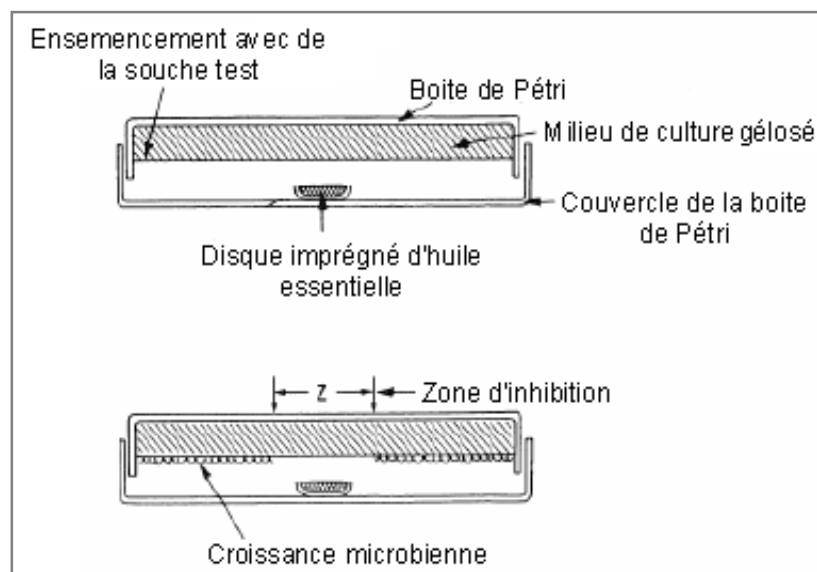


Figure 1 : Illustration de la méthode en micro-atmosphère (Pibiri, 2005)

2.2. Etude de l'association huile essentielle / antibiotique

La méthode en micro-atmosphère utilisée pour évaluer l'association huiles essentielles/antibiotiques est celle préconisée par Rodrigues et *al.* (2009).

Dans des boîtes de Mueller Hinton, préalablement ensemencées avec les suspensions bactériennes des souches testées (10^6 UFC/ml), un disque d'antibiotique est déposé au centre de chaque boîte, un autre disque de papier Wattman N°01 est déposé au centre du couvercle des boîtes de Pétri, puis chargé de 10 μl de l'huile essentielle sans que l'huile entre en contact avec la gélose. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 6 jours. Trois essais sont réalisés pour chaque test. Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés les 2^{èmes}, 3^{èmes}, 4^{èmes} et 6^{èmes} jours d'incubation.

2.3. Effet bactéricide ou bactériostatique des antibiotiques et des huiles essentielles

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et des antibiotiques peut être soit bactériostatique ou bactéricide Laouer et *al.* (2003).

Afin de déterminer l'effet de l'huile en micro-atmosphère et l'effet des antibiotiques après l'antibiogramme, des prélèvements de zones d'inhibition sont transférés dans des tubes contenant un bouillon nutritif. Les prélèvements sont effectués le 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 6^{ème} jour d'incubation des boîtes de Pétri pour les huiles et après 24 h d'incubation pour les antibiotiques. Des tubes témoins sont préparés. Un témoin positif en ensemençant un prélèvement de zone de croissance ainsi qu'un témoin négatif stérile. Après 24 h et 48 h d'incubation à 37° C, la croissance bactérienne est appréciée. La présence d'un trouble indique un effet bactériostatique tandis qu'un milieu clair indique un effet bactéricide.

2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par micro-dilution en milieu liquide (CMI) (Vardar-Unlu et *al.*, 2003 ; Pavlovic et *al.*, 2012)

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles (HEs), des antibiotiques (ATBs) et des associations huiles/antibiotiques (HEs/ATBs) ont été déterminées selon la méthode de micro dilution en milieu liquide. Les gammes d'HEs, ATBs et HEs/ATBs ont été réalisées en microplaque de 96 puits à fond en U. Tous les essais sont effectués avec du bouillon Mueller Hinton (MH) additionné de tween 80 (0.5%). Les souches testées issues de culture fraîche (10^6 UFC/mL), ont été inoculées dans du bouillon MH pour obtenir une charge finale de 5×10^5 UFC/ml. Les solutions d'ATB et de HEs sont bien homogénéisées avant utilisation, soit 2 mn au minimum pour les huiles essentielles.

Les antibiotiques testés seuls sont fonction d'espèces :

- ✓ L'amikacine et la ciprofloxacine sont testés contre la souche d'*A.baumannii* (3310) et la souche de contrôle *E.coli* ATCC 25922 ;
- ✓ L'oxacilline, la céfoxitine et la vancomycine sont testés contre la souche de *S.aureus* (S19) et la souche de contrôle *S.aureus* ATCC 25923 ;

Les antibiotiques utilisés en association avec les huiles sont également fonction d'espèces :

- ✓ L'association de l'amikacine/huile d'*O. glandulosum* Desf. pour la souche d'*A.baumannii* (3310) ;
- ✓ L'association céfoxitine/huile de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. est testée pour la souche de *S.aureus* (S19) ;

Les CMI sont déterminées comme suit :

- Pour les HEs (A) et les ATBs (B) seuls : la gamme testée est de 300µL/mL à 0,3µL/mL et 300µg/ml à 0,3µg/ml respectivement ;
- Pour les associations HEs/ATB (A /B) : la gamme testée pour les HEs est de CMI×8 à CMI/32 des HEs seuls, quant aux ATBs la gamme est celle de CMI×2 à CMI/128.

En milieu liquide, la croissance bactérienne se visualise par formation d'un trouble ou d'un culot bactérien. Après 24 h d'incubation à 37° C, la CMI correspond à la concentration en HEs, ATB ou HEs/ATB du premier puits ne présentant ni trouble ni culot bactérien. Pour chaque souche, les tests sont effectués en double.

L'analyse de la combinaison de ces substances est obtenue par le calcul de l'indice de FIC (FICI), déterminé comme suit :

$$\text{FIC} = \frac{\text{CMI A lors de la combinaison}}{\text{CMI A seul}} + \frac{\text{CMI B lors de la combinaison}}{\text{CMI B seul}}$$

Si : $\text{FIC} \leq 0,5$: l'association est synergique.

$0,5 < \text{FIC} \leq 1$: l'association est additive.

$1 < \text{FIC} \leq 4$: donne une association indifférente.

$\text{FIC} > 4$: donne une association antagoniste (Mulyaningsih et *al.*, 2010).

2.5. Etude statistique

Le traitement statistique des résultats obtenus a été réalisé par le logiciel statistique XLSTAT pro6.0. Les résultats sont exprimés en Moyenne ± Ecart type. Les résultats sont analysés par les tests ANOVA, LSD et le test DUNNETT ($P > 0,05$):

- LSD utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne des HEs en micro-atmosphère et qui fait apparaître l'existence ou non de différences significatives entre les moyennes et évalue l'homogénéité des groupes.
- Le test DUNNETT utilisé pour traiter les résultats obtenus lors de l'étude de l'association des HEs aux antibiotiques, il est basé sur la comparaison de moyennes multiples par rapport à un témoin qui est l'huile seule.

Résultats et discussion

1. Résultat du contrôle de la stérilité des huiles

Les trois huiles essentielles sont stériles, la boîte contenant les disques chargés des huiles n'a présenté aucun contaminant après incubation à 37°C.

2. Résultat des antibiogrammes

Les résultats des antibiogrammes des souches testées et souches de contrôle sont présentés dans le tableau II (Annexe III).

3. Résultats de l'aromatogramme en micro-atmosphère

3.1. Effet des huiles essentielles sur SARM

Les trois huiles présentent des activités antibactériennes différentes, l'huile d'*O.glandulosum* Desf. s'est montrée la plus active avec des zones d'inhibition de $24,33 \pm 3,25$ mm, $25,16 \pm 3,81$ mm, $24,66 \pm 3,81$ mm et $24,58 \pm 4,30$ mm et celle de *T.numidicus* Poiret. a été la moins active avec des zones d'inhibition de $19,33 \pm 3,51$ mm, $19,58 \pm 3,79$ mm, $19,16 \pm 3,81$ mm et $18,83 \pm 3,40$ mm. Quant à l'huile de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. l'activité antibactérienne présentée est intermédiaire aux deux autres avec des zones de $22,66 \pm 1,15$ mm, $23,66 \pm 0,76$ mm, $23,33 \pm 0,57$ mm et $22,91 \pm 0,14$ mm le 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 6^{ème} jour d'incubation respectivement.

Pour chacune des huiles étudiées aucune différence significative n'est observée entre le 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 6^{ème} jour d'incubation, leur activité est donc similaire au cours du temps.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 2 et figure 3, les groupes homogènes désignés en lettres différentes désignent des groupes statistiquement distincts.

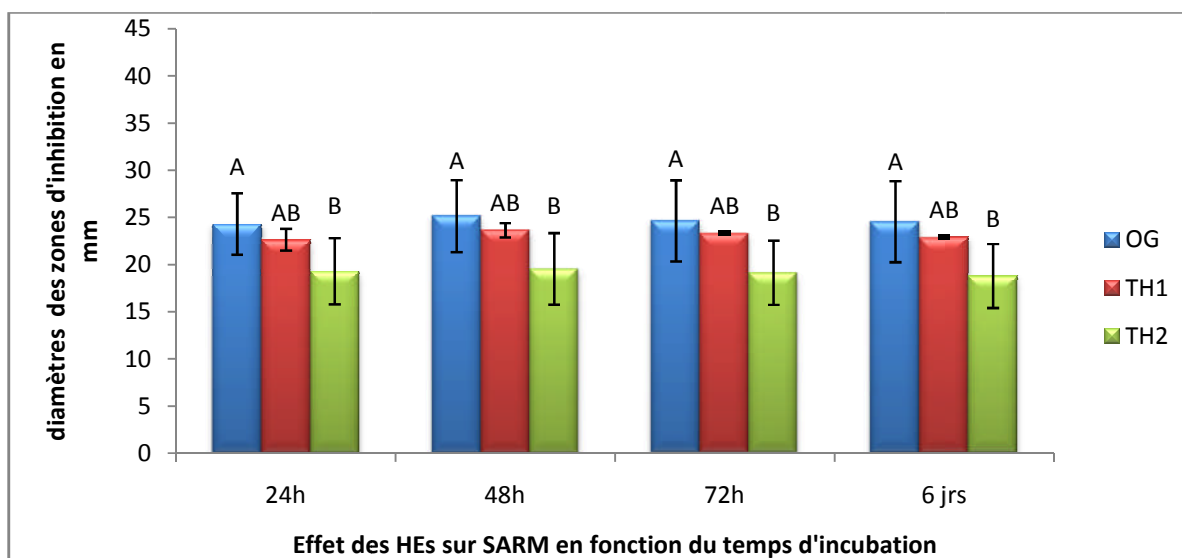


Figure 2 : Etude comparative de l'effet des HEs sur SARM en fonction du temps d'incubation



Figure 3 : Photos représentant l'effet des huiles essentielles en micro-atmosphère sur SARM

D'après les résultats obtenus, on constate que les trois huiles essentielles étudiées présentent une activité anti-staphylococcique particulièrement intéressante en micro-atmosphère.

Notre résultat diffère de celui de Dorman et Deans (2000) obtenu en micro-atmosphère. Ces auteurs trouvent une activité inférieure pour *Origanum vulgare*, avec un diamètre de zone d'inhibition de $17,60 \pm 0,5$ mm et une activité supérieure avec *Thymus vulgaris*, avec une zone d'inhibition supérieure à 90 mm ; sachant qu'ils ont utilisé 15 μ l de chaque huile essentielle. L'activité antibactérienne des autres huiles essentielles (*Myristica fragrans*, *Pelagronium graveolens*, *Piper nigrum*, *Syzygium aromaticum*) a été également étudiée et qui ce sont montrées moins actives que les nôtres, à l'exception de *Myristica fragrans* dont l'activité y est comparable. De même, Edwards-Jones et al. (2004) ont montré l'absence de l'activité des huiles de *Malaleuca alternifolia*, *Pogostemon cablin*, *Lavendula officinalis* et *Pelagronium graveolens* sur SARM en micro-atmosphère et cela en utilisant 20 μ l de chaque huile. Cependant, Boukhatem et al. (2013) montrent une bonne activité de *Pelagronium graveolens* ($33,50 \pm 7,7$ mm avec 10 μ l de l'huile) sur *S.aureus* d'origine clinique, l'activité de cette huile a aussi été évaluée en aromagramme et donne des résultats beaucoup moins importants avec un diamètre de $12,83 \pm 0,76$ mm.

D'autres études effectuées par la méthode de Vincent dont celle de Bendahou et al. (2008) portant sur l'activité d'*O.glandulosum* Desf. sur un *S.aureus* clinique fait apparaître des résultats comparables aux nôtres avec un diamètre de 23 mm.

L'huile de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. étudiée par Haddouchi et Benmansour (2008) révèle une valeur de zone d'inhibition de 31 mm sur *S.aureus* avec une concentration de 3 μ l d'huile essentielle.

Certaines huiles essentielles apparaissent plus actives par contact direct qu'en atmosphère. Un composé donné peut être inhibiteur lorsqu'il est en contact avec le micro-organisme, mais peut présenter une faible activité lorsqu'il est testé en phase vapeur à cause de sa faible volatilité (Bendjilali et *al.*, 1984).

3.2. Effet des huiles essentielles sur *A.baumannii*

Les trois huiles essentielles ont montré des activités antibactériennes intéressantes, mais bien qu'elles soient toutes actives, l'activité diffère. L'huile d'*O.glandulosum* Desf. présente l'activité la plus élevée avec des zones d'inhibition de $39,33 \pm 2,08$ mm, $38,5 \pm 1,8$ mm, $37,83 \pm 2,02$ mm et $37,16 \pm 1,75$ mm suivi de celle de *T.numidicus* Poiret. avec des zones d'inhibition de $34 \pm 3,6$ mm, 33 ± 3 mm, 33 ± 3 mm et 33 ± 3 mm et enfin celle de *T.fontanesii* Boiss. et Reut avec des zones d'inhibition de $32 \pm 3,12$ mm, $30,66 \pm 2,51$ mm, $30,66 \pm 3,32$ et $30 \pm 3,27$ mm le 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 6^{ème} jours d'incubation respectivement.

L'activité des huiles est stable tout au long des 6 jours d'incubation, il n'y a pas eu de différence significative entre les différents résultats enregistrés.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4 et figure 5, les groupes homogènes désignés en lettres différentes désignent des groupes statistiquement distincts.

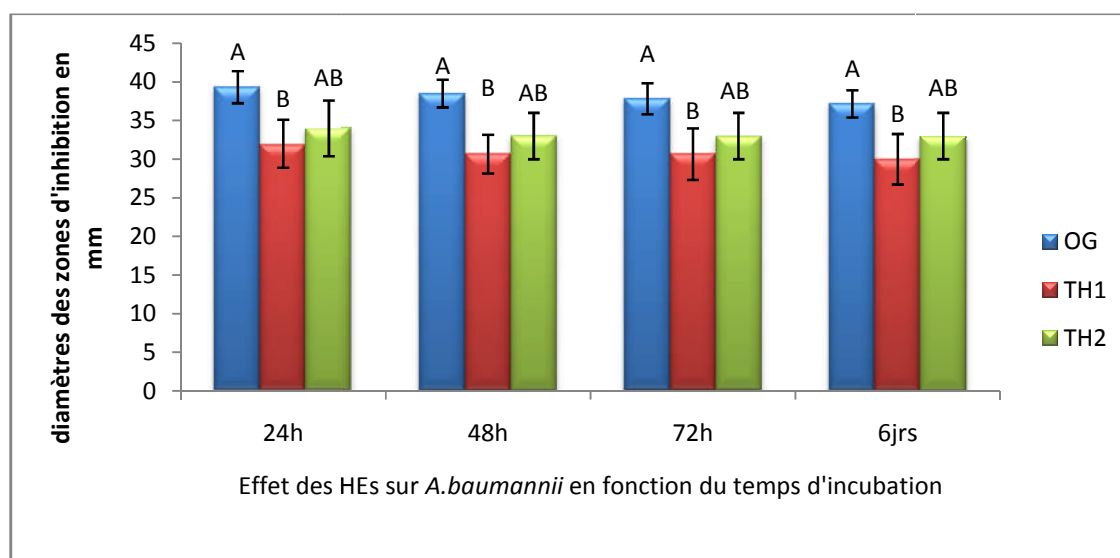


Figure 4 : Etude comparative de l'effet des HEs sur *A. baumannii* en fonction du temps d'incubation

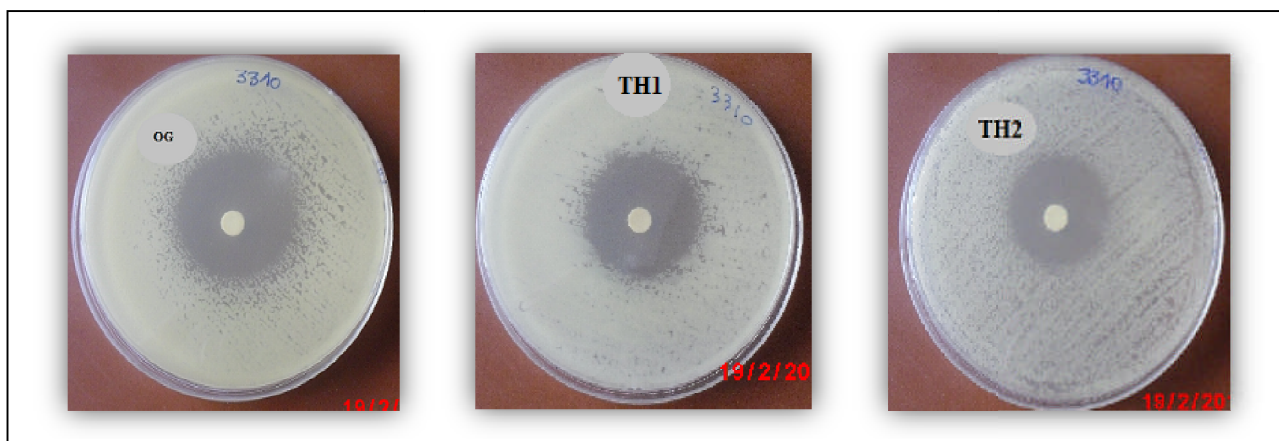


Figure 5 : Photos représentant l'effet des huiles essentielles en micro-atmosphère sur *A.baumannii*

Notre résultat montre que l'huile essentielle d'*O.glandulosum* Desf. est la plus active sur *A.baumannii* ce qui correspond aux résultats de l'étude faite par Dorman et Deans (2000) sur *O.vulgare*. Cependant, il s'avère que l'effet des huiles essentielles de *T. fontanesii* Boiss. et Reut. et *T. numidicus* Poiret. est meilleur que celui obtenu avec l'espèce de *T. vulgaris* sur *Acinetobacter calcoaceticus* (Dorman et Deans, 2000).

L'effet de l'huile essentielle d'*O.vulgare* de Turquie sur *A.baumannii* en aromagramme est significativement moins importante (18 mm de diamètre) comparé à notre résultat en micro-atmosphère sur *O.glandulosum* Desf. (Sahin et al., 2004). Cependant, l'activité de l'huile essentielle de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. sur *A.baumannii* par la méthode des disques effectuée par Haddouchi et al. (2009) révèle des zones d'inhibition assez importantes en comparaison avec notre résultat en micro-atmosphère. Cela suggère que lorsque les bactéries sont exposées aux vapeurs des huiles essentielles, les effets inhibiteurs sont sensiblement différents de ceux trouvés par la méthode de contact direct (Goni et al., 2009).

3.3. Comparaison de l'effet des huiles sur SARM et *A.baumannii*

Les trois huiles ont une activité antibactérienne plus importante sur la bactérie Gram négatif que sur la bactérie Gram positif et cette activité est constante pendant les 6 jours d'incubation. Elle montre également que l'huile essentielle d'*O.glandulosum* Desf. est significativement plus active que les huiles de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. et *T.numidicus* Poiret. et cela sur les deux souches (Figure 6), les groupes homogènes désignés en lettres

différentes représentent des groupes statistiquement distincts.

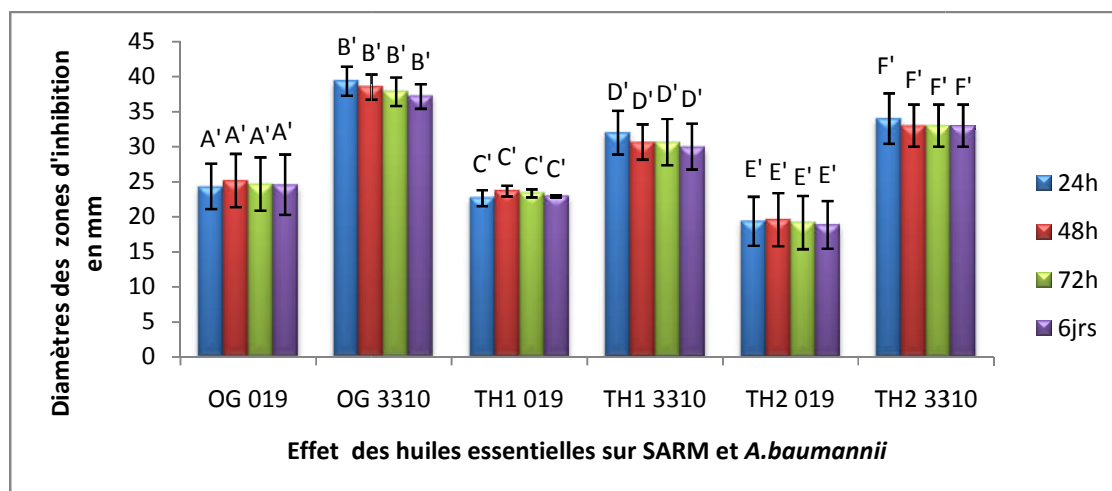


Figure 6: Etude comparative de l'effet des HEs sur les deux souches testées

Ces résultats concordent avec ceux de Dorman et Deans (2000) pour *O.vulgare* où *S.aureus* résiste mieux à l'action de l'huile qu'*A.calcoacetica* ($17,6 \pm 0,5$ mm et $52,2 \pm 1,5$ mm respectivement). Cependant, il a été également montré que l'action de *T.vulgaris* est significativement plus importante sur *S.aureus* (DZI est supérieur à 90 mm) que sur *A.calcoacetica* ($30,7 \pm 0,5$ mm). D'après Mc Donnell et Russell (1999), chez les Gram négatif, la bicouche lipidique du LPS permet la pénétration des molécules hydrophobes dans les lipopolysaccharides et les molécules à faibles poids moléculaires hydrophyles via les porines.

Dans l'étude de l'activité antibactérienne d'*O.glandulosum* Desf. en micro-atmosphère, Bekhechi et al. (2008) rapportent une efficacité variable de l'huile sur les bactéries testées et cela indépendamment de leur appartenance au Gram (Gram négatif ou Gram positif). Cette méthode ne confirme pas également les résultats obtenus avec la méthode de contact direct en milieu gélosé. Cela est dû au fait qu'un composé volatil donné présent dans l'huile essentielle, responsable de l'inhibition d'un microorganisme par contact direct, ne réagit pas de la même manière dans la phase vapeur.

Haddouchi et al. (2009) en étudiant l'activité de l'huile essentielle de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. sur *S.aureus* et *A.baumannii* en milieu solide, trouvent que ce dernier est plus sensible vis-à-vis de cette huile. Il est communément reconnu que les bactéries Gram négatif sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram positif, mais il apparaît dans cette étude que l'huile essentielle de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. constitue une exception. Ce qui correspond à notre résultat.

L'étude de Sahin et *al.* (2004), avec la méthode des disques, rapporte aussi que l'huile d'*O.vulgare* est plus active sur *A.baumannii* que sur *S.aureus* avec des DZIs de 18mm contre 10 mm respectivement.

Selon Benouda et *al.* (1988), l'origine de l'huile essentielle ou la nature d'espèce botanique semble jouer un rôle important dans son activité antibactérienne.

Concernant l'activité antibactérienne en fonction du temps d'incubation, notre résultat ne concorde pas avec celui obtenu par Mondello et *al.* (2009) qui montrent que l'activité de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* sur des souches de *Legionella pneumophila* en micro-atmosphère, n'est pas constante. En effet, les DZIs diminuent de 90 mm pour atteindre des fois un diamètre de 15 mm au bout de 6 jrs d'incubation.

4. Effet de l'association huiles/antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme témoin sont présentés dans le tableau III (Annexe III). Dans cette partie les différentes lettres attribuées aux différents groupes statistiques homogènes désignent :

T : Huile témoin / a : Effet antagonisme avec l'huile témoin / b : Effet indifférent avec l'huile témoin / c : Effet synergique avec l'huile témoin

4.1. Effet de l'association huiles/antibiotiques sur SARM

Les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles d'*O.glandulosum* Desf., de *T. fontanesii* Boiss. et Reut. et de *T.numidicus* Poiret. contre SARM ainsi que ceux de leurs associations aux antibiotiques en fonction du temps d'incubation sont présentés dans les figures 7, 8 et 9 respectivement.

4.1.1. Effet de l'association de l'huile d'*O. glandulosum* Desf. (OG) avec les antibiotiques

Les résultats montrent que l'association de l'huile essentielle d'*O.glandulosum* Desf. avec la vancomycine ainsi qu'avec la céfoxitine n'ont aucun effet sur l'activité de l'huile pendant les 6 jours d'incubation, par contre son association avec l'oxacilline donne un effet synergique avec une augmentation des diamètres des zones d'inhibition de $24,33\pm 3,25$ mm, $25,16\pm 3,81$ mm, $24,66\pm 3,81$ mm et $24,58\pm 4,30$ mm à $33,66\pm 1,52$ mm, $34\pm 1,32$, $33\pm 1,32$ mm et $32,66\pm 1,52$ mm le 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 6^{ème} jours d'incubation respectivement (Figure 7).

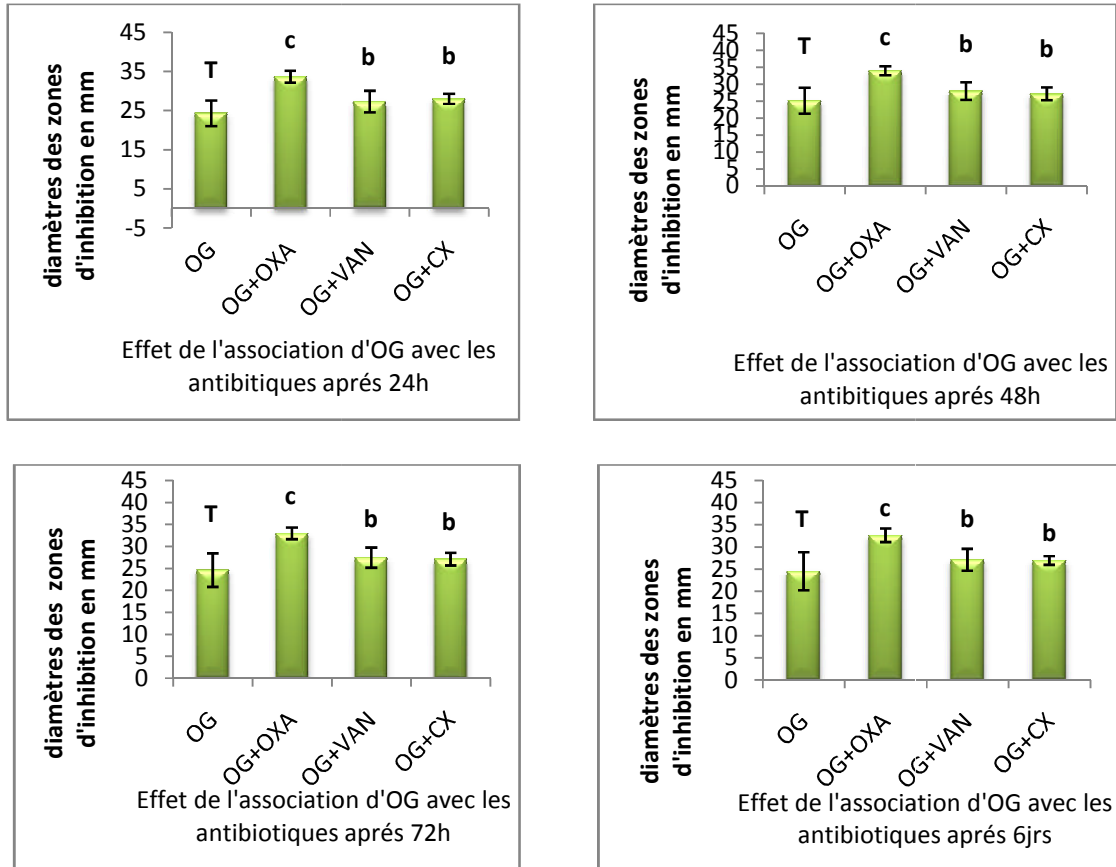


Figure 7: Effet de l'association de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* Desf. (OG) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur SARM

4.1.2. Effet de l'association de l'huile de *T. fontanesii* Boiss. et Reut. (TH1) avec les antibiotiques

L'association de l'huile essentielle de *T. fontanesii* Boiss. et Reut. avec la céfoxitine donne un effet synergique, cette synergie est conservée tout au long du temps d'incubation, il en résulte une augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de l'huile seule de 22,66±1,15mm, 23,66±0,76mm, 23,33±0,57mm et 22,91±0,14mm à 28,58±0,38mm,

29,33±0,76mm, 28,66±1,04mm et 28,33±0,76 mm en association avec l'antibiotique, le 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, et 6^{ème} jour d'incubation respectivement.

Les associations avec l'oxacilline et la vancomycine n'ont aucun effet sur l'activité de l'huile essentielle de *T. fontanesii* Boiss. et Reut. (Figure 8).

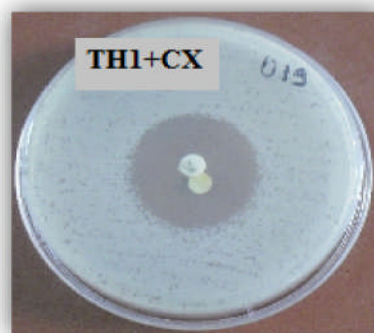
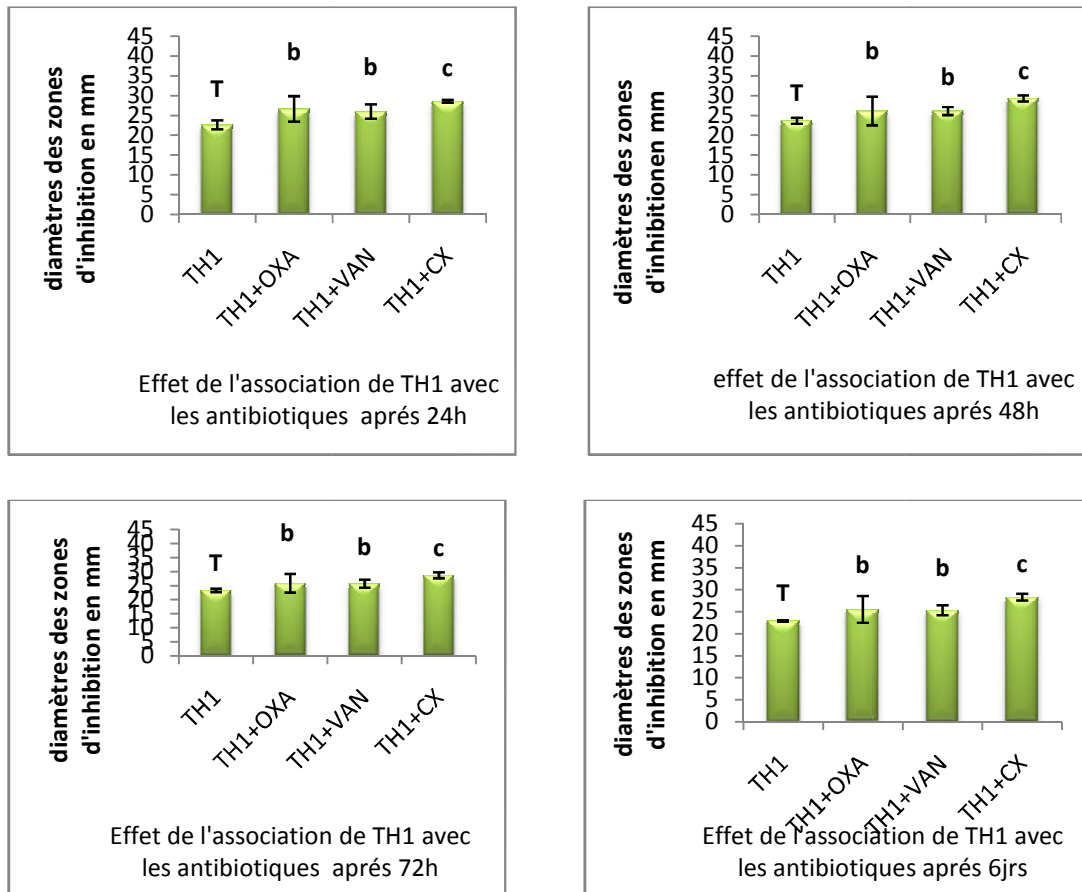


Figure 8 : Effet de l'association de l'huile essentielle de *T. fontanesii* Boiss. et Reut. (TH1) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur SARM.

4.1.3 Effet de l'association de l'huile de *T. numidicus* Poiret. (TH2) avec les antibiotiques

Selon les résultats obtenus, l'huile essentielle de *T.numidicus* Poiret. donne un effet synergique avec les trois antibiotiques testés, avec une augmentation des zones d'inhibition de 19,33±3,51mm, 19,58±3,79mm, 19,16±3,81mm et 18,83±3,40mm de l'huile seule à 28±1,73mm, 28±1,73mm, 27,33±0,57mm et 27,33±0,57 en association avec l'oxacilline, à 28,66±1,04mm, 27±1,32mm, 26,83±1,04mm et 26,66±1,25mm en association avec la céfoxitine et à 26,16±1,75mm, 26±1,80mm, 26±1,80mm et 25,83±1,75mm en association avec la vancomycine (Figure 9).

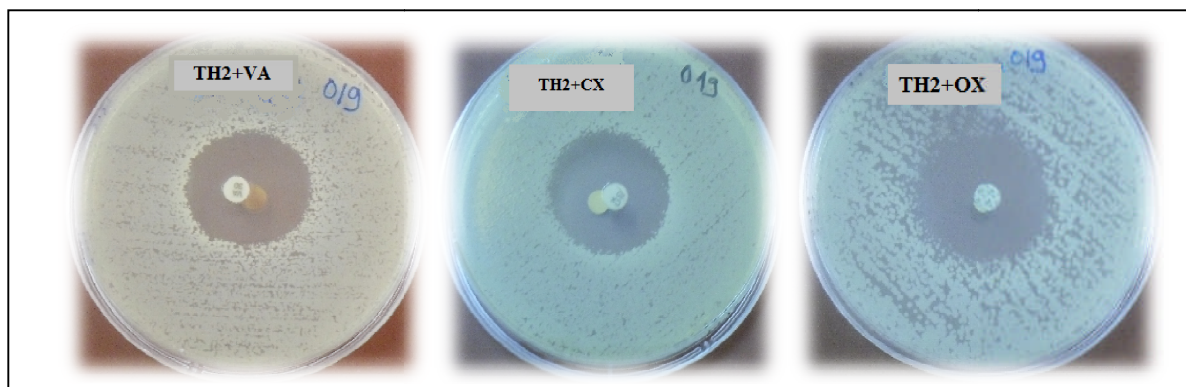
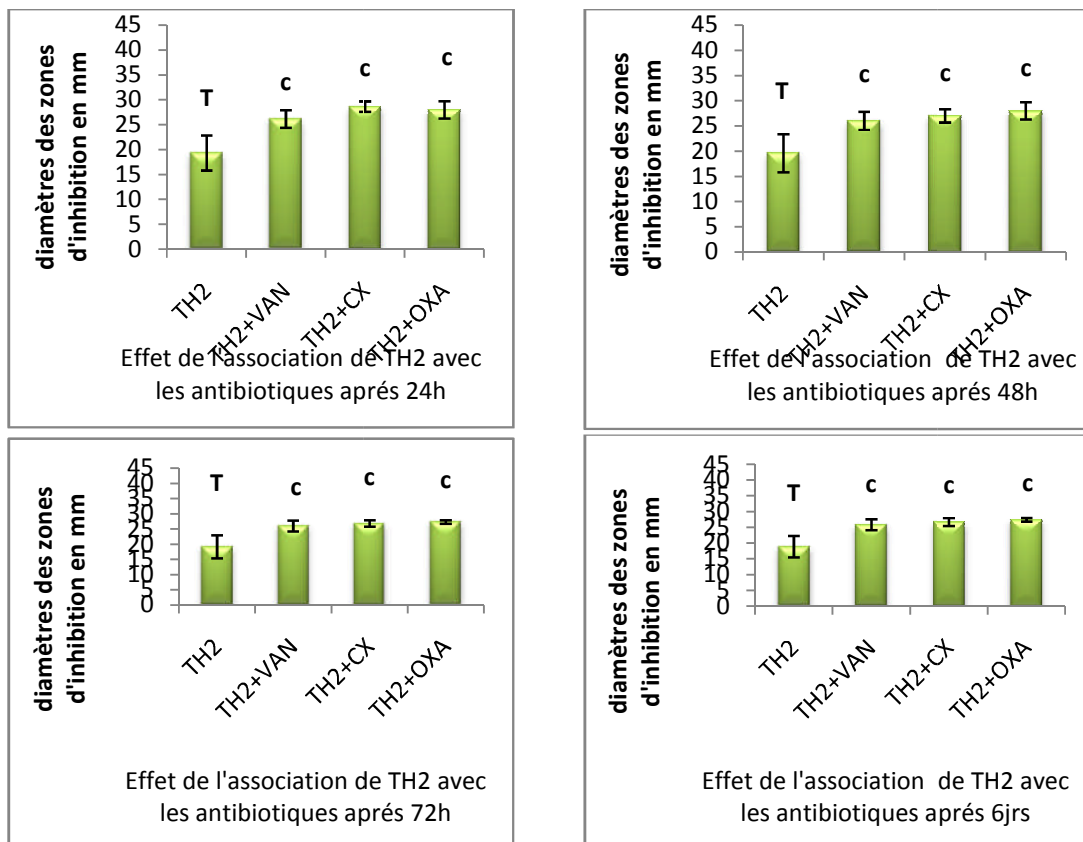


Figure 9: Effet de l'association de l'huile essentielle de *T.numidicus* Poiret. (TH2) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur SARM

Notre résultat démontre deux types d'interaction : indifférence et synergie.

Betoni et *al.* (2006) ont rapportés 54 associations synergiques sur un total de 104 associations en testant l'association de plusieurs huiles et antibiotiques dont l'oxacilline, la céfoxitine et la vancomycine sur *S. aureus* en utilisant la méthode des disques.

Sousa et *al.* (2012) ont trouvé une synergie entre l'amikacine et l'huile essentielle de *Lantana camara L.* en micro-atmosphère.

Un effet synergique entre l'amoxicilline et deux huiles essentielles (*Embilica officinalis* et *Nymphae odora*) contre douze SARMs a été rapporté par Mandal et *al.* (2010).

Galluci et *al.* (2006) ont prouvé que l'association de terpènes dont le carvone avec la pénicilline donne un effet synergique.

4.2. Effet de l'association huiles/antibiotiques sur *A.baumannii*

Les zones d'inhibition des huiles essentielles d'*O.glandulosum* Desf., de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. et de *T.numidicus* Poiret. sur *A.baumannii* et celle de leurs associations aux antibiotiques en fonction du temps d'incubation sont présentés dans les figures 10, 11 et 12 respectivement.

4.2.1. Effet de l'association de l'huile d'*O. glandulosum* Desf. (OG) avec les antibiotiques

L'association de l'huile essentielle d'*O.glandulosum* Desf. avec la ceftazidime, l'azteronam, la ticarcilline-clavulanate, la tobramycine, la piperacilline et l'imipenem donne un effet indifférent à celui de l'huile seule et cela au tout au long des 6 jours d'incubation.

Une interaction antagoniste a été observée en association avec la ticarcilline et la cefepime tout au long de l'incubation, tandis que pour la ciprofloxacine cette interaction n'est observée que le 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} jours d'incubation et une indifférence se manifeste le 6^{ème} jour.

Un effet indifférent est obtenu en association avec l'acide nalidixique, exception faite le 3^{ème} jour d'incubation ou un effet antagoniste apparait, c'est également, le cas pour la cefotaxime ou cet effet est observé le 4^{ème} jour. Un effet synergique entre l'huile et l'amikacine a été montré pour le 3^{ème} et 4^{ème} jour d'incubation (Figure 10).

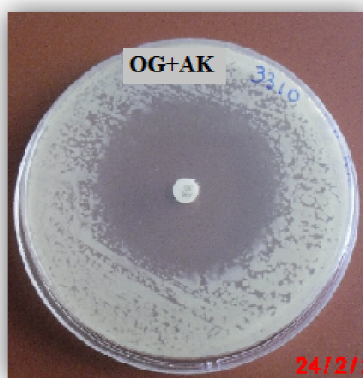
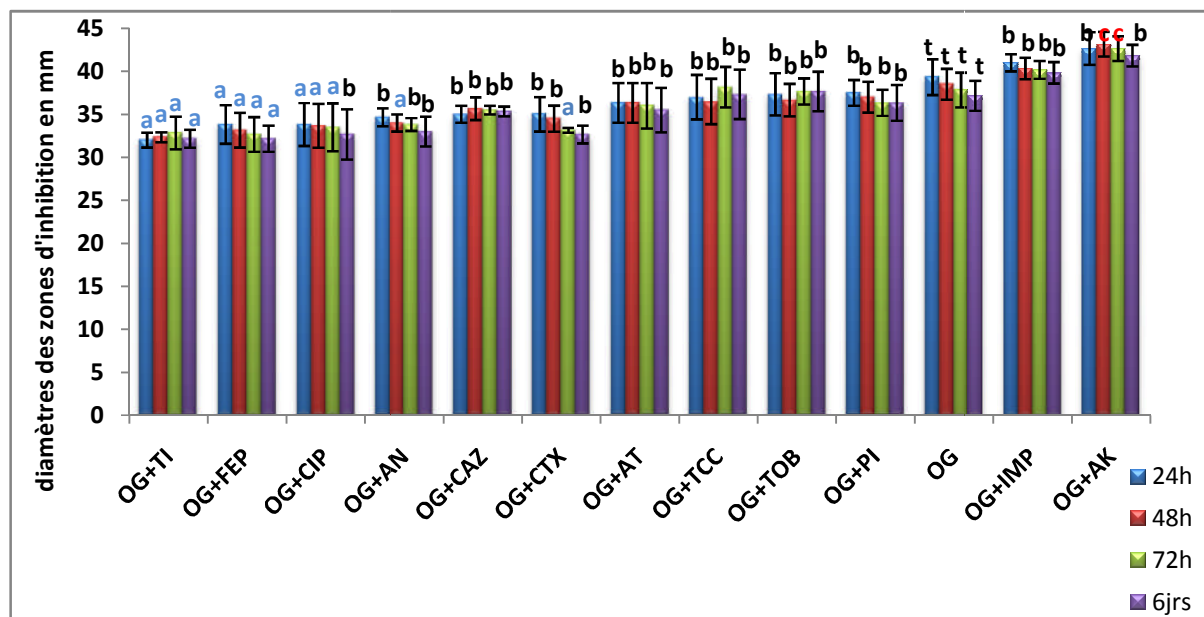


Figure 10: Effet de l'association de l'huile essentielle d' *O.glandulosum* Desf. (OG) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur *A.baumannii*.

4.2.2. Effet de l'association de l'huile de *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. (TH1) avec les antibiotiques

Tous les antibiotiques utilisés ont montré des associations indifférentes avec l'huile tout au long des 6 jours d'incubation à l'exception de la piperacilline qui montre une interaction synergique après le 3^{ème} jour, c'est également le cas pour l'amikacine qui présente un effet synergique à partir du 4^{ème} jour et la ceftazidime uniquement le 6^{ème} jour d'incubation. Aucune association antagoniste n'est observée pour cette huile.

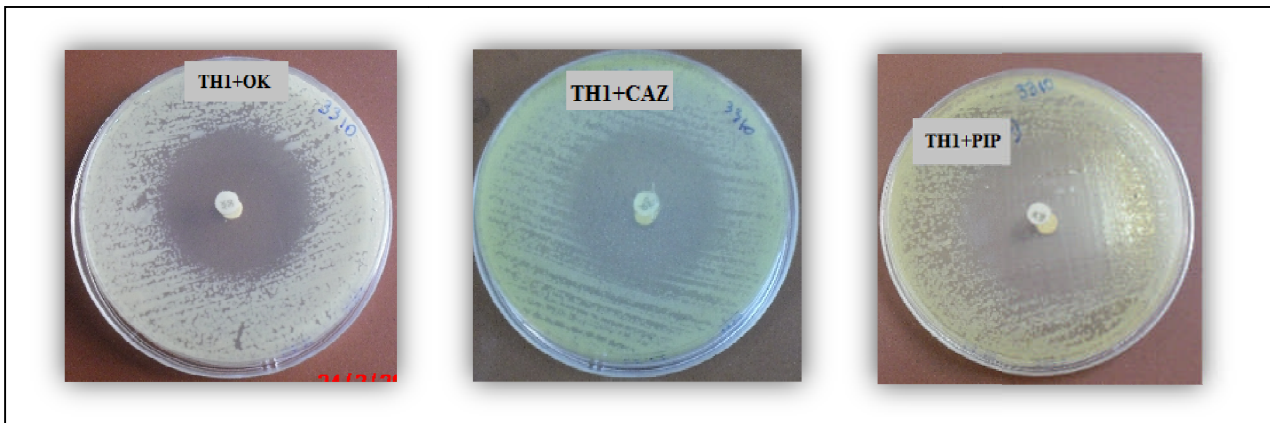
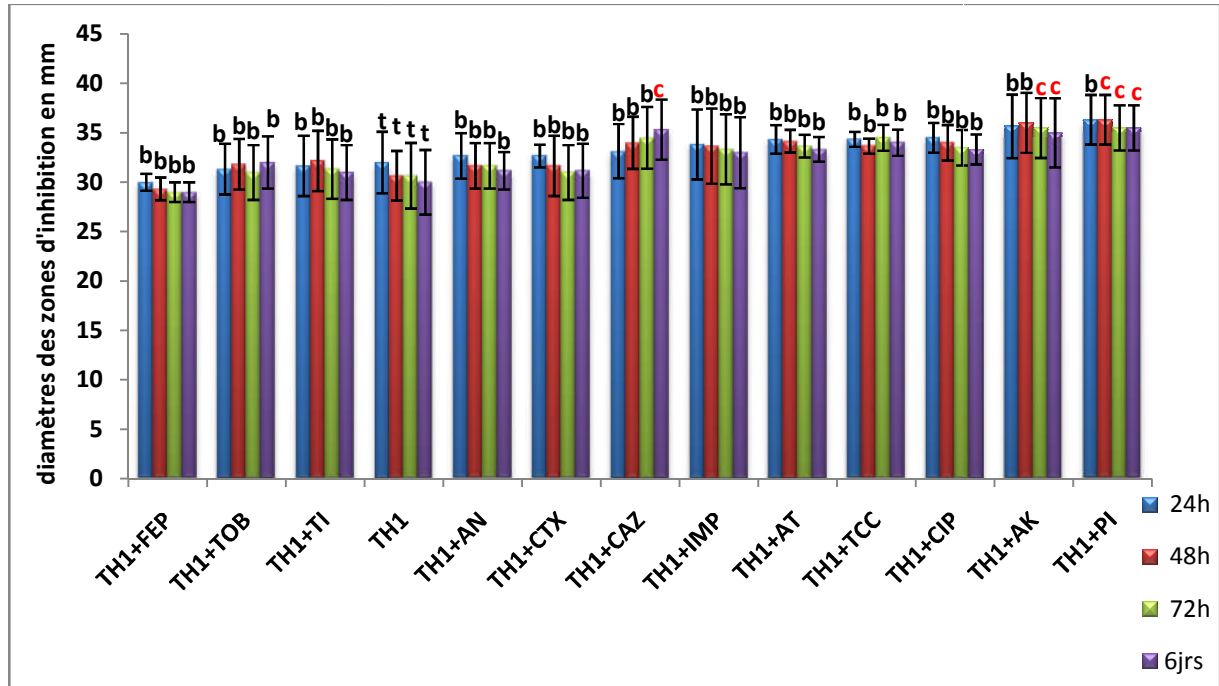


Figure 11 : Effet de l'association de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. (TH1) avec les antibiotiques en fonction du temps d'incubation sur *A.baumannii*.

4.2.3. Effet de l'association de l'huile de *Thymus numidicus* Poiret. (TH2) avec les antibiotiques

Le test statistique fait apparaitre pour les 6 jours d'incubation des associations indifférentes pour les antibiotiques suivants : la ticarcilline, la ceftazidime, la piperacilline, l'aztereonam, l'amikacine et la cefotaxime, et des associations antagonistes pour l'imipenème, la tobramycine, ticarcilline-clavulanate, la ciprofloxacine et la cefepime. Quant à l'acide nalidixique associé à l'huile, il donne une association antagoniste le 2^{ème} et 6^{ème} jour d'incubation.

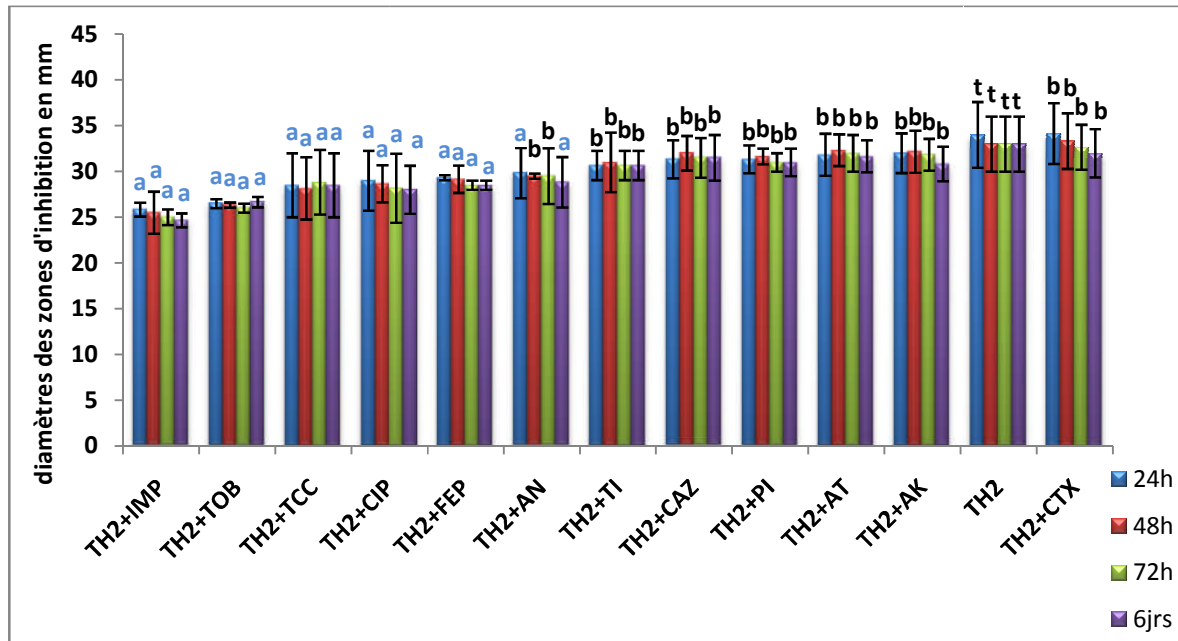


Figure 12 : Effet de l’association de l’huile essentielle de *Thymus numidicus* Poiret. (TH2) avec les antibiotiques en fonction du temps d’incubation sur *A.baumannii*.

Duarte et al. (2012) ont trouvé des synergies entre le chloramphenicol, la ciprofloxacine, la tetracycline et la gentamycine et l’huile de *Coriandrum sativum* L contre *A.baumannii*.

L’étude menée par Rosato et al. (2010) donne des associations synergiques entre les huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* et *Aniba rosaeodora* et la gentamycine sur des souches Gram négatif avec une forte synergie sur *A.baumannii*.

Une synergie entre l’amikacine ainsi que la gentamycine et l’huile essentielle de *Lantana camara* L. contre *Pseudomonas aeruginosa* en micro-atmosphère a été trouvée par Sousa et al. (2012) et qui est expliquée par la rupture des composés lipophiles de la membrane plasmique par l’action de l’huile et l’amélioration ainsi de sa perméabilité en permettant à l’antibiotique d’atteindre sa cible intracellulaire.

Fadli et al. (2012), en testant l’effet de l’association de deux huiles de Thym avec vingt sept antibiotiques sur un ensemble de bactéries Gram positif et Gram négatif, rapportent 57/80 associations synergiques. Ils montrent aussi que la synergie se manifeste plus souvent chez les Gram positif que chez les Gram négatif, ce résultat concorde avec les nôtres (5/9 associations synergiques pour SARM contre 4/36 associations synergiques pour *A.baumannii*).

5. Résultats de l'effet bactéricide ou bactériostatique des antibiotiques et des huiles essentielles

Après 24h d'incubation des bouillons, aucune croissance n'est observée ; les antibiotiques testés exercent un effet bactéricide. Cependant, l'effet de l'aztereonam sur *A.baumannii* et de l'oxacilline sur le SARM est bactériostatique après 48 h d'incubation (tableau IV, Annexe III).

L'effet des béta-lactamines sur *S.aureus* est bactéricide (Bure et *al.*, 1975), notre résultat pour l'oxacilline ne correspond pas à celui obtenu par l'auteur.

Les quinolones et l'amikacine ont un effet bactéricide sur les souches Gram négatif, mais les béta-lactamines ont un pouvoir bactéricide faible et lent (Simeon de Buochberg et *al.*, 1990), ce qui correspond à notre résultat.

Toutes les huiles essentielles exercent un effet bactéricide sur les deux souches testées (tableau V, Annexe III).

Notre résultat pour l'huile essentielle d'*O.glandulosum* Desf. correspond aux résultats de l'aromatogramme sur milieu solide, obtenus par Laouer et *al.* (2003) sur les bactéries Gram négatif avec l'huile essentielle de l'espèce *Ammoides pusilla* (Brot) riche en thymol. L'effet de cette huile est en revanche, bactériostatique sur *S.aureus* alors que notre résultat, donne un effet bactéricide sur cette espèce, cela peut s'expliquer par la différence des méthodes utilisées. Egalement, le résultat obtenu avec l'huile essentielle de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. est différent de celui trouvé par Haddouchi et Benmansour (2008) qui démontrent un effet bactéricide de l'huile sur *A.baumannii* et un effet bactériostatique sur *S.aureus*. Cependant, Cosentino et *al.* (1999) évaluent l'effet bactéricide/bactériostatique de quatre variétés de Thym sur quatorze souches bactériennes dont *S.aureus*, où ils démontrent un effet bactéricide, ce qui correspond à notre résultat pour les deux espèces de *Thymus*.

Cette différence dans les résultats pour les Gram positif peut être dû au fait que les deux résultats révèlent l'activité des molécules diffusible en milieu solide et non volatiles. Ainsi, nous pourrions estimer que l'effet bactéricide de nos huiles est lié aux molécules volatiles contenues dans les huiles.

D'une manière générale, les résultats dépendent du type de micro-organisme cible (certains sont plus résistant que d'autres) ainsi que de la composition de l'huile essentielle testée. Une huile essentielle peut être par exemple bactéricide pour certaines souches et bactériostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Pibiri, 2005).

6. Résultat de la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles et antibiotiques

Les Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles et des antibiotiques sont représentées dans le tableau VI. Les deux huiles essentielles extraites de *Thymus* donnent des CMI de 0,3 µL/mL confirmant ainsi leurs excellentes activités antibactériennes. Leur activité est similaire contre les deux espèces bactériennes Gram négatif et Gram positif.

Tableau VI : Diamètres des zones d'inhibition (mm) et Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles (µL/mL) et des antibiotiques (µg/mL).

| Souches HEs/ATBs | 3310 | | <i>E.coli</i> ATCC 25922 | | S19 | | <i>S.aureus</i> ATCC 25923 | |
|---------------------|-------|------|--------------------------|------|-------|------|----------------------------|------|
| | DZI | CMI | DZI | CMI | DZI | CMI | DZI | CMI |
| OG | 39.33 | ≤0.3 | ND | ND | 24.33 | 1.17 | ND | ND |
| TH1 | 32 | ≤0.3 | ND | ND | 22.66 | ≤0.3 | ND | ND |
| TH2 | 34 | ≤0.3 | ND | ND | 19.33 | ≤0.3 | ND | ND |
| CIP | 14 | 75 | 36 | <0.3 | ND | ND | ND | ND |
| AK | 12 | ≥300 | 20 | 4.68 | ND | ND | ND | ND |
| CX | ND | ND | ND | ND | 19.5 | ≥300 | 26 | 2.34 |
| OX | ND | ND | ND | ND | 19 | ≥300 | 26 | 0.58 |
| VAN | ND | ND | ND | ND | 17.5 | 1.17 | 20.5 | 1.17 |

ND : Non Déterminé.

L'étude faite par Kabouche et *al.* (2005) sur les huiles de *T. fontanesii* Boiss. et Reut. ainsi que *T. numidicus* Poiret. montre une activité antibactérienne moindre contre *S.aureus*. Ceci dévoile une meilleure activité des huiles essentielles de *Thymus* de la région de Béjaia comparée à celle de Constantine.

Notre résultat est supérieur à celui trouvé par Vardar-Unlu et *al.* (2012) pour *Thymus pectinatus*. Cependant, la même activité antibactérienne rapportée pour les deux souches testées (*Acinetobacter lwoffii* et *S.aureus*), ce qui concorde avec notre résultat.

L'huile essentielle d'*O. glandulosum* Desf. montre aussi une très bonne activité antibactérienne contre *A.baumannii* et *S.aureus*. Cependant cette huile est significativement plus active sur *A.baumannii* que sur *S.aureus* avec des CMI de 0,3 µL/mL et 1,17 µL/mL respectivement. Ce résultat correspond à celui obtenu par Sahin et *al.* (2004), où ils montrent que l'activité de l'huile d'*O.vulgare* sur *S.aureus* est moins importante que sur *A.baumannii*.

7. Résultat de l'étude de l'association huiles /antibiotiques par la méthode de micro-dilution en milieu liquide

* Association OG/AK sur *A.baumannii* :

Les Concentrations Minimales Inhibitrices de l'antibiotique et l'huile témoin sont :

CMI de l'AK seul = 300µg/mL , CMI d'OG seule=0,3µL/mL

Tableau VII: Concentrations de l'antibiotique (AK) et de l'huile (OG) combinés et nature de l'interaction obtenue.

| CMI de l'antibiotique combiné (µg/mL) | CMI de l'huile combiné (µL/mL) | FICI | Type de l'interaction |
|---------------------------------------|--------------------------------|-------|-----------------------|
| 600 | 1,2 | 6 | Antagoniste |
| 300 | 0,6 | 3 | Indifférente |
| 150 | 0,6 | 2,5 | Indifférente |
| 75 | 0,6 | 2,25 | Indifférente |
| 37,5 | 0,6 | 2,125 | Indifférente |
| 18,75 | 0,3 | 1,062 | Indifférente |
| 9,375 | 0,3 | 1,031 | Indifférente |
| 4,68 | 0,3 | 1,015 | Indifférente |
| 2,34 | 0,3 | 1,007 | Indifférente |

Dans l'association OG /AK, à fortes concentrations de l'antibiotique (600µg /mL) et une concentration de l'huile de 1,2µL/mL, l'association est antagoniste, cela est peut être dû à un effet toxique de l'amikacine à forte concentration ou encore à d'autres facteurs, mais à des concentrations inférieures c'est-à-dire (2,34 à 300 µg/mL) de l'antibiotique et (0,3 à 0,6µL/mL) pour l'huile, un effet indifférent s'établit.

*Association TH1/CX sur SARM

Les Concentrations Minimales Inhibitrices de l'antibiotique et l'huile témoin sont :

CMI de la CX seule = 300µg/mL , CMI de TH1 seule=0,3µL/mL

Tableau VIII : Concentrations de l'antibiotique (CX) et de l'huile (TH1) combinés et nature de l'interaction obtenue.

| CMI de l'antibiotique combiné (µg/mL) | CMI de l'huile combiné (µL/mL) | FICI | Type de l'interaction |
|---------------------------------------|--------------------------------|-------|-----------------------|
| 600 | 0,15 | 2,5 | indifferente |
| 300 | 0,15 | 1,5 | indifferente |
| 150 | 0,3 | 1,5 | indifferente |
| 75 | 0,6 | 2,25 | indifferente |
| 37,5 | 1,2 | 4,125 | antagoniste |
| 18,75 | 1,2 | 4,062 | antagoniste |
| 9,375 | 1,2 | 4,031 | antagoniste |
| 4,68 | 2,1 | 7,015 | antagoniste |
| 2,34 | 2,1 | 7,007 | antagoniste |

L'absence de synergie entre la céfoxitine et l'huile de *T. fontanesii* Boiss. et Reut. peut être le résultat d'une compétition entre elles, sachant qu'elles agissent toutes les deux sur la paroi, mais cependant nous ne pouvons pas négliger l'existence d'une co-action entre ces dernières, dans ce sens l'apparition de l'effet antagoniste lors de la dilution de l'antibiotique pourrait la confirmer. Pour les deux associations étudiées en milieu liquide, la disparition de la synergie observée en micro-atmosphère est due à la différence dans les composants présents dans l'huile interagissant en milieu vapeur et en milieu liquide, de même certains composants faiblement présents dans la phase liquide, exercent une activité très importante en phase vapeur (Bendhjalali et *al.*, 1984).

Conclusion

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles, obtenues de plantes aromatiques locales appartenant à la famille de *Lamiaceae* sur deux bactéries multi-résistantes.

L'étude de l'effet des huiles volatiles révèle un pouvoir antibactérien intéressant et stable pendant les 6 jours d'incubation. Ce pouvoir est plus important contre *Acinetobacter baumannii*, de plus l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* Desf. s'est montrée très active par rapport au *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. et *Thymus numidicus* Poiret. Les huiles essentielles des trois plantes montrent des zones d'inhibition variant de 18,33mm à 39,33mm.

Les résultats d'association en micro-atmosphère des trois huiles essentielles avec les différents antibiotiques ont donné diverses interactions ; indifférentes, antagonistes montrées seulement avec *A.baumannii* et des interactions synergiques plus souvent retrouvées chez *S.aureus*.

Pour le SARM aucune interaction antagoniste n'a été observée. L'association de l'huile essentielle de *T.numidicus* Poiret. avec les antibiotiques testés n'a donné que des interactions synergiques ; synergies entre l'huile d'*O.glandulosum* Desf. et l'oxacilline ainsi qu'entre l'huile essentielle de *T.fontanesii* Boiss. et Reut. et la cefoxitine.

Toutes ces synergies sont stables pendant les 6 jours d'incubation. Cependant une seule association synergique a été observée pour *A.baumannii* entre l'huile d'*O.glandulosum* Desf. et l'amikacine et cela uniquement pendant le 3^{ème} et 4^{ème} jours d'incubation.

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) en milieu liquide des huiles essentielles de thym sont de 0,3µL/mL pour les deux souches. Tandis que celles de l'origan varient en fonction de l'espèce ; 0,3µL/ml pour *A.baumannii* et 1,17µL/mL pour SARM.

L'étude de l'association huiles essentielles/antibiotiques par la méthode de microdilution en milieu liquide fait apparaître des résultats totalement différents de ceux de l'association en micro-atmosphère, qui ne révèlent aucune synergie.

Les activités variables observées avec les trois huiles, selon la méthode utilisée, peuvent s'expliquer par la composition de la phase liquide et volatile qui est probablement différentes ; les composés trouvés dans les deux phases ne réagissent pas de la même manière.

Notre étude a révélé un grand potentiel antibactérien de nos plantes locales, ce qui peut contribuer à l'élargissement de l'arsenal des plantes douées de propriétés antibactériennes. Par ailleurs, la confirmation de l'activité des phases volatiles de nos huiles essentielles en micro-atmosphère, peut rendre leur utilisation, dans l'assainissement de l'air notamment dans les

hôpitaux possible et ainsi limiter la dispersion des micro-organismes pathogènes. D'une autre part, nos résultats montrent que les huiles combinées avec des antibiotiques pourront être une source très efficace pour lutter contre les bactéries multi-résistantes. Toutefois, ce travail reste préliminaire et d'autres approches et études sont souhaitables afin de l'approfondir, à savoir :

- Une analyse par HPLC, CG-MS des huiles essentielles actives permettra de connaître la composition chimique et ainsi leurs principes actifs et leurs chémotypes ;
- Effectuer une étude comparative de la composition chimique et de l'effet antibactérien des huiles essentielles de différentes origines ainsi que pendant les différentes saisons ;
- Etude des activités antibactériennes de l'association huile/antibiotique pour d'autres plantes et d'autres antibiotiques ;
- Utiliser d'autres méthodes pour étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles et leur association avec les antibiotiques ;
- Vérification de la biodisponibilité et de la toxicité des associations dans des modèles *in vivo* ;
- Etude des autres activités biologiques des huiles ;
- Etablissement d'inventaires et de cartes géographiques et ce dans le but de localiser les espèces présentant un potentiel antibactérien important et de protéger les espèces endémiques rares.

Références bibliographiques

- 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**, 399-402.
- Bastien F. (2008). Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la réunion. Thèse de Doctorat en Médecine vétérinaire. Université Paul-Sabatier, Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse. 78 p.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*. **46**, 446-475.
- Bekhechi C, Atik-Bekkara F et Abdelouahid DE. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*. **6**, 153-159.
- Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini AF et Costa J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*. **106**, 132-139.
- Bendjilali B, Tantaoui-Elaraki AG, Ayadi A et Ihlal M. (1984). Method to study antimicrobial effects of essential oils: Application to the antifungal activity of six Moroccan essences. *Journal of Food Protection*. **47(10)**, 748-752.
- Benkiki N. (2006). Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricia pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de Doctorat en Chimie. Université Haj Lakhdar, Faculté des Sciences, Batna. 217 p.
- Benouda A, Bendjilali B et Hassar M. (1988). Les propriétés antiseptiques des huiles essentielles *in vitro*, testées contre des germes pathogènes hospitaliers. *Phytotherapia*. **59**, 115-119.
- Betoni JEC, Passarelli Mantovani R, Barbosa LN, Di Stasi LC et Fernandes Junior. (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Antimicrobial drugs and plants synergism*. **101(4)**, 387-390.
- Boukhatem MN, Kameli A et Saidi F. (2013). Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. *Food Control*. **34(1)**, 208-213.
- Bruneton J. (1999). Terpènes et stéroïdes In *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. (3^{ème} Eds.), Technique et Documentation, Paris. Pp. 461-769.

- Bure AM, Witghitz JL et Hornstein MD. (1975). Choix d'une antibiothérapie anti-staphylococcique bactéricide. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **5(3)**, 156-163.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food-Areview. *International Journal of Food Microbiology*. **94**, 223-253.
- 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**, 2580-2595.
- Carson CF, Mee BJ et Riley TV. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agent Chemoyherapy*. **46**, 1914-1920.
- Carson CF, Hammer KA et Riley TV. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*. **19(1)**, 50-62.
- Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C et Garrabé E. (2004). Bêtalactamines. *EMC-Maladies Infectieuses*. **1**, 129-202.
- Chambers HF. (1997). Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*. **10(4)**,781–791.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2010). Institute antimicrobial susceptibility testing standards. **30(1)**.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E et Palmas F. (1999). *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. **29**, 130–135.
- Cox SD, Mann CM, Markham J L, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR et Wyllie SG. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 170-175.
- De Billerbeck VG, Roques C, Vanière P et Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiène*. **10 (3)**, 248-251.
- Degryse AC, Delpa I et Voinier MA. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier Santé Environnement. Ingénieur du Génie Sanitaire, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique*. 106 p.

- Delaquis PJ, Ward SM, Holley RA, Cliff MC et Mazza G. (1999). Microbiological, Chemical and Sensory Properties of Pre-cooked Roast Beef Preserved with Horseradish Essential Oil. *Journal of Food Science*. **64(3)**, 519-524.
- Derwich E, Benziane Z et Boukir A. (2010). Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal Of Agriculture and Biology*. **12(2)**, 199-204.
- Dorman HJD et Deans SG. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 308-316.
- Duarte A, Ferreira S, Silva F et Domingues FC. (2012). Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*. **19**, 236-238.
- Edwards-Jones V, Buck R, Shawcross SG, Dawson MM et Dunn K. (2004). The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns*. **30**, 772-777.
- El Kalamouni C. (2010). Caractérisation chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat de Sciences des Agroressources. L'institut National Polytechnique, Toulouse. 263 p.
- Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pagès JM 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.
- Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygadlo J et Demo M. (2006). Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Molecular Medicinal Chemistry*. **10**, 30-32.
- Gausson H, Leroy JF et Ozenda P. (1982). Précis de botanique : Végétaux supérieurs. Edition : Masson, Paris. 579p.
- Ghannadi A, Sajjadi SB, Kabouche A et Kabouche Z. (2004). *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. **59**, 187-189.
- Girard G. (2010). Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaires d'hier à aujourd'hui. Mise au point d'un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour

- tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Henri Poincaré, Faculté de Pharmacie, Nancy1. 116 p.
- Goni P, Lopez P, Sanchez C, Gomez-Lus P, Becerril R et Nerin C. (2009). Antibacterial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*. **116**, 982-989.
- Gordon NC, Wareham DW. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **35**, 219–226.
- Haddouchi F et Benmansour AH. (2008). Huiles essentielles, utilisation et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les Techniques de Laboratoire*. **8**, 20-27.
- Haddouchi F, Lazouni HA, Meziane A. et Benmansour A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. *Afrique Science*. **5(2)**, 246-259.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK et Doble M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. **15**, 639-652.
- Hulin V, Mathot AG, Mafart P et Duffossé L. (1998). Antimicrobial properties of essential oils and flavour compounds. *Sciences des Aliments*. **18**, 563-582.
- Ibrahim MA, Kainulainen P, Aflatuni A, Tiilikkala K et Holopainen JK. (2001). Insecticide, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science in Finland*. **10**, 243-259.
- Inouye S, Takizawa T et Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **47**, 565-573.
- Kabouche A, Kabouche Z et Bruneau C. (2005). Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*. **20**, 235-236.
- Kabouche Z, Boutaghane N, Laggoune S, Kabouche A, Ait-Kaki Z et Benlabeled K. (2005). Comparative antibacterial activity of five *Lamiaceae* essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*. **15**, 129-133.
- Karah N, Sundsfjord A, Towner K et Samuelsen O. (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resistance Updates*. **15**, 237-247.

- Koroch AR, Juliani HR et Zygadlo JA. (2007). Bioactivity of essential oils and their components. In: Berger RG. (Ed.), *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Edition: Springer, Germany, pp. 87-115.
- Lahlou M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy research*. **18**, 435-448.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ et Nycha GJE. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. **91**, 453-462.
- Laouer H, Zerroug MM, Sahli F et Chaker AN. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. essential oil. *Journal of Essential Oil Research*. **15**, 135-138.
- Mandal S, Manda MD, Pal NK et Saha K. (2010). Synergistic anti *Staphylococcus aureus* activity of amoxicillin in combination with *Embllica officinalis et Nymphae odorata* extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **3**, 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.
- Mc Donnell G. et Russell AD. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. **12(1)**, 147-179.
- Mondello F, Girolamo A, Scaturro M et Ricci ML. (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.
- 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.
- Nour M, Mastouri M et Ben Nejma M. (2005). Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Emergence and Molecular Basis. *Pathologie Biologie*. **53**, 334-340.

- Pavlovic I, Petrovic S, Radenkovic M, Milenkovic M, Couladis M, Brankovic S, Pavlovic Drobac M, Niketic M. (2012). Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (*Apiaceae*) essential oil. *Food Chemistry*. **130**, 310-315.
- Pibiri MC. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit, Institut des infrastructures, des ressources et de l'environnement, Suisse. 177 p.
- Piichersky E, Noel JP et Dudareva N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*. **311**, 808-811.
- Quezel P et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition : Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 600 p.
- Rassoli I et Mirmostafa SA. (2003). Bacterial susceptibility to ... and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* et *Thymus persicus* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 2200-2205.
- Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire appliquée à l'environnement et la santé. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences Dhar Mehraz, Fès, Maroc. 161p.
- Rodrigues FFG, Costa JGM et Coutinho HDM. (2009). Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*. **16**, 1052-1055.
- 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.
- Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, Agar G et Ozer H. (2004). Biological activities of essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. **15**, 549-557.
- Schelz Z, Molnar J et Hohmann J. (2006). Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*. **77**, 279-285.

- Simeone De Buochberg M, Zuccareli M et Dusart G. (1990). Activité bactériostatique et bactéricide de la ciprofloxacine seule ou associée sur des souches de bacille à Gram négatif. **20(4)**, 203-209.
- Sousa EO, Almeida TS, Menezes IRA, Rodrigues FFG, Campos AR, Lima SG et Costa JGM. (2012). Chemical Composition of Essential Oil of *Lantana camara* L. (*Verbenaceae*) and Synergistic Effect of the Aminoglycosides Gentamicin and Amikacin. *Records of Natural Products*. **6(2)**, 144-150.
- Vardar-Ünlü G, Candan F, Sökmen A, Daferera D, Oolissiou M, Sökmen M, Dönmez E et Tepe B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Thymus pectinatus* Fisch. Et Mey. *Var. pectinatus* (*Lamiaceae*). *Journal of Agriculture Food Chemistry*. **51**, 63-67.
- Zouari N, Fakhfakh N, Zouari S, Bougatef A, Karray A, Neffati M et Ayadi MA. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (*Lamiaceae*). *Food and Bioproducts Processing*. **89**, 257-265.
- Zouari S, Zouari N, Fakhfakh N, Bougatef A, Ayadi MA et Neffati M. (2010). Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso. *Journal of Medicinal Plants Research*. **4(10)**, 871-880.

Annexes

Monographie des plantes

❖ *Origanum glandulosum* Desf.

✓ Classification botanique

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédonae

Sous classe : Astéridae

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Origanum*

Espèce : *Origanum glandulosum* Desf.

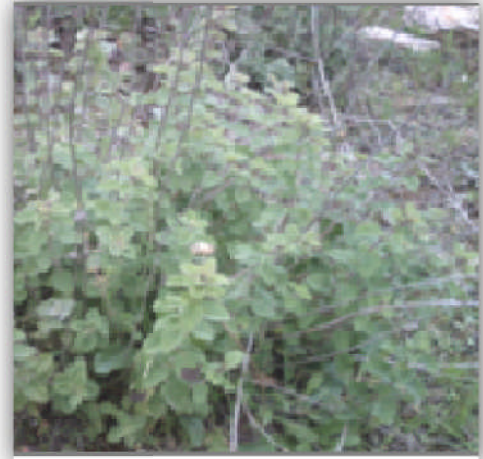


Photo d'*Origanum glandulosum*
Desf.

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

✓ Description de la plante

Origanum glandulosum Desf. synonyme *Origanum vulgare* ssp *glandulosum*, est une plante spontanée endémique se développant en Afrique du Nord (l'Algérie et la Tunisie) (Bendahou et *al.*, 2008).

C'est une plante à tiges toutes dressées, l'inflorescence est en épis dense, à fleur restant contiguës après la floraison. La corolle a une lèvre inférieure plus longue que la lèvre supérieure (Quezel et Santa, 1963).

✓ Habitat et aire de distribution

Broussailles, garrigues. Plante commune dans tout le Tell (Quezel et Santa, 1963).

✓ Propriétés et usage

La plante présente plusieurs propriétés dont l'action sédative, apéritive, antispasmodique, expectorante et antiseptique. L'origan est recommandé en cas de manque d'appétit, d'aérophagie de bronchite chronique, action antalgique. Les espèces d'*origanum* sont très connues comme herbe culinaire (Bendahou et *al.*, 2008).

❖ *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut.

✓ Classification botanique

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédonae

Sous classe : Astéridae

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut.



Photo de *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut.

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

✓ Description de la plante

Plante spontanée à tiges dressées robustes. Elle présente des inflorescences plus au moins interrompues vers le bas. Ces fleurs sont blanches à peine plus longue que le calice (Quezel et Santa, 1963).

✓ Habitat et aire de distribution

Commune dans les pelouses et les garrigues. On la retrouve dans le Tell (Quezel et Santa, 1963).

✓ Propriétés et usage

La plante entière est très utilisée en médecine traditionnelle comme antispasmodique, carminatif, antitussif, antiseptique. Ses huiles essentielles sont utilisées en particulier comme antiseptique (Ghannadi et *al.*, 2004 ; Haddouchi et *al.*, 2009).

❖ *Thymus numidicus* Poiret.

✓ Classification botanique

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédonae

Sous classe : Astéridae

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus numidicus* Poiret.



Photo de *Thymus numidicus* Poiret.

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

✓ Description de la plante

Thymus numidicus Poiret. est une plante endémique, buissonnante avec des tiges érigées. Ses feuilles sont en général lancéolées, feuilles florales nettement plus larges. Les fleurs sont roses et sessiles (Quezel et Santa, 1963 ; Kabouche et *al.*, 2005).

✓ Habitat et aire de distribution

Plante retrouvée au Nord de l'Algérie et de la Tunisie (Quezel et Santa, 1963; Kabouche et *al.*, 2005).

✓ Propriétés et usage

Plante possède des actions antispasmodiques, expectorantes et antiseptiques ainsi que des propriétés vermifuges. Très utilisée en cas de toux ou d'irritation de la gorge (Kabouche et *al.*, 2005).

Tableau I : Caractéristiques et origines des souches testées

| Souches | Origine | Année d'isolement | Type de prélèvement | Caractéristiques de souches |
|---|--|--------------------------|----------------------------|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (S19) (Gram positif) | Souche communautaire | 2010 | Pus | Exprime les gènes <i>mecA</i> et <i>pvl</i> . Résistante à la méticilline. |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (3310) (Gram négatif) | Souche hospitalière (Hôpital de Tizi Ouzou) | 2010 | Cathéter | Exprime le gène <i>oxa-23</i> . Résistante à l'imipénème et à la céfoxitine. |

Tableau II : Résultats (mm) de l'antibiogramme de vérification de 10^8 UFC/mL et lecture interprétative (CLSI, 2010)

| ATBs | SARM (S19) | <i>S.aureus</i> ATCC 25923 | <i>A.baumannii</i> 3310 | <i>E.coli</i> ATCC 25922 |
|------------|------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| OX | 19 (S) | 26 (S) | - | - |
| CX | 19.5 (R) | 26 (S) | - | - |
| VA | 17.5 | 20.5 | - | - |
| TI | - | - | 6 (R) | 28.5 (S) |
| TCC | - | - | 6 (R) | 27 (S) |
| PI | - | - | 6 (R) | 24 (S) |
| CTX | - | - | 6 (R) | 31 (S) |
| CAZ | - | - | 6 (R) | 24 (S) |
| FEP | - | - | 6 (R) | 31 (S) |
| AT | - | - | 10 (R) | 23 (S) |
| IMP | - | - | 6 (R) | 26 (S) |
| AN | - | - | 6 (R) | 26 (S) |
| CIP | - | - | 14 (R) | 36 (S) |
| TOB | - | - | 12 (R) | 24 (S) |
| AK | - | - | 12 (R) | 20(S) |

S : sensible / R : résistant /- : non testé

Tableau III : Résultats (mm) de l'antibiogramme de 10^6 UFC/mL

| Antibiotiques | SARM S19 | <i>A.baumannii</i> 3310 |
|---------------|----------|-------------------------|
| OX | 23 | - |
| CX | 23 | - |
| VA | 21 | - |
| TI | - | 6 |
| TCC | - | 6 |
| PI | - | 6 |
| CTX | - | 7 |
| CAZ | - | 7 |
| FEP | - | 8.5 |
| AT | - | 14 |
| IMP | - | 6 |
| AN | - | 6 |
| CIP | - | 16 |
| TOB | - | 13.5 |
| AK | - | 15.5 |

- : Non testé

Tableau IV : Effet bactéricide ou bactériostatique des antibiotiques sur les souches

| Souches | Antibiotique | Après 24h | Après 48h |
|-------------|--------------|-----------|-----------|
| S19 | OX | - | + |
| | CX | - | - |
| | VAN | - | - |
| 3310 | AT | - | + |
| | CIP | - | - |
| | TOB | - | - |
| | AK | - | - |

+ : bactériostatique / - : bactéricide

Tableau V : Effet bactéricide ou bactériostatique des huiles sur les souches

| Souches | Temps d'incubation | OG | | | | TH1 | | | | TH2 | | | |
|-------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 24h | 48h | 72h | 6jr | 24h | 48h | 72h | 6jr | 24h | 48h | 72h | 6jr |
| S19 | Après 24h | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Après 48h | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3310 | Après 24h | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Après 48h | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : bactéricide

Tableau IX : Marque, dosage, diamètre critique et lecture interprétative des antibiotiques utilisés (CLSI, 2010)

| Bactérie | Antibiotique | Famille | Abréviation | Marque | Dosage | Diamètres critiques (mm) | | Concentrations critiques (µg/µL) | |
|--|--------------------------|---|-------------|---------|----------|--------------------------|-----|----------------------------------|--------|
| | | | | | | S | R | S | R |
| <i>A.baumannii</i> | Acide nalidixique | Quinolone | AN | HIMEDIA | 30 µg | - | - | - | - |
| | Ciprofloxacine | Fluoro-quinolone | CIP | OXOID | 5 µg | ≥21 | ≤15 | ≥1 | ≤4 |
| | Amikacine | Aminoside | AK | HIMEDIA | 30 µg | ≥17 | ≤14 | ≥16 | ≤64 |
| | Tobramycine | Aminoside | TOB | HIMEDIA | 10 µg | ≥15 | ≤12 | ≥4 | ≤16 |
| | Aztréonam | Monobactame | AT | HIMEDIA | 30 µg | - | - | - | - |
| | Ticarcilline | Penicilline | TI | HIMEDIA | 75 µg | ≥20 | ≤14 | ≥16 | ≤128 |
| | Piperacilline | Penicilline | PI | HIMEDIA | 100 µg | ≥21 | ≤17 | ≥16 | ≤128 |
| | Ticarcilline-clavulanate | β – lactamine inhibiteurs de β-lactamases | TCC | HIMEDIA | 75/10 µg | ≥20 | ≤14 | ≥16/2 | ≤128/2 |
| | Cefotaxime | Cephalosporine | CTX | HIMEDIA | 30 µg | ≥23 | ≤14 | ≥8 | ≤64 |
| | Ceftazidime | Cephalosporine | CAZ | HIMEDIA | 30 µg | ≥18 | ≤14 | ≥8 | ≤32 |
| | Cefepime | Cephalosporine | FEP | OXOID | 30 µg | ≥18 | ≤14 | ≥8 | ≤32 |
| | Imipeneme | Carbapeneme | IMP | OXOID | 10 µg | ≥16 | ≤13 | ≥4 | ≤16 |
| <i>S.aureus</i> résistant à la méticilline | Céfoxitine | Céphamycine | CX | HIMEDIA | 30 µg | ≥22 | ≤21 | ≥4 | ≤8 |
| | Vancomycine | Glycopeptide | VA | HIMEDIA | 30 µg | - | - | ≥2 | ≤16 |
| | Oxacilline | Penicilline | OX | Bio-Rad | 1 µg | ≥13 | ≤10 | ≥2 | ≤4 |

(-) : Non déterminé

Composition des milieux de cultures (pour 1 litre d'eau distillée)**Mueller-Hinton (MH), HIMEDIA**

| | |
|------------------------------|------------|
| Infusion de viande de bœuf | 300,00 g/L |
| Hydrolysate acide de caséine | 17,50 g/L |
| Amidon | 1,50 g/L |
| Agar | 17,00 g/L |
| PH 7,3 ±0,1 | |

Préparation

Dissoudre 38,00 g de poudre Mueller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Autoclaver à 120°
Cependant 20 min.

Bouillon Mueller-Hinton, FLUKA

| | |
|----------------------------|-----------|
| Peptone acide caséine | 17,50 g/L |
| Infusion de viande de bœuf | 2,00 g/L |
| Amidon | 1,50 g/L |
| PH 7,4 ± 0,2 | |

Préparation

Dissoudre 21 g de milieu dans un litre d'eau distillée. Autoclaver à 120° C pendant 20 min.

Diluant (eau physiologique stérile)

| | |
|--------------------|---------|
| Chlorure de sodium | 9 g |
| Eau distillée | 1000 mL |

Préparation

Dissoudre 9 g de NaCl dans un litre d'eau distillée. Autoclaver à 120° C pendant 20 min

Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de la région de Béjaia (*Origanum glandulosum* Desf., *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. et *Thymus numidicus* Poiret.) sur deux souches multi-résistantes par la méthode en micro-atmosphère durant 6 jours d'incubation et de déterminer l'effet de leurs associations avec les antibiotiques.

En micro-atmosphère, l'huile de l'origan s'est avérée plus active que les deux huiles de thym. Les trois huiles présentent une activité plus prononcée sur *A.baumannii* que SARM et toutes les huiles présentaient une activité stable pendant les 6 jours d'incubation.

L'association huile/antibiotique a donné de différents types d'interactions (indifférentes, antagonistes et synergiques) pour les trois huiles, les interactions antagonistes n'ont été observées que pour *A.baumannii*, et les synergies concernaient plus le SARM.

Les huiles essentielles avaient un effet bactéricide sur les deux souches, avec des CMI de : 1.17 $\mu\text{L/mL}$, 0.3 $\mu\text{L/mL}$ et 0.3 $\mu\text{L/mL}$ pour *O.glandulosum* Desf., *T.fontanesii* Boiss. et Reut. et *T.numidicus* Poiret. respectivement pour le SARM, et de 0.3 $\mu\text{l/ml}$ avec les trois huiles pour *A.baumannii*.

L'association huile/antibiotique en milieu liquide n'a donné aucun effet synergique, cependant des associations antagonistes et indifférentes ont été montrées.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, huiles essentielles, micro-atmosphère, synergie, antibiotiques, *Lamiaceae*.

Abstract

The aim of this study is to evaluate the antibacterial activity of essential oils of three aromatic plants from Bejaia region (*Origanum glandulosum* Desf., *Thymus fontanesii* Boiss. and Reut. and *Thymus numidicus* Poiret.) against two multidrug-resistant strains on volatile phase during 6 days of incubation and to determining the effect of their association with antibiotics.

Oregano oil was more active than the two oils of thyme. The three oils have a more pronounced activity against *A.baumannii* as MRSA. Essential oils have a stable activity during the 6 days of incubation.

Oil / antibiotic association gave different types of interactions (indifferent, antagonistic and synergistic) for the three oils, thus antagonistic interactions were observed only with *A.baumannii* and synergic effect was involved with MRSA.

Essential oils have a bactericidal effect against both strains with the following MIC: 1,17 $\mu\text{L/mL}$, 0,3 $\mu\text{L/mL}$ and 0,3 $\mu\text{L/mL}$ for *O.glandulosum* Desf. *T.fontanesii* Boiss. and Reut. *T.numidicus* Poiret. with MRSA respectively, and 0,3 $\mu\text{L/mL}$ for three oils with *A.baumannii*.

Oil / antibiotic association on micro-dilution broth yielded no synergistic; however, antagonistic and indifferent associations have been shown.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, essentials oils, micro-atmosphere, synergy; antibiotics, *Lamiaceae*.