

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Microbiologie Appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

**Thème**

**Etude de l'activité inhibitrice de biofilms de l'huile  
essentielle de l'*Origanum vulgare* seule et en association  
avec un antibiotique**

Présenté par :

**M<sup>lle</sup> HAMOUDI Souhila et M<sup>lle</sup> SAIDANI Nihad**

Soutenu le : **30 Juin 2024**

Devant le jury composé de :

M<sup>me</sup> ARKOUB W.

MCA

Présidente

M<sup>me</sup> SAIDANI K.

MCA

Promotrice

M<sup>me</sup> BELHAMICHE N.

MCB

Examinatrice

**Année universitaire 2023/2024**

## **Remerciements**

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et le tout miséricordieux, qui nous a donné la force, la santé et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Merci Dieu de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

### **A notre chère promotrice**

*Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement exceptionnel de Mme SAIDANI Karima, nous la remercions pour ses précieux conseils, son aide, ses encouragements sa constante disponibilité, sa patience, sa gentillesse et pour ses orientations scientifiques qui nous ont permis de mener à bien ce passionnant travail.*

### **Aux membres de jury**

*Nous tenons à exprimer notre gratitude, nos profonds respects et remerciements aux membres de jury : Mme ARKOUB Warda qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être présidente de jury et Mme BELHAMICHE Nabila pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos vifs remerciements pour Mme Touati Naïma et Mme Merzouk Hafida pour leur aide et leurs encouragements.*

*Finalement, Notre reconnaissance s'étend également à nos familles, nos amies, nos proches et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

**Un grand merci à tous !**

## *Dédicaces*

*À l'aide de Dieu le tout puissant, qui a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*À ma mère, pour son amour inconditionnel, ses sacrifices et ses encouragements constants. Merci de m'avoir toujours soutenue et d'avoir cru en moi, même dans les moments les plus difficiles.*

*À mon père, pour ses conseils, sa patience et sa présence rassurante. Merci de m'avoir toujours motivée.*

*À mes sœurs Karima, Kahina, Saou et Nawel, pour leur soutien moral. Merci pour votre écoute, vos conseils et vos encouragements qui m'ont aidé à surmonter les défis de ce parcours.*

*À ma belle-sœur Nadia et à mon frère Bilal, merci pour votre bienveillance et votre aide.*

*À mes neveux et nièces, merci pour vos câlins réconfortants.*

*À mes cousines, qui ont toujours été à l'écoute.*

*À mes amies Célia et Akila, pour leur amitié sincère. Merci pour les moments de partage, de rire et de réconfort qui ont rendu ce voyage plus agréable.*

*À Nihad, chère amie avant d'être binôme, pour sa collaboration, sa patience et son esprit d'équipe. Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure, pour les heures de travail partagées, les idées échangées et les défis relevés ensemble. Ton soutien et ta coopération ont été essentiels à l'accomplissement de ce travail.*

*Warda et Hanane, celles avec qui j'ai partagé les meilleurs moments au laboratoire au cours de la réalisation de ce travail. Merci pour tout ce qu'on a partagé ensemble.*



*Souhila.*

## *Dédicaces*

*Les louanges sont à Allah seigneur des mondes qui m'a comblé de grâce en me permettant d'achever en bonne santé ce modeste travail que je dédie :*

### *A la mémoire de mon cher papa*

*Papa, tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, courageux, patient et honnête. Grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Que dieu t'accueille dans son vaste paradis.*

### *A la prunelle de mes yeux*

*Ma mère, qui a souffert sans me laisser souffrir. Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien ma vie et mes études, rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être, toute cette abnégation dont tu as fait preuve afin que je devienne ce que je suis, je t'en serai éternellement reconnaissante. Puisse Dieu, le tout puissant te préserver et t'accorder la bonne santé, longue vie et bonheur.*

*Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation.*

*A mes sources de bonheur qui n'ont jamais cessé de me soutenir, mes sœurs **Djida** et **Dalila**. Je vous souhaite une longue vie pleine de joie et de bonheur.*

*A mes très chers frères, qui ont toujours été derrière moi.*

*A mes neveux et nièces que j'aime énormément !*

*A mes plus proches : **Chahrazed** et **Rahim** qui ont toujours été à l'écoute.*

*A **Racha** et **Nesrine**, merci pour tout.*

*A ma chère binôme **Souhila***

*Merci pour tout ce qu'on a partagé ensemble : les beaux ou les tristes moments, merci pour ton écoute, ta patience et ta compréhension tout au long de ce travail. Sans toi ce mémoire n'aurait pu être réalisé. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*A mes très chères copines*

***Warda** et **Hanane**, celles avec qui j'ai passé les beaux moments au laboratoire pendant la réalisation de ce travail, je vous aime !*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Nihad* 

# Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

**Introduction ..... 1**

## Synthèse bibliographique

**I. Biofilms ..... 3**

I.1. Historique ..... 3

I.2. Définition des biofilms ..... 3

I.3. Rôles des biofilms ..... 3

I.4. Compositions d'un biofilm ..... 4

I.5. Formation d'un biofilm ..... 4

I.5.1. Adhésion réversible des bactéries sur une surface ..... 5

I.5.2. Attachement irréversible des bactéries ..... 6

I.5.3. Formation de microcolonies ..... 6

I.5.4. Maturation de biofilm ..... 6

I.5.5. Dispersion des cellules du biofilm ..... 6

I.6. Résistance des biofilms aux antibiotiques ..... 7

**II. Huiles essentielles ..... 9**

II.1. Définition ..... 9

II.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles ..... 9

II.3. Composition des huiles essentielles ..... 9

II.3.1. Terpènes ..... 9

II.3.2. Terpénoïdes ..... 10

II.3.3. Phénylpropanoïdes ..... 10

II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles ..... 11

II.4.1. Hydrodistillation ..... 11

II.4.2. Distillation à la vapeur ..... 11

II.4.3. Pressage à froid ..... 11

II.4.4. Extraction par solvant ..... 11

II.4.5. Extraction assisté par micro-ondes ..... 11

II.5. Activités biologiques des huiles essentielles ..... 12

II.5.1. Activité antibactérienne .....	13
II.5.2. Activité antifongique .....	13
II.5.3. Activité antivirale .....	14
<b>Matériel et méthodes</b>	
<b>I. Matériel.....</b>	<b>15</b>
I.1. Matériel végétal.....	15
I.2. Souches bactériennes.....	16
<b>II. Méthodes .....</b>	<b>16</b>
II.1. Activité antibactérienne .....	16
II.1.1. Evaluation qualitative (Aromatogramme) .....	16
II.1.2. Evaluation quantitative (Détermination des CMI/CMB).....	17
II.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de l' <i>Origanum vulgare</i> en association avec un antibiotique .....	17
II.3. Test d'inhibition de la formation de biofilm.....	18
II.4. Etude statistique .....	19
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>I. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'<i>Origanum vulgare</i>.....</b>	<b>20</b>
I.1. Evaluation qualitative (Aromatogramme).....	20
I.2. Evaluation quantitative.....	24
<b>II. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'<i>Origanum vulgare</i> en association avec un antibiotique.....</b>	<b>28</b>
<b>III. Inhibition de la formation de biofilms .....</b>	<b>32</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>35</b>
<b>Références bibliographiques</b>	

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ATB** : Antibiotique

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BMH** : Bouillon Mueller Hinton

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DMSO** : DiMéthylSulfOxyde

**EPS** : ExoPolySaccharide

**FIC<sub>i</sub>** : Fractional inhibitory concentration index

**GN** : Gélose nutritive

**HE** : Huile Essentielle

**LSD** : Low Significant Difference

**MEP** : Méthyl-d-Erythritol-4-Phosphate

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**pH** : Potentiel Hydrogène

**QS** : Quorum Sensing

## Liste des tableaux

Tableau I : Composants de biofilm. ....	4
Tableau II : Avantages et inconvénients de quelques méthodes d'extraction des HEs. ....	12
Tableau III : Caractéristiques botaniques de l' <i>Origanum vulgare</i> . ....	15
Tableau IV : Tableau représentant les différentes souches testées. ....	16
Tableau V : Résultats de l'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'HE de l' <i>Origanum vulgare vis-à-vis</i> les souches testées. ....	21
Tableau VI : Résultats de l'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'HE de l' <i>Origanum vulgare vis-à-vis</i> les souches testées. ....	24
Tableau VII : Résultats de l'association de l'HE de l' <i>Origanum vulgare</i> et le thymol avec l'ATB amoxicilline. ....	28
Tableau VIII : Effet de la combinaison d'une HE avec une autre huile essentielle, un antibiotique ou un composant majeur. ....	30
Tableau IX : Résultats des Taux d'inhibition en % de l'HE de l' <i>Origanum vulgare vis-à-vis</i> de quatre souches cibles. ....	32

## Liste des figures

Figure 1 : Modèle de formation d'un biofilm microbien.....	5
Figure 2 : Représentation schématique de la fonction du biofilm.....	7
Figure 3 : Structure chimique de quelques composants des huiles essentielles.....	10
Figure 4 : Photographies de la plante (a) (Goetz et Ghedira, 2012) et de l'HE de l' <i>Origanum vulgare</i> (b).....	15
Figure 5 : Photographies des résultats de l'aromatogramme obtenues par l'HE de l' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis les souches testées (A : <i>B. subtilis</i> , B : <i>E. coli</i> , C : <i>K. pneumoniae</i> , D : <i>P. aeruginosa</i> , E : <i>S. aureus</i> ).....	22
Figure 6 : Photographies des résultats des concentrations minimales inhibitrices d'HE de l' <i>Origanum vulgare</i> .....	25
Figure 7 : Photographies des résultats des concentrations minimales bactéricides de l'HE de l' <i>Origanum vulgare</i> (A : Origan, B : Thymol, C : ATB).....	25
Figure 8 : Photographies de quelques microplaques des associations de l'HE de l'Origan et du thymol avec l'amoxicilline.....	29
Figure 9 : Photographies de la microplaque de biofilms, après coloration avec le cristal violet (T1 : témoin, a : <i>K. pneumoniae</i> , b : <i>P. aeruginosa</i> , c : <i>B. subtilis</i> , d : <i>S. aureus</i> ).....	33

# *Introduction*

## Introduction

Les cellules bactériennes construisent des communautés appelées biofilms, dans lesquelles des cellules individuelles et des groupes de cellules interagissent, ainsi une infrastructure globale est mise en place (Yan *et al.*, 2019), par une matrice polymère autoproduite attachée à une surface, ce qui protège les bactéries et leur permettent de survivre et de se développer dans des environnements extrêmes (Jacques *et al.*, 2010). Un biofilm est composé d'un seul ou de plusieurs microorganismes. Il possède une structure de canaux qui contrôle la libération de gaz, de nutriments et d'antimicrobiens. Il se caractérise par des changements dans l'adhésion irréversible des cellules microbiennes aux surfaces, aux substrats ou entre elles (Zhao *et al.*, 2023).

Les biofilms sont couramment présents dans l'industrie, dans les environnements naturels, à la surface des instruments hospitaliers et des tissus corporels (Hacioglu *et al.*, 2021). Ces biofilms peuvent être associés à des dispositifs médicaux ou se former indépendamment d'un corps étranger via la colonisation des tissus de l'hôte, ce qui est principalement la cause de plusieurs infections chroniques (Lagha *et al.*, 2019). Grâce aux médicaments antibactériens, de nombreuses infections peuvent être éradiquées. Cependant, les souches qui ont développé des mécanismes de résistance aux antibiotiques représentent toujours un problème important. Par conséquent, des agents antimicrobiens efficaces sont nécessaires de toute urgence pour lutter contre les microorganismes multirésistants (Kwiatkowski *et al.*, 2022). À cet égard, de nombreuses herbes et plantes ou leurs composants représentent une source prometteuse de composés biologiquement actifs dotés de propriétés antimicrobiennes (anti-biofilm) et dont les effets secondaires néfastes sur la santé humaine sont limités (Abdullah *et al.*, 2021). Parmi ces composés bioactifs on retrouve les HEs, qui se présentent comme des mélanges de plusieurs composés aromatiques (Nazzaro *et al.*, 2017). L'idée d'utiliser les huiles essentielles et leurs composants pour lutter contre les bactéries connaît un succès croissant, et les travaux sur leur mise en œuvre dans le traitement se sont considérablement accélérés au cours de la dernière décennie (Schulze *et al.*, 2021).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude dont l'objectif est d'évaluer l'effet de l'inhibition de la formation de biofilms par l'huile essentielle de l'origan (*Origanum vulgare*), une plante très répandue et très utilisée dans notre région (Bejaia, Algérie). Notre travail est subdivisé en trois parties :

Dans la première partie se trouve la synthèse bibliographique, le premier chapitre donne un aperçu général sur les biofilms et le deuxième aborde les huiles essentielles. La seconde partie est consacrée à la partie expérimentale basée sur les différentes méthodes utilisées et la mise en évidence de la capacité de l'huile essentielle, de la plante aromatique étudiée, à inhiber la formation de biofilms par quelques bactéries pathogènes utilisées comme souches cibles. En fin, la troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

*Synthèse  
bibliographique*

## I. Biofilms

### I.1. Historique

Au 17<sup>e</sup> siècle, Antonie Von Leeuwenhoek a observé pour la première fois un type de créature sur ses propres dents, une découverte considérée comme un biofilm (**Muhsin et al., 2015**). Ce sont les formes planctoniques des microorganismes, qui ont été les plus étudiées. En 1933, Arthur Henrici plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement. En 1943, Claude Zobell montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension (**Roux et Ghigo, 2006**).

Dans les années 1980, John William Costerton a popularisé le terme de « film bactérien » puis « biofilm ». Il a montré que, contrairement aux données établies, le mode de vie dominant des bactéries était sous forme de communautés complexes apparentées à un être pluricellulaire qu'il a dénommées biofilms (**Aumeran et al., 2020**).

### I.2. Définition des biofilms

Les biofilms sont des communautés microbiennes associées à une surface qui jouent un rôle à la fois bénéfique et néfaste dans la nature, en médecine et dans l'industrie (**Yan et al., 2019**). Ce complexe est encapsulé dans un réseau d'exopolysaccharides (EPSs), des protéines et de l'ADN (**Venkatesan et al., 2015**). Ce sont l'un des modes de vie les plus répandus et les plus résistants dans le monde des microorganismes. Ils déterminent les processus de cycle biogéochimique de la plupart des éléments dans l'eau, le sol, les sédiments et les environnements souterrains (**Flemming et al., 2016**). Par exemple, les plantes ne sont pas capables de fixer leur propre azote, mais certaines d'entre elles (principalement les légumineuses) fixent l'azote par l'intermédiaire de micro-organismes symbiotiques anaérobies (**Martínez-Espinosa, 2020**).

### I.3. Rôles des biofilms

Les biofilms peuvent être bénéfiques pour la santé, par exemple en tant que composants normaux des microbiomes végétaux, animaux et humains, et ils peuvent être cruciaux pour des processus industriels efficaces tels que le traitement des eaux usées. Cependant, les biofilms sont souvent à l'origine de problèmes majeurs : en médecine, les biofilms sont à l'origine d'infections chroniques, et dans l'industrie, les biofilms encrassent les surfaces des canalisations

et obstruent les dispositifs de filtration. L'éradication des biofilms nuisibles, que ce soit en médecine ou dans l'industrie, est très difficile (Yan *et al.*, 2019).

#### I.4. Compositions d'un biofilm

Les biofilms se forment à partir de diverses substances extracellulaires secrétées par les microorganismes qui les forment (tableau I) (Nazir *et al.*, 2019).

**Tableau I** : Composants de biofilm (Srinivasan *et al.*, 2021).

Composant	Pourcentage (%)
Protéines	< 1-2
Polysaccharides	1-2
ADN	< 1
ARN	< 1
Eau	97

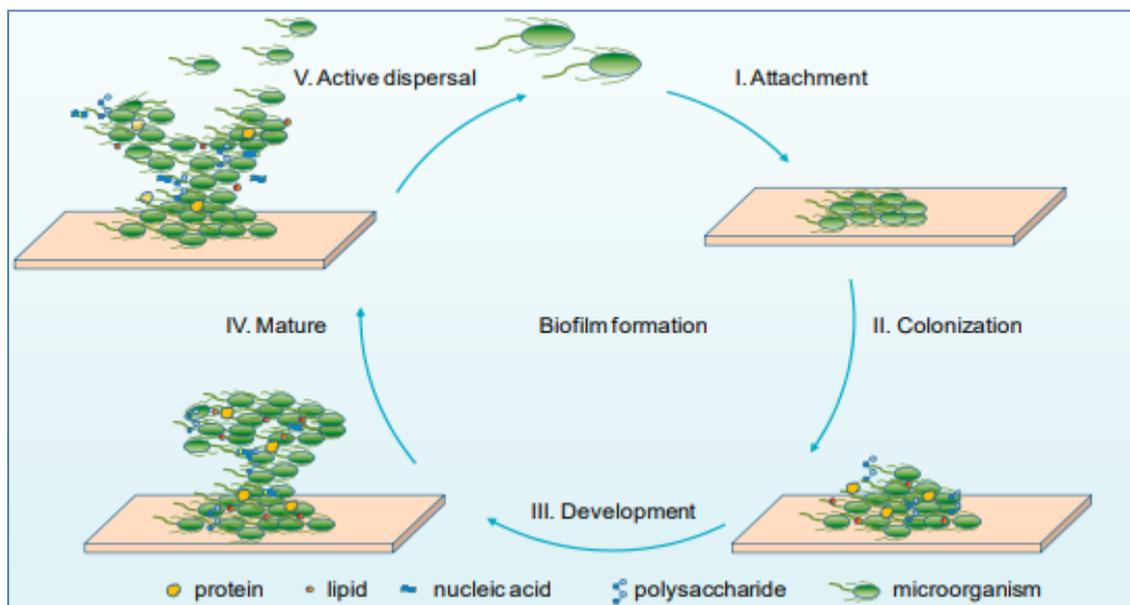
Les biofilms se composent de deux éléments majeurs les cellules microbiennes représentent moins de 10 % de la masse sèche, alors que la matrice peut en représenter plus de 90 % (Flemming *et al.*, 2010). Ils sont composés de protéines agissant comme source de carbone et d'énergie, d'ADN extracellulaire (ADNe), et des EPSs qui jouent un rôle crucial dans l'établissement global de la structure du biofilm, principalement ceux qui fournissent des sites pour les interactions de cohésion et d'adhésion (Saxena *et al.*, 2019). Ces derniers, en tant que barrière physique, ont la capacité de retenir diverses substances, et créant un gradient nutritionnel et chimique qui favorise la diffusion d'oxygène, de molécules de signalisation, d'ions inorganiques, de métabolites et d'autres substances à travers l'architecture tridimensionnelle du biofilm (Karygianni *et al.*, 2020).

#### I.5. Formation d'un biofilm

Le processus de formation d'un biofilm est défini comme étant complexe et dynamique, où les microorganismes sont enfermés dans une matrice d'EPS (Renner *et al.*, 2011). Cependant, de nombreux facteurs peuvent influencer la formation d'un biofilm, on cite : les microorganismes, la rugosité et l'hydrophobicité de la surface, les conditions environnementales telles que la disponibilité de nutriments et de l'humidité et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, etc) (Alain *et*

*al.*, 2007 ; Nazir *et al.*, 2019 ). Ce processus de formation est un cycle sans fin (figure 1), peut être classée en cinq étapes distinctes, qui comprennent :

- l'adhésion réversible des bactéries sur une surface ;
- l'attachement irréversible des bactéries ;
- La formation de micro colonies ;
- La maturation de biofilm ;
- La dispersion des cellules du biofilm (**Rasamiravaka *et al.*, 2015**).



**Figure 1** : Modèle de formation d'un biofilm microbien (**Yin *et al.*, 2019**).

### I.5.1. Adhésion réversible des bactéries sur une surface

La première étape de la formation du biofilm implique la création d'un film de conditionnement qui modifie les propriétés physicochimiques de la surface (**Amankwah *et al.*, 2021**). Cette couche est composée de matière organique ou inorganique, elle favorise la colonisation de la surface par des microorganismes, l'attachement initial des cellules bactériennes sur une surface abiotique ou biotique est réversible se fait via des liaisons d'interactions faibles telles que les forces de van der Waals (**Sadekuzzaman *et al.*, 2015**).

### **I.5.2. Attachement irréversible des bactéries**

Dans ce stade d'attachement les cellules se posent à plat contre la surface et résistent aux tentatives de délogement physique (Armbruster *et al.*, 2018). L'attachement irréversible à la surface se fait par des interactions hydrophiles/hydrophobes, sont plus fortes, telles que flagelles, fimbriae, lipopolysaccharides ou protéines adhésives (Srinivasan *et al.*, 2021).

### **I.5.3. Formation de microcolonies**

Après la fixation des microorganismes à une surface, cet attachement devient stable, un processus de multiplication et de division des cellules microbiennes commence par une signalisation chimique particulière au sein de l'EPS. Ce processus conduit alors à la formation de micro-colonies (Muhsin *et al.*, 2015).

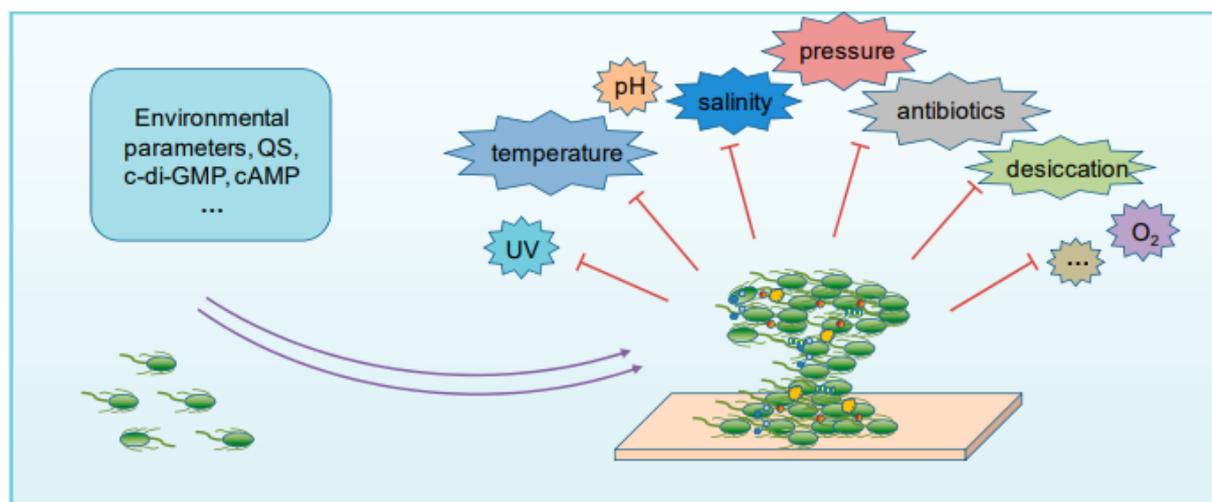
### **I.5.4. Maturation de biofilm**

Pendant cette étape, certains gènes liés à la formation du biofilm sont exprimés, ainsi les canaux hydriques se forment, pour faciliter le transport des nutriments et l'élimination des déchets au sein des communautés bactériennes du biofilm (Nazir *et al.*, 2019). Cette étape de maturation permet le développement de la structure tridimensionnelle avec mise en place d'un environnement hétérogène dans lequel les bactéries évoluent et interagissent, sous la forme de compétition ou de synergie (Aumeran *et al.*, 2020).

### **I.5.5. Dispersion des cellules du biofilm**

Au fur et à mesure que le biofilm mûrit, les ressources nutritives sont consommées en grandes quantités et les substances toxiques continuent de s'accumuler. Ainsi, pour obtenir plus de nutriments, les cellules bactériennes du biofilm se dispersent de la surface et migrent vers d'autres zones (Li *et al.*, 2023). Les bactéries se retrouvent dans leur état planctonique, et colonisant d'autres surfaces pour former un nouveau biofilm (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

La formation de biofilm est donc un processus de développement qui augmente la résistance aux stress exogènes (De la Fuente-Núñez *et al.*, 2013). Comme la résistance aux antibiotiques, aux produits chimiques désinfectants et même la résistance à la phagocytose et à d'autres éléments du système immunitaire (Høiby *et al.*, 2010). Cette résistance aux environnements extrêmes (figure 2) semble être capable de créer un habitat convenable pour les populations microbiennes, faciliter l'échange de substances et d'informations entre les micro-organismes, et constituer ainsi un mécanisme d'autoprotection pour la croissance de ces derniers (Yin *et al.*, 2019).



**Figure 2** : Représentation schématique de la fonction du biofilm (Yin *et al.*, 2019).

### I.6. Résistance des biofilms aux antibiotiques

Les microorganismes enfermés dans un biofilm tolèrent les antibiotiques à des concentrations allant de 10 à 1000 fois plus importantes que les bactéries planctoniques (Roux *et Ghigo*, 2006). Cette résistance est due à plusieurs facteurs tels que les EPSs, qui peuvent servir de barrières physiques, leur épaisseur et leur composition chimique peuvent empêcher la pénétration des antibiotiques, de plus les molécules anioniques et cationiques dans ces EPSs (les acides uroniques, les protéines, les glycoprotéines, les glycolipides, l'ADNe) peuvent se lier à des antibiotiques chargés et former un abri pour les microorganismes (Yin *et al.*, 2019). Les microorganismes présents dans le biofilm bénéficient de facteurs tels qu'une activité métabolique réduite et une croissance lente, ce qui contribue à renforcer leur résistance aux antibiotiques qui ciblent la division cellulaire. De plus, lorsque le traitement est interrompu, certaines bactéries dormantes peuvent reprendre leur prolifération cellulaire (Rather *et al.*, 2021 ; Sionov *et al.*, 2022).

Aussi, certaines bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques via des mutations aléatoires sur les gènes et d'autres portent les gènes de résistance sur des plasmides, ces plasmides peuvent être facilement transmis à d'autres cellules par transfert horizontal. La fréquence de transfert horizontal de plasmides dans les biofilms est beaucoup plus élevée qu'entre cellules planctoniques (Rabin *et al.*, 2015). Les gènes de résistances codes pour la synthèse de plusieurs molécules comme des enzymes tels que les  $\beta$ -lactamases, qui une fois secrétées par une bactérie dans la matrice peut empêcher les antibiotiques  $\beta$ -lactamines d'agir sur une cellule voisine, même si cette dernière ne produit pas l'enzyme (Sionov *et al.*, 2022).

Les antibiotiques sont actuellement la principale stratégie thérapeutique pour traiter à la fois les infections planctoniques et les infections à biofilm (**Makabenta *et al.*, 2021**). L'usage abusif de ces antibiotiques a engendré un problème de santé publique qui est la résistance des microorganismes aux antibiotiques, provoquant ainsi un problème croissant dans la pharmacothérapie (**Kowalczyk *et al.*, 2020**). L'émergence de cette résistance a poussé les chercheurs à explorer les composés naturels en tant qu'antimicrobiens alternatifs sûrs, comme les huiles essentielles, qui pourraient être des produits antimicrobiens naturels présentant un meilleur profil de sécurité (**Abdullah *et al.*, 2021 ; Mansuri *et al.*, 2022**).

## II. Huiles essentielles

### II.1. Définition

Les huiles essentielles (HEs) sont des liquides huileux naturellement aromatiques produits par les plantes. Elles peuvent être extraites de différentes parties des plantes, y compris les feuilles, les écorces, les fleurs, les bourgeons et les graines (**Sattayakhom et al., 2023**). La pharmacopée européenne définit l'huile essentielle comme : « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage » (**Pharmacopée européenne, 2016**). Ces métabolites secondaires volatils sont produits par plus de 17 500 espèces de plantes appartenant à de nombreuses familles d'angiospermes, mais seulement 300 d'entre elles sont commercialisées (**Wińska et al., 2019**).

### II.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont très sensibles à la chaleur, alors, ils se trouvent en partie à l'état de vapeur. Elles sont constituées de composés organiques volatils, généralement de faible poids moléculaire (**Dhifi et al., 2016**). Elles sont généralement de couleur jaune presque imperceptible, elles prennent une couleur plus foncée au cours de leur oxydation. Leur densité est très souvent inférieure à celle de l'eau (**Kakouri et al., 2022**).

### II.3. Composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes (**Dhifi et al., 2016**), pouvant contenir deux ou trois composants en proportions allant de 20 à 70 %. Elles sont principalement composées de terpènes et de terpénoïdes, avec plus de 300 composés différents (**Wińska et al., 2019**).

#### II.3.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures constitués de combinaisons de plusieurs unités à base de 5 carbones (C5) appelées isoprènes. Les principaux terpènes hydrocarbonés peuvent constituer plus de 80 % des HEs végétales, comme les monoterpènes (C10) et les sesquiterpènes (C15), présentant des structures acycliques mono-, bi- ou tri-cycliques (figure 3). Ces composants aromatiques possèdent diverses activités biologiques, notamment des propriétés anti-inflammatoires, antispasmodiques, antioxydants, antivirales, antidiabétiques,

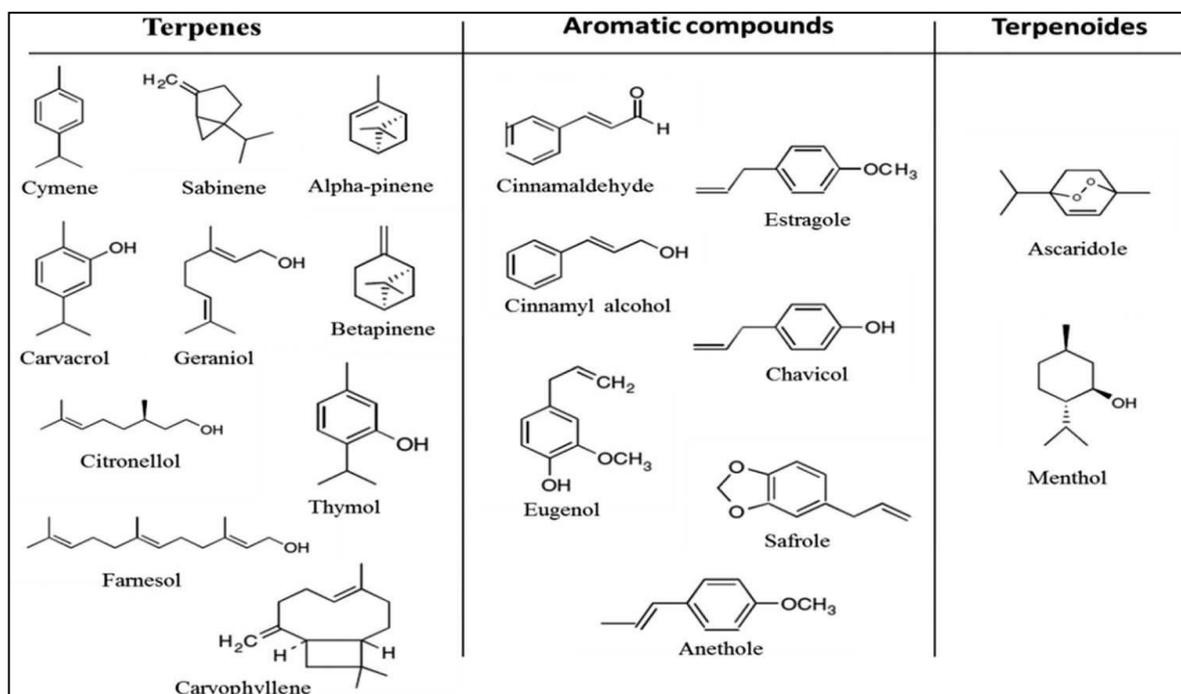
anticancéreuses et antibactériennes (Turek *et al.*, 2013 ; Reyes-Jurado *et al.*, 2019 ; Kim *et al.*, 2022 ).

### II.3.2. Terpénoïdes

Les terpénoïdes (hydrocarbures contenant de l'oxygène) sont définis comme une classe modifiée de terpènes avec différents groupes fonctionnels et des groupes méthyles oxydés déplacés ou éliminés à divers moments. Leur biosynthèse est localisée à la fois dans le cytoplasme et les plastes des cellules végétales via la voie du méthyl-d-érythritol-4-phosphate (MEP) (Masyita *et al.*, 2022).

### II.3.3. Phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes sont synthétisés par la voie de l'acide shikimique. Leur structure de base repose sur le groupe phénol aromatique à six carbones lié généralement à la queue propène à trois carbones de l'acide cinnamique, oxygénée en troisième/quatrième/cinquième position et possédant fréquemment une double liaison carbone-carbone. Parmi ces phénylpropanoïde, on cite : l'anéthole, le cinnamaldéhyde, l'eugénol, l'isoeugénol, la myristicine, le safrole et la vanilline (Dajic Stevanovic *et al.*, 2020).



**Figure 3 :** Structure chimique de quelques composants des huiles essentielles (Baptista-Silva *et al.*, 2020).

## **II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

### **II.4.1. Hydrodistillation**

C'est la méthode la plus ancienne et la plus simple pour extraire des huiles essentielles, cette méthode se caractérise par un contact direct entre le solvant et le matériel végétal, la matière première étant immergée dans de l'eau bouillante. Au cours de cette procédure, les parois cellulaires sont brisées et l'huile s'évapore avec l'eau, puis se condense en un mélange de vapeur d'eau et de composés volatils de la matière première végétale. Cependant, ces deux phases ne sont toutefois pas miscibles, ce qui rend possible une séparation supplémentaire en fonction de la différence de densité (Sousa *et al.*, 2022).

### **II.4.2. Distillation à la vapeur**

Cette méthode utilise la vapeur pour libérer les composés aromatiques des plantes et les transporter pour les refroidir avec la vapeur d'eau (Zhang *et al.*, 2012). La vapeur traverse le flacon contenant des plantes, ce qui entraîne l'évaporation de l'huile, le mélange d'eau et d'huile vaporisée qui émerge passe à travers un serpentín généralement refroidi à l'eau courante, où la vapeur est condensée. Ce mélange est recueilli et séparé par décantation (Fitriady *et al.*, 2017).

### **II.4.3. Pressage à froid**

Le principe de cette méthode consiste à briser les glandes à huile et de libérer les huiles volatiles dans un état aqueux, ensuite l'huile peut être obtenue par centrifugation, décantation ou distillation fractionnée (Dima *et al.*, 2015).

### **II.4.4. Extraction par solvant**

Cette méthode d'extraction est utilisée dans le cas des huiles avec une faible stabilité thermique et incapables de supporter des températures élevées, l'échantillon est mis en contact avec le solvant organique pendant une période qui permet le transfert du contenu soluble de l'échantillon. La matrice extraite est concentrée par évaporation du solvant présent dans la phase liquide. Cette méthode permet à l'échantillon d'être en contact permanent avec une quantité de solvant frais, il n'est pas nécessaire de procéder à une filtration, tant que les rendements sont élevés (De Castro *et al.*, 1998).

### **II.4.5. Extraction assisté par micro-ondes**

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un réacteur à micro-ondes sans solvant. L'énergie électromagnétique produite à l'intérieur du réacteur se transforme en chaleur, ce qui

entraîne l'évaporation de l'humidité présente dans les cellules de l'échantillon. Cette évaporation provoque une augmentation de la température interne des cellules, augmentant ainsi la pression interne et conduisant à la rupture des glandes, libérant ainsi l'huile essentielle (**Martínez-Abad et al., 2020**).

Les méthodes d'extraction des HEs présentent des différences notables dans le rendement et ont un impact significatif sur les composants chimiques extraits (**Zhang et al., 2022**). Le tableau II résume quelques avantages et inconvénients de quelques méthodes d'extraction.

**Tableau II** : Avantages et inconvénients de quelques méthodes d'extraction des HEs (**Cai et al., 2022** ; **Sousa et al., 2022**).

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Hydrodistillation	Opération simple, économique et respectueuse de l'environnement.	L'efficacité d'extraction est faible.
Distillation à la vapeur	Réduction du temps d'extraction, pas de contact direct avec l'eau	température élevée entraîne la dégradation de certains composants.
Pressage à froid	Le processus est simple et préserve l'arôme original de l'huile essentielle.	La pureté de l'huile essentielle est faible.
Extraction par solvant	Utilisation de températures basses afin de prévenir la détérioration des composants sensibles à la chaleur.	L'huile essentielle présente une concentration élevée en impuretés.
Extraction assisté par micro-ondes	Rapide et efficace, permettant une économie de solvant.	L'huile essentielle est facile à dégrader.

## II.5. Activités biologiques des huiles essentielles

Les HEs ont été utilisées pendant des milliers d'années dans diverses cultures pour des raisons médicinales et de santé, en particulier dans les anciennes civilisations de l'Égypte, de la Grèce, de l'Inde, de la Chine et du Moyen-Orient (**Donato et al., 2020**). De nombreuses études ont démontré le potentiel anti-pathogène des HEs des herbes et des épices (**Leyva-López et al., 2017**), elles possèdent des activités antiseptiques, antibactériennes, antivirales, antioxydants, antiparasitaires, antifongiques et insecticides significatives (**Chouhan et al., 2017**).

### II.5.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des HEs n'est pas attribuable à un mécanisme unique, mais plutôt à une cascade de réactions impliquant l'ensemble de la cellule bactérienne, ces mécanismes d'actions dépendent de la composition chimique des HEs (**Burt, 2004**).

Les composants hydrophobes présents dans les HEs agissent à la fois sur la paroi cellulaire et le cytoplasme, ils se fixent à la surface de la cellule, puis pénètrent dans la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, leur accumulation perturbe l'intégrité structurelle de la membrane cellulaire, ce qui peut avoir un effet négatif sur le métabolisme cellulaire et entraîner la mort de la cellule (**Chouhan et al., 2017**).

Les composés phénoliques, qui sont également présents dans les HEs, ont une activité antimicrobienne dont les effets dépendent de la quantité du composé présent, cependant, à faible concentration, ils peuvent interférer avec les enzymes impliquées dans la production d'énergie, et à des concentrations élevées, ils peuvent dénaturer les protéines. En général, les HEs inhibent la croissance des cellules bactériennes et la production de métabolites bactériens toxiques (**Nazzaro et al., 2013**).

### II.5.2. Activité antifongique

Pendant de nombreuses années, les chercheurs ont montré un intérêt soutenu pour les activités antifongiques des HEs, comme en témoigne les études réalisées par **Delespaul et al. (2000)** ; **Kalembe et al. (2003)** ; **Hu et al. (2019)** et **Zimmermann et al. (2023)**. Ces activités sont due aux propriétés des terpènes / terpénoïdes qui sont capables de perturber la membrane cellulaire grâce à leur nature hautement lipophile et leur faible poids moléculaire (**Nazzaro et al., 2017**), de nombreuses HEs et leurs composants volatils ont une forte activité antimicrobienne, qui inhibe la croissance de certaines bactéries mais aussi les champignons, et empêchent la production ou l'accumulation des mycotoxines. Ces HEs agissent sur la membrane interne de la mitochondrie, affectant ainsi la respiration cellulaire (**Cai et al., 2022**). Ils empêchent la polymérisation de la chitine, qui est un élément structural majeur affectant la maturation de la paroi cellulaire, la formation des septa et la formation de l'anneau de bourgeonnement, en endommageant la division cellulaire et la croissance cellulaire, de plus, ils inhibent les ATPases, induisant ainsi une acidification intracellulaire. Toutes ces modifications entraînent la mort cellulaire (**Nazzaro et al., 2017**).

### **II.5.3. Activité antivirale**

Les HEs, en raison de leur composition chimique variée, peuvent être développées en tant qu'agents antiviraux contre différentes maladies virales chez l'Homme, et pourraient remplacer les médicaments antiviraux synthétiques. Cependant, ils possèdent une forte action antivirale contre plusieurs virus, les rhinovirus et les virus de l'herpès, ils peuvent interférer avec l'enveloppement du virion en modifiant la structure de l'enveloppe du virus et/ou en masquant les protéines virales (**Ma *et al.*, 2020 ; Wani *et al.*, 2021**).

*Matériel et  
méthodes*

## I. Matériel

### I.1. Matériel végétal

Ce présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'université de Béjaia. Nous avons étudié l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'une plante locale ; il s'agit de l'*Origanum vulgare* (origan), achetée chez l'entreprise EAZY LIFE MED : Fabrication du matériel et produits pharmaceutiques de Boudjellil-Bejaia). La photographie de cette l'HE est présentée dans la figure 4. La description et la classification botanique de cette plante étudiée est présentée dans le tableau III.



**Figure 4** : Photographies de la plante (a) (Goetz et Ghedira, 2012) et de l'HE de l'*Origanum vulgare* (b).

**Tableau III** : Caractéristiques botaniques de l'*Origanum vulgare*.

Classification botanique	Description botanique
Embranchement : Magnoliophyta Classe : Magnoliopsida Ordre : Lamiales Famille : Lamiaceae Genre : <i>Origanum</i> Espèce : <i>Origanum vulgare</i> (Goetz et Ghedira, 2012).	L' <i>Origanum vulgare</i> est une plante vivace à base ligneuse et à tiges herbacées, atteignant une hauteur de 20 à 80 cm. Ses feuilles sont opposées, en forme d'œuf, de 1 à 4 cm de long et de 0,5 à 2,5 cm de large ; la marge de la feuille est lisse et la pointe varie d'arrondie à pointue. Les fleurs sont relativement petites de couleur rose à pourpre (Lombrea et al., 2020).

## I.2. Souches bactériennes

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne et inhibitrice de biofilms, de l'huile essentielle étudiée, cinq souches bactériennes formatrices de biofilms ont été testées (Tableau IV).

**Tableau IV** : Tableau représentant les différentes souches testées.

Souche	Référence
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 29522
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souche de laboratoire
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6314

## II. Méthodes

### II.1. Activité antibactérienne

Dans le but d'obtenir des cultures fraîches, les souches cibles ont été repiquées sur gélose nutritive (annexe I) puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Des colonies bien isolées de chaque culture pure sont prélevées et transférées dans 9 mL d'eau physiologique afin de préparer une suspension bactérienne de 10<sup>8</sup> (UFC/mL) qui correspond aux normes de McFarland équivalentes à une densité optique variant de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 630 nm.

#### II.1.1. Evaluation qualitative (Aromatogramme)

L'effet antibactérien de l'HE de l'origan est évalué par la réalisation des aromatogrammes selon **Sfeir *et al.* (2013)**. C'est une méthode de diffusion en milieu gélosé qui permet d'étudier la sensibilité des microorganismes à l'HE et de mesurer leur pouvoir antibactérien de manière fiable.

Après avoirensemencé, par écouvillonnage, les souches cibles, à raison de 10<sup>6</sup> UFC/mL, sur des boîtes contenant de la gélose Muller Hinton (MH) (annexe I), des disques de papier Wattman (6 mm de diamètre) sont placés à la surface de ces boîtes puis imprégnés par 10 µL de l'HE préalablement diluée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à des concentrations allant de 5 à 30 mg/mL. Les boîtes de Pétri ont été maintenues à 4 °C pendant 2 heures, pour une près-diffusion, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne a été

évaluée en mesurant, en millimètre (mm), le diamètre de la zone d'inhibition entourant le disque. Des témoins sont utilisés :

- **Témoin négatif** : des disques imprégnés de DMSO.
- **Témoins positifs** : des disques imprégnés d'antibiotique (amoxicilline) et d'un standard des HEs (thymol), aux mêmes concentrations testées.

## **II.1.2. Evaluation quantitative (Détermination des CMI/CMB)**

### **II.1.2.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration de substances bioactives capable d'inhiber toute croissance visible de la population microbienne (Chebaibi *et al.*, 2016). La CMI de l'HE étudiée est déterminée en utilisant la méthode rapporté par Fontanay *et al.* (2015). Dans cette méthode, l'HE est incorporée dans les géloses MH en surfusion à des concentrations finales allant de 25 µg/mL à 10 mg/mL. Les géloses sont ensuite coulées dans une série de boîtes, lorsque ces dernières sont prises en masse, les bactéries sont ensemencées en spot ( $10^4$  UFC/mL), puis incubées à 37 °C pendant 24 h. La CMI est déterminée visuellement par l'absence de croissance bactérienne à la surface de la boîte de Pétri.

### **II.1.2.2. Détermination des concentrations minimales bactéricides**

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration d'un agent antimicrobien nécessaire pour tuer 99,99 % d'une population microbienne (0,01 % de survivants) (Meyer *et al.*, 1994).

Des tubes de bouillon Mueller Hinton (BMH) (annexe I) sont ensemencés par des morceaux de gélose raclés là où aucune croissance n'est observée sur la boîte de Pétri (CMI). Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 h. La CMB correspond à la première concentration où aucun trouble n'est observé (Traoré *et al.*, 2012).

## **II.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* en association avec un antibiotique**

La méthode utilisée pour évaluer les différentes associations entre les huiles essentielles étudiées et l'antibiotique (amoxicilline), est la technique de microdilution en damier. Pour déterminer la nature de l'interaction entre deux substances, la concentration fractionnelle inhibitrice index (FIC<sub>i</sub>) a été déterminée. Cette dernière représente la concentration d'un composant qui inhibe la croissance bactérienne lorsqu'il est utilisé avec un autre agent, divisée

par la concentration qui a le même effet lorsque ce composant est utilisé seul (**Rosato et al. 2018**).

Des dilutions en série ont été préparés à partir de l'HE de *L'Origanum vulgare*, du thymol et de l'antibiotique (amoxicilline), et différentes combinaisons de ces extraits ont été réalisées et testées, en utilisant la solution d'agar 0,2 % comme diluant (annexe II). Chaque puits de la microplaque contient : 100 µL de BMH, 50 µL de la suspension bactérienne ( $10^6$  UFC/mL), 50 µL d'une dilution de l'HE ou d'ATB s'ils sont testés seuls, et 25 µL de chaque échantillon avec une combinaison binaire (HE plus ATB). Le volume final dans chaque puits est égal à 200 µL. Les microplaques sont mélangées par un agitateur puis incubées à 37 °C pendant 24 H (**CLSI, 2006**).

Deux témoins sont réalisés :

- **Témoins positif** : deux puits contenant 100 µL de BMH + 50 µL de la solution d'agar à 0,2 % + 50 µL de la suspension bactérienne.
- **Témoins négatif** : deux puits contenant 150 µL de BMH + 50 µL de la solution d'agar à 0,2 %.

### II.3. Test d'inhibition de la formation de biofilm

Pour évaluer la formation de biofilm des souches étudiées sur des plaques de polystyrène, une méthode semi-quantitative a été utilisée, comme décrit par **Ouali et al. (2014)**. Brièvement, 50 µL de chaque suspension bactérienne ( $10^6$  UFC/mL) et 50 µL de différentes concentrations, allant de 100 µg/mL jusqu'à 400 µg/mL, de HE testée, ont été ajoutées aux puits de microplaques stériles à 96 puits déjà remplis de 100 µL de BMH à 1 % de glucose (annexe I). Les microplaques ont été laissées pendant 15 minutes sous légère agitation avant d'être incubées à 37 °C. Après 24 heures, les cultures ont été aspirées et les cellules non adhérentes ont été éliminées par deux lavages des puits avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (annexe II). Ensuite, 200 µL d'éthanol à 96 % ont été ajoutés à chaque puits afin de fixer les cellules adhérentes. Après 15 minutes de fixation, les puits ont été égouttés, séchés et colorés avec du cristal violet à 0,1 % pendant 30 minutes. Les cellules colorées ont été lavées deux fois avec 200 µL de PBS avant d'extraire le colorant avec 200 µL d'éthanol à 96 %. Le nombre de cellules a été quantifié à l'aide d'un lecteur de microplaques en mesurant l'absorbance (A) à 630 nm (**Stepanović et al., 2000**). Deux témoins négatifs sont réalisés, à savoir :

- **Un témoin sans l'inoculum (T1)** : 100 µL BMH + 50 µL d'extrait + 50 µL de la suspension bactérienne.
- **Un témoin sans extrait (T2)** : 100 µL BMH + 50 µL de la solution d'agar à 0,2 % + 50 µL de la suspension bactérienne.

Le pourcentage d'inhibition du biofilm a été calculé comme décrit par **Merghni et al. (2022)**, selon la formule ci-dessous :

$$[(DO (T1) - DO test)/DO (T1)] \times 100.$$

#### **II.4. Etude statistique**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les données sont analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA). Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les moyennes sont déterminées par le test LSD (Low Significant Difference). Le logiciel utilisé est STATISTICA 5.5.

*Résultats*  
*et*  
*discussion*

## Résultats et discussion

### I. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare*

Pour évaluer l'activité antibactérienne de l'HE de l'*Origanum vulgare vis-à-vis* de cinq souches cibles formatrices de biofilms (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*), deux méthodes ont été utilisées. Une évaluation qualitative, repose sur la technique de diffusion sur disque, et une autre quantitative pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

#### I.1. Evaluation qualitative (Aromatogramme)

C'est une méthode qui permet d'évaluer la capacité de l'HE à inhiber la croissance bactérienne en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques. L'échelle de l'estimation de l'activité antibactérienne est donnée par **Boughendjioua (2017)**, comme suit :

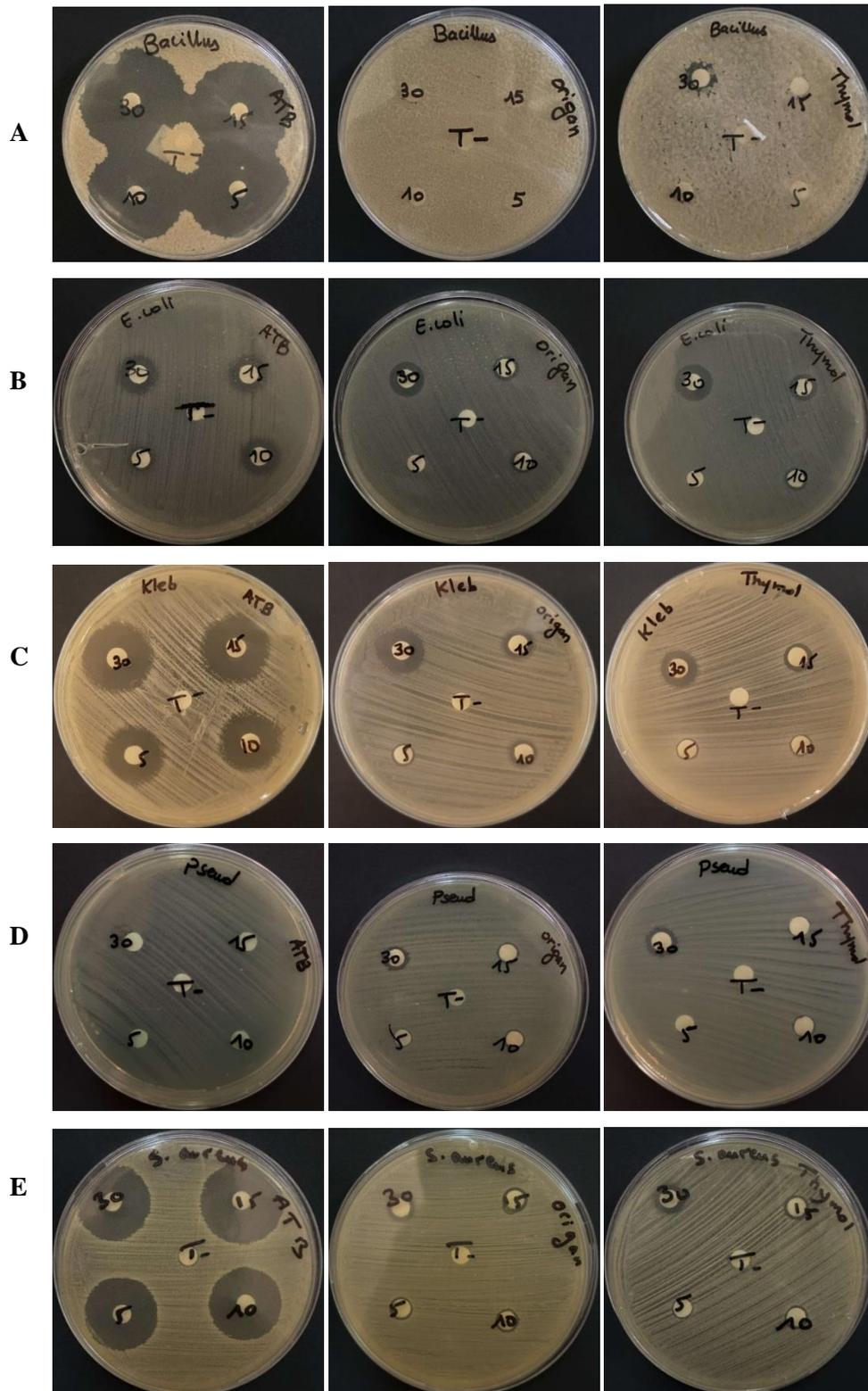
- $D < 10$  mm : HE sans action inhibitrice (résistant) ;
- $16 > D \geq 10$  mm : HE à une action inhibitrice intermédiaire ;
- $25 > D \geq 16$  mm : HE à une action inhibitrice importante (sensible) ;
- $D \geq 25$  mm : HE à une action inhibitrice très efficace (très sensible).

Les résultats de l'effet de l'HE de l'*Origanum vulgare* contre les souches bactériennes testées sont enregistrés dans le tableau V et illustrés dans la figure 5.

**Tableau V** : Résultats de l'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'HE de l'*Origanum vulgare* vis-à-vis les souches testées.

Souche	Extrait mg/disque	Zone d'inhibition (mm)			
		0,05	0,1	0,15	0,3
<i>Escherichia coli</i>	Origan	/	8 ± 0,33 <sup>b</sup>	9 ± 0,5 <sup>c</sup>	12 ± 0,33 <sup>f</sup>
	Thymol	/	9 ± 0,66 <sup>c</sup>	10 ± 0,5 <sup>d</sup>	20 ± 0,5 <sup>l</sup>
	ATB	7 ± 0,5 <sup>a</sup>	12 ± 0,33 <sup>f</sup>	13 ± 0,33 <sup>g</sup>	13 ± 0,66 <sup>g</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Origan	8 ± 0,33 <sup>b</sup>	10 ± 0,66 <sup>d</sup>	11 ± 0,66 <sup>e</sup>	15 ± 0,5 <sup>h</sup>
	Thymol	7 ± 0,33 <sup>a</sup>	8 ± 0,33 <sup>b</sup>	9 ± 0,66 <sup>c</sup>	11 ± 0,33 <sup>e</sup>
	ATB	18 ± 0,33 <sup>j</sup>	19 ± 0,33 <sup>k</sup>	22 ± 0,66 <sup>m</sup>	23 ± 0,5 <sup>n</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Origan	7 ± 0,33 <sup>a</sup>	8 ± 0,33 <sup>b</sup>	8 ± 0,33 <sup>b</sup>	9 ± 0,33 <sup>c</sup>
	Thymol	/	7 ± 0,5 <sup>a</sup>	8 ± 0,33 <sup>b</sup>	10 ± 0,66 <sup>d</sup>
	ATB	/	/	/	/
<i>Bacillus subtilis</i>	Origan	/	/	/	/
	Thymol	/	/	/	/
	ATB	35 ± 0,33 <sup>r</sup>	36 ± 0,33 <sup>s</sup>	37 ± 0,33 <sup>t</sup>	37 ± 0,33 <sup>t</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Origan	/	8 ± 0,33 <sup>b</sup>	8 ± 0,33 <sup>b</sup>	8 ± 0,33 <sup>b</sup>
	Thymol	7 ± 0,5 <sup>a</sup>	8 ± 0,66 <sup>b</sup>	8 ± 0,5 <sup>b</sup>	17 ± 0,33 <sup>i</sup>
	ATB	24 ± 0,5 <sup>o</sup>	24 ± 0,5 <sup>o</sup>	28 ± 0,5 <sup>p</sup>	30 ± 0,5 <sup>q</sup>

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ( $p < 0,05$ ).



**Figure 5 :** Photographies des résultats de l'aromatogramme obtenues par l'HE de l'*Origanum vulgare* vis-à-vis les souches testées (**A** : *B. subtilis*, **B** : *E. coli*, **C** : *K. pneumoniae*, **D** : *P. aeruginosa*, **E** : *S. aureus*).

D'après le tableau V, l'HE de l'*Origanum vulgare* et son principal composé actif, le thymol, présentent une activité antibactérienne variable selon les souches et les concentrations testées, avec une différence significative ( $p > 0,05$ ). En effet, des zones d'inhibition de 12 mm pour l'origan et de 20 mm pour le thymol ont été obtenues à l'égard d'*E. coli*, à 0,3 mg/disque. Une activité inhibitrice intermédiaire a été aussi enregistrée par **Simirgiotis et al. (2020)**, la zone d'inhibition est égale à 16 mm. **Merghni et al. (2022)**, ont rapporté une zone d'inhibition plus importante (28,66 mm) *vis-à-vis* de cette souche, à 0,015 mg/disque. Contre *K. pneumoniae*, une activité inhibitrice intermédiaire a été révélée par l'HE de l'*Origanum vulgare*, avec une zone de 15 mm à 0,3 mg/disque. Par contre, **Şahin et al. (2004)**, n'ont enregistré aucune action inhibitrice de cette l'HE à l'encontre de cette souche à la même concentration testée. Cependant, une activité inhibitrice importante a été rapportée par **Busatta et al. (2008)**, la zone d'inhibition est égale à 19,5 mm. Des zones d'inhibition de 9 mm et 10 mm à 0,3 mg/disque pour l'HE de l'*Origanum vulgare* et le thymol respectivement, ont été enregistrées contre *P. aeruginosa*, elles sont supérieures à celles obtenues par l'antibiotique où aucune zone d'inhibition n'a été révélée, montrant ainsi une résistance de cette souche à l'HE étudiée et à l'antibiotique testé.

A l'égard des bactéries Gram positives, en prenant en considération l'échelle de l'estimation de l'activité antibactérienne, l'HE de l'*Origanum vulgare* n'a montré aucune action inhibitrice *vis-à-vis* de *S. aureus* et de *B. subtilis* mais le thymol a révélé un effet inhibiteur notable contre *S. aureus* (17 mm à 0,3 mg/disque). Le même effet a été observé dans une étude réalisée par **Rathore et al. (2023)** contre *S. aureus*, par contre *vis-à-vis* de *B. subtilis*, un effet intermédiaire a été obtenu (14,33 mm). Des résultats opposés aux nôtres sont obtenus par **Merghni et al. (2022)** (27,33 mm à 0,015 mg/disque) et **Busatta et al. (2008)** (26,8 mm), enregistrant ainsi une action inhibitrice très efficace de leur l'HE de l'*Origanum vulgare* contre *S. aureus*.

## I.2. Evaluation quantitative

L'évaluation quantitative a été réalisée afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB). Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI et la figure 6 et 7.

**Tableau VI :** Résultats de l'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'HE de l'*Origanum vulgare* vis-à-vis les souches testées.

Souches	HE	CMI µg/mL	CMB µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	Origan	150 <sup>d</sup>	250 <sup>f</sup> 250 < CMB ≤ 1000
	Thymol	225 <sup>e</sup>	
	ATB	100 <sup>c</sup>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Origan	250 <sup>f</sup>	250 <sup>f</sup>
	Thymol	> 250	> 250
	ATB	≤ 150	> 250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Origan	250 <sup>f</sup>	> 250
	Thymol	1000 <sup>g</sup>	
	ATB	5000 <sup>h</sup>	
<i>Bacillus subtilis</i>	Origan	150 <sup>d</sup>	> 250
	Thymol	225 <sup>e</sup>	
	ATB	< 25 <sup>a</sup>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Origan	150 <sup>d</sup>	250 <sup>f</sup>
	Thymol	225 <sup>e</sup>	> 250
	ATB	< 25 <sup>a</sup>	25 <sup>b</sup>

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ( $p < 0,05$ ).

Origan



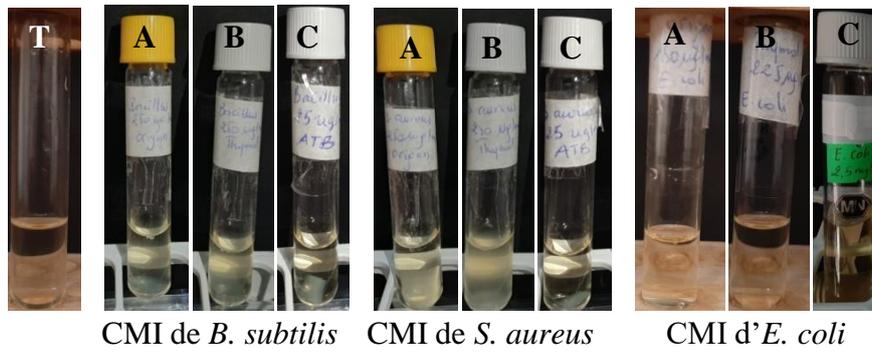
Thymol



ATB



**Figure 6 :** Photographies des résultats des concentrations minimales inhibitrices d'HE de l'*Origanum vulgare*.



**Figure 7 :** Photographies des résultats des concentrations minimales bactéricides de l'HE de l'*Origanum vulgare* (A : Origan, B : Thymol, C : ATB).

D'après le tableau VI, l'HE de l'*Origanum vulgare vis-à-vis* d'*E. coli*, a montré un effet inhibiteur bactériostatique à une concentration de 150 µg/mL, elle est inférieure à celle enregistrée par le thymol (225 µg/mL), avec une différence significative ( $p > 0,05$ ). Cependant, un effet bactéricide a été obtenu aux mêmes concentrations pour l'HE de l'*Origanum vulgare* et le thymol, avec une CMB de 250 µg/mL. Une CMI inférieure est révélée par l'ATB, elle est de 100 µg/mL. **Kosakowska et al. (2021)**, ont indiqué des valeurs supérieures aux notre, en étudiant l'activité de l'HE de l'*Origanum vulgare vis-à-vis* de deux souches d'*E. coli*, leurs CMI et CMB sont respectivement de 2 mg/mL et 4 mg/mL. L'HE de l'*Origanum vulgare*, à l'égard de *K. pneumoniae*, a présenté des CMI et CMB égales à 250 µg/mL. En revanche, des concentrations inhibitrices et bactéricides supérieures à 250 µg/mL ont été enregistrées par le thymol. **Silva et al. (2023)**, ont étudié l'effet de l'HE de l'*Origanum vulgare* contre six souches de *K. pneumoniae*, les CMI obtenues sont de 128 et 256 µg/mL, et les CMB sont supérieures à 256 µg/mL. L'HE de l'*Origanum vulgare* est aussi actif à l'encontre de *P. aeruginosa* avec une CMI de 250 µg/mL. Par contre, elle s'est révélée la plus résistante aux thymol et l'ATB. En effet, des valeurs de CMI respectivement de 1000 µg/mL et 5000 µg/mL sont obtenues. De plus, tous les extraits ont présenté des CMB supérieures à 250 µg/mL. Des concentrations supérieures aux notre ont été observées dans une étude menée par **De Farias Diniz et al. (2024)** sur l'HE de l'*Origanum vulgare* contre deux souches de *P. aeruginosa*, elles sont de 256 µg/mL pour la CMI et de 512 µg/mL pour la CMB.

Une CMI de 150 µg/mL a été obtenue par l'HE de l'*Origanum vulgare* contre les bactéries Gram positives, les CMB sont inférieures ou égales à 250 µg/mL. Le thymol a donné les mêmes CMI (225 µg/mL) et CMB ( $> 250$  µg/mL). Par contre, l'ATB a enregistré de faibles CMI (25 µg/mL) et CMB ( $< 25$  µg/mL). **Mathlouthi et al. (2012)**, ont évalué l'activité de l'HE de l'*Origanum vulgare* à l'égard de *B. subtilis*, ils ont révélé des effets inhibiteur et bactéricide à une concentration égale à 2,25 mg/mL. Une autre étude sur cette l'HE, menée par **Boskovic et al. (2015)**, a révélé des CMI (640 µg/mL) et des CMB ( $\leq 2560$  µg/mL) contre *S. aureus*.

Dans notre étude, la plupart des CMI obtenues sont comprises entre 150 et 250 µg/mL, suggérant ainsi que l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* est active. En effet, selon **Sartoratto et al (2004)**, une HE est considérée comme ayant une forte activité lorsque sa CMI se situe entre 50 et 500 µg/mL. L'activité est modérée lorsque la CMI est comprise entre 600 et 1500 µg/mL, et elle est de faible activité lorsque la CMI est supérieure à 1500 µg/mL.

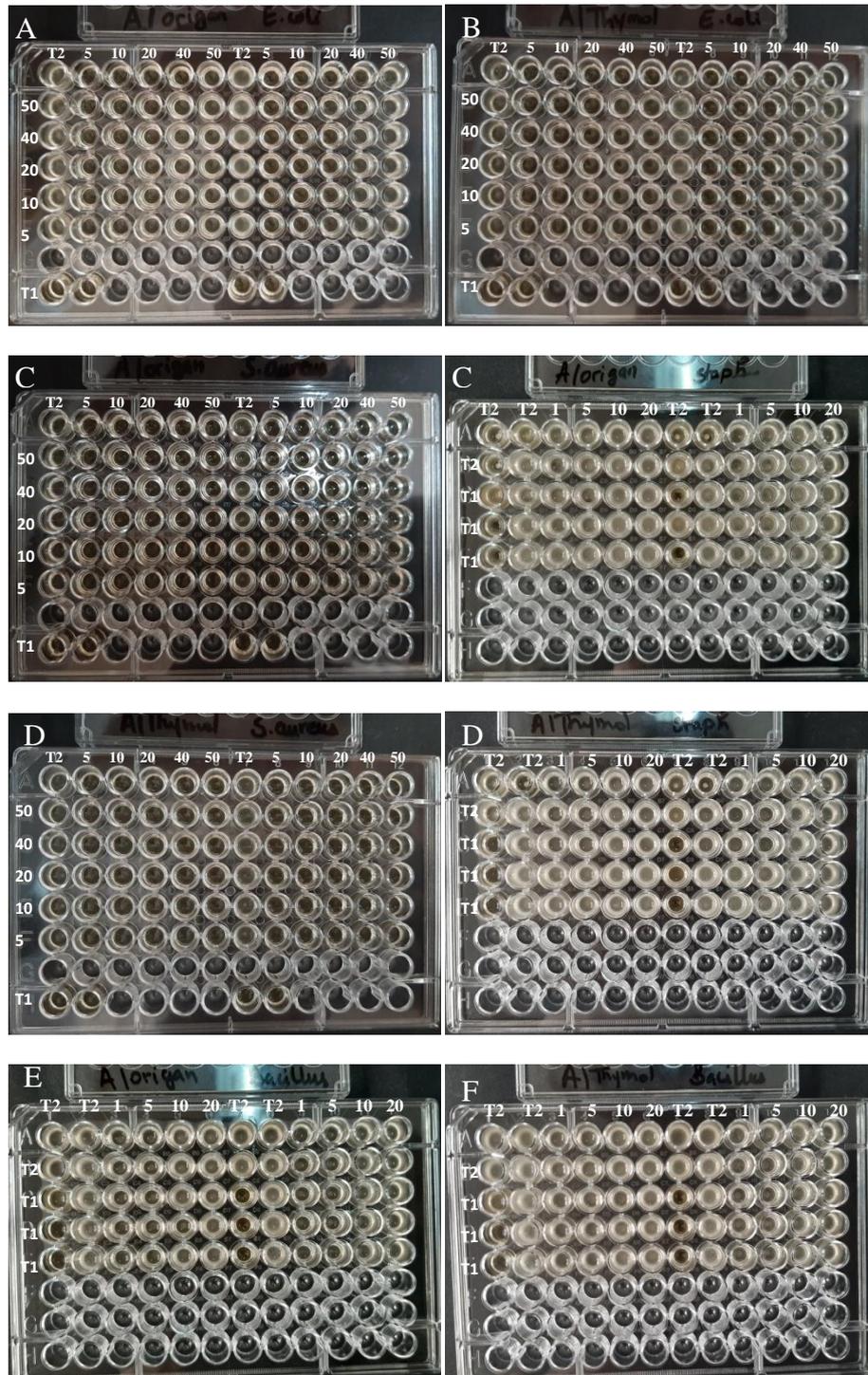
Les travaux précédemment cités ont parfois rapporté des résultats différents de ceux observés dans notre étude. Cette variabilité peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment les facteurs expérimentaux telle que la variation des méthodes utilisées (**Mansouri et al., 2018**). De plus, la nature volatile, le caractère hydrophobe et la viscosité des huiles essentielles entraînent une distribution irrégulière dans le milieu de culture (**Faleiro, 2011**), jouant un rôle crucial dans cette diversité des résultats. D'autre part, la composition chimique des huiles essentielles est très variable, très complexe, pouvant contenir environ 20 à 60 composants à des concentrations très différentes, et se distinguent par la présence de deux ou trois composants majeurs à des concentrations relativement élevées (**Bakkali et al., 2008**). En effet, leurs concentrations varient en fonction des saisons de récolte, des sources géographiques, des conditions pédologiques et climatiques (**Burt, 2004**), du processus d'extraction (**Lombrea et al., 2020**), ainsi que de la présence de différentes sous-espèces d'*Origanum vulgare* (**Marotti et al., 1994**). Concernant l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare*, les principaux composants antimicrobiens sont le thymol et le carvacrol (**Chaftar et al., 2016**), leur forte activité a été démontrée par plusieurs auteurs **Xu et al. (2008)** ; **Lee et al. (2017)** ; **Marchese et al. (2018)** et **Asadi et al. (2023)**.

## II. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* en association avec un antibiotique

Dans ce travail, l'activité antibactérienne de l'HE de l'*Origanum vulgare* et le thymol en association avec un ATB (amoxicilline) contre cinq souches pathogènes a été étudiée. Les résultats sont illustrés dans la figure 8 et donnés sous forme de FIC<sub>i</sub>, dans le tableau VII, qui permet d'évaluer l'effet de ces associations *vis-à-vis* les différentes souches testées.

**Tableau VII :** Résultats de l'association de l'HE de l'*Origanum vulgare* et le thymol avec l'ATB amoxicilline.

Souche	Concentration des associations Origan /ATB µg/mL	FIC <sub>i</sub> Origan/ATB	Concentration des associations Thymol/ATB µg/mL	FIC <sub>i</sub> Thymol/ATB
<i>Escherichia coli</i>	5/10	0,106	5/5	0,073
	10/5	0,113	10/10	0,146
	20/5	0,193	20/5	0,193
	40/10	0,386	40/5	0,353
	80/10	0,706	80/5	0,673
	100/125	1,83	100/100	1,54
	125/100	1,91	125/100	1,83
	150/100	2,33	150/100	1,86
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/100	0,674	1/100	0,674
	5/100	0,706	5/100	0,706
	50/100	1,066	50/100	1,066
	100/100	1,466	100/100	1,466
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1/10	0,074	1/10	0,014
	5/10	0,1	5/20	0,17
	10/20	0,21	10/5	0,113
	20/20	0,29	20/5	0,193
<i>Bacillus subtilis</i>	1/50	0,341	1/50	0,341
	5/100	0,706	5/100	0,706
	50/100	1,06	50/50	0,733
	100/50	1,133	100/50	1,133
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/10	0,074	1/10	0,074
	5/10	0,106	5/10	0,106
	10/20	0,213	10/20	0,213
	20/20	0,293	20/20	0,293
	40/5	0,353	40/5	0,353
	80/5	0,67	80/5	0,673
	100/100	1,74	100/125	1,71
	125/125	2,18	125/100	1,66
150/150	2,33	150/100	2,03	



**Figure 8** : Photographies de quelques microplaques des associations de l'HE de l'Origan et du thymol avec l'amoxicilline.

**A** : association ATB/origan, *E. coli*, **B** : association ATB/thymol, *E. coli*, **C** : association ATB/origan, *S. aureus*, **D** : association ATB/thymol, *S. aureus*, **E** : association ATB/origan, *B. subtilis*, **F** : association ATB/thymol, *B. subtilis*.

Des travaux sur la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques sont de plus en plus décrits dans la littérature (**Langeveld et al., 2013 ; Rosato et al., 2020**). Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en vue de potentielles applications clinique, car permettant de réduire les éventuels effets secondaires des traitements actuels en diminuant la dose de composé utilisé (**Rosato et al., 2007**), limitant ainsi également de développement des phénomènes de résistances. C'est dans cette optique que l'HE de l'*Origanum vulgare* et le thymol ont été testés en combinaison avec l'amoxicilline *vis-à-vis* de cinq souches cibles. L'effet de la combinaison (tableau VIII) été détermine selon **Rosato et al. (2010)**.

**Tableau VIII** : Effet de la combinaison d'une HE avec une autre huile essentielle, un antibiotique ou un composant majeur (**Rosato et al., 2010**).

Effet obtenu	FIC <sub>i</sub>
Synergique	$\leq 0,5$
Additif	$0,5 < \text{FIC}_i \leq 1$
Indifférent	$= 1$
Antagoniste	$> 1$

D'après le tableau VII, aux concentrations élevées, des effets antagonistes, ont été observés pour l'HE de l'*Origanum vulgare* et du thymol en combinaison avec l'antibiotique vis à vis de toutes les souches testées. A l'égard d'*E. coli*, des effet synergiques, à des faibles concentrations (5/10, 10/5, 40/10, 20/5 µg/mL), et un effet additif (80/10 µg/mL) ont été enregistrés. **Si et al. (2008)** ont observé un effet additif sur *E. coli* dans l'association Origan/ATB à la concentration 250/320 (µg/mL). Cela pourrait indiquer que, dans notre étude, les associations Origan/ATB et Thymol/ATB sont plus efficaces et à des concentrations plus faibles. En ce qui concerne *K. pneumoniae*, les associations Origan/ATB et Thymol/ATB ont démontré un effet additif à des concentrations de 1/100 et 5/100 (µg/mL). Des effets synergiques ont été observés dans toutes les associations Origan/ATB (FIC<sub>i</sub> de 0,074) et Thymol/ATB (FIC<sub>i</sub> de 0,014) contre *P. aeruginosa*, avec une synergie plus importante à la concentration 1/10 (µg/mL). **De Farias Diniz et al. (2024)** ont étudié l'association de l'HE de l'*Origanum vulgare* avec l'ATB (ampicilline) *vis-à-vis* de *K. pneumoniae* et de *P. aeruginosa* en utilisant la technique de diffusion sur milieu solide. Ils ont enregistré un effet synergique et un effet Indifférent pour chaque souche.

Un effet synergique a été enregistré pour l'association Origan/ATB ainsi que pour le thymol/ATB contre *B. subtilis* à une concentration de 1/50 ( $\mu\text{g/mL}$ ), tandis qu'un effet additif a été observé à 5/100 ( $\mu\text{g/mL}$ ) pour Origan/ATB et à 5/100, 50/50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) pour le thymol/ATB. Ces résultats montrent que dans notre étude, les associations origan/ATB et thymol/ATB présentent une synergie à des concentrations beaucoup plus faibles (1/50  $\mu\text{g/mL}$ ) en comparaison aux résultats obtenus dans une étude menée par **Rosato et al. (2010)**, où une synergie est observée à 70/50  $\mu\text{g/mL}$ . Concernant *S. aureus*, des effets synergiques ont été révélés à des concentrations allant de 1/10 à 40/5  $\mu\text{g/mL}$ . Un effet additif a été obtenu à la concentration 80/5  $\mu\text{g/mL}$ . Les mêmes effets ont été observés pour les associations thymol/ATB. Nos résultats montrent encore une fois que des synergies efficaces sont obtenues à de faibles concentrations, contrairement aux résultats observés dans l'étude de **Rosato et al. (2010)** où l'effet synergique est révélé à 150/30  $\mu\text{g/mL}$ , cela suggère que nos combinaisons sont potentiellement plus efficaces à des doses plus faibles.

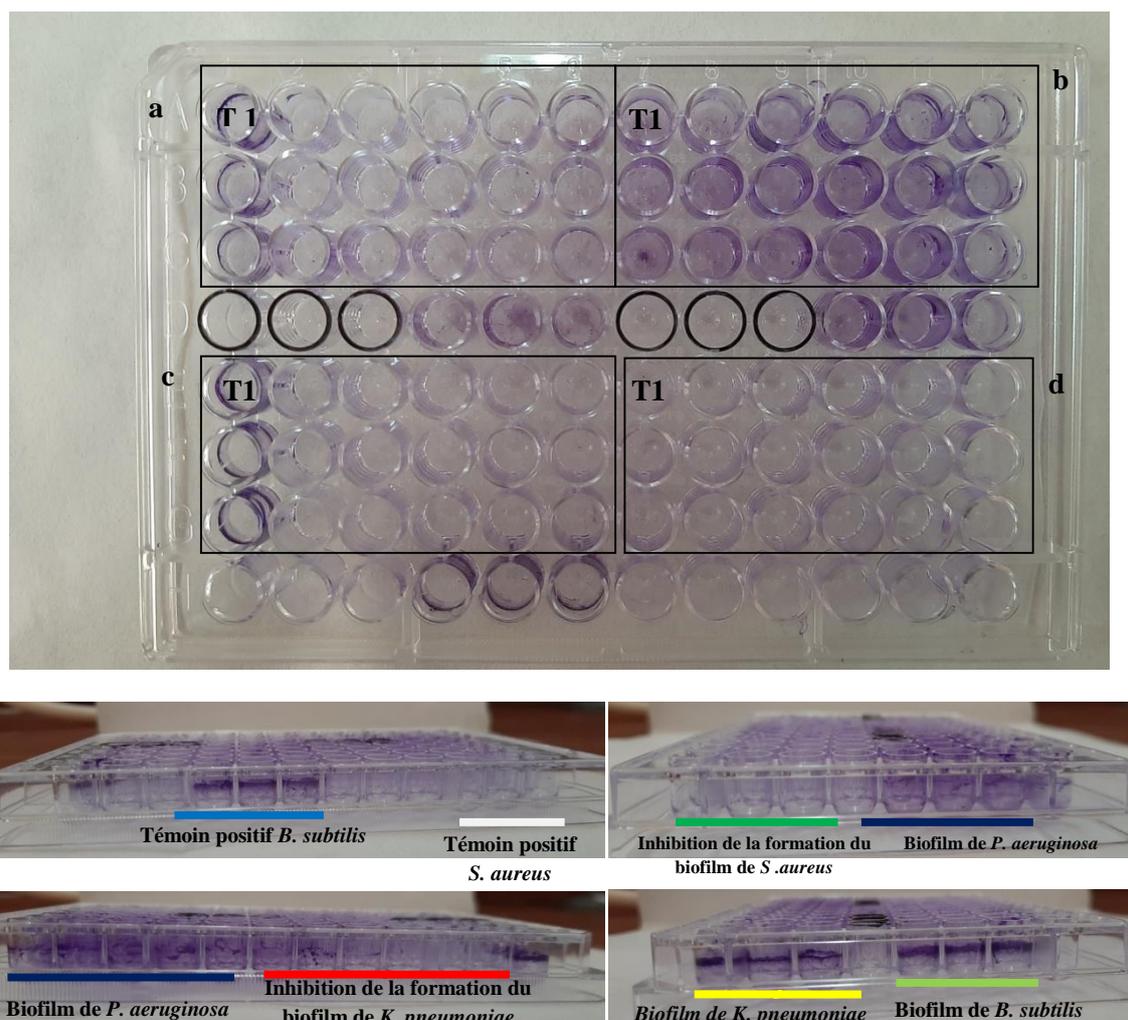
Ces différences peuvent être dues à des variations dans les conditions expérimentales, les méthodes de préparation des antibiotiques, ou celles d'extraction des HEs (**Romo-Castillo et al., 2023**).

### III. Inhibition de la formation de biofilms

L'effet inhibiteur de l'HE de l'*Origanum vulgare* sur la formation de biofilms des souches cibles a été évalué par la méthode des microdilutions sur microplaques de 96 puits (figure 9). Le tableau IX présente les taux d'inhibition (%) calculés après avoir mesuré les absorbances à 630 nm.

**Tableau IX :** Résultats des Taux d'inhibition en % de l'HE de l'*Origanum vulgare* vis-à-vis de quatre souches cibles.

Souche	Concentration µg/mL	Taux d'inhibition %	Souche	Concentration µg/mL	Taux d'inhibition %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	57	<i>Bacillus subtilis</i>	100	73
	125	71		125	74
	150	74		150	79
	300	75		300	81
	400	76		400	81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	14	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	14
	125	18		125	20
	150	20		150	20
	300	20		300	25
	400	21		400	25



**Figure 9** : Photographies de la microplaque de biofilms, après coloration avec le cristal violet (T1 : témoin, **a** : *K. pneumoniae*, **b** : *P. aeruginosa*, **c** : *B. subtilis*, **d** : *S. aureus*).

D'après le tableau IX, les résultats montrent que l'HE de l'*Origanum vulgare*, à toutes les concentrations testées, inhibe efficacement la formation de biofilms de *B. subtilis* et de *K. pneumoniae* (figure 9), avec des taux d'inhibition allant de 57 à 81 %. En revanche, l'HE de l'*Origanum vulgare* est moins efficace contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*, avec des taux d'inhibition qui varient entre 14 et 25 %. **Silva et al. (2023)** ont étudié l'inhibition de la formation de biofilm de *K. pneumoniae* par l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* par la méthode des tubes avec l'ajout de 5 % de saccharose, ils n'ont enregistré aucune inhibition à toutes les concentrations testées. Des taux d'inhibition de biofilm de *P. aeruginosa*, allant de 40,0 à 59,8 % par l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* subsp *hirtum* ont donné par **Schillaci et al. (2013)**. **Kryvtsova et al. (2020)**, ont étudié l'effet inhibiteur de l'HE de l'*Origanum vulgare* à l'égard de *S. aureus*, le taux d'inhibition enregistré est de 78 % à une concentration de 0,1 %. **Rossi et al. (2022)**, ont expliqué que la variabilité entre les résultats pourrait être due

à la sensibilité des bactéries aux huiles essentielles, qui dépend de l'espèce et de la souche bactérienne. Ces auteurs ont expliqué le mécanisme d'inhibition de la formation de biofilms ; les HEs ont principalement une action sur les différentes étapes de la formation du biofilm (adhésion, formation de microcolonies et maturation). L'inhibition de la formation de biofilms pourrait aussi être due à l'inhibition de la matrice d'EPS et à l'altération du système de QS (Quorum Sensing).

*Conclusion*

## Conclusion

Les biofilms, constitués de communautés de microorganismes, représentent une forme de survie et de protection accrue. Cette structure leur confère une résistance notable aux divers traitements, y compris les antibiotiques, rendant leur élimination particulièrement difficile. En réponse à ce défi, l'utilisation des huiles essentielles est en plein essor. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressées à l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE de l'*Origanum vulgare* vis-à-vis de cinq souches bactériennes à savoir *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* et *S. aureus*.

Une évaluation qualitative de l'activité antibactérienne est réalisée par des aromagrammes, les résultats obtenus ont montré que l'HE de l'*Origanum vulgare* possède un effet inhibiteur intermédiaire à l'égard de toutes les souches testées, à l'exception de *B. subtilis* qui n'a montré aucune zone d'inhibition. *K. pneumoniae* s'est révélée la plus sensible avec une zone d'inhibition de 15 mm à 0,3 mg/disque.

Les données expérimentales de l'évaluation quantitative ont montré que l'HE de l'*Origanum vulgare* a un effet bactériostatique à 150 µg/mL vis-à-vis de *B. subtilis*, *E. coli* et *S. aureus*, et à 250 µg/mL à l'égard de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. Par contre l'effet bactéricide n'a été observé qu'à 250 µg/mL pour toutes les souches testées, à l'exception de *B. subtilis* où la CMB a été supérieure à 250 µg/mL.

Les tests des associations de l'HE de l'*Origanum vulgare* et le thymol avec un antibiotique (amoxicilline), ont révélé des effets synergiques à des concentrations faibles. Concernant *P. aeruginosa*, des effets synergiques ont été observés à toutes les concentrations testées. En revanche, aucun effet synergique n'a été constaté vis-à-vis de *K. pneumoniae*.

Les résultats des microplaques ont démontré que l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* possède une activité antibiofilm à l'égard de toutes les souches testées. Des taux d'inhibition élevés (57 à 81 %) ont été observés contre *B. subtilis* et *K. pneumoniae*. Par contre, des taux d'inhibition moins significatifs ont été notés à l'encontre de *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Cette étude souligne que l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* peut potentiellement contribuer au développement de traitements phytothérapeutiques ciblant les biofilms et les infections associées. Son utilisation pourrait également permettre de réduire les doses d'antibiotiques nécessaires. Néanmoins, ce travail reste préliminaire et d'autres études sont

souhaitables afin de l'approfondir, il serait donc nécessaire de : Etudier l'activité antibactérienne *vis-à-vis* de la plupart des souches bactériennes formatrices de biofilms ;

- Etablir des synergies avec d'autres huiles essentielles et aussi avec d'autres ATB ;
- Réaliser des tests de cytotoxicité pour éviter les doses toxiques en thérapeutique ;
- Réaliser l'identification des composés bioactifs de l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare*.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

Abdullah, Asghar, A., Algburi, A., Huang, Q., Ahmad, T., Zhong, H., Javed, H. U., Ermakov, A. M., & Chikindas, M. L. (2021). Anti-biofilm potential of *Elletaria cardamomum* essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* JSG 1748. *Frontiers in Microbiology*, 12, 620227.

Alain, B., Marie-Madeleine, R., & Sébastien, R. (2007). Microbiochimie et alimentation. Ed. *Educagri*. Dijon. P : 343.

Amankwah, S., Abdella, K., & Kassa, T. (2021). Bacterial biofilm destruction: A focused review on the recent use of phage-based strategies with other antibiofilm agents. *Nanotechnology, Science and Applications*, 14, 161-177.

Armbruster, C. R., & Parsek, M. R. (2018). New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), 4317-4319.

Asadi, S., Nayeri-Fasaei, B., Zahraei-Salehi, T., Yahya-Rayat, R., Shams, N., & Sharifi, A. (2023). Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 23(1), 55.

Aumeran, C., Balestrino, D., & Forestier, C. (2020). Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'Environnement*, 1-7.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O., Pintado, M., Sarmiento, B., (2020). The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(4), (279-295).

Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., & Baltic, M. Z. (2015). Antimicrobial activity of thyme (*Tymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Science*, 5, 18-21.

Boughendjioua, H. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Lavandula officinalis* grown in the region of Skikda-Algeria. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 86, 88 - 95

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

Busatta, C., Vidal, R. S., Popiolski, A. S., Mossi, A. J., Dariva, C., Rodrigues, M. R., Corazza, F. C., Corazza, M. L., Vladimir Oliveira, J., & Cansian, R. L. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 25(1), 207–211.

Cai, J., Yan, R., Shi, J., Chen, J., Long, M., Wu, W., & Kuca, K. (2022). Antifungal and mycotoxin detoxification ability of essential oils: A review. *Phytotherapy Research*, 36(1), 62-72.

Chaftar, N., Girardot, M., Labanowski, J., Ghrairi, T., Hani, K., Frere, J., & Imbert, C. (2016). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*, 2, 1-15.

Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., & Ed-Dra, A. (2016). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*, 14(6), 355-362.

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Seventh edition: M7-A7 26-n°2. Pennsylvania, U.S.A.

Dajic Stevanovic, Z., Sieniawska, E., Glowniak, K., Obradovic, N., & Pajic-Lijakovic, I. (2020). Natural macromolecules as carriers for essential oils: From extraction to biomedical application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 563.

De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1-10.

De Farias Diniz, A., da Cruz, P. D. S. C., Mariz, W. S., Santos, V. R. L., de Oliveira Nóbrega, L. M. M., Simões, M. M., ... & de Oliveira Filho, A. A. (2024). Evaluation of the antibacterial, modulatory and anti-adherent properties of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against food pathogenic bacteria. *Semina: Ciências Agrárias*, 45(1), 7-22.

De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580-589.

Delespaul, Q., de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Michel, G., Marquier-Viñuales, C., & Bessière, J. M. (2000). The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 256-266.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical Review. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 3(4), 25.

Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29-35.

Donato, R., Sacco, C., Pini, G., & Bilia, A. R. (2020). Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 249, 112376.

Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, 1143-1156.

Fitriady, M. A., Sulaswatty, A., Agustian, E., Salahuddin, S., & Aditama, D. P. F. (2017). Steam distillation extraction of ginger essential oil: Study of the effect of steam flow rate and time process. *AIP Conference Proceedings*, 1803(1), 020032.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(9), 563–575.

Fontanay, S., Mougenot, M. E., & Duval, R. E. (2015). Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*, 5(2), 109-118.

Goetz, P., Ghédira, K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. *Springer Science & Business Media*, 394p.

Hacioglu M, Oyardi O, Kirinti A.( 2021). Oregano essential oil inhibits *Candida spp.* biofilms. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 76(11-12):443-450.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322-332.

Hu, F., Tu, X. F., Thakur, K., Hu, F., Li, X. L., Zhang, Y. S., ... & Wei, Z. J. (2019). Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110821.

Jacques, M., Aragon, V., & Tremblay, Y. D. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews*, 11(2), 97–121.

Kakouri, E., Daferera, D., Kanakis, C., Revelou, P. K., Kaparakou, E. H., Dervisoglou, S., Perdikis, D., & Tarantilis, P. A. (2022). *Origanum majorana* essential oil a review of its chemical profile and pesticide activity. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(12), 1982.

Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668-681.

Kim, M., Sowndhararajan, K., & Kim, S. (2022). The chemical composition and biological activities of essential oil from korean native thyme Bak-Ri-Hyang (*Thymus quinquecostatus* Celak.). *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(13), 4251.

Kosakowska, O., Węglarz, Z., Pióro-Jabrucka, E., Przybył, J. L., Kraśniewska, K., Gniewosz, M., & Bączek, K. (2021). Antioxidant and antibacterial activity of essential oils and hydroethanolic extracts of Greek oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietswaart) and common oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). *Molecules*, 26(4), 988.

Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil-new Insights into selected therapeutic applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(18), 4125.

Kryvtsova, M. V., Fedkiv, O. K., Hrytsyna, M. R., & Salamon, I. (2020). Anty-microbial, and anti-biofilm-forming properties of *Origanum vulgare L.* essential oils on *Staphylococcus aureus* and its antioxidant action. *Studia Biologica*, 14(2), 27-38.

Kwiatkowski, P., Sienkiewicz, M., Pruss, A., Łopusiewicz, Ł., Arszyńska, N., Wojciechowska-Koszko, I., Kilanowicz, A., Kot, B., & Dołęgowska, B. (2022). Antibacterial and anti-biofilm activities of essential oil compounds against New Delhi Metallo-β-Lactamase-1-Producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(2), 147.

Lagha, R., Ben Abdallah, F., Al-Sarhan, B. O., & Al-Sodany, Y. (2019). Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1161.

Langeveld, WT., Veldhuizen, EJA. et Burt, SA. (2013). Synergie entre les composants des huiles essentielles et les antibiotiques : un bilan. *Revue Critiques en Microbiologie*, 40 (1), 76-94.

Lee, J. H., Kim, Y. G., & Lee, J. (2017). Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1420-1428.

Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6), 989.

Li, P., Yin, R., Cheng, J., & Lin, J. (2023). Bacterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11680.

Lombrea, A., Antal, D., Ardelean, F., Avram, S., Pavel, I. Z., Vlaia, L., ... & Danciu, C. (2020). A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare L.* essential oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9653.

Ma, L., & Yao, L. (2020). Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: an updated review. *Molecules*, 25(11), 2627.

Makabenta, J. M. V., Nabawy, A., Li, C. H., Schmidt-Malan, S., Patel, R., & Rotello, V.M. (2021). Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 23-36.

Mansouri, N., Aoun, L., Dalichaouche, N., & Hadri, D. (2018). Yields, chemical composition, and antimicrobial activity of two Algerian essential oils against 40 avian multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. *Veterinary World*, 11(11), 1539.

Mansuri, A., Lokhande, K., Kore, S., Gaikwad, S., Nawani, N., Swamy, K. V., Junnarkar, M., & Pawar, S. (2022). Antioxidant, anti-quorum sensing, biofilm inhibitory activities and chemical composition of Patchouli essential oil: *in vitro* and *in silico* approach. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 40(1), 154–165.

Marchese, A., Arciola, C. R., Coppo, E., Barbieri, R., Barreca, D., Chebaibi, S., ... & Daglia, M. (2018). The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: Mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling*, 34(6), 630-656.

Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., Deans, S. G., & Eaglesham, E. (1994). Effects of variety and ontogenic stage on the essential oil composition and biological activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of Essential Oil Research*, 6(1), 57-62.

Martínez-Abad, A., Ramos, M., Hamzaoui, M., Kohnen, S., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2020). Optimisation of sequential microwave-assisted extraction of essential oil and pigment from lemon peels waste. *Foods*, 9(10), 1493.

Martínez-Espinosa R. M. (2020). Microorganisms and their Metabolic capabilities in the context of the biogeochemical nitrogen cycle at extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4228.

Masyita, A., Mustika Sari, R., DwiAstuti, A., Yasir, B., RahmaRumata, N., Emran, T. B., Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, 13, 100217.

Mathlouthi, N., Bouzaienne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M., & Bergaoui, R. (2012). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: *in vitro* antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of Animal Science*, 90(3), 813-823.

Merghni, A., Haddaji, N., Bouali, N., Alabbosh, K. F., Adnan, M., Snoussi, M., & Noumi, E. (2022). Comparative study of antibacterial, antibiofilm, antiswarming and antiquorum sensing activities of *Origanum vulgare* essential oil and terpinene-4-ol against pathogenic bacteria. *Life*, 12(10), 1616.

Meyer A., Deiana J. et Leclerc H. (1994). Cours de microbiologie generale. Ed. Doin. Paris. P: 365.

Muhsin, J., Ufaq, T., Tahir, H., & Saadia, A. (2015). Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *J Microbiol Biotechnol*, 4, 1-14.

Nazir, R., Zaffar, M. R., & Amin, I. (2019). Bacterial biofilms: the remarkable heterogeneous biological communities and nitrogen fixing microorganisms in lakes. *Freshwater Microbiology*, 307-340.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.

Ouali, F. A., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., ... & Drider, D. (2014). Identification of *Lactobacilli* with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 116-124.

Pharmacopée européenne, (2016). Direction européenne de la qualité du médicament. 9e édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe. <https://www.edqm.eu/fr/9e-edition-depharmacopee-europeenne>.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512.

Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, 2015(1), 759348.

Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 1-18.

Rathore, S., Mukhia, S., Kumar, R., & Kumar, R. (2023). Essential oil composition and antimicrobial potential of aromatic plants grown in the mid-hill conditions of the Western Himalayas. *Scientific Reports*, 13(1), 4878.

Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*, 36(5), 347-355.

Reyes-Jurado, F., Cervantes-Rincón, T., Bach, H., López-Malo, A., & Palou, E. (2019). Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. *Industrial Crops and Products*, 131, 90-95.

Romo-Castillo, M., Flores-Bautista, V. A., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Reyes-Chilpa, R., León-Santiago, M., & Luna-Pineda, V. M. (2023). Synergy of plant essential oils in antibiotic therapy to combat *Klebsiella pneumoniae* infections. *Pharmaceuticals*, 16(6), 839.

Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., & Antonietta Milillo, M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14(11), 727–732.

Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M. E., & Vitali, C. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 17(28), 3289–3295.

Rosato, A., Carocci, A., Catalano, A., Clodoveo, M. L., Franchini, C., Corbo, F., Carbonara, G. G., Carrieri, A., & Fracchiolla, G. (2018). Elucidation of the synergistic action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. *PloS One*, 13(8), e0200902.

Rosato, A., Sblano, S., Salvagno, L., Carocci, A., Clodoveo, M. L., Corbo, F., & Fracchiolla, G. (2020). Anti-biofilm inhibitory synergistic effects of combinations of essential oils and antibiotics. *Antibiotics*, 9(10), 637.

Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Casaccia, M., Maggio, F., & Paparella, A. (2022). Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 2172-2191.

Roux, A., Ghigo, J.M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* tome, 3, 261-268.

Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491-509.

Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., ... & Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7), 549-557.

Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275-280.

Sattayakhom, A., Wichit, S., & Koomhin, P. (2023). The Effects of Essential Oils on the Nervous System: A Scoping Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(9), 3771.

Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., & Bisht, R. (2019). Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. *Indian Journal of Microbiology*, 59, 3-12.

Schillaci, D., Napoli, E. M., Cusimano, M. G., Vitale, M., & Ruberto, G. (2013). *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *Journal of Food Protection*, 76(10), 1747-1752.

Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., & Schild, S. (2021). Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutical strategies. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 8(2), 28–56.

Sfeir, J., Lefrançois, C., Baudoux, D., Derbré, S., & Licznar, P. (2013). *In Vitro* Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2013(1), 269161.

Si, H., Hu, J., Liu, Z., & Zeng, Z. L. (2008). Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53(2), 190–194.

Silva, S. L., Araújo, F. S. M., Silva, P. O. A., Silva, E. V. A., Bezerra, M. M. S. L., Diniz, A. F., ... & Oliveira Filho, A. A. (2023). Evaluation of the antimicrobial effect of the *Origanum vulgare* L essential oil on strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Brazilian Journal of Biology*, 83, 269317.

Simirgiotis, M. J., Burton, D., Parra, F., López, J., Muñoz, P., Escobar, H., & Parra, C. (2020). Antioxidant and Antibacterial Capacities of *Origanum vulgare* L. Essential oil from the Arid Andean region of Chile and its chemical characterization by GC-MS. *Metabolites*, 10(10), 414.

Sionov, R. V., & Steinberg, D. (2022). Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Microorganisms*, 10(6), 1239.

Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022). Microencapsulation of essential oils: A review. *Polymers*, 14(9), 1730.

Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzhali, P., Geetha, M., Dyavaiah, M., & Xiangmin, L. (2021). Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. *Frontiers in Microbiology*, 12, 676458.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.

Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., & Coulibaly, A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied Biosciences*, 58, 4234-4242.

Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53.

Venkatesan, N., Perumal, G., & Doble, M. (2015). Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiology*, 10(11), 1743–1750.

Wani, A. R., Yadav, K., Khursheed, A., & Rather, M. A. (2021). An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104620.

Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents-myth or real alternative?. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11), 2130.

Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S., & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 174-179.

Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host & Microbe*, 26(1), 15–21.

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3423.

Zhang, H., Huang, T., Liao, X., Zhou, Y., Chen, S., Chen, J., & Xiong, W. (2022). Extraction of camphor tree essential oil by steam distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Molecules*, 27(17), 5385.

Zhang, X., Gao, H., Zhang, L., Liu, D., & Ye, X. (2012). Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 39, 162-169.

Zhao, A., Sun, J., & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1137947.

Zimmermann, R. C., Poitevin, C. G., da Luz, T. S., Mazarotto, E. J., Furuie, J. L., Martins, C. E. N., ... & Zawadneak, M. A. (2023). Antifungal activity of essential oils and their

combinations against storage fungi. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(16), 48559-48570.

*Annexes*

## **Annexe I : Préparation des milieux de culture utilisés pour 1 L d'eau distillée**

### **Bouillon Muller Hinton**

- 21 g bouillon Muller Hinton
- pH  $7,4 \pm 0,2$

### **Bouillon Muller Hinton à 1 % glucose**

- 21 g bouillon Muller Hinton
- 10 g glucose
- pH  $7,4 \pm 0,2$

### **Gélose Muller Hinton**

- 38 g MH
- pH  $7,4 \pm 0,2$

### **Gélose nutritive**

- 28 g GN
- pH  $7,4 \pm 0,2$

## Annexe II : Préparation des solutions pour 1 L d'eau distillée

### Eau physiologique

- 9 g NaCl
- pH  $7,2 \pm 0,2$

### Tampon PBS (10 mM)

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,42 g  $K_2HPO_4$
- 0,24 g  $KH_2PO_4$
- pH  $7,2 \pm 0,2$

### Solution d'agar à 0,2 %

- 2 g d'agar
- pH  $7,2 \pm 0,2$

## Résumé

La résistance des biofilms et les infections qu'ils causent posent un problème majeur en santé publique et dans le domaine thérapeutique. Les traitements antibiotiques actuels perdent de leur efficacité face à cette résistance, nécessitant l'exploration d'alternatives de soins. Cette étude visait à évaluer l'efficacité de l'huile essentielle de *Origanum vulgare*, couramment utilisée dans notre région, comme solution alternative pour combattre la formation de biofilms et les infections associées. Une évaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'HE de *Origanum vulgare* a été menée contre des bactéries formatrices de biofilms en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Par la suite, une évaluation quantitative a été réalisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB). Les résultats ont révélé que cette l'HE possède une activité antibactérienne notable contre toutes les souches testées. *K. pneumoniae* a montré une sensibilité particulière avec une zone d'inhibition de 15 mm à 0,3 mg/disque. Des CMI de 150 µg/mL ont été enregistrées contre *B. subtilis*, *E. coli* et *S. aureus*, et de 250 µg/mL vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. Un effet bactéricide a été observé à 250 µg/mL à l'égard de la plupart des souches cibles. L'association de l'HE de *Origanum vulgare* avec l'antibiotique (amoxicilline) a montré des effets synergiques à de faibles concentrations vis-à-vis de *P. aeruginosa*, mais pas pour *K. pneumoniae*. De plus, l'HE de *Origanum vulgare* a démontré une activité antibiofilm importante, avec des taux d'inhibition élevés (57 à 81 %) contre *B. subtilis* et *K. pneumoniae*,

**Mots clés :** antibiotique, activité antibactérienne, associations, biofilms, huile essentielle, *Origanum vulgare*.

## Abstract

Biofilm resistance and the infections it causes pose a major public health and therapeutic challenge. Current antibiotic treatments are losing their effectiveness in the face of this resistance, necessitating the exploration of alternative treatments. The aim of this study was to evaluate the efficacy of the essential oil of *Origanum vulgare*, commonly used in our region, as an alternative solution to combat biofilm formation and associated infections. A qualitative evaluation of the antibacterial activity of *Origanum vulgare* EO was carried out against biofilm-forming bacteria using the disk diffusion method. Quantitative evaluation was then carried out to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The results revealed that this EO possessed significant antibacterial activity against all the strains tested. *K. pneumoniae* showed particular sensitivity, with a zone of inhibition of 15 mm at 0.3 mg/disc. MICs of 150 µg/mL were recorded against *B. subtilis*, *E. coli* and *S. aureus*, and 250 µg/mL against *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. A bactericidal effect was observed at 250 µg/mL against most target strains. The combination of *Origanum vulgare* EO with the antibiotic (amoxicillin) showed synergistic effects at low concentrations against *P. aeruginosa*, but not against *K. pneumoniae*. In addition, *Origanum vulgare* EO demonstrated significant antibiofilm activity, with high inhibition rates (57 - 81 %) against *B. subtilis* and *K. pneumoniae*,

**Key words:** antibiotic, antibacterial activity, associations, biofilms, essential oil, *Origanum vulgare*.