

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار- عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

En Sciences

Option : Microbiologie Appliquée

Screening de molécules a activité antimicrobienne

Présentée par: Mme ChahrazedBenzaid

Directeur de thèse : Ryad Djeribi

Professeur, Université Badji Mokhtar- Annaba

Co Directeur de thèse : Mahmoud Rouabhia

Professeur, Université Laval Quebec- Canada

### Membres de Jury:

Président : M Djamel Chekireb

Professeur, Université Badji Mokhtar-Annaba

Examineurs : M. Moussa Houhamdi

Professeur, Université 8mai 1945 - Guelma

M. Djekoun Mohamed

Maitre de Conférences A, Université 8mai 1945 - Guelma

N° DBCH...../2019

Année universitaire 2018/2019

*"Les plantes semblent avoir été semées avec profusion sur la terre, comme les étoiles dans le ciel, pour inviter l'homme par l'attrait du plaisir et de la curiosité à l'étude de la nature".*

Jean- Jacques Rousseau

*Les rêveries du promeneur solitaire*

## *Dédicaces*

*« On ne cherche que ce que l'on espère trouver » E. Ancelet.*

*A mes chers, disparus trop tôt*

*Vous n'êtes plus là où tu étiez, mais tu vous êtes partout là où je suis.*

*A tous ceux que j'aime*

*A tous ceux qui m'aiment.*

*Chahrazed*

## Remerciements

Nombreux sont ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma parfaite gratitude.

Je tiens à exprimer mes remerciements à mon promoteur, le Professeur Ryad Djeribi pour avoir accepté de diriger ce travail, et de m'avoir toujours soutenu.

Mes sincères et profonds remerciements vont également au Professeur Mahmoud Rouabhia , Directeur du Groupe de Recherche en Écologie Buccale Faculté de médecine dentaire, Université Laval ,Québec (Canada) et mon co directeur de thèse pour avoir dirigé ce travail , pour sa confiance, son soutien, ses conseils , pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire afin de réaliser cette étude ; et pour sa présence aucun mot ne peut exprimer ma gratitude a son égard. son aide est précieuse .

J'exprime mes profonds remerciements aux honorables membres du jury :

Professeur Djamel Chekireb, Professeur Moussa Houhamdi et Docteur Mohamed Djekoun ; pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.

Une pensée amicale à mes collègues enseignant(e)s et personnel des Département de Biochimie et de la Chimie de l'Université de Badji Mokhtar- Annaba, pour leurs collaborations et soutien.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu ou aidé de près ou de loin au cours de la réalisation de ce travail.

## Sommaire

ملخص.....	I
Résumé.....	II
Abstract.....	III
Liste des abréviations .....	IV
Liste des tableaux .....	V
Liste des figures.....	VI
INTRODUCTION GENERALE.....	1

### **PARTIE REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### Chapitre I : les maladies infectieuses

1. Définition .....	3
2. Généralités .....	3
3 . Maladies émergentes ou ré-émergentes .....	4
3. 1 - Maladies anciennes ré-émergentes.....	4
3. 2 - Maladies anciennes.....	4
3. 3 - Maladies nouvelles émergentes .....	5
4 - Epidémiologie des maladies infectieuses.....	6
5. Les agents infectieux.....	7
5.1. Les virus.....	8
5.2. Les bactéries.....	9
5.3. Les champignons parasites.....	11
5.4. Les protozoaires.....	12
6. Les biofilms.....	13
6.1. Définition.....	13
6.2. Les biofilms dans les divers environnements.....	13
6.3. La formation d'un biofilm.....	13
6.4. Le biofilm dans la résistance bactérienne aux traitements antimicrobiens.....	14

1. Les antibiotiques	
1.1 Généralités.....	16
1.2 . Le mode d'action des antibiotiques .....	16
1.3. Toxicité des Antibiotiques.....	16
1.4. La résistance aux antibiotiques.....	19
1-5 Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques.....	20
2. Les antifongiques .....	21
2.1. Généralités .....	22
2.2. Mode d'action des antifongiques .....	24
2.3. Toxicité des antifongiques.....	25
2.4. La résistance aux antifongiques.....	26
2.5. Epidémiologie de la résistance aux antifongiques.....	27
3. Les molécules utilisées en chimiothérapie virale.....	29
3.1 .Généralités.....	29
3.2. Mode d'action des antiviraux.....	30
3.3. Toxicité des antiviraux .....	31
3.4. Résistance aux antiviraux.....	31
3.5. Epidémiologie de la résistance aux antiviraux.....	31
4. Autres molécules .....	32
5. Les nouveaux traitements .....	32
5.1 . Les bactériophages.....	32
5.1-1 Les propriétés et mécanismes d'action des bactériophages.....	32
5.1-2- L'avenir de la phagothérapie .....	33
5.1-3- Inconvénients de la phagothérapie .....	33
5. 2 Les peptides antimicrobiens.....	34
5.2-1 Les peptides cationiques antimicrobiens (PCAs).....	34
5. 2-1-1 Aspects structuraux.....	35
5. 2-1-2 Mode d'action .....	36
5. 2-2 Les peptides anioniques antimicrobiens.....	39
5. 2-3 Les applications des peptides antimicrobiens.....	39

5. 2.4. Les inconvénients des PAM.....	41
6. Les plantes.....	41
7- Les Huiles essentielles.....	43
7.1. Définition et répartition dans le règne végétal.....	43
7.2. Aperçu historique.....	44
7.3. Propriétés physiques.....	44
7.4. Propriétés chimiques .....	45
7.4.1. La composition chimique des huiles essentielles.....	46
7-4-2- Constituants et structures .....	46
7.5. Les activités biologiques des huiles essentielles.....	49
7.6. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles.....	51
7.7. Activité anti biofilms des huiles essentielles.....	52
7.8. Mécanisme d'action des huiles essentielle.....	52
7.9. Activité antioxydante des huiles essentielles.....	58
7.9.1. Le stress oxydatif.....	58
7.9.2. Les antioxydants.....	59
7.10. La toxicité des huiles essentielles.....	60

### Chapitre III : Description des plantes utilisées

1. La menthe poivrée ( <i>Mentha piperita</i> ).....	62
1.1. Présentation.....	62
1.1.1 Origine et culture.....	62
1.1.2. Bref historique sur l'utilisation de la plante.....	62
1.1.3. Description botanique.....	62
1.1.4. Position systématique.....	63
1.1.5. Appellations .....	64
1. 2. L'huile essentielle de la menthe poivrée.....	64
1.2.1. Composition chimique.....	64
1. 3. Utilisations et propriétés biologiques.....	65
1.4. Effets thérapeutiques – aromathérapie.....	65
1. 5. Toxicité .....	67
2. Le Bigaradier ( <i>Citrus aurantium</i> ).....	68
2.1. Présentation .....	68

2.1.1. Origine et culture.....	68
2.1.2. Bref historique sur l'utilisation de la plante.....	68
2. 1.3. Description botanique.....	68
2.1.4. Position systématique.....	69
2.1.5. Appellations .....	69
2.2. L'huile essentielle du bigaradier .....	70
2. 3. Composition chimique.....	70
2.4. Utilisations et propriétés biologiques.....	70
2.5. Effets thérapeutiques – aromathérapie.....	71
2.6. Toxicité .....	72

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

### Chapitre I : Caractérisation des huiles essentielles *M.piperita* et *C.aurantium*

1. Introduction .....	74
2. Matériel végétal et extraction d'huile essentielle.....	74
3. Détermination des indices physico-chimiques des HES .....	75
3.1. Caractéristiques organoleptiques .....	75
3.2.Détermination du pH .....	75
3.3.La densité relative.....	75
3.4.Miscibilité à l'éthanol .....	75
4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	77
4.1.Condition analytiques .....	78
4.2.Identification des composés.....	78
5. Résultats .....	79
5.1.Propriétés physico chimiques.....	79
5.2.Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	79
5.3.Composition chimique des huiles essentielles.....	80
6. Discussion.....	82

### Chapitre 2 : Activité biologique des huiles essentielles *M.piperita* et *C.aurantium*

1 Etudes <i>in vitro</i> des activités biologiques .....	86
a. Introduction .....	86
b. Evaluation de l'activité antioxydante .....	86

1.3.1. Essai de piégeage du radical libre DPPH.....	87
1.3.2. La méthode de réduction de fer « <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (FRAP)....	88
1.4. Résultats .....	89
1.4.1. La méthode DPPH•.....	89
1.4.2. Le test FRAP.....	89
1.5. Discussion .....	92
2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HEs .....	95
2.1. Introduction.....	95
2.2. Les souches microbiennes .....	95
2.3. Les antibiotiques, antifongiques et solvants utilisés .....	97
2.4. Méthodes.....	97
2.4.1. Pré-culture des souches microbiennes.....	97
2.4.2. Activité sur la croissance microbienne.....	97
- Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme...	97
- Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par la	
technique de micro atmosphère.....	99
- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice .....	100
- Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide.....	101
2.4.3. Activité anti biofilm.....	101
2.4.4. Evaluation de l'activité métabolique des biofilms.....	102
2.5. Résultats .....	103
2.5.1. Evaluation de la croissance microbienne par la méthode de l'aromatogramme..	103
2.5.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par la	
technique de micro atmosphère.....	106
2.5.3. Activité anti biofilm.....	107
2.6. Discussion.....	110

**Chapitre 3 : Evaluation moléculaire et cellulaire de l'activité des HE de *M.piperita* sur *C.albicans***

1. Introduction.....	116
2. Matériel .....	116
3. Méthodes.....	117

3.1. Effet des HEs de <i>M.piperita</i> sur la croissance en milieu liquide.....	117
3.2. Effet de l'HE <i>M.piperita</i> sur la formation de biofilm de <i>C. albicans</i> .....	118
3.3. Effet de l' HE sur la dégradation des biofilms matures de <i>C. albicans</i> .....	118
3.4. Détermination de l'effet sur le bourgeonnement cellulaire de <i>C. albicans</i> .....	118
3.5. La microscopie électronique à balayage.....	120
3.6. Effet de l'HE sur l'activation / la répression des gènes de <i>C. albicans</i> .....	120
3.7. RT-PCR quantitative en temps réel.....	121
4. Analyses statistiques .....	123
5. Résultats .....	124
5.1. Effet des HEs de <i>M.piperita</i> sur la croissance en milieu liquide .....	124
5.2. Effet de l' HE de <i>M.piperita</i> sur le bourgeonnement de <i>C.albicans</i> .....	125
5.3. Effet de l'HE <i>M.piperita</i> sur la structure de <i>C. albicans</i> .....	127
5.4. L'Effet de l' HEM. <i>piperita</i> et leurs vapeurs à réduire la formation de biofilm...	128
5.5. L'Effet de de l'HE <i>M.piperita</i> sur les biofilms matures de <i>C. albicans</i> .....	129
5.6. L'effet de l'HE sur l'expression des gènes de <i>C. albicans</i> .....	130
6. Discussion .....	134
7. CONCLUSION.....	137
8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	VII
9. ANNEXE.....	..IIX

## ملخص

يهدف العمل الحالي إلى فحص النشاط المضاد للميكروبات للزيوت العطرية *Mentha x piperita* و *Citrus aurantium* من منطقة الشفة - بليدة - الجزائر

لهذا ، دراسة التركيب الكيميائي لهذه الزيوت الأساسية ونشاطها

تم تقييم البيولوجية (مضاد للميكروبات ، ومضادات الأكسدة ، مضاد حيوي).

في الجزء الأول ، تم إجراء تحديد خصائص مكونات الزيوت العطرية وتحديدتها ، من أجل مقارنة تراكيبها مع نفس الزيوت الأساسية من المناطق الأخرى.

في الجزء الثاني ، نحن مهتمون بدراسة الخصائص المضادة للميكروبات ومضادات الأكسدة والمضادات الحيوية للزيوت الأساسية

*Citrus aurantium* و *Mentha x piperita*

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الزيوت الأساسية *Citrus aurantium* و *Mentha x piperita* قادرة على تثبيط نمو وتشكيل

الأغشية الحيوية من الأنواع الميكروبية المختلفة وعلى وجه الخصوص المبيضات بالمقارنة مع السلالات الجرثومية الأخرى.

ومع ذلك ، فإن هذه الزيوت العطرية لديها نشاط مضاد للأكسدة المعتدل من حيث محاصرة الجذور الحرة ، والحد من الحديد.

للاضطلاع في الجزء الثالث لفهم تأثير زيت *Mentha x piperita* على انتقال *C. albicans* الذي يشكل عنصرا أساسيا في

إمراضه ، لتصور تثبيط تكوين بيوفيلم وتثبيط البيوفيلم الناضج من هذه الأنواع نفسها ، وأخيرا فهم التعبير الجيني ل *C. albicans*

في وجود زيت أساسي من *Mentha x piperita*

**كلمات مفتاح :** الزيوت الطيارة - مضاد الأكسدة - مضاد الميكروبات - مضاد البيوفيلم-

*Mentha x piperita* و *Citrus aurantium*

## I

### Résumé

Le présent travail a pour objectif le screening de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Mentha x piperita* et *Citrus aurantium* de la région La Chiffa- Blida- Algérie.

Pour cela, une étude de la composition chimique ces huiles essentielles ainsi que leur activité biologique (antimicrobienne, antioxydante, antibiofilm) a été évalué.

Dans la première partie, une caractérisation et une identification des composants de ces huiles essentielles a été entreprise, et ce afin de comparer leur compositions avec les mêmes huiles essentielles issues d'autres régions.

Dans la deuxième partie, nous sommes intéressés à l'étude des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antibiofilm des huiles essentielles *Mentha x piperita* et *Citrus aurantium*

Les résultats de cette étude, montre que les huiles essentielles *Mentha x piperita* et *Citrus aurantium* sont capables d'inhiber in-vitro la croissance et la formation de biofilms de différentes espèces microbiennes et notamment de *Candida* par rapport les autres souches microbiennes.

Cependant, ces huiles essentielles présentent une activité antioxydante modérée en termes de piégeage des radicaux libres, et de la réduction du fer.

Pour entreprendre dans la troisième partie de comprendre l'effet d'une huile essentielle *Mentha x piperita* sur la transition de *C.albicans* qui constitue un élément de base dans sa pathogénicité, visualiser l'inhibition de la formation du biofilm et l'inhibition du biofilm mature de cette même espèce, et enfin comprendre l'expression génétique de *C.albicans* en présence de l'huile essentielle de *Mentha x piperita*.

**Mots clés :** Huiles essentielles, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Activité antibiofilm, *Mentha x piperita*, *Citrus aurantium*

## II

### **Abstract**

The present work aims to screen the antimicrobial activity of the essential oils of *Mentha x piperita* and *Citrus aurantium* from the region La Chiffa- Blida-Algeria.

For this, a study of the chemical composition of these essential oils and their activity biological (antimicrobial, antioxidant, antibiofilm) was evaluated.

In the first part, a characterization and identification of the components of these essential oils was undertaken, in order to compare their compositions with the same essential oils from other regions.

In the second part, we are interested in studying the antimicrobial, antioxidant and antibiofilm properties of the essential oils *Mentha x piperita* and *Citrus aurantium*

The results of this study show that the essential oils *Mentha x piperita* and *Citrus aurantium* are able to inhibit in-vitro the growth and formation of biofilms of different microbial species and in particular *Candida* compared to other microbial strains.

However, these essential oils have moderate antioxidant activity in terms of trapping of free radicals, and reduction of iron.

To undertake in the third part to understand the effect of a *Mentha x piperita* essential oil on the transition of *C. albicans* which constitutes a basic element in its pathogenicity, to visualize the inhibition of biofilm formation and the inhibition of mature biofilm of this same species, and finally understand the genetic expression of *C.albicans* in the presence of the essential oil of *Mentha x piperita*.

**Key words :** Essential oil, antioxydant, antimicrobial, antibiofilm, *Mentha x piperita* ,  
*Citrus aurantium*

## Liste des abréviations

*A.baumannii* : *Acinetobacterbaumannii*

**ADN** : Acide désoxyribonucléosique cyclique

**AmpB** : Amphotéricine B ou Fungizone®

**AMPc** : Adenosinemonophosphate complémentaire

**ARNm** : Acide ribonucléosique messenger

**BMR** : bactéries multirésistantes

**BSA** : Bovineserumalbumin

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BHA** : HydroxyanisoleButylé

**BHT** : HydroxyToluèneButylé

**BLSE** : Bétalactamase à spectre élargi

**BN** : Bouillon Nutritif

*C.albicans* : *Candida albicans*

**CD** : Cluster of determination

*C.koseri* : *Citrobacterkoseri*

*C.frendii* : *Citrobacterfrendii*

**CFU** : Colony-forming unit

**cfu/mL** : unités de colonies formés / millilitre

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**CPG** Chromatographie Phase Gazeuse

**CV** : Cristal violet

*d*: Densité relative

**DNase** : Désoxyribonucléase

**dNTPs** : désoxyribonucléotides

**D.O** : Densité Optique

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**EC50** : Efficient Concentration value (valeur de la concentration efficace)

*E.coli* : *Escherichia coli*

*E.faecalis* : *Enterobacterfaecalis*

*E.sakazaki* : *Enterobactersakazaki*

*E.cloacae* : *Enterobacter cloacae*

**Fig.** : Figure

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power

**g/L**: gramme / litre

**GN**: Gélose Nutritif

**H2O2**: Peroxyde d'hydrogène

**HCl** : Acide chlorhydrique

**HE** Huile essentielle

**I %** : Pourcentage d'inhibition

**IC50** : Inhibition Concentration value (valeur de la concentration inhibitrice)

**IR** : Indice de rétention

*K.pneumoniae* : *Klebsiellapneumoniae*

*K.oxytica* : *Klebsiellaoxytica*

**LC50** : Lethal concentration value (valeur de la concentration létale)

**LB** : Luria Bertani both

**MEB** : Microscopie électronique à balayage

**MH** : Muller-Hinton

**Min** : Minimum

**MTT** : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

*M.morganii* : *Morganellamorganii*

**Moy** : Moyenne (Mean)

**nm**: Nanomètre

**O2** : Oxygène

*P.multicoda* : *Pasteurella multicoda*

**Pb** : paire de bases

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne

**pH** : Potentiel d'hydrogène

*P.mirabilis* : *Proteus mirabilis*

*P.vulgaris* : *Proteusvulgaris*

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

**RNase**: Ribonucléase

**ROS**: Reactive oxygen species

**RT-PCR** : Reverse transcription polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse)

**Rt** : Temps de rétention

**R** : Résistant

**S**: Sensible

**Sap/SAP**: Secreted aspartyl protease (protease aspartyle sécrétée)

**SD** : Standard deviation (Ecart type)

***S.aureus*** : *Staphylococcus aureus*

***S.enteridis*** : *Salmonelle enteridi*

***S.hominis*** : *Staphylococcus hominis*

***S.marscences*** : *Serratiamarscences*

***S.maltophilia*** : *Stenotrophomonas maltophilia*

**tr**: Temps de rétention

**UV** : Ultraviolet

**µl**: Microlitre

**v/v** : volume / volume

**ZI** : Zone d'inhibition

## Liste des figures

**Figure 1** : Structures des virus (<http://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/structure-virale/>)

**Figure2** : Structure d'une bactérie (<http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html>)

**Figure 3** : Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa* (Ruim et Andremont, 2004).

**Figure 4** : Processus de développement d'un biofilm (Sauer et al., 2007)

**Figure 5**: Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahia et al., 2017).

**Figure 6** : Principales cibles cellulaires des antifongiques.

**Figure7** : Prévalence des infections fongiques systémiques (Fernández-García et al., 2017)

**Figure 8** : Mécanisme d'action des antiviraux

**Figure 9** : Séquences et structures de quelques peptides cationiques antimicrobiens (adapté de Hancock et Sahl, 2006)

**Figure 10**: Mode d'action des peptides antimicrobiens (adapté de Brogden, 2005)

**Figure 11** : structure chimique de quelques composants des huiles essentielles

**Figure 12** : Schéma des principaux sites et mécanismes d'action des huiles essentielles et de leurs composants dans la cellule bactérienne (Burt, 2004).

**Figure13**: Des observations en microscopie électronique à transmission réalisées par Rasooli et al. 2006 sur des bactéries de *Listeria monocytogenes*

**Figure 14** : Micrographies électroniques à balayage de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Kwon et al., 2003).

**Figure 15**: Micrographies en microscopie à transmission de *Staphylococcus aureus* contrastés à l'acétate d'uranyle (Guinoiseau et al., 2011).

**Figure 16** : Feuilles et tiges de la *M. piperita*

**Figure 17**: Fleurs, feuilles et fruits de *Citrus aurantium*

**Figure 18**: Schéma d'un distillateur pour extraction d'huiles essentielles

**Figure 19**: Réaction du DPPH avec un antioxydant [Molyneux, 2004]

**Figure 17**: Evaluation de l'activité DPPH des HEs

**Figure 18**: Evaluation du test FRAP des HEs

**Figure 19**: Schéma représente la méthode de l'aromatogramme (Zaika, 1988)

**Figure 20**: Schéma récapitulatif illustrant la méthode micro atmosphère (Zaika, 1988)

**Figure 21** : Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur les biofilms par la méthode de cristal violet

**Figure 22** : Evaluation de l'effet de l'HE *C.aurantium* sur les biofilms par la méthode de cristal violet

**Figure 23**: Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur l'activité métaboliques des biofilms

**Figure 24** : Evaluation de l'effet de l'HE *C.aurantium* sur l'activité métaboliques les biofilms

**Figure 25** : Effet des HE de *M.piperita* liquide sur la croissance de *C.albicans* .

**Figure 26**: Effet des vapeurs de l' HE de *M.piperita* sur la croissance de *C.albicans*

**Figure A 27** : Observation microscopique de l'effet de l'HE *M.piperita* sur la transition de *C.albicans*

**Figure B 28** : Effet de l'HE *M.piperita* sur la transition de *C.albicans*

**Figure 29** : Observation au microscopie électronique de l'effet de l'HE *M.piperita* sur *C.albicans*

**Figure 30** : L'Effet de l' HE et leurs vapeurs à réduire la formation de biofilm

**Figure 31**: L'Effet de de l'HE *M.piperita* sur les biofilms matures de *C. albicans* **Figure 26** : L'effet de l'HE sur l'expression les gènes Sap 1 de *C. albicans*

**Figure 32** : L'effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 2 de *C. albicans*

**Figure 33**: L'effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 3 de *C. albicans*

**Figure 34** : L'effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 9 de *C. albicans*

**Figure 35**: L'effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 10 de *C. albicans*

**Figure 36** : L'effet de l'HE sur l'expression des gènes HWP1 de *C. albicans*

## **Liste des Tableaux**

- Tableau 1:** Principaux agents pathogènes pour l'homme découverts depuis 35 ans (1980 2016)(Aubry , *et al.*,2016)
- Tableau 2 :** Mode d'action des principales classes d'antibiotiques (Guinoiseau ,2011)
- Tableau 3 :** principales classes des antifongiques et leur mode d'action
- Tableau 4 :** Principales caractéristiques physiques de quelques terpènes
- Tableau 5:** Activité biologique des molécules aromatiques selon leur fonction chimique (Hernandez, 2005).
- Tableau 6:** caractéristiques physico- chimiques des HEs étudiées
- Tableau 7:** caractéristiques physico- chimiques des HEs étudiées
- Tableau 8 :** Les constituants majoritaires de l'HE *M.piperita*
- Tableau 9 :** Les constituants majoritaires de l' HE *C.aurantium*
- Tableau 10:** Comparaison avec les normes AFNOR
- Tableau 11:** Variation de la composition chimique de l'HE de *M.piperita* suivant les régions.
- Tableau 12 :** IC50 des HEs , Acide ascorbique, BHT
- Tableau 13:** Souches microbiennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne
- Tableau 14:** Activité antimicrobienne des HEs
- Tableau 15 :** Effet des vapeurs des HEs sur la croissance microbienne
- Tableau 16:** Description des paires d'amorces utilisées dans les réactions de PCR quantitative

## Sommaire

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

#### Chapitre 1 Les maladies infectieuses

1. Définition .....	1
2. Généralités.....	1
3. Maladies émergentes ou ré-émergentes .....	2
3. 1 - Maladies anciennes ré-émergentes.....	2
3. 2 - Maladies anciennes.....	2
3. 3 - Maladies nouvelles émergentes .....	4
4 -Epidémiologie des maladies infectieuses.....	4
5. Les agents infectieux.....	5
5.1. Les virus.....	5
5.2. Les bactéries.....	6
5.3. Les champignons parasites.....	8
5.4. Les protozoaires.....	9
6. Les biofilms.....	10
6.1. Définition.....	10
6.2. Les biofilms dans les divers environnements.....	10
6.3. La formation d'un biofilm.....	11
6.4. Le biofilm dans la résistance bactérienne aux traitements antimicrobiens.....	12

#### Chapitre 2 Les traitements anti infections

1. Les antibiotiques.....	13
1.1. Généralités.....	13
1.2 . Le mode d'action des antibiotiques .....	13
1.3. Toxicité des Antibiotiques.....	15

1.4. La résistance aux antibiotiques.....	16
1-5 Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques.....	17
2. Les antifongiques .....	19
2.1. Généralités .....	19
2.2. Mode d'action des antifongiques .....	21
2.3. Toxicité des antifongiques.....	23
2.4. La résistance aux antifongiques.....	23
2.5. Epidémiologie de la résistance aux antifongiques.....	24
3. Les molécules utilisées en chimiothérapie virale.....	26
3.1 .Généralités.....	26
3.2. Mode d'action des antiviraux.....	26
3.3. Toxicité des antiviraux .....	28
3.4. Résistance aux antiviraux.....	28
3.5. Epidémiologie de la résistance aux antiviraux.....	28
4. Autres molécules .....	29
5. Les nouveaux traitements .....	29
5.1. Les bactériophages.....	29
5.1.1. Les propriétés et mécanismes d'action des bactériophages.....	29
5.1.2. L'avenir de la phagothérapie .....	30
5.1.3. Inconvénients de la phagothérapie .....	30
5. 2. Les peptides antimicrobiens.....	31
5.2-1 Les peptides cationiques antimicrobiens (PCAs).....	31
1-1 Aspects structuraux.....	31
5. 2-1-2 Mode d'action .....	33
5. 2-2 Les peptides anioniques antimicrobiens.....	36
5. 2-3 Les applications des peptides antimicrobiens.....	36
5. 2.4. Les inconvénients des PAM.....	38
6. Les plantes.....	38
7- Les Huiles essentielles.....	40
7.1. Définition et répartition dans le règne végétal.....	40
7.2. Aperçu historique.....	41
7.3. Propriétés physiques.....	42
7.4. Propriétés chimiques .....	42
7.4.1. La composition chimique des huiles essentielles.....	43

7.4.2. Constituants et structures .....	43
7.5. Les activités biologiques des huiles essentielles.....	46
7.6. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles.....	48
7.7. Activité anti biofilms des huiles essentielles.....	49
7.8. Mécanisme d'action des huiles essentielle.....	49
7.9. Activité antioxydante des huiles essentielles.....	55
7.9.1. Le stress oxydatif.....	55
7.9.2. Les antioxydants.....	56
7.10. La toxicité des huiles essentielles.....	58

**PARTIE EXPERIMENTALE**

**Chapitre 1 Description des plantes utilisées**

1. La menthe poivrée ( <i>Mentha piperita</i> ).....	59
1.1. Présentation.....	59
1.1.1 Origine et culture.....	59
1.1.2. Bref historique sur l'utilisation de la plante.....	59
1.1.3. Description botanique.....	59
1.1.4. Position systématique.....	60
1.1.5. Appellations .....	61
1. 2. L'huile essentielle de la menthe poivrée.....	61
1. 3. Utilisations et propriétés biologiques.....	62
1.4. Effets thérapeutiques – aromathérapie.....	62
1. 5. Toxicité .....	64
2. Le Bigaradier ( <i>Citrus aurantium</i> ).....	65
2.1. Présentation .....	65
2.1.1. Origine et culture.....	65
2.1.2. Bref historique sur l'utilisation de la plante.....	65
2. 1.3. Description botanique.....	65
2.1.4. Position systématique.....	66
2.1.5. Appellations .....	66
2.2. L'huile essentielle du bigaradier .....	67
2.3. Utilisations et propriétés biologiques.....	67
2.4. Effets thérapeutiques – aromathérapie.....	67
2.5. Toxicité .....	69

## **Chapitre 2 Caractérisation des huiles essentielles *M.piperita* et *C.aurantium***

1. Matériel végétal et extraction d'huile essentielle.....	71
2. Détermination des indices physico-chimiques des HEs .....	73
2.1. Caractéristiques organoleptiques .....	73
2.2. Détermination du pH .....	73
2.3. La densité relative.....	73
2.4. Miscibilité à l'éthanol .....	74
3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	75
3.1. Condition analytiques .....	75
3.2. Identification des composés.....	76
4. Résultats .....	77
5. Discussion.....	80

## **Chapitre 3 Activité biologique des huiles essentielles *M.piperita* et *C.aurantium***

1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	85
1.1. Essai de piégeage du radical libre le 2,2-diphényl 1picrylhydrazyl(DPPH).....	85
1.2. La méthode de réduction de fer « <i>FerricReducingAntioxidant Power</i> (FRAP).....	87
2. Résultats .....	88
3. Discussion .....	90

## **Chapitre 4 Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles *M.piperita* et *C.aurantium***

1. Matériel.....	93
1.1. Les souches microbiennes .....	93
1.2. Les antibiotiques, antifongiques et solvants utilisés .....	94
2. Méthodes.....	95
2.1. Pré-culture des souches microbiennes.....	95
2.2. Activité sur la croissance microbienne.....	97
2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par la technique de micro atmosphère.....	97
2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice .....	98
2.5. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide.....	99
2.6. Activité anti biofilm.....	99

2.7. Evaluation de l'activité métabolique des biofilms.....	100
2.8. Traitement statistique des résultats.....	101
3. Résultats .....	102
4. Discussion.....	117

**Chapitre 5 Les effets de l'huile essentielle de *Menthapiperita* sur *C. albicans* : Croissance, transition, formation de Biofilm, et l'expression des gènes**

1. Matériels.....	125
2. Méthodes.....	125
2.1. Effet de l' HE de <i>M.piperita</i> sur la croissance de <i>C.albicans</i> en milieu liquide.....	125
2.2. Effet de l'HE de <i>M.piperita</i> sur la formation de biofilm de <i>C. albicans</i> .....	127
2.3. Effet de l'HE de <i>M.piperita</i> sur la dégradation des biofilms matures de <i>C. albicans</i> .....	127
2.4. Détermination de l'effet l'HE de <i>M.piperita</i> de sur le bourgeonnement cellulaire de <i>C. albicans</i> .....	127
2.5. La microscopie électronique à balayage.....	128
2.6. Effet de l'HE de <i>M.piperita</i> sur l'activation / la répression des gènes de <i>C. albicans</i> .....	129
2.7. Analyses statistiques.....	131
3. Résultats.....	132
4. Discussion.....	141

**Conclusion.....**145

**Références Bibliographiques.....**147

**Annexes**

**Publications**

## Liste des abréviations

*A.baumannii* : *Acinetobacterbaumannii*

**ADN** : Acide désoxyribonucléosique cyclique

**AmpB** : Amphotéricine B ou Fungizone®

**AMPc** : Adenosinemonophosphate complémentaire

**ARNm** : Acide ribonucléosique messenger

**BMR** : bactéries multirésistantes

**BSA** : Bovine serum albumin

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BHA** : HydroxyanisoleButylé

**BHT** : HydroxyToluèneButylé

**BLSE** : Bétalactamase à spectre élargi

**BN** : Bouillon Nutritif

*C.albicans* : *Candida albicans*

**CD** : Cluster of determination

*C.koseri* : *Citrobacterkoseri*

*C.frendii* : *Citrobacterfrendii*

**CFU** : Colony-forming unit

**cfu/mL** : unités de colonies formés / millilitre

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**CPG** Chromatographie Phase Gazeuse

**CV** : Cristal violet

**d**: Densité relative

**DNase** : Désoxyribonucléase

**dNTPs** : désoxyribonucléotides

**D.O** : Densité Optique

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**DZI** : Diamètre de la zone d'inhibition

**EC<sub>50</sub>** : Efficient Concentration value (valeur de la concentration efficace)

***E.coli*** : *Escherichia coli*

***E.faecalis*** : *Enterobacterfaecalis*

***E.sakazaki*** : *Enterobactersakazaki*

***E.cloacae*** : *Enterobacter cloacae*

**Fig.** : Figure

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power

**g/L**: gramme / litre

**GN**: Gélose Nutritif

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène

**HCl** : Acide chlorhydrique

**HE** Huile essentielle

**I %** : Pourcentage d'inhibition

**IC<sub>50</sub>** : Inhibition Concentration value (valeur de la concentration inhibitrice)

**IR** : Indice de rétention

***K.pneumoniae*** : *Klebsiella pneumoniae*

***K.oxytica*** : *Klebsiella oxytica*

**LC<sub>50</sub>** : Lethal concentration value (valeur de la concentration létale)

**LB** : Luria Bertani

**MEB** : Microscopie électronique à balayage

**MH** : Muller-Hinton

**Min** : Minimum

**MTT** : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

***M.morganii*** : *Morganella morganii*

**Moy** : Moyenne (Mean)

**nm**: Nanomètre

**O<sub>2</sub>** : Oxygène

***P.multicoda*** : *Pasteurella multicoda*

**Pb** : paire de bases

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne

**pH** : Potentiel d'hydrogène

***P.mirabilis*** : *Proteus mirabilis*

***P.vulgaris*** : *Proteus vulgaris*

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

**RNase:**Ribonucléase

**ROS:** Reactive oxygen species

**RT-PCR :** Reverse transcription polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse)

**Rt :** Temps de rétention

**R :** Résistant

**S:** Sensible

**Sap/SAP:** Secreted aspartyl protease (protease aspartyle sécrétée)

**SD :** Standard deviation (Ecart type)

***S.aureus* :** *Staphylococcus aureus*

***S.enteridis* :** *Salmonelle enteridi*

***S.hominis* :** *Staphylococcus hominis*

***S.marscences* :** *Serratiamarscences*

***S.maltophilia* :** *Stenotrophomonas maltophilia*

**tr:** Temps de rétention

**UV :** Ultraviolet

**µl:** Microlitre

**v/v :** volume / volume

**ZI :** Zone d'inhibition

## **Introduction**

La lutte contre la maladie infectieuse a toujours été un challenge pour l'Homme, animée par l'instinct de survie, ou utopie à la recherche de l'éternité, elle est passée par plusieurs étapes au fil de l'histoire.

Aujourd'hui plus que jamais, ce défi que l'on a cru gagné semblerait être perdu et le champ d'action face aux microbes régresse : d'un côté, l'adaptabilité des germes et l'évolution de ces derniers, mais aussi des erreurs dans l'action humaine face à ces germes.

Actuellement, les maladies infectieuses sont un élément à prendre sérieusement dans les politiques de la santé publique. Le risque d'apparition de nouvelles épidémies et de leur propagation à l'échelle planétaire dans un monde connecté n'a jamais été aussi accru. **(Dali,2015)**.

Toutefois le tracas le plus épineux demeure la résistance acquise des germes aux molécules utilisées dans la chimiothérapie antimicrobienne. Il faut noter que les traitements des maladies infectieuses représentent une classe particulière de médicament et ce, est dû essentiellement au fait que leur mauvaise utilisation n'engendre pas uniquement des effets non souhaitables au plan individuel mais aussi des effets délétères pour la communauté **(Walsh et Wanbcezwicz, 2003)**.

La vitesse avec laquelle la résistance microbienne se développe pèse lourdement, et accable, au moment où la marge de manœuvre se voit réduire. Quelle alternative alors peut-on faire face à cette évolution qui échappe à notre contrôle ? Deux visions qui ne sont pas totalement opposés, elles peuvent même être complémentaires. La première tend à faire prolonger la durée de vie des molécules existantes sur le marché, essentiellement par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des germes en cause, mais aussi, des mécanismes d'action des antibiotiques à l'échelle moléculaire, tout cela accompagné d'une rationalisation de la prescription et l'utilisation de ces médicaments **(Meridith et al., 2015)**. Une autre pensée penche plutôt vers la recherche de nouvelles molécules. Il est à noter que l'évolution de cette branche de thérapie était historiquement portée par deux courants distincts et parallèles, celui de la recherche de molécules dans la nature et de l'autre coté la synthèse de molécules nouvelles par des procédés purement chimiques **(Walsh et Wencewicz, 2003)**.

Dans cette perspective, les molécules isolées à partir des règnes de la nature notamment des espèces végétales constituent un choix indétournable pour la recherche.

L'utilisation des plantes aromatique et des huiles essentielles en thérapeutique, remonte aux temps les plus anciens. Elles sont utilisées depuis des siècles dans les préparations alimentaires non

seulement pour la saveur qu'elles apportent mais, également pour leurs propriétés antimicrobiennes et anti inflammatoires (**Taleb-Toudert,2015**).

En outre, l'utilisation des huiles essentielles est de plus en plus populaire pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires, vu que les consommateurs sont plus conscients des problèmes de santé causés par plusieurs conservateurs de synthèse (**Mohammedi et al.,2011**).

L'Algérie, par sa situation géographique, se trouve dotée d'une végétation riche et diverse un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y poussent spontanément. A cette grande diversité floristique, s'ajoute une tradition ancestrale d'utilisation traditionnelle des plantes. En effet malgré les progrès réalisés en médecine, une multitude de la population a recours aux plantes pour se soigner.

La flore Algérienne, avec ses 3000 espèces offre une diversité dans les familles botaniques, parmi lesquelles 15% endémiques (**Quezel et Santa,1963**), ce patrimoine demeure très peu explorée aussi bien sur le plan pharmacologique que phytochimique.

La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale, sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique Algérienne et aura un impact économique certain.

Ainsi, cette présente étude s'inscrit dans ce cadre. Par elle consiste en un screening de molécules a activité antimicrobienne : l'essentiel de cette recherche est d'essayer d'évaluer d'éventuelles activités antimicrobiennes et biologiques des huiles essentielles de la menthe poivrée (*Mentha piperita*) et le bigaradier (*Citrus aurantium*) .

# Chapitre 1 : Les maladies infectieuses

## 1. Définition

L'infection est la conséquence du développement, dans un organisme sain, de microorganismes pathogènes: bactérie, parasite, virus ou autres. Elle résulte de la rupture de l'équilibre qui existe entre microorganismes, et l'Homme (hôte). Ce déséquilibre être causé soit par une diminution des défenses du sujet (innée ou acquise), soit par un accroissement de virulence de germes (Benzeggoutta *et al.*, 2005).

## 2. Généralités

Au cours de ces dernières décennies, les maladies infectieuses semblaient être maîtrisées suite au déploiement des mesures d'hygiène et à l'utilisation des différents traitements et des vaccins. Les avancées scientifiques et technologiques ont même laissé croire à une possible éradication de nombreuses pathologies ; celle de la variole à la fin des années 1970 par la vaccination généralisée en a été le symbole (Sansonetti et Orth, 2006). La résurgence des maladies infectieuses et des parasitoses ainsi que l'apparition régulière de nouveaux vecteurs infectieux ont démenti ce pronostic optimiste. Les faits sont concluants:

- La persévérance d'endémies dans les pays en développement et le risque de pathologies d'importation dues aux voyages intercontinentaux;
- La résistance des microorganismes aux traitements ;
- Le sida et les hépatites B et C, ainsi que quelques formes de grippe sont devenus endémiques;
- Les toxi-infections d'origine alimentaire ;
- L'émergence des infections nosocomiales ;
- La menace de catastrophes économiques dues à la résurgence d'épizooties avec le risque de transmission à l'Homme ;
  - Les risques probables du bioterrorisme microbiologiques : utilisation de *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* et le virus de la variole).
  - L'impact du réchauffement global de la planète, modifications de l'écosystème (travaux de déforestation, travaux d'irrigation, construction de routes, construction de voies ferrées, créations de zones suburbaines mal contrôlées, déplacement dépopulation,...) sur les agents infectieux, leurs réservoirs et leurs vecteurs (Connolly *et al.*, 2004; Desenclos et De Valk, 2005).

### 3. Maladies émergentes ou ré-émergentes

Une maladie émergente est définie comme « une infection dont l'incidence chez les humains a augmenté au cours des deux dernières décennies ou dont le risque d'augmentation de l'incidence est vraisemblable dans un futur proche » (Thomas *et al.*, 2003).

Les émergences des maladies infectieuses transmissibles sont en 2018 une préoccupation majeure pour les responsables de santé publique humaine ou animale. Pour la plupart, les maladies infectieuses émergentes trouvent leur origine dans le monde animal, et en voici quelques exemples :

#### 3.1. Maladies anciennes ré-émergentes

- **Peste** : épidémie en Inde en 1994, pays indemne depuis 1956; épidémie à Madagascar dans la ville de Mahajanga en 1991, dernier cas en 1928; épidémie à Oran (Algérie) en 2003, 50 ans après le dernier cas; épidémie au Kirghizistan en 2013, 30 ans après le dernier cas dépisté.

- **Trypanosomiase humaine africaine**: réémergence en Afrique centrale (Angola, RDC, Soudan, RCA, Congo, pays ayant été ou étant en guerre déclarée ou larvée) d'une maladie oubliée 1970-1980.

#### 3.2. Maladies anciennes

Connues avant 1980, émergentes dans d'autres pays ou dans d'autres régions d'un même pays :

- **Infection à virus *Monkey-pox***: le virus *Monkey-pox* isolé chez des macaques en 1958 a causé une première épidémie humaine en 1970 en RDC. Des cas ont été rapportés en 2003 aux États-Unis.

- **Infection à virus *Chikungunya***: Connue en Afrique depuis 1952, puis en Asie, l'infection à virus *Chikungunya*(CHIK) a atteint l'océan Indien en 2004-2005, puis les Caraïbes et le continent américain en 2013 où la maladie s'est propagée dans 33 pays et territoires. Puis, le virus *Chikungunya* CHIKV a atteint l'Océanie en 2014.

- **Maladie à virus *Ebola*** : connue en Afrique centrale depuis 1976, la maladie à virus Ebola (MVE) a «explosé» durant l'été 2014 en Afrique de l'Ouest dans 3 pays : la Guinée, le Libéria et la Sierra Léone. L'incidence des cas a ensuite commencé à diminuer grâce à l'intensification rapide des capacités de traitement, d'isolement et d'inhumation sûre dans les 3 pays. La fin de l'épidémie a été déclarée la fin mars 2016.

- **Maladie à virus *Zika***: la première épidémie est survenue dans le Pacifique (île de Yap en Micronésie) en 2007. La deuxième épidémie a touché la Polynésie en 2013. L'épidémie actuelle a atteint l'Amérique du Sud et l'Amérique centrale en 2015. Le virus *Zika* a été détecté en 2015 en Afrique au Cap Vert. Puis, en décembre 2015 dans les départements français d'Amérique. La menace plane sur les États-Unis et l'Europe : un premier cas de virus *Zika* a été dépisté au Texas après un voyage au Salvador ; cinq cas importés ont été confirmés fin janvier 2016 en France métropolitaine

chez des touristes de retour en métropole. L'OMS a estimé, dans son rapport du 01/02/2016, que nous étions face à une « urgence de santé publique de portée mondiale ».

### 3.3. Maladies nouvelles émergentes

Dans le monde depuis 1980. L'infection à VIH/Sida signait le renouveau des maladies infectieuses, marqué par l'émergence de nouvelles maladies transmissibles, mais aussi par la réémergence de maladies anciennes. Les progrès techniques en biologie moléculaire (clonage, PCR, RT-PCR) ont permis la mise en évidence ce renouveau. (Tableau 1)

**Tableau 1.** Principaux agents pathogènes pour l'homme découverts depuis 35 ans (1980-2016). (Aubry *et al.*,2012)

Germe	Microorganisme	Année	Méthodes de diagnostic	Pouvoir pathogène
Bactéries	<i>Staphylocoque doré</i>	1981	Culture	Syndrome du choc toxique
	<i>producteur de toxine</i>	1982	ELISA, WB, PCR	Maladie de Lyme
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	1982	Culture	Colite hémorragique
	<i>Escherichia coli</i> O157	1983	Test à l'uréase	Ulcère gastrique
	<i>Hélicobacter pylori</i>	1989	IFD, ELISA	Pneumopathies
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1990	Histologie	Angiomatose bacillaire
	<i>Bartonella henselae</i>	1992	Culture	Choléra
	<i>Vibrio cholerae</i> O139	1992	Histologie	Maladie de Whipple
	<i>Trophery mawhipplelii</i>	1993	Cultures	Mycobactérioses atypique
Parasites	<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	1985	Microscopie	Diarrhées chroniques
	<i>Septata intestinalis</i>	1992	Microscopie	Diarrhées chroniques
	<i>Cyclosporacayetanensis</i>	1993	Microscopie	Turista,diarrhées chroniques
Champignons	<i>Penicilium marneffi</i>	1992	Culture	Pénicilliose
Virus	<i>HTLV1</i>	1980	ELISA, WB	Leucémie à cellules T
	<i>HTLV2</i>	1982	ELISA, WB	Leucémie à cellules T
	<i>VIH1</i>	1983	ELISA, WB	Infection à VIH/SIDA
	<i>VIH2</i>	1985	ELISA, WB	Infection à VIH/SIDA
	<i>HHV6</i>	1986	IF, ELISA, WB	Roséole
	<i>VHC</i>	1989	ELISA, PCR	Hépatite virale C
	<i>VHE</i>	1990	ELISA, PCR	Hépatite virale E
	<i>HHV7</i>	1993	IF, ELISA, WB	Roséole
	<i>Virus « sin nombre »</i>	1993	ELISA, PCR	SDRA et choc
	<i>VHG</i>	1993	ELISA, PCR	Hépatite virale G

<i>HHV8*</i>	1994	ELISA, PCR	Maladie de Kaposi
<i>Virus Hendra</i>	1994	PCR	Encéphalite
<i>TTV</i>	1997	ELISA, PCR	Hépatites non A-G
<i>A/H5N1</i>	1997	PCR	Grippe aviaire
<i>Virus Nipah</i>	1998	PCR	Encéphalite
<i>Coronavirus (SRAS/CoV)</i>	2003	PCR	SRAS
<i>A/H1N1</i>	2009	RT-PCR	Grippe A
<i>Coronavirus</i>	2013	RT-PCR	Nouveau coronavirus
<i>(MERS/CoV)A//H7N9</i>	2013	RT-PCR	Grippe aviaire

#### 4. Epidémiologie des maladies infectieuses

Avec une mortalité de près de 15 millions par année, les maladies infectieuses et parasitaires sont responsables de 26,3 % des décès causés par l'ensemble des maladies et des traumatismes survenant sur la planète (OMS, 2002). Les principaux types d'infections responsables de décès sont les infections respiratoires aiguës (3,9 millions par an), le sida (2,9 millions par an), les maladies diarrhéiques (2 millions par an), la tuberculose (1,6 million par an) et le paludisme (1,1 million par an). La rougeole cause encore 745 000 décès en dépit de l'existence d'un vaccin efficace, bien toléré et abordable (**Sansonetti et Orth, 2006**).

Plus de 90 % des maladies infectieuses humaines surviennent dans les pays en voie de développement, particulièrement chez les enfants, dans les régions les plus déshéritées, où l'hygiène générale et individuelle est insuffisante et où les politiques de prévention sont quasi inexistantes, inadaptées ou insuffisamment financées (**McMichael, 2004**).

Cependant, le développement industriel génère aussi dans les pays industrialisés de nouvelles conditions d'émergence infectieuse, comme les infections alimentaires via la chaîne du froid ou de l'industrialisation de la chaîne alimentaire, les infections nosocomiales, et les infections opportunistes chez les patients immunodéprimés et les infections des voyageurs (**McMichael et Butler, 2004**). Bien que de moindres prévalences dans les pays industrialisés, les maladies infectieuses y sont encore responsables d'une mortalité non négligeable. Il est également important de signaler qu'un pourcentage important de cancers (de 15 à 20 %) sont probablement causés par un agent infectieux viral ou bactérien (**Sansonetti et Orth, 2006**). Les cancers du foie, du col utérin, du cavum et de l'estomac pourraient être quasi éradiqués par la mise au point ou l'utilisation (lorsque disponibles) de vaccins, respectivement contre les virus des hépatites B (vaccin disponible) et C, certains papillomavirus (vaccins en partie disponibles), Epstein barr virus et *Helicobacter pylori*. Il est par ailleurs probable que des infections constituent un facteur de risque dans l'étiologie de

maladies touchant une large fraction de la population du globe, telles que l'athérosclérose avec *Chlamydia pneumoniae* (Yamashita et al., 1998) et le diabète avec *Helicobacter pylori* (Jeon et al., 2012).

Les décès et la morbidité liés aux maladies infectieuses ont un coût économique et social considérable. Ce poids porte essentiellement sur les populations les plus défavorisées de la planète (McMichael et Butler, 2004). Grâce à l'index Daly (Disability adjusted life years) qui intègre le nombre annuel de vies perdues à cause d'une maladie donnée, multiplié par un coefficient de ressources par individu, les pertes économiques subies peuvent être évaluées. Avec un Daly de 30 %, les maladies infectieuses représentent la fraction la plus élevée du poids socio-économique total des maladies. Ce taux est plus élevé comparativement aux maladies neuropsychiatriques (12,9 %), la traumatologie (12,2 %), la pathologie maternelle périnatale (11 %), les maladies cardio-vasculaires (9,9 %) et le cancer (5,1 %) (Sansone et Orth, 2006). Les simulations montrent, particulièrement dans le cas de la tuberculose, du sida et du paludisme, que la prévention et le contrôle des maladies infectieuses dans les régions endémiques représentent une approche socio-économique rentable et humaniste (Sansone et Orth, 2006; OMS, 2002).

## 5. Les agents infectieux

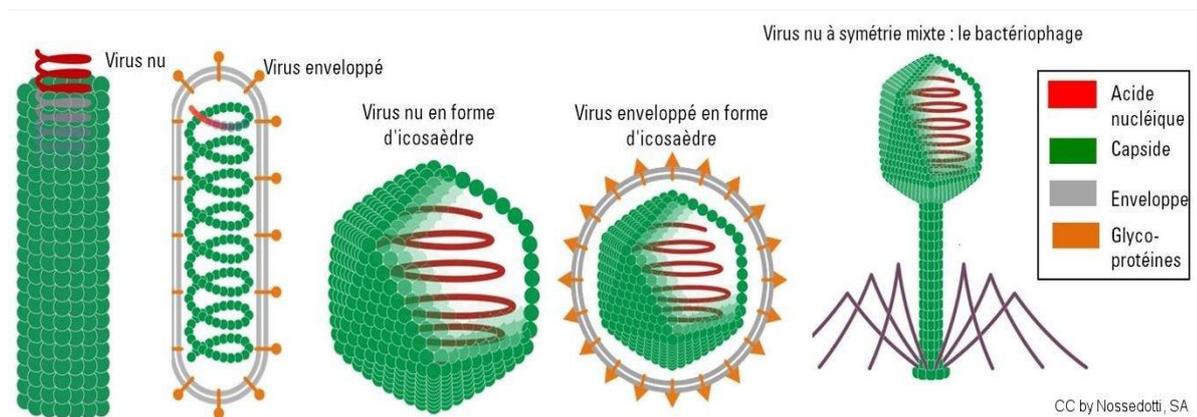
Les organismes responsables des infections chez l'Homme sont une très large gamme de groupes taxinomiques, qui vont des vers aux virus, une diversité considérable tant en termes de taille qu'en organisation :

### 5.1. Les virus

La notion de maladie virale remonte à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, avec la mise en évidence d'affections transmissibles par des agents ultra-filtrables et invisibles jusqu'à l'avènement de la microscopie électronique, et l'évolution de la biologie moléculaire mettant en évidence l'apoptose, les nécroses causés par cet agent infectieux. (Rouabhia, 1996).

Les virus sont des agents infectieux dont l'hôte peut être toute forme de vie : des bactéries à l'homme en passant par les champignons, les plantes et les animaux (Mims et al., 1966). Ils portent l'information génétique dans leur ADN ou ARN, mais étant métaboliquement inertes ils ne peuvent se répliquer qu'après avoir infecté un hôte, parasitant ainsi l'habilité de l'hôte à transcrire l'information génétique (Kayser et al., 2008).

Un virus est constitué d'un génome viral formé d'un type d'acide nucléique (ADN ou ARN) protégé par une coque protéique : la capside. L'ensemble formé par la capside et l'acide nucléique est nommé nucléocapside. Chez certains virus, la nucléocapside est entourée d'une enveloppe ce qui permet de distinguer les virus nus, sans enveloppe, des virus enveloppés (figure 1).



**Figure 1.** Structures des virus (<http://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/structure-virale/>)

Les virus varient en taille de 20 nanomètres de diamètre, comme les *Parvoviridae*, à plusieurs centaines de nanomètres de longueur dans le cas des *Filoviridae*.

Des études menées sur les virus ont récemment démontré que les virus ont connu beaucoup de diversité dans les régimes de la dérive génétique, selon le génotype hôte. (Rousseau et al., 2017).

La classification des virus en grands groupes (familles) est basée sur quelques critères simples incluant le type d'acide nucléique du génome, le nombre de brins et la polarité des chaînes d'acides nucléiques, le mode de répllication, la taille, la structure et la symétrie des particules virales (Lemahieu et Decoster, 2009)

## 5.2. Les bactéries

Les bactéries sont des cellules procaryotes avec une organisation cellulaire caractéristique ;

Les bactéries sont ubiquitaires et la plupart ont un effet bénéfique, soit pour leur potentiel économique (utilisation commerciale), soit pour leur action sur le corps humain (flore commensale) ou sur les différents écosystèmes dans lesquels nous vivons (Mims et al., 1966). Comparativement au grand nombre de bactéries vivant librement, il y en a relativement peu qui causent des pathologies avec un impact important sur le bien-être des humains.

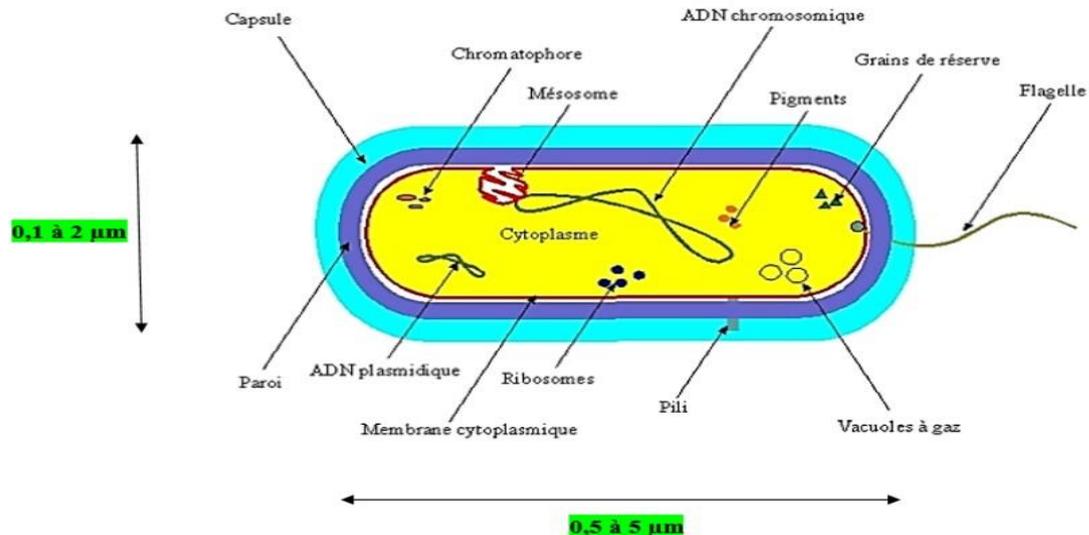
Leur importance est telle que les principales ont été bien étudiées et sont actuellement bien connues. Cependant, de nouveaux pathogènes continuent à émerger entraînant l'apparition d'infections méconnues, ainsi des cas d'infections à *Photobacterium symbiotica*, ont été récemment signalés aux États-Unis et en Australie (da Costa et al., 2010).

Les cellules bactériennes ont une petite taille (0,3 à 0,5 µm). Elles peuvent avoir deux formes de base : la coque et le bacille (Mims et al., 1966 ; Kayser et al., 2008).

La cellule bactérienne (Figure 2) est entourée d'une enveloppe rigide : la paroi, qui lui confère forme et résistance; et une enveloppe plus mince qui est la membrane cytoplasmique. Un cytoplasme

homogène ou se trouve ribosomes ; vacuoles à gaz et pigments. Un filament d'ADN constitue son appareil nucléaire : il forme un chromosome unique.

À côté de ces éléments constants, la cellule bactérienne peut posséder une capsule, des flagelles, des pili ou fimbriae.



**Figure2.** Structure d'une bactérie (<http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html>)

### Comportement social des bactéries : le quorum sensing

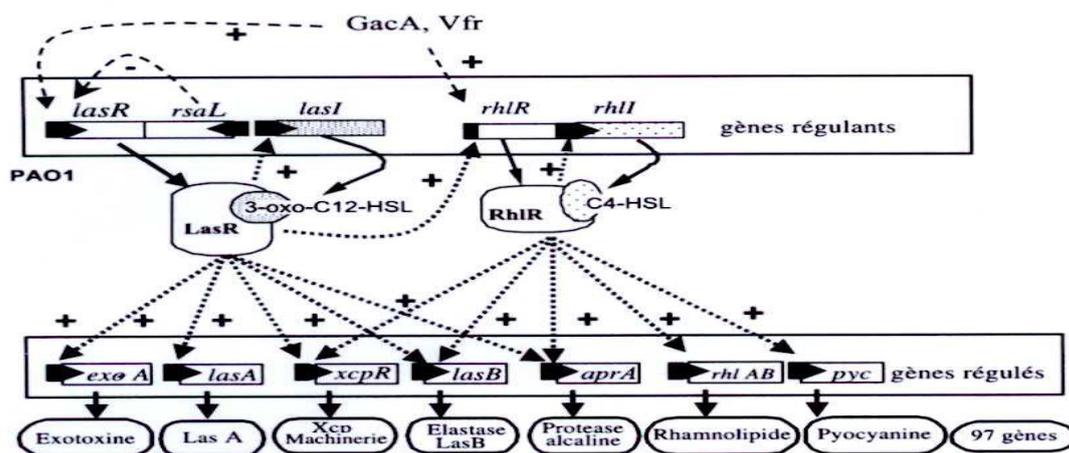
**La détection du quorum** (*quorum sensing* en anglais) est un ensemble de mécanismes régulateurs qui contrôlent l'expression coordonnée de certains gènes bactériens au sein d'une même population bactérienne (Millet et al., 2014).

De nombreuses bactéries pathogènes produisant des facteurs de virulence sous le contrôle du quorum sensing (QS), inhiber celui-ci pourrait constituer un moyen efficace d'atténuer la virulence des agents infectieux (Ruimy and Andremont, 2004).

Le principe de fonctionnement du QS repose sur le fait que chaque cellule de la population produit l'AHL à un niveau de base ; la concentration en cette molécule signal augmente donc avec la population. Quand celle-ci atteint un certain seuil (quorum), l'AHL se lie à une protéine réceptrice, lui permettant d'exercer un rôle de régulation au niveau de la transcription de l'expression de certains gènes regroupés en opéron. Cette expression peut résulter en production de biofilm, de facteurs de virulence, ou de luminescence (Ruimy et Andremont, 2004).

Dans les années 1990, ces mécanismes ont été découverts chez des bacilles à Gram négatif comme le *Pseudomonas aeruginosa*, responsable de diverses infections nosocomiales. Ses biofilms

constituent la cause principale de persistance de pneumopathie chez les patients souffrant de mucoviscidose et d'infection oculaire chez les porteurs de lentilles de contact (Driscoll et al., 2007). Pour déclencher une infection, la bactérie doit produire un groupe de molécules qui déterminent la pathogénicité (facteurs de virulence) (Figure 3) ; il s'agit d'une étape cruciale pour la survie du pathogène et le succès de l'invasion de l'hôte (Passador et al, 1993).



**Figure 3.** Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa* (Ruim et Andremont, 2004).

### 5.3. Les champignons parasites

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes dont 200 seulement, parmi plus d'un million d'espèces existantes, ont été décrits jusqu'à présent comme agents infectieux chez l'Homme. Seulement une douzaine de ces espèces pathogènes sont responsables de 90 % des mycoses (Kayser et al., 2008). Beaucoup de mycoses sont relativement bénignes, c'est le cas des dermatomycoses (Mims et al., 1966). Cependant, ces dernières années, le nombre de mycoses menaçant le pronostic vital a augmenté, de par notamment l'augmentation du nombre de patients présentant un déficit immunitaire (Kayser et al., 2008).

Les espèces les plus communes qui causent des infections systémiques fongiques sont: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Cryptococcus neoformans*, ainsi que d'autres champignons opportunistes tels comme *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* et *Fusarium*. En outre, de nouveaux champignons pathogènes résistants aux antifongiques actuels sont apparus, comme *Acremonium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* et *Trichoderma* ou *C. auris* (Theberge et al., 2013).

Les champignons d'intérêt médical sont généralement classés en levures qui croissent soit comme cellules individuelles, soit en filaments pluricellulaires ou hyphomycètes, champignons dimorphes (se rencontrent sous forme de levure ou de mycelium) et dermatophytes (Murray et al., 2009). La

plupart des champignons pathogènes vivent librement ; ils entrent dans l'organisme de l'hôte par inhalation ou à travers les plaies. Certains existent dans la flore normale du corps humain (*Candida*) et sont inoffensifs à moins qu'il y ait une défaillance des défenses immunitaires (**Kayser et al., 2008**).

Les infections fongiques peuvent être superficielles ou profondes. Les champignons vivant librement peuvent également causer des intoxications de façon indirecte via les toxines (cas des aflatoxines d'*Aspergillus* ou des alcaloïdes de l'ergot) qu'ils libèrent sur les aliments (**Kayser et al, 2008**).

#### **5.4. Les protozoaires**

Les protozoaires sont des eucaryotes unicellulaires vivant librement dans l'environnement, et parasitant l'homme. Ils occasionnent ainsi des infections dont la prévalence est significative dans les pays chauds. Par exemple le paludisme, une des plus grandes maladies infectieuses de notre planète, est très fréquent dans les régions tropicales et subtropicales (**Mims et al., 1966**).

Le plus souvent la chaîne épidémiologique fonctionnelle comporte un réservoir de parasites (l'homme malade ou un réservoir animal) à partir duquel l'agent pathogène va être pris en charge par un hôte intermédiaire, vecteur incontournable dans la transformation du parasite devenu infestant et prêt à contaminer l'homme sain. Les conditions déterminantes d'un cycle infestant (ou le maintien d'une chaîne épidémiologique), comportent :

- l'existence d'un réservoir de parasites (l'homme malade ou un réservoir animal),
- la présence d'un ou plusieurs hôtes intermédiaires ou vecteurs incontournables assurant la transformation et la pénétration du parasite chez l'homme,
- des conditions écologiques (climats, géophysique des sols, faune et flore)-
- des conditions éthologiques (comportements, habitudes socioculturelles, économiques et politiques)
- la résistance du sujet contact (réceptivité génétique ou liée à la profession, l'âge, les
- maladies associées, ou son état immunitaire naturel ou acquis passivement (anticorps

de la mère) ou activement en restant périodiquement confronté au parasite).

Les protozoaires peuvent infecter tous les tissus et organes du corps humain. On les retrouve comme parasites intracellulaires dans une grande variété de cellules et comme parasites extracellulaires dans le sang, l'intestin et le système urogénital (**Mims et al., 1966**).

Au niveau médical, les protozoaires sont classés en fonction de leur localisation dans l'hôte, du mode de transmission et de la pathologie causée.

## **6. Les biofilms**

### **6.1. Définition**

Un biofilm est défini comme étant un groupe ou une communauté de microorganismes qui s'attachent et colonisent une surface. C'est un mode de croissance d'autoprotection répandu chez les microorganismes dans la nature et qui est différent de celui des cellules planctoniques (**Hood and Zottola, 1995; Xianming and Zhu, 2009**). Un biofilm n'inclut pas seulement les bactéries, mais il décrit aussi toute la matière extracellulaire ou matrice de substances polymères extracellulaires (EPS) qui est responsables de la morphologie, structure et les propriétés physicochimiques de ces agrégats cellulaires (**Jessen et Lammert, 2003; Pang Chee Meng, 2005**).

Un biofilm peut comprendre une seule ou de multiples espèces, mais dans un environnement naturel. Souvent les biofilms sont formés par une variété d'espèces bactériennes, de moisissures, d'algues ou des protozoaires organisés en structures tridimensionnelles.

### **6.2. Les biofilms dans les divers environnements**

Les biofilms arborent une ample diversité vis-à-vis du type du support colonisé. Ils peuvent se développer sur n'importe quel type de surface biotique ou abiotique. Un support peut être minéral (systèmes aquatiques naturelles, roche, interfaces air-liquide...), organique (peau, dents, tissus vivants, racines et feuilles des plantes), industriel (canalisations industrielles ou d'eau potable, coques des navires, des surfaces immergées....) ou médicale (prothèses, cathéters ....). Les propriétés physiques et chimiques de la surface jouent un rôle majeur dans les mécanismes de formation d'un biofilm (**De Chalvet de Rochemonteix, 2009; Donlan, 2002**).

La capacité des microorganismes pathogènes de se fixer et de se développer sur les surfaces de contact alimentaires ou sur les différents équipements dans les industries agroalimentaires allant de l'acier, plastique, le bois, caoutchouc, métal ou le verre, sous des conditions favorables qui sont suffisantes pour leur viabilité et leur croissance (**Kumar et Anand, 1998; Trachoo, 2003; Vlková et al., 2008**) met en jeu la qualité et la sécurité microbiologique des aliments. Les biofilms peuvent se former tout au long de la chaîne alimentaire et notamment à la surface des équipements ou matériaux de conditionnement.

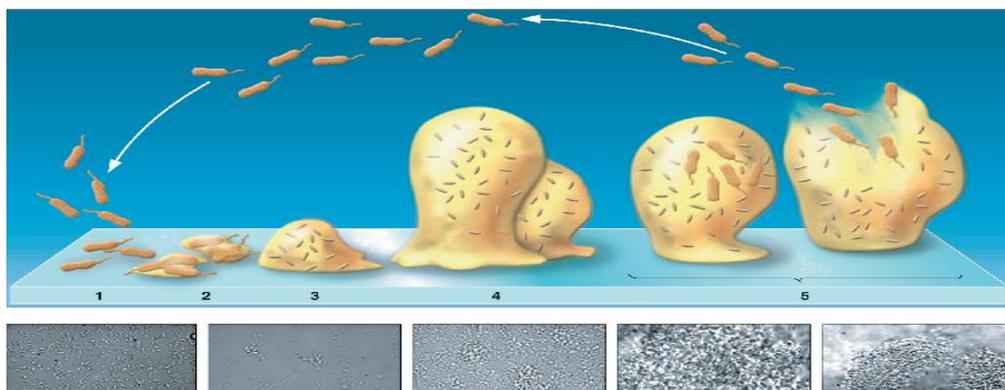
### **6.3. La formation d'un biofilm**

La formation d'un biofilm est un processus dynamique et complexe et plusieurs mécanismes sont engagés dans leur attachement et leur croissance contrôlés par de nombreux facteurs exogènes et endogènes (**Sauer et al., 2007**). La conception d'un biofilm débute par la colonisation d'une surface par les bactéries (Figure 4).

Le mécanisme le plus accepté dans la fixation bactérienne aux surfaces solides est un processus à deux étapes. La première étape implique que les bactéries soient transportées assez proche de la

surface pour qu'elles puissent être adsorbées. Cette étape est réversible et les bactéries peuvent être enlevées par un lavage simple (**Kumar et Anand, 1998; Strevett et Chen, 2003; Marchal, 2010**). La seconde étape implique la production de la matière extracellulaire (EPS) pour que les microorganismes s'ancrent la surface; c'est la phase irréversible de l'adhésion. Cette étape implique des forces plus importantes, tel que les liaisons hydrogènes, covalentes ou des interactions hydrophobes fortes (**Marchal, 2010**). Les cellules bactériennes irréversiblement adhérentes croissent et se divisent utilisant les nutriments présents dans l'environnement fluide avoisinant. Cela conduit à la formation de zones de forte densité cellulaire qui s'agrandissent et s'unissent pour former une couche de cellules recouvrant la surface (**Kumar and Anand, 1998**).

Durant cette période, il y aura aussi production de la matière exopolymère additionnelle (EPS) qui aide à l'ancrage des cellules à la surface et à stabiliser la colonie (**Characklis et Marshall, 1990**).



**Figure 4.** Processus de développement d'un biofilm

(1) Attachement réversible, (2) Attachement irréversible, (3) Maturation (4) Maturation et (5) dispersion. (**Sauer et al., 2007**).

#### 6.4 .Le biofilm dans la résistance bactérienne aux traitements antimicrobiens

La majorité des infections chez les êtres humains causée par des microorganismes en état de biofilm. Ce mode de vie permet aux pathogènes non seulement d'échapper aux contrôles des systèmes immunitaires innés et adaptatifs de l'hôte, mais également de développer des résistances contre les différents types d'agents antimicrobiens (**Cherrat, 2013**). La résistance du biofilm microbien envers les antibiotiques est présentement un vrai problème de santé publique. Plusieurs chercheurs ont constaté que les bactéries présentes au sein d'un biofilm sont plus résistantes à l'action des antibiotiques que celles à l'état planctonique (**Stewart et Costerton, 2001**). Cette résistance est généralement expliquée par plusieurs paramètres, notamment: l'activation de certains gènes par détection du Quorum, la croissance lente des bactéries (puisque la plupart des antibiotiques agissent

au niveau de la phase exponentielle), le transfert des gènes de résistance entre les espèces bactériennes au sein d'un biofilm et finalement l'activation des gènes du stress (**Hoiby et al., 2010**). En revanche, d'autres auteurs suggèrent que les cellules microbiennes au sein d'un biofilm ne sont pas plus résistantes que celles à l'état planctonique. Ils suggèrent que la matrice extra cellulaire (EPS) du biofilm joue un rôle clé dans la résistance des pathogènes vis-à-vis des biocides par empêchement et neutralisation de ces agents antimicrobiens (**Nadell et al., 2015**).

## Chapitre 2 : Les traitements anti infections

### 1-Les antibiotiques

#### 1.1. Généralités

Les antibiotiques sont par définition : « des produits microbiens, ou leur dérivés capables de tuer les micro organismes sensibles ou inhiber leur croissance » (Perscott et al., 1995). Leurs cibles sont des structures moléculaires essentiellement bactériennes. Elles ont une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes (Touati et al., 2013).

L'activité antibactérienne d'un antibiotique est son spectre d'action, on parle alors d'un large spectre d'action si l'antibiotique agit sur différentes espèces bactériennes. L'action des antibiotiques cible les structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi on parle d'effet « bactéricide » quand il y a mort de bactéries et d'effet « bactériostatique » quand il y a inhibition de la croissance bactérienne. Les antibiotiques peuvent être des molécules d'origine naturelle, synthétiques ou semi-synthétique (Newman et al., 2003), elles sont divisées en classes selon leur propriétés structurales.

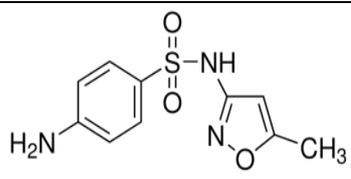
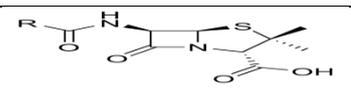
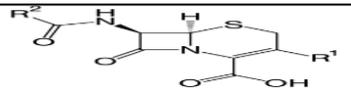
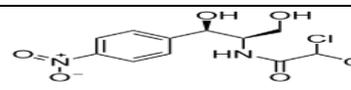
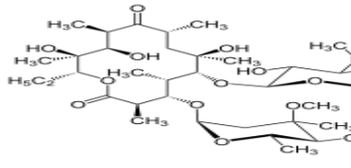
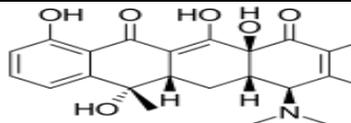
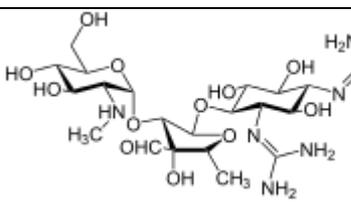
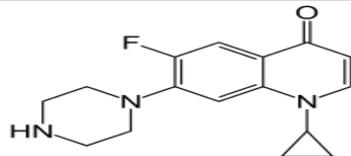
La penicilline, premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium sp*, a marqué le début de cette génération de traitements. La penicilline fait partie de la famille des  $\beta$ -lactamases, et sa découverte était le pas initiateur vers l'identification d'autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle telles que : les phenylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogamines, et les  $\beta$ -lactames de deuxième génération. Une troisième génération de  $\beta$ -lactames a été commercialisée à la fin des années 1970 sous le nom de : carbapénèmes. Les antibiotiques synthétiques sont regroupés en classes. Les sulfamides, les quinolones (ou fluoroquinolones) et les oxazolidinones. Ils sont obtenus soit à partir de dérivés artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro organismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus d'une modification en laboratoire de substance produite par des microorganismes.

#### 1.2. Le mode d'action des antibiotiques

Pour classer les antibiotiques, le critère le plus utilisé est la cible anatomique ou moléculaire au niveau de la bactérie. On compte quatre classes Tableau (2):

- Antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi bactérienne ;
- Antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines par les bactéries ;
- Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'ADN ou de l'ARN bactérien ;
- Antibiotiques agissant sur la synthèse des folates.

**Tableau 2.** Mode d'action des principales classes d'antibiotiques (Guinoiseau et al., 2011).

Classe	Origine	Mode d'action	Exemple	Structure chimique (Singh et Barret ,2006)
Sulfamides	Synthétique	Inhibent la synthèse de l'acide folique ; entraînant une baisse de la production	Sulfaméthoxazole	
$\beta$ lactames de 1 <sup>ère</sup> génération	<i>Penicillium notatum</i>	Inhibent la synthèse du peptidoglycane par blocage de la transpeptidation	Pénicilline	
$\beta$ lactames 2 <sup>ème</sup> génération	<i>Cephalosporum</i>		Céphalosporine	
Phénylpropanoïdes	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Se fixent sur l'ARN23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	Chloramphénicol	
Macrolides	<i>Streptomyces erythraeus</i>		Erythromycine	
Tetracyclines	<i>Streptomyces</i>	Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome	Tétracycline	
Aminoglycosidases	<i>Streptomyces</i> ou <i>Micromonospora</i>	Se fixent sur la sous-unité 30 S du ribosome et bloquent en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture	Streptomycine	
Quinolones et Fluoroquinolones	Synthétique	Inhibent la gyrase bactérienne	Ciprofloxacine	

### 1.3. Toxicité des Antibiotiques

Hormis son action sur les bactéries, un antibiotique peut entraîner des effets néfastes sur les cellules eucaryotes (**Perscott et al., 1995**). Cette toxicité se manifeste la plupart du temps quand la dose administrée est trop élevée ou lorsque le traitement est de longue durée. Par ailleurs, certains antibiotiques peuvent augmenter les effets thérapeutiques et toxiques d'autres médicaments en inhibant leur fixation, ou leur inactivation dans l'organisme.

Il faut noter que les troubles toxiques causés par les antibiotiques sont différents d'une famille à l'autre, et même dans une même famille il y a des discordances entre les antibiotiques, il peut y avoir une molécule très toxique et l'autre dépourvue de toxicité ou peu toxique. Citons comme exemple, la streptomycine qui n'est pratiquement pas toxique pour le néphron, alors que la néomycine est la plus toxique pour cet organe.

- Toxicité Hépatique: Les antituberculeux peuvent induire des désordres importants dans le métabolisme du foie: Une insuffisance hépato-cellulaire aiguë, consécutive à une dégénérescence graisseuse du parenchyme hépatique peut apparaître lors d'un traitement par la tétracycline.

- Toxicité rénale : Elle est fréquemment observée lors de l'administration d'un aminoside à posologie trop élevée. Dans cette famille le risque de néphrotoxicité n'est pas le même pour tous les antibiotiques. Une tubulo-néphrite aiguë interstitielle peut se développer au cours d'un traitement mal conduit (posologie trop élevée) par la colistine (polymyxine E).

- Toxicité du système nerveux et des organes sensoriels: Cette toxicité représente l'un des effets indésirables le plus souvent observé lors de l'utilisation d'antibiotiques, exemple: isoniazide, en particulier chez les sujets âgés, alcooliques ou dénutris. Cette polynévrite peut également se développer au cours d'un traitement prolongé ou d'un surdosage de certains antibiotiques. Des troubles visuels, telle une névrite optique, surgissent en cas de surdosage.

- Toxicité hématologique (sang et la moelle osseuse): Elle est causée principalement par le chloramphénicol; un déficit transitoire de l'hématopoïèse se traduisant par une anémie progressive, parfois accompagnée d'une leucopénie ou une thrombopénie modérée. Autres antibiotiques (ou une association) peuvent provoquer une agranulocytose, inhibition de l'agrégation plaquettaire, diminution de la synthèse de prothrombine.

- Autres types de toxicité: Elles sont rencontrées au niveau de la peau (éruption prurigineuse ou urticarienne, érythème noueux, ulcération des muqueuses oculaires ou buccale...); ou du tube digestif (nausées, épigastralgies).

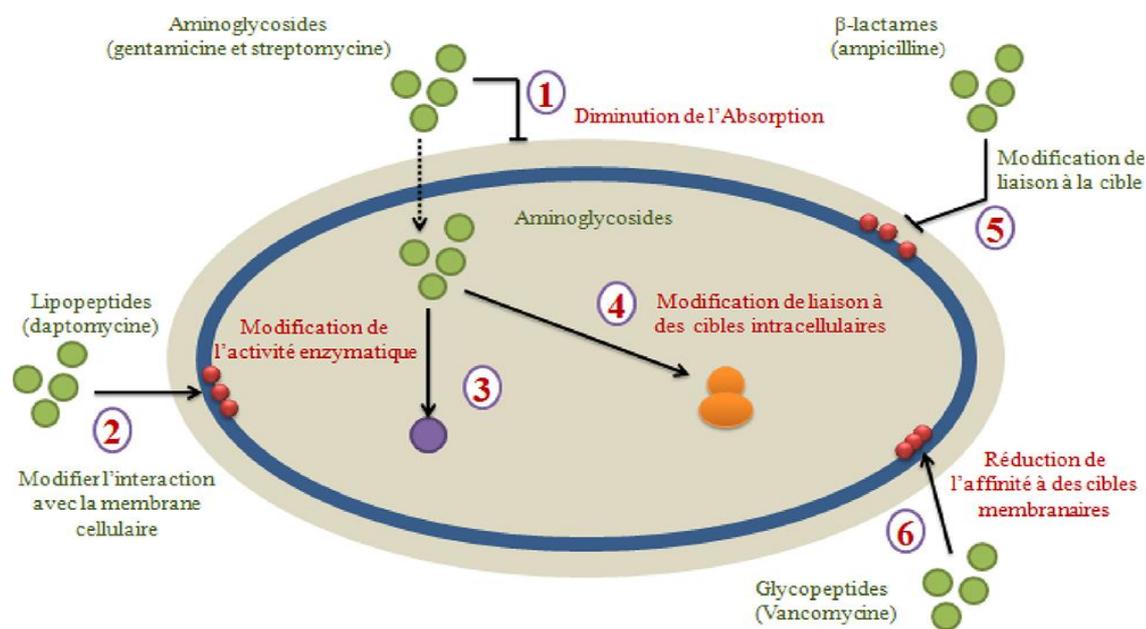
## **1.4. La résistance aux antibiotiques**

### **1.4.1. La résistance naturelle**

Par définition : La résistance naturelle est lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire empêchent les antibiotiques d'accéder à leur Cible. L'absence de cible est un autre facteur qui peut conditionner la résistance naturelle d'une bactérie à un antibiotique.

### **1.4.2. La résistance acquise**

La résistance acquise apparaît lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes. Elle est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (**Goossens *et al.*, 2006**). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales. Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques via différents mécanismes (Figure 5). Elles peuvent acquérir des gènes codant pour des enzymes, telles que les  $\beta$ -lactamases, qui détruisent l'agent antibactérien avant qu'il ne produise un effet. En plus, elles peuvent acquérir des pompes d'efflux qui extrudent l'agent antibactérien de la cellule avant qu'il n'atteigne le site de sa cible. Par ailleurs, les bactéries peuvent acquérir plusieurs gènes pour une voie métabolique qui aboutit à la production de parois cellulaires altérées ne contenant plus de sites de fixation des agents antimicrobiens. La bactérie peut acquérir des mutations qui limitent l'accès des agents antimicrobiens aux sites intracellulaires des cibles via la régulation négative des gènes codant les porines. Finalement, la résistance peut être acquise via l'échange génétique entre les bactéries, voire, la transformation (incorporation de segments d'ADN libérés dans le milieu extérieur par une autre bactérie après la lyse cellulaire), la conjugaison (échange des gènes de résistance entre deux bactéries via le contact physique) ou la transduction (transfert des gènes de résistance entre les bactéries via les bactériophages) (**Tenover, 2006 et Bouyahia *et al.*, 2017**).



hia et al .,2017)

**Figure 5.** Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouya

Les bactéries possèdent différents modes de résistance aux antibiotiques.

- 1) Diminution de l'adsorption des aminoglycosides.
- 2) Modification de l'interaction des lipopeptides avec la membrane cellulaire.
- 3) Modification de l'activité enzymatique des aminoglycosides.
- 4) Modification de liaison des β-lactamines à des cibles intracellulaires.
- 5) Modification de liaison à des cibles membranaires.
- 6) Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires .

### 1.5. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques

Depuis plus de 20 ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrits avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes (Alekhshun et Levy, 2007). C'est le cas des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), à la vancomycine (SARV) ou de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Nous trouvons aussi des souches de pneumocoques de sensibilité diminuée ou résistantes aux pénicillines.

Des souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides (ERG), des souches d'entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre étendu (BLSE) ou des souches multi-résistantes de *Pseudomonasaeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Des souches de SARMs résistantes à la daptomycine, antibiotique agréé depuis 2003, ont récemment été identifiées (Mangili et al., 2005 et Marty et al., 2006).

L'impact de cette multi-résistance aux antibiotiques est important au niveau clinique, en termes de morbidité et de mortalité, mais aussi sur le plan économique car les infections liées aux bactéries multi-résistantes engendrent des coûts d'hospitalisation élevés (6000 à 30 000 \$, soit 4 300 à 21 550 €) (Cosgrove *et al.*, 2005 ; Maragakis *et al.*, 2008).

L'extension géographique des résistances se produit au niveau international (Afset , Boras *et al.*, 2001), et touche aussi tout les milieux de vie. En effet, les infections causées par les bactéries résistantes et multi-résistantes, autrefois cantonnées au milieu hospitalier, deviennent communautaires (extra-hospitalières) (Crum, 2005 ; Maltezou et Giamarellou, 2006). Ainsi, le nombre de personnes, susceptibles d'être exposées aux bactéries résistantes et multi-résistantes est continuellement augmenté :

On retrouve à cet effet qu'en 2013, the Global Burden of Disease dans une étude basée sur des données provenant de 188 pays à travers le monde, a rapporté que l'infection des voies respiratoires inférieures était la deuxième cause de décès la plus fréquente.

En Europe, les taux de mortalité par ces infections varient considérablement d'un pays à l'autre, allant de <1% à 48%. L'incidence annuelle de la pneumonie aux États-Unis était de 24,8 cas pour 10 000 adultes ; et en 2014, elle a été citée comme la huitième cause de mortalité aux États-Unis rapportée par le Centre national de Statistiques de la santé était la grippe et la pneumonie ensemble.

Chez les enfants, la pneumonie est le seul plus grande cause infectieuse de décès dans le monde entier.

En 2015, la pneumonie a tué 920 136 enfants de moins de 5ans, représentant 15% de tous les décès d'enfants de moins de cinq ans ; avec un coût économique élevé. Une étude néerlandaise publiée récemment qui incluait 195 372 cas de pneumonie et indiqué que les coûts médians des cas étaient en fonction de l'âge du patient, et du type de soins, variant de 344 €par cas pour les patients de 0 à 9 ans traités en ambulatoire, à 10 284 €par épisode pour les 50-64 ans admis à l'unité de soins intensifs (Cilloniz *et al.*,2016).

Un des moyens innovant pour contrer au développement des infections nosocomiales et la réduction des coûts de la maladie est un nouveau concept appelé «hôpital a domicile »Au cours des dernières années, un nombre croissant d'articles pertinents ont été publiées, qui confirment les avantages de cette alternative. Par rapport à l'hospitalisation conventionnelle, puisque les résultats cliniques ne sont pas inférieures à celles de l'hôpital. (González Ramallo *et al.*,2017).

## 2. Les antifongiques

### 2.1. Généralités

Les médicaments antifongiques sont principalement utilisés pour traiter les pathologies dues aux infections fongiques. C'est seulement depuis cette dernière décennie que la thérapeutique antifongique s'est réellement développée, Le nombre d'agents disponibles pour traiter les champignons a augmenté de 30% depuis le début du millénaire. Néanmoins, le nombre de médicaments thérapeutiques disponible pour le traitement des infections fongiques invasives est assez limité par rapport à ceux disponibles pour traiter les infections bactériennes (**Fernández-García et al.,2017 ; Scorzoni et al.,2017**). Cette inertie trouvait sa justification dans la relative rareté des mycoses systémiques à l'exclusion de certaines mycoses tropicales à répartition géographique bien limitée, et le fait que l'on disposait depuis 1960 d'un antifongique systémique, l'amphotéricine B : toxique avec des effets indésirables liés à la perfusion nécessitant souvent l'hospitalisation du patient ,mais très efficace.(**Afif chaouche ,2015**) . Une prévalence des infections fongiques invasives et aspergilloses, a été rapporté. Et, le nombre d'espèces de champignons qui provoquent des mycoses systémiques est de plus en plus élevé. Plusieurs facteurs ont déclenché ce grave problème de santé publique, tels que : (i) l'augmentation des patients immunodéprimés en raison du VIH, traitements du cancer et de transplantation d'organe ; (ii) l'augmentation de l'utilisation d'antibiotiques à large spectre pour un long temps menant à des résistances et (iii) l'augmentation des bactériémies liées aux cathéters. (**Fernández-García et al.,2017**).

Ceci a conduit au développement des antifongiques azolés de deuxième et troisième génération moins toxiques et administrables par voie orale, des classes totalement nouvelles d'antifongiques ont été découvertes en plus des associations de médicaments car l'utilisation de plus d'un médicament peut augmenter l'efficacité en raison de la possibilité d'une action sur plus d'une cible; avec une toxicité réduite ; comme dans le cas de traitement de patients atteints d'aspergillose invasive avec une combinaison de voriconazole et l'anidulafungine ou il a été constaté une amélioration de la survie en comparaison avec le traitement en Monothérapie de voriconazole. La prévention des infections fongiques invasives est devenue d'une importance vitale , des chercheurs développent des vaccins fongiques, en particulier ceux qui peuvent être utiles pour les infections endémiques ou dans les infections chroniques ou chez les patients de soins intensifs ; et deux vaccins prometteurs sont en phase d'essai clinique .Le premier, contenant l'antigène rAls3p-N, empêchant l'adhérence et l'invasion fongique chez des hôtes immunisés, et le second vaccin dirigée contre candida à base de virosome contenant un antigène recombinant antigène SAP2 SAP2 / tronqué. La forme tronquée est stable, immunogène et sans danger. Le vaccin SAP2 administré par voie intramusculaire ou intra-

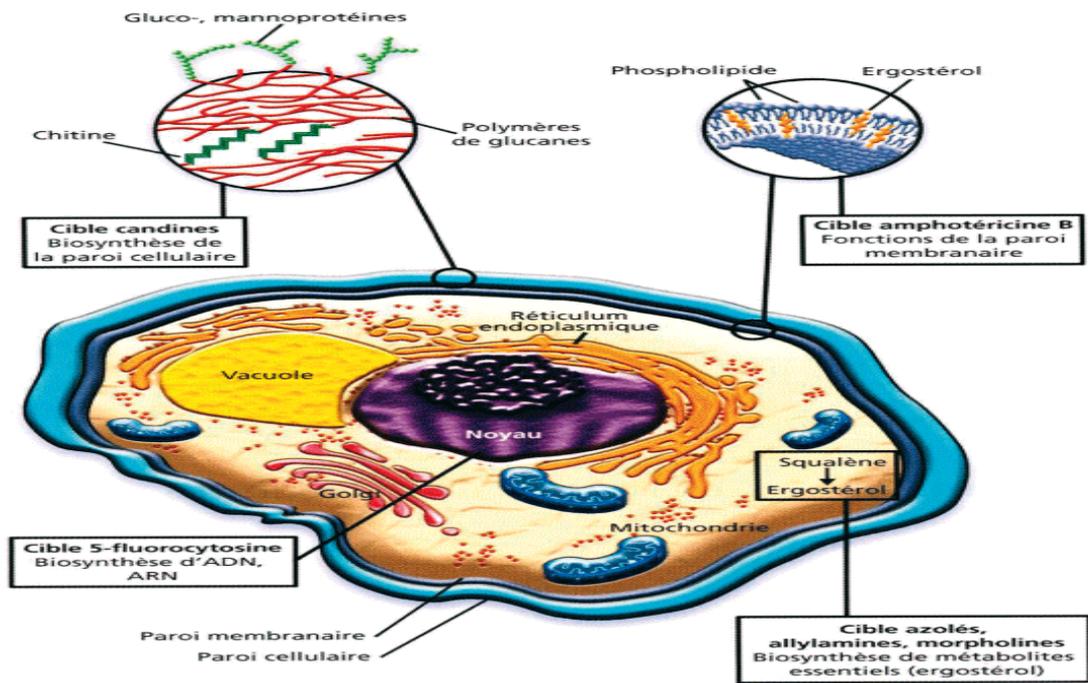
induit par voie vaginale systémique et 100% immunité protectrice des muqueuses (**Scorzoni et al.,2017**). L'amphotéricine B qui est le premier antifongique à usage systémique jusqu'à l'avènement des dérivés triazoliques à la fin des années 1980, appartient à la classe des polyènes et il d'origine naturelle (produit par un actinomycète : *Streptomyces nodosus*). Une autre classe d'antifongique naturelle : le griséofulvine qui est synthétisée par certaines souches de *Penicillium griseofulvum*, une moisissure à partir de laquelle elle a été isolée en 1939. D'autres groupes de molécules sont utilisés : Les allylamines qui sont un groupe de molécules de synthèse à large spectre utilisées dans le traitement des dermatophytoses et des formes superficielles de la candidose, incluant plusieurs molécules dont la naftifine et la terbinafine. Un autre groupe important et largement utilisé dans la thérapeutique contemporaine est celui des dérivés azolés. Il inclut des molécules de synthèse, tel que le fluconazole et l'itraconazole, utilisés dans le traitement des maladies fongiques et de certaines maladies d'origine bactérienne. En effet ; les azoles sont les plus fréquemment utilisées pour traiter des infections fongiques du fait qu'elles sont peu coûteuses et sont disponibles sous la forme orale. Cependant, une résistance aux médicaments azolés chez *C. albicans* et d'autres espèces de *Candida*. Dans des études récentes, il a été démontré qu'un changement de configuration du groupe alkyl de ces drogues résulterait une activité antifongique prometteuse. (**Thamban Chandrika et al.,2018**).

Le groupe des échinocandine est le plus récent de l'arsenal thérapeutique antifongique, et qui en raison de son mécanisme unique d'action cible sélectivement les cellules fongiques sans affecter les cellules de mammifères. Depuis son introduction a fini par occuper une place importante dans la pharmacothérapie antifongique, en raison de son efficacité, et innocuité. (**Patil et al.,2015**). Il comporte des molécules hémi synthétiques notamment l'anidulafungine et la caspofungine agissant par l'interférence de la synthèse de la paroi cellulaire. Ce groupe est particulièrement efficace contre les *Candida* (**Walsh, 2003;Murray et al., 2009**) ; et a été couronné de succès dans le traitement de la candidose invasive aspergillose et avec plus de sécurité et de tolérabilité chez des patients adultes et en pédiatrie, permettant ainsi d'être utilisés en première ligne dans la prise en charge des infections fongiques invasives. (**Patil et al.,2017**). Ceci ramène à six classes de traitements antifongiques : **les polyènes** ( dont l'AmphotericineB) , **les azolés**, **les échinocandines**, **les Allyamines et thiocarbamates**, les **fluorocytosine**, (la flucytosine fait partie de la liste des médicaments essentielles de l'Organisation mondiale de la santé (liste mise à jour en avril 2013).

## 2.2. Mode d'action des antifongiques

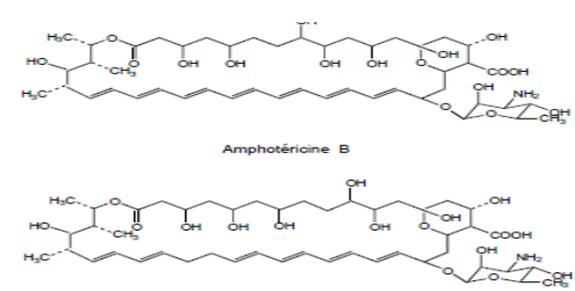
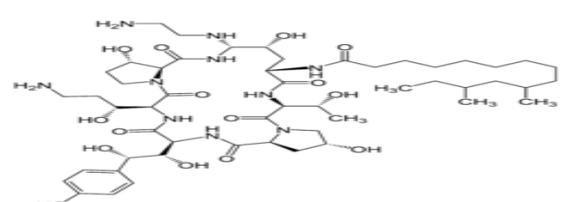
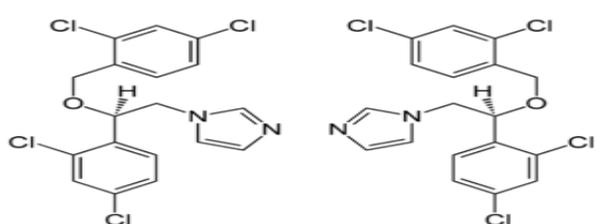
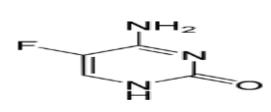
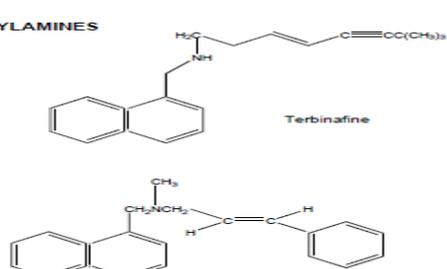
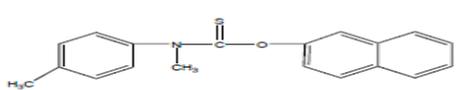
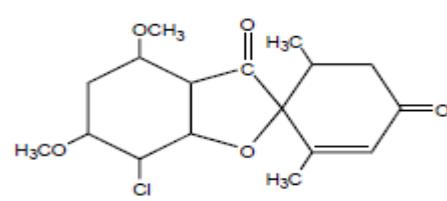
Les molécules antifongiques agissent soit au niveau de la paroi cellulaire, soit sur la membrane cellulaire ou au niveau de l'acide nucléique. L'action peut être fongicide ou fongistatique selon la molécule elle-même ou par rapport à la souche cible. Figure (6),

Tableau (3).



**Figure 6.** Principales cibles cellulaires des antifongiques. ( Dupont,2018).

**Tableau 3.** principales classes des antifongiques et leur mode d'action

antifongiques	Cibles	Action	Structure chimique
Polyènes	Membrane fongique	Fongicide	 <p>Amphotéricine B</p> <p>Nystatine</p>
Echinocandines	Paroi fongique	Fongicide sur <i>Candida</i> Fongiostatique sur <i>Aspergillus</i>	
Azolés	Inhibition de la 14 $\alpha$ -déméthylase	Fongiostatique sur <i>Candida.sp</i> Fongicide sur <i>C.krusei</i>	
5- Fluorocytosine	Acide nucléique	Fongiostatique	
Allyamines et thiocarbamates	La paroi fongique	Fongiostatique et fongicide selon les souches	<p>ALLYLAMINES</p>  <p>Terbinafine</p> <p>Naftifine</p> <p>THIOCARBAMATE</p>  <p>Tolnaftate</p>
Griseoflavine	Acide nucléique	fongiostatique	

### 2.3. Toxicité des antifongiques

Le profil de toxicité et les interactions médicamenteuses potentielles de chaque antifongique sont des critères de choix, qui permettent de sélectionner le traitement adapté à la situation clinique. Les principales interactions rencontrées avec les antifongiques sont un critère de choix du traitement quand le clinicien dispose de plusieurs options thérapeutiques, en particulier pour les traitements de deuxième intention. Des réactions aiguës telles que frissons, fièvre, anorexie, nausées, vomissements, céphalées, sont fréquentes avec l'ensemble des antifongiques systémiques. Certains effets indésirables, sont de réels facteurs limitant les choix thérapeutiques. La toxicité rénale de l'amphotéricine B limite souvent son utilisation, en particulier du fait de l'impossibilité de l'association à d'autres principes actifs néphrotoxiques (antibiotiques en particuliers). Une toxicité hématologique a été rapportée lors des traitements à base d'amphotéricine B prolongées se traduisant par une anémie, une leucopénie ou une thrombopénie. Une toxicité hépatique est largement observée dans les traitements azolés qui se manifeste par l'augmentation des transaminases, et c'est cette toxicité qu'on retrouve avec les allyamines et les thiocarbamates. La griséofuline peut causer des réactions allergiques, des maux de tête, des troubles digestifs et parfois une toxicité hépatique ; elle est tératogène et carcinogène chez l'animal.

### 2.4. La résistance aux antifongiques

La résistance aux antifongiques continue à croître et à évoluer, compliquant ainsi la prise en charge des malades, surtout avec l'apparition de nouvelles espèces hautement résistantes aux traitements (cas de *C. auris* et *C. pseudohaemulonii*) découvertes toutes les deux en 2009 et où on rapporte des CMI élevés à l'amphotéricine B et de la caspofungine et une résistance au fluconazole (**Shallu Kathuria et al., 2015**).

Divers mécanismes sont impliqués : pour le genre *Candida*, largement isolé en clinique, la résistance aux dérivés azolés intervient par un mécanisme influant l'efflux médié par des pompes membranaires. (**Scorzoni et al., 2017**) La résistance à l'échinocandine intervient par une mutation modifiant la cible moléculaire de cet antifongique (**Pfaller, 2012**).

Pour *C. auris* qui est cours de devenir une multirésistante pathogène dans de nombreux centres en Inde, suite à des erreurs d'identification dans les laboratoires de routine qui s'appuient fortement sur des systèmes commerciaux pour l'identification alors qu'une approche prudente est recommandée pour les isolats présentant une élévation MICs avec ces systèmes ce qui pourrait être fiable et rapidement identifié par MALDI-TOF MS. (**Shallu Kathuria et al., 2015**).

L'augmentation de la résistance azolé chez *A. fumigatus* est devenue dernièrement un défi dans la gestion efficace de l'aspergillose. Des études antérieures ont mis en lumière la contribution des

mutations du gène non-cyp51 ainsi que des altérations du gène cyp51A entraînant des phénotypes résistants à l'azole de *A. fumigatus*. (Anuradha Chowdhary et al.,2017).

Il est à noter que la capacité de plusieurs espèces fongiques à former des biofilms est une autre raison pour les échecs thérapeutiques et le développement des résistances comme chez *C.albicans*, *Pneumocystis* spp. , *Coccidioides* spp. , *Aspergillus* spp. , Zygomycetes, *Malassezia* spp. *Trichosporon* spp. , *Cryptococcus*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton* spp. Orlandietal., et *Paracoccidioides* spp. (Scorzoni et al.,2017).

Parmi les stratégies proposées pour pallier à la résistance des champignons, on peut citer la recherche de nouvelles molécules, l'étude approfondie de la relation champignon-hôte et l'étude génomique, ainsi que la mise au point de vaccins antifongiques ( Scorzoni et al., 2017). Ceci peut mettre en évidence de nouvelles possibilités de traitements, et permet par la même occasion la détection de nouvelles cibles (Vandiputte et al., 2011).

## 2.5. Epidémiologie de la résistance aux antifongiques

La fréquence des mycoses n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies, favorisées par la prise d'antibiotiques, de traitements corticoïdes ou immunosuppresseurs. A titre d'exemple : *Aspergillus* spp. sont responsables de plus de 200 000 cas d'infection invasive par an, affectant principalement les patients immunodéprimés comme dans le cas des greffes de cellules souches hématopoïétiques ou une greffe d'un organe, les patients subissant une chimiothérapie ou qui prennent des corticostéroïdes .Autre manifestation importante de l'aspergillose est d'aspergillose pulmonaire chronique affectant les patients avec maladie pulmonaire sous-jacente sans pour autant négliger l'augmentation de l'incidence des infections fongiques nosocomiales et qui sont largement documentées : et ou *Candida* représente 50% des mycoses suivi par *Aspergillus*(6,8%), *Cryptococcus* (4,5%), moisissures (4,3%), zygomycètes (1,4%) et autres champignons(33%) (Figure 7 ) (Fernández-García et al.,2017).

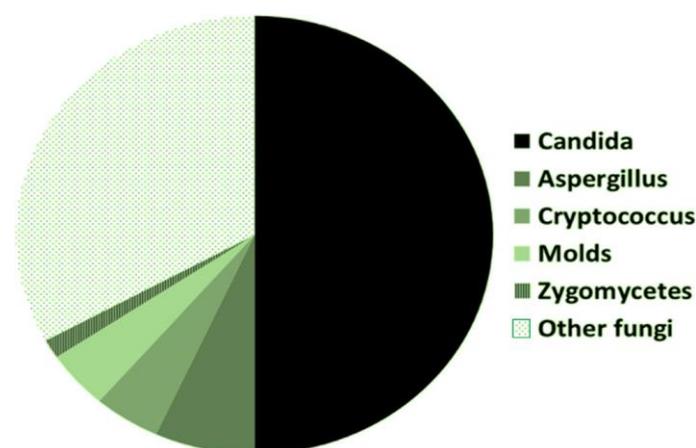


Figure 7. Prévalence des infections fongiques systémiques

**(Fernández-García et al.,2017)**

Les levures, et principalement *Candida spp.* sont actuellement classés entre la quatrième et la sixième place des infections systémiques dans des études américaines et européennes ; et ont montré que les taux de mortalité à 30 jours a ceci s'ajoute le coûts des soins qui a augmenté de manière significative lorsque la thérapie empirique était retardé ou inadéquat (dosage inapproprié, isolat résistant) . **(Zhi-Tao Yang et al.,2014).**

Les prescriptions d'antifongiques en milieu hospitalier comportent intrinsèquement le risque de modifier l'épidémiologie des infections fongiques avec l'apparition de ces résistances. L'Observatoire des Levures surveille activement depuis 10 ans l'épidémiologie des fongémies en région parisienne. Pour l'instant, aucune modification importante de la répartition des espèces de *Candida* ainsi que de leur sensibilité naturelle aux antifongiques n'a été observée. Cependant, la prescription antérieure d'antifongiques modifie considérablement la répartition des espèces (fluconazole et émergence de *Candida glabrata* et *Candida krusei* ; caspofungine et émergence de *Candida parapsilosis*, mais aussi de *C. glabrata* et de *C. krusei*). Si ces traitements antifongiques empiriques ou prophylactique devaient se généraliser, on peut craindre une augmentation pérenne de ces espèces peu sensibles aux antifongiques. Pour *Aspergillus fumigatus*, certains pays rapportent une fréquence de 5–6 % d'isolats résistants aux triazolés. Le principal mécanisme est une mutation du gène *cyp51A* codant pour l'enzyme 14-alpha-déméthylase, cible des azolés. Cette mutation a été retrouvée en Europe, en Amérique du Nord et en Asie. La principale hypothèse pour son apparition et sa dispersion est l'emploi d'azolés dans l'agriculture. Le risque est donc d'inhaler des spores d'emblée résistantes aux azolés. Si le phénomène devait augmenter, cela menacerait l'emploi des azolés en première ligne et en prophylaxie. Cela menacerait aussi la seule classe d'antifongiques anti-aspergillaires disponible par voie orale. Il semble donc primordial que chaque hôpital traitant des patients à risque d'aspergillose développe une surveillance microbiologique de cette résistance et que celle-ci suscite une réflexion sur le bon usage des antifongiques **(Alanio et al.,2014).**

### **3. Les molécules utilisées en chimiothérapie virale**

#### **3.1. Généralités**

Contrairement aux infections bactériennes, peu de médicaments antiviraux spécifiques sont disponibles pour traiter les infections virales et l'arsenal thérapeutique est limité du fait même de problèmes posés par les infections virales :

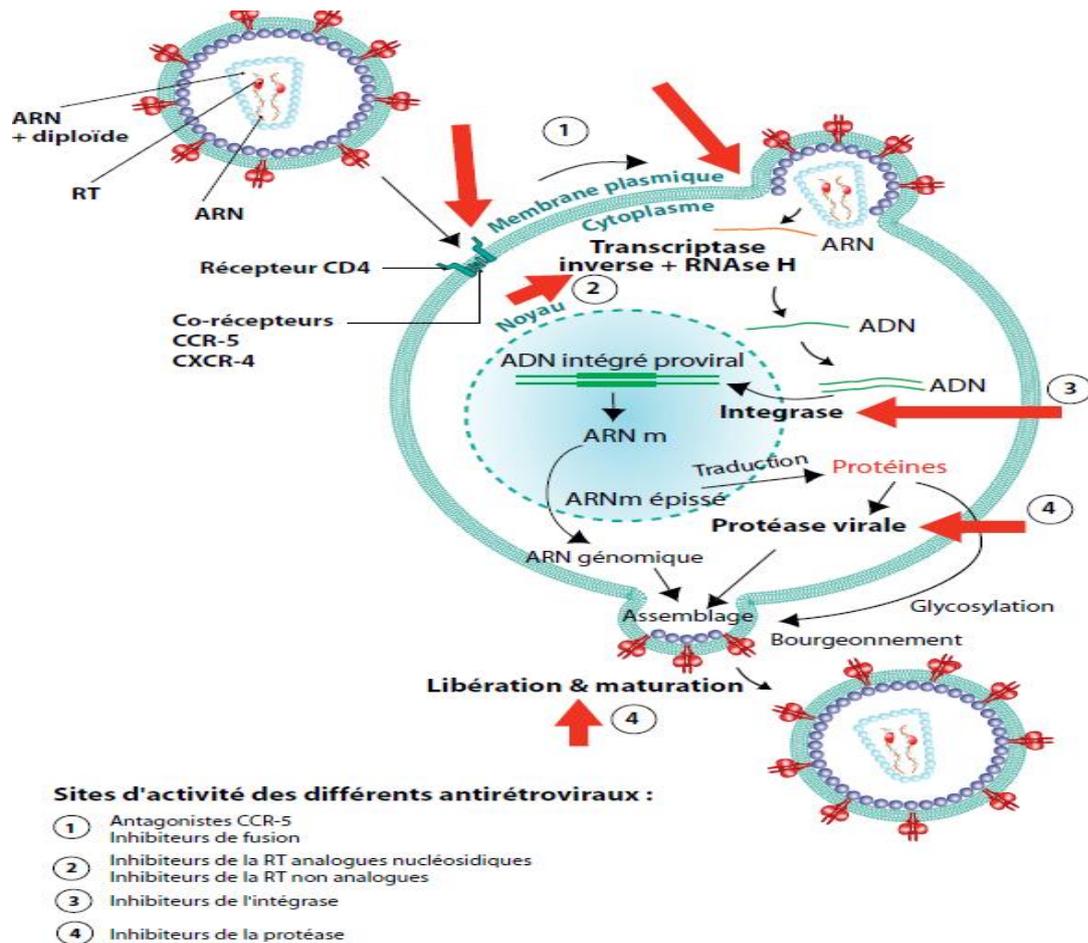
- Le parasitisme intracellulaire strict impose des molécules actives au sein des cellules et donc actives au sein du métabolisme intracellulaire puisque la réplication virale utilise la machinerie cellulaire.

- La diversité des réplifications des virus à ADN ou à ARN impose le développement de médicaments spécifiques à chaque infection virale.

- Enfin, l'industrie pharmaceutique a longtemps considéré le marché des antiviraux comme peu attractif, du fait qu'il concerne majoritairement des infections comme la rougeole ou la polio, qui touchent des pays en voie de développement, sans moyens financiers et sans politique de santé publique. C'est l'émergence récente d'infections virales persistantes et mortelles comme le sida et l'hépatite C qui ont relancé les recherches et permis de nombreux développements de nouvelles molécules et de nouveaux concepts en thérapie antivirale : comme l'introduction de l'abacavir dans le traitement du HIV chez l'enfant et l'adolescent (Olatunji O Adetokunboh et al.,2014). Il faut souligner l'ampleur du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) qui reste une préoccupation mondiale majeure avec 3,3 millions estimé à moins de 15 ans les enfants et les adolescents vivent avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et environ 2 millions ont besoin d'un traitement antirétroviral. (Olatunji O Adetokunboh et al.,2014). Non seulement l'approche classique consistant à cibler les enzymes virales spécifiques a abouti à des traitements anti-VIH efficaces, mais aussi l'utilisation d'associations médicamenteuses a permis d'obtenir de bons résultats (trithérapie). Premiers traitements antiviraux: années 1960 Vaccination antivariolique:1796.

### **3.2. Mode d'action des antiviraux**

Les antiviraux agissent soit sur des cibles précises (récepteurs cellulaires, enzymes virales) soit sur des cibles multiples (protéines cellulaires induites par l'interféron, mécanismes d'action complexe de la ribavirine). (Figure 8) Les cibles des antiviraux peuvent être virales ou plus rarement cellulaires. Les antiviraux sont tous virostatiques et n'agissent donc qu'en bloquant la réplication virale. On compte actuellement environ 40 molécules utilisées dans le traitement des maladies d'origine virale. La plupart de ces molécules exercent leur activité au niveau du génome et de sa réplication. La classe des inhibiteurs de la nucléoside reverse transcriptase est de loin la plus connue, incluant la zidovudine, le didanosine, la zalcitabine, la stavudine, la lamivudine, l'abacavir et l'emtricitabine. Une autre classe est représentée par les inhibiteurs de la nucléotide reverse transcriptase, incluant le tenofovir et le disoproxil fumarate. La classe des inhibiteurs de la reverse transcriptase non nucléotidique renferme des molécules comme la nevirapine, delavirdine et les inhibiteurs de la protéase incluant saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir et amprenavir entre autres (Ismail et al., 2013).



**Figure 8.** Mécanisme d'action des antiviraux (Ismail *et al.*, 2013).

### 3.3. Toxicité des antiviraux

Plusieurs antiviraux sont activés par des enzymes cellulaires et peuvent donc être activés même dans des cellules non infectées

- Toxicité médullaire: AZT, Ganciclovir, Ribavirine
- Toxicité rénale: Foscarnet
- Toxicité neuropsychique: Interféron, Amantadine, Rimantadine, Vidarabine
- Troubles du métabolisme: Inhibiteurs des protéases.

### 3.4. Résistance aux antiviraux

Dans la résistance, il y a 3 éléments qui interviennent : le virus, l'antiviral et le patient :

- Le virus : Lors de sa réplication, le virus génère une variabilité génétique plus ou moins importante. Il peut être naturellement résistant ou acquérir des résistances secondairement. En fonction des cibles virales, la résistance apparaît après un nombre plus ou moins élevé de mutations.

- L'antiviral : Ce genre de molécule à une puissance plus ou moins importante sur l'inhibition de la réplication virale, ses concentrations et sa métabolisation peuvent également varier.

- Le patient : Chaque patient a une influence directe sur les concentrations de l'antiviral (observance du traitement, métabolisme) et sur le niveau de réplication du virus (facteurs génétiques, immunologiques et comportementaux).

### **3.5. Epidémiologie de la résistance aux antiviraux**

Pour les agents antiviraux, le traitement qui est déjà de longue durée crée un climat favorable pour le développement des résistances et conduit, le plus souvent, à l'échec des thérapies. Un moyen pour pallier à cette éventualité est la pratique de test de sensibilité avant la prescription des traitements, ou lorsqu'on constate l'absence d'amélioration après l'administration d'un traitement antiviral donné. Une autre solution pour vaincre la résistance est l'association de plusieurs molécules antivirales dirigées contre des cibles cellulaires différentes.

Ces résistances sont plus élucidées lorsqu'il s'agit de virus impliqués dans des maladies endémiques. Par ailleurs, l'HIV reste le virus où la résistance est un défi pour l'intelligence humaine. Des chercheurs signalent que parmi les risques majeurs induits par l'émergence de la résistance est celui lié à la continuation dans un traitement de première ligne qui a échoué. Il s'agit de l'accumulation des mutations virales qui vont même compliquer la prise en charge par les thérapies de deuxième ligne (**Sigalof *et al.*, 2011**).

## **4. Autres molécules**

Une autre classe des médicaments anti-infectieux est celle des anti-protistes. Ce sont des substances d'origine naturelle ou de synthèse, capables de détruire différents organismes ayant un développement parasite regroupant des médicaments et des pesticides.

Plusieurs molécules anti infectieuses ont été développées entre 1920 et 1930. On peut citer parmi les molécules utilisées dans ce sens, les organométalliques qui sont des dérivés de l'arsenic et de l'antimoine comme le melarsoprol et l'antimoinate de méglumine.

Une autre classe est celle des quinolines, largement utilisée comme traitement au paludisme. Pour cette classe, la chloroquine fut la première molécule découverte suivie d'autres molécules comme la méfloquine et l'amodiaquine.

Enfin, les molécules de la classe des diamodines telles que la pentamidine et la propamidine utilisées dans le traitement des trypanosomiasés, mais aussi d'autres maladies due à des protozoaires (**Croft et Seifert, 2010**).

## **5. Les nouveaux traitements**

### **5.1. Les bactériophages**

Les bactériophages forment un groupe particulier de virus, dont l'hôte spécifique est une bactérie. Découverts en 1915, ils ont été utilisés dans le traitement de certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme la dysenterie bacillaire. Bien que prometteurs, les premiers essais de phagothérapie ou « thérapie par les phages » ont été supplantés par les succès de l'antibiothérapie dès 1941. Seuls les pays de l'ex bloc soviétique ont poursuivi leurs recherches sur les phages et les utilisent encore de nos jours en thérapeutique humaine. Le regain d'intérêt des pays occidentaux pour la phagothérapie s'observe depuis une vingtaine d'années (**Brussow, 2005 ; Skurnik et Strauch, 2006**), période durant laquelle le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques n'a cessé de s'amplifier.

#### **5.1.1. Les propriétés et mécanismes d'action des bactériophages**

La phagothérapie utilise les propriétés lytiques des phages pour détruire les cellules bactériennes infectées. Le parasitisme intracellulaire de l'hôte est indispensable au développement et à la prolifération du bactériophage. Après sa fixation à des récepteurs spécifiques de la surface bactérienne, le bactériophage introduit son génome à l'intérieur de l'hôte où il gouverne la synthèse de nouveaux phages ou virions. La libération et la dissémination des virions requièrent la destruction de la cellule bactérienne, qui est assurée par les enzymes lytiques du phage, comme les lysines.

Les nouvelles études s'intéressent plus aux produits des gènes de phage qu'aux phages entiers car ces derniers peuvent être immunogènes (**Matzusaki et al., 2005 et Ravat et al., 2015**). Ainsi, les lysines, qui détruisent la paroi cellulaire des bactéries Gram positives, sont largement décrites dans la littérature (**Fischetti, 2005 ; Hermoso et al., 2007 ; Kurzepa et al., 2009**).

La plupart des lysines sont dépourvues de « séquence signal » ; aussi, leur passage à travers la membrane plasmique est assuré par d'autres protéines phagiques, les holines. Durant la phase de maturation des virions, les lysines synthétisées s'accumulent dans le cytoplasme de l'hôte tandis que les holines s'agrègent dans la membrane où elles forment des pores non spécifiques.

Les lysines, qui peuvent alors accéder à leur cible, perforent la paroi cellulaire par digestion du peptidoglycane entraînant ainsi la lyse de la bactérie infectée (**Wang et al., 2000**).

### 5.1.2. L'avenir de la phagothérapie

De nombreux travaux ont démontré l'efficacité de la phagothérapie dans le traitement ou la prévention des maladies infectieuses, causées par les bactéries Gram positives et Gram négatives, et c'est dans ce cadre que s'inscrit le protocole multicentrique européen PHAGOBURN ([www.phagoburn.eu](http://www.phagoburn.eu)) qui vise à évaluer la phagothérapie pour traiter les infections cutanées bactériennes (*E. coli* et *P. aeruginosa*) chez les patients brûlés. (Ravat *et al.*, 2015).

Le principal avantage des bactériophages et des enzymes phagiques est leur haute spécificité d'action, qui est dirigée contre une seule espèce bactérienne, voire quelques sous espèces d'un même genre bactérien (Nelson *et al.*, 2001). Ainsi, leur utilisation en phagothérapie permet de traiter les maladies infectieuses de manière ciblée. Ce type de thérapie n'affecte pas les bactéries de la flore commensale, contrairement aux traitements antibiotiques qui éliminent, sans aucune distinction, les bactéries pathogènes et les bactéries non pathogènes. De plus, la contamination bactérienne par les phages s'illustre comme un mécanisme d'action original et singulier. En induisant la destruction des cellules bactériennes peu de temps après l'infection, les phages neutralisent les capacités adaptatives des bactéries, limitant ainsi l'apparition des résistances.

### 5.1.3. Inconvénients de la phagothérapie

Dans la mesure où leur cible est la bactérie, il ne faut en espérer aucun bénéfice sur les infections fongiques, parasitaires et virales. (Ravat *et al.*, 2015).

Des risques potentiels existent quant à l'utilisation des bactériophages en thérapeutique. Ils sont liés aux propriétés lysogéniques des phages dits « tempérés », qui ont la capacité d'intégrer leur ADN dans le génome bactérien et de persister à l'état latent sous forme de prophages. Ils sont alors susceptibles de transmettre des gènes supplémentaires au génome bactérien, comme des gènes de virulence ou des gènes de résistance aux antibiotiques, qui, en cas de réactivation des prophages, peuvent se disséminer entre espèces bactériennes (Loeffler *et al.*, 2001, Ravat *et al.*, 2015).

La réactivation des prophages, encore appelée « processus d'induction », implique l'excision de l'ADN phagique du génome bactérien et le retour à un cycle lytique. La lyse cellulaire alors occasionnée entraîne la libération de nombreuses endotoxines bactériennes, qui peuvent provoquer des chocs septiques (Matsuda *et al.*, 2005 ; Skurnik et Strauch, 2006). Pour limiter ces risques, les recherches actuelles se concentrent sur la création de phages génétiquement modifiés, incapables d'adopter ce comportement de latence et/ou d'entrer en phase d'induction (Hagens et Blasi, 2003 ; Hagens *et al.*, 2004).

De plus, les interactions-hôtes bactéries et leur co-évolution laissent apparaître la possibilité de résistances des bactéries à l'action des bactériophages et laissent entrevoir une possible inefficacité des phages sur les bactéries (Ravat *et al.*, 2015).

## 5.2. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens regroupent un vaste ensemble de molécules, qui sont produites par de nombreux types cellulaires. Ils constituent la première ligne de défense naturelle des organismes, unicellulaires et multicellulaires, contre les invasions pathogènes. (Michel, 2010).

Les PAM, ou encore AMP (« Antimicrobial peptide »), sont des peptides multifonctionnels jouant un rôle biologique fondamental, notamment dans l'élimination de micro-organismes pathogènes. La structure même des peptides leur confère certaines caractéristiques essentielles pour leur action antimicrobienne : leur petite taille, 12 à 50 AA, le caractère amphiphile et cationique pour certains (Michel, 2010). A l'heure actuelle, plus de 1500 peptides antimicrobiens d'origines différentes ont été identifiés (Lai *et al.* 2009), Antimicrobial Peptide Database : <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Cela inclut les peptides antimicrobiens produits dans des tissus et cellules très divers de plantes, d'invertébrés, d'animaux (Ganz *et al.* 1998; Zasloff 2002).

### 5.2.1. Les peptides cationiques antimicrobiens (PCAs)

Plus de 750 peptides cationiques antimicrobiens (PCAs) ont été isolés jusqu'à présent de divers organismes, incluant les animaux, vertébrés et invertébrés, les plantes, les bactéries et les champignons (Lehrer et Ganz, 1999 ; Hancock, 2001 ; Zasloff, 2002, Vizioli et Salzet, 2002 ; Brogden *et al.*, 2003 ; Ganz, 2003).

La plupart des PCAs présentent un spectre d'activité très étendu puisqu'il couvre la majorité des espèces bactériennes et fongiques incluant les pathogènes pour l'Homme, des virus enveloppés et des protozoaires (Hancock, 2001).

Des PCAs, à spectre d'activité plus réduit, ont toutefois été identifiés. Ce sont notamment des peptides d'origine bactérienne, tels que les bactériocines, produites par les bactéries lactiques. L'activité antibactérienne de ces PCAs est limitée car restreinte aux bactéries proches de la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009).

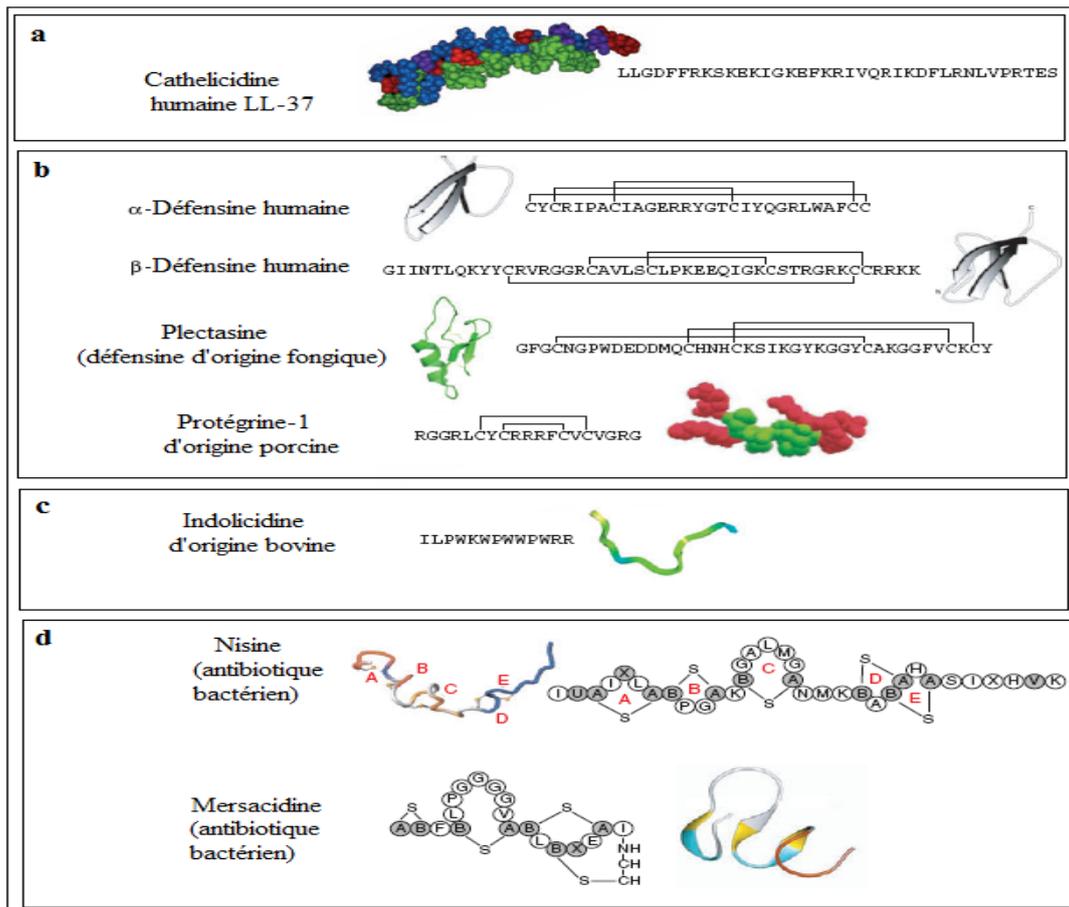
Chez les organismes multicellulaires, les PCAs sont les molécules effectrices de l'immunité innée. Leur action dans la lutte antimicrobienne peut s'exercer de deux manières distinctes : soit par une action de type antibiotique, ciblant directement les microorganismes en vue de les détruire, soit par une activité immuno-modulatrice, passant par le recrutement et l'activation des cellules immunitaires sur le lieu de l'infection (Hancock, 2001).

### 5.2.2. Aspects structuraux

Les PCAs présentent une très grande diversité structurale (fig. ). Ils sont codés génétiquement et dérivent de précurseurs peptidiques, *via* une ou plusieurs voies d'activation protéolytiques (Bals, 2000). Ce sont de courts peptides, constitués de 10 à 50 acides aminés en moyenne, uniquement de type lévogyre. Ils présentent une charge nette positive (généralement +2 ou +9) et une proportion

conséquence ( $\geq 30\%$ ) de résidus hydrophobes, qui leur confère des propriétés amphiphiles (Zasloff, 2002 ; Hancock et Sahl, 2006). Suivant la composition en acides aminés, la longueur et le mode de repliement de ces peptides, on distingue 4 grands groupes structuraux :

- les peptides linéaires formant des hélices  $\alpha$  (figure 9 a),
- les peptides riches en résidus cystéyl formant des ponts disulfures (figure 9 b),
- les peptides de structure étendue enrichis en acides aminés spécifiques (figure 9 c),
- les peptides avec des acides aminés modifiés (figure 9 d).



**Figure 9.** Séquences et structures de quelques peptides cationiques antimicrobiens (Hancock et Sahl, 2006)

### 5.2.3. Mode d'action

Les mécanismes par lesquels agissent les PCAs demeurent complexes et ne sont pas totalement élucidés. Il est toutefois admis que ces molécules agissent préférentiellement au niveau de la membrane cellulaire. Le caractère amphiphile des PCAs semble jouer un rôle important dans les interactions qu'ils établissent au niveau membranaire.

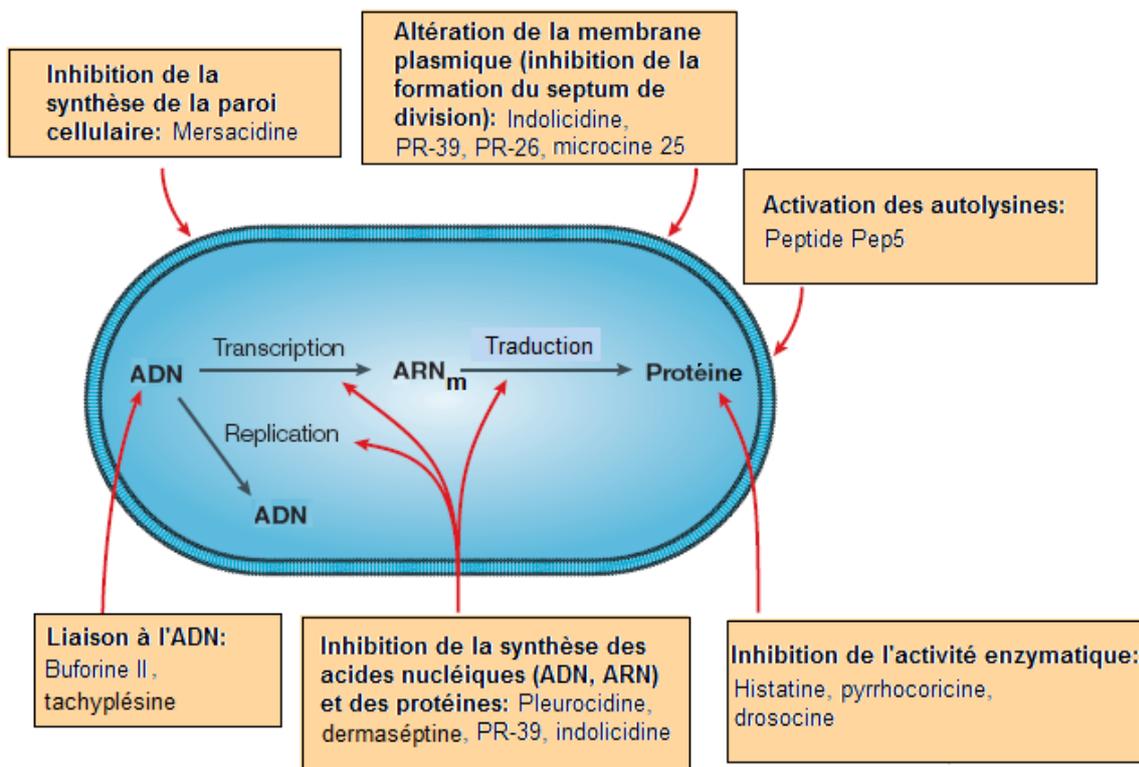
En effet, leur charge nette positive assure leur ancrage à la surface membranaire microbienne polyanionique et leur caractère hydrophobe facilite leur passage à travers les phospholipides membranaires. Après leur insertion dans la bicouche lipidique, ils peuvent agir de deux façons : soit

en détruisant l'intégrité structurale de la membrane, par la formation de pores, de canaux et /ou de micelles, soit en traversant la membrane et en agissant sur des cibles intracellulaires (**Brogden, 2005**).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les altérations induites par les PCAs au niveau membranaire (**Brogden, 2005 ; Hancock et Sahl, 2006**). Les interactions, établies entre ces PCAs et les phospholipides membranaires, conduisent à la formation de pores, qui peuvent être de type toroïdal ou en forme de tonneau, comme cela a pu être observé pour l'alaméthicine (**Yang et al., 2001**) et la protégrine I de porc (**Yamagushi et al., 2002**). L'intégrité de la membrane est alors altérée et la perméabilité membranaire modifiée.

Ces événements conduisent rapidement à la mort du microorganisme cible. Ainsi, la défensine A de l'insecte *Phormia terranova* déstabilise instantanément la membrane cytoplasmique de *Micrococcus luteus*, entraînant une fuite du potassium, une diminution de la concentration intracellulaire en ATP et une inhibition de la respiration cellulaire (**Cociancich et al., 1993**). La magainine II provoque les mêmes effets sur les membranes, externe et interne, d'*E. coli* (**Matzusaki et al., 1997**). Les PCAs qui agissent par un effet de type détergent, s'accablent parallèlement à la surface membranaire, puis se réorientent à l'intérieur de la bicouche pour former des agrégats de type peptides-lipides ou des micelles. Ce mécanisme est « concentration-dépendant » puisque des concentrations élevées en PCAs entraînent la lyse immédiate des cellules microbiennes par rupture de leur membrane (**Oren et Shai, 1998 ; Shai, 1999 ; Verdon et al., 2009**).

Toutefois il apparaît que la formation de pores transmembranaires et la perméabilisation de la membrane ne soient pas les seuls mécanismes impliqués dans le processus de mort cellulaire (Figure 10). En fait, plusieurs observations suggèrent que la translocation des PCAs à travers la membrane cytoplasmique altère également la formation des septa de division (**Shi et al., 1996**), inhiber les activités enzymatiques (**Bierbaum et Sahl, 1987**) et les activités métaboliques de synthèse de la paroi cellulaire (**Brotz et al., 1998**), des acides nucléiques et des protéines (**Sahl et al., 2005**).



**Figure 10.** Mode d'action des peptides antimicrobiens (**Broden, 2005**)

Certains peptides de la classe des lantibiotiques retirent leur activité antibactérienne de la combinaison de plusieurs actions, qui s'exercent sur différentes cibles cellulaires. En plus de leur affinité pour les membranes bactériennes, la nisine et l'épidermine interagissent spécifiquement avec le précurseur de la biosynthèse du peptidoglycane, le lipide II. En bloquant cette molécule, qui leur sert de point d'ancrage à la membrane plasmique, ces PCAs induisent, à la fois, la formation de pores transmembranaires et l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (**Sahl et al., 2005**). L'action de la nisine sur la paroi peut également se traduire par l'activation des autolysines, enzymes lytiques qui assurent la dégradation du peptidoglycane. La mort cellulaire de *Staphylococcus simulans* est ainsi induite par l'action simultanée de la nisine sur la membrane, qui s'exerce *via* la formation de pores non spécifiques, et sur la paroi, *via* l'activation du système autolytique (**Bierbaum et Sahl, 1987 ; Brotz et al., 1998 ; Sahl et al., 2005**). Quand ces actions se produisent de manière synchrone, des concentrations piconanomolaires en peptides suffisent à provoquer la mort cellulaire.

### 5.3. Les peptides anioniques antimicrobiens

A côté des peptides cationiques antimicrobiens, se démarque un groupe particulier de peptides, de petite taille (5-70 acides aminés) et caractérisés par la présence d'une charge nette négative (généralement -1 à -7). Ces peptides, qualifiés de peptides anioniques antimicrobiens, sont codés génétiquement et leur expression peut être constitutive ou induite. Ils sont produits à de faibles concentrations dans les glandes sudoripares des épithéliums humains, comme la dermcidine (**Schittek et al., 2001**), et les liquides broncho-alvéolaires (**Brogden et al., 1996**). Certains d'entre eux peuvent être obtenus par clivage protéolytique, comme la lactoferricine, produite par clivage pepsique de la lactoferrine (**Brogden, 2005**).

Le spectre d'activité des peptides anioniques antimicrobiens est vaste car ils agissent contre les bactéries Gram positives et Gram négatives, les champignons, les virus et les insectes. Les interactions établies entre les peptides anioniques et la membrane plasmique semblent primordiales pour exercer cette activité. Pour faciliter ces interactions, ils adoptent une structure amphiphile et nécessitent l'intervention de cofacteurs comme le Zinc (**Fritsche et al., 2008 ; Harris et al., 2009**). La liaison des peptides aux ions entraîne la formation de sels, qui vont pouvoir agir avec les constituants anioniques des membranes microbiennes, tels que les acides teichoïques chez les bactéries Gram positives ou le lipopolysaccharide chez les bactéries Gram négatives.

Toutefois, les mécanismes, par lesquels les peptides anioniques antimicrobiens exercent leur activité et induisent la mort cellulaire, ne sont pas encore élucidés.

### 5.4. Les applications des peptides antimicrobiens

Plusieurs peptides antimicrobiens, ou analogues, sont en cours de développement clinique, essentiellement sous forme de crèmes pour application locale (topiques). Le premier peptide antimicrobien, développé dans les années 1990, est un dérivé de la magainine, le pexiganane. Dans une étude clinique de phase III, ce peptide, incorporé dans une crème, s'est révélé aussi efficace qu'une antibiothérapie orale par ofloxacine, dans le traitement d'ulcérations cutanées surinfectées chez des patients diabétiques (**Brogden, 2005**).

Chez les grands brûlés, le principal risque est l'infection. Il existe des greffes de peau ainsi que des substituts cutanés, mais n'étant pas vascularisés, ils sont très sensibles aux infections bactériennes. Les PAM, et notamment les défensines, jouent un rôle crucial dans la protection du greffon, même si la concentration en PAM n'est pas suffisante pour éradiquer les bactéries à elle seule (**Michel, 2010**).

Le déficit en PAM, observés chez les patients atteints d'eczéma atopique, serait à l'origine d'infections chroniques à *Staphylococcus aureus* (**Guinoiseau et al., 2011**). Une sur expression de

ces PAM surprotège contre les infections cutanées ; ainsi, les patients atteints de psoriasis, maladie auto-immune, présentent rarement des infections liées à la peau (**Schroder et al. 2011**).

Benincasa et collaborateurs ont mené une étude sur des patients atteints de mucoviscidose. Ils ont étudié l'effet des polysaccharides produits par des bactéries à tropisme pulmonaire, comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* sur l'activité antibactérienne de la cathélicidine humaine (LL-37) et la  $\beta$ -défensine humaine hBD-3. Les résultats ont confirmé le rôle important des PAM dans la protection du tractus respiratoire vis-à-vis de ces bactéries (**Guinoiseau et al., 2011**). En effet, les PAM sont sécrétées dans les voies respiratoires et contribuent à la première ligne de défense contre les pathogènes inhalés.

L'épithélium pulmonaire réagit lors d'une agression bactérienne, par la production de défensines en très grandes concentrations (**Jonard et al. 2006**). Dans une autre étude menée chez des patients atteints de mucoviscidose, il a été démontré que les défensines synthétisées par les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires perdraient leur activité antimicrobienne à cause de fortes concentrations salines. C'est ce qui provoque les sur infections bactériennes, les défensines étant incapables de jouer leur rôle sur les bactéries (**Goldman et al. 1997**).

Parmi les autres peptides antimicrobiens en développement avancé, il convient de citer le dérivé de la protégrine I, l'Iseganane®, qui est en étude de phase III dans le traitement des mucites chimio-induites, sous forme de bains de bouche, et l'Omiganane®, analogue de l'indolicidine, également en cours d'étude de phase III dans le cadre de la prévention des infections cutanées, associées à la pose de cathéters (**Brogden, 2005 ; Fritsche et al., 2008**). Les premiers candidats médicaments sont actuellement confrontés à l'établissement de la preuve de concept de leur valeur thérapeutique, surtout pour le traitement des infections systémiques. Leur labilité à l'action des protéases est un paramètre à prendre en compte pour une utilisation *in vivo*, car elle peut générer des interactions pharmacocinétiques défavorables. Par ailleurs, même si ces peptides semblent présenter une affinité spécifique pour les membranes microbiennes polyanioniques, l'absence de toxicité contre les cellules humaines n'est pas à exclure.

## **5.5. Les inconvénients des PAM**

Les PAM, comme toutes molécules à visée thérapeutique, sont dotés d'avantages indéniables mais également d'inconvénients.

Parmi les avantages, nous pouvons citer leur rôle multifonctionnel dans la lutte contre les bactéries, fungi et virus, leur action bactéricide rapide et sur des bactéries multi-résistantes. Malheureusement,

les PAM naturels ou de synthèse coûte très cher en production, et le recul reste encore faible quant à leur toxicité potentielle en tant qu'agent anti infectieux.

Le besoin en nouveaux médicaments pour agrandir l'arsenal de thérapeutiques anti-infectieuses fait toutefois des PAM des molécules prometteuses.

Aussi, peu d'études sur la toxicité des peptides ont été publiées, et il semble indispensable de mener des recherches approfondies sur la toxicité éventuelle des PAM en vue de l'obtention de nouveaux médicaments anti infectieux. En effet, l'existence d'une activité hémolytique pourrait être un frein majeur au développement de ces molécules.

## **6. Les plantes**

Les plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine, la morphine, la quinine ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antibactérienne. Peu d'espèces végétales sont connues et seule une minorité d'entre elles est explorée chimiquement. Il resterait entre 300 000 et 500 000 espèces de plantes à découvrir (UNEP-WCMC, 2002) ce qui laisse présager un nombre conséquent de nouvelles molécules à identifier. Hormis cette vaste biodiversité, les plantes combinent un ensemble de critères, qui justifient le regain d'intérêt pour l'exploitation de cette ressource naturelle (**Guinoiseau , 2011**).

Une plante médicinale et plus précisément une drogue végétale est à la fois un produit accompli destiné à la consommation, et une matière première pour l'obtention de substances actives.

La plante possède un métabolisme primaire qui lui permet d'élaborer des molécules indispensables à sa vie. Ces molécules lui assurent une croissance et une reproduction. Parmi ces molécules nous trouvons les acides organiques, acides aminés, protéines, sucres simples (polysaccharides), acides gras ou lipides et un métabolisme secondaire qui sont des molécules spécifiques et sans action pour la croissance et la reproduction des plantes.

Ces molécules servent pour la défense (lutte contre les agressions, maladies), à attirer des insectes et des animaux pour la reproduction, la pollinisation ou encore à éloigner les prédateurs (via des molécules colorées ou odorantes). Parmi ces substances, on trouve les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les alcaloïdes et les huiles essentielles. Ces composés constituent sont doués d'activités pharmacologiques et toxicologiques.

En effet, de nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes ; ces composés agissent suivant plusieurs mécanismes :

- (i) formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides, inhibant ainsi leurs fonctions (polyphénols) ;
- (ii) rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes lipophiles, terpénoïdes, défensines) ;
- (iii) inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides).

Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes), provoquant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) et inhibiteurs des bêta-lactamases (alkyls gallates). En plus des mécanismes d'action et des classes Phytochimiques auxquelles appartiennent les composés actifs présentés ci-dessus, il y a lieu d'ajouter quelques résultats importants publiés récemment :

(i) La formation de biofilms par les agents infectieux rend ces derniers inaccessibles aux antibiotiques, leur conférant ainsi une résistance. Inhiber la formation des biofilms constitue donc une stratégie permettant aux antimicrobiens d'atteindre les agents infectieux ; des métabolites secondaires de plantes médicinales peuvent jouer ce rôle. Ainsi, les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* et *Syzygium aromaticum* inhibent la formation des biofilms chez *Candida albicans* (**Khan et Ahmad, 2012**). Le Tan Re Qing (TRQ), extrait aqueux d'un mélange de cinq drogues (*Scutellaria baicalensis* Georgi, Bear Gall, Goral, *Lonicera japonica* Thunb et *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl.) présente une double action, d'une part il inhibe la formation des biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa* et d'autre part il tue les microorganismes se trouvant dans la matrice (**Wang et al., 2011**).

(ii) Une macrolactone contenant le D-xylose et le L-rhamnose, la pescapréine, isolée de *Ipomoea pes-caprae* a montré un effet inhibiteur sur les pompes à efflux des MRSA, augmentant ainsi l'action de la norfloxacine (**Escobedo-Martinez et al, 2010**).

(iii) L'effet antimicrobien indirect de deux triterpènes, l'acide oléanolique et l'acide ursolique, a été décrit. Ces deux composés augmentent l'activité des lactames vis-à-vis des souches de *S. aureus*, *S. epidermidis* et *L. monocytogenes* (**Kurek et al., 2012**).

## 7. Les Huiles essentielles

Les molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques des micro organismes et d'insectes.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents . (Piochon et al.,2008).

Les terpénoïdes disponibles en quantités relativement importantes chez les végétaux comme huile essentielle, résine ou cire sont des ressources renouvelables importantes qui fournissent une large gamme de produits d'importance commerciale (Zinkel & Russell, 1989 ; Dawson, 1994). Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices d'huiles essentielles. L'exploration des huiles essentielles pour la recherche de molécules à activité antibiotique semble être une voie intéressante.

Etant donné que les huiles essentielles de la menthe poivrée et les bigaradiers, sujets principale de cette thèse, sont des plantes productrices d'HE, nous nous limiterons dans cette introduction aux HEs.

### 7.1. Définition et répartition dans le règne végétal

Le terme "huile essentielle" a été inventé au 16ième siècle par le médecin suisse Parascelsus von Hohenheim afin de désigner le composé actif d'un remède naturel. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums.

Les HEs, appelées communément essences végétales, sont des mélanges variables et complexes de substances volatiles aromatiques et parfumantes contenant principalement des terpénoïdes (principalement des mono- et sesquiterpènes bien que des diterpènes puissent être également présents), et des dérivés des acides gras (hydrocarbures aliphatiques de faible poids moléculaire, linéaires, ramifiés, saturés et insaturés, acides, alcools, aldéhydes, esters, lactones). Exceptionnellement, des composés azotés, soufrés, et phénoliques (dérivant de la voie de synthèse des phénylpropanoïdes) peuvent être également présents. La norme française, AFNOR NF T 75-006 (AFNOR, 1996), donne une définition aux HEs basée sur leur méthode d'obtention "produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche".

De très nombreuses espèces végétales produisent les HEs. Il en existe plus de 2000 espèces appartenant à environ 60 familles. Les HEs se retrouvent dans toutes les parties de la plante comme

les fleurs (lavande, bergamote, jasmin, rose), les feuilles (lavande, citronnelle, laurier, romarin, sauge, sapin), les tiges (citronnelle, lemongrass), les racines (vétiver, angélique), les rhizomes (gingembre, acorus), le bois (santal), l'écorce (cannelier), les fruits (bleuet, citron) et les graines (muscade, aneth). Les espèces productrices d'HE sont présentes dans toutes les régions climatiques du globe (**Benabdlekader et al.,2012**).

## **7.2. Aperçu historique**

L'utilisation de substances odorantes de plantes est connue depuis l'antiquité et décrites par les plus anciennes civilisations : dans l'Orient et le Moyen Orient, le Nord de l'Afrique suivi de l'Europe (**Franchomme, 1990**). Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des HEs occupent une place de plus en plus importante. En 1928 le chimiste français René-Maurice Gattefosse a utilisé le terme 'aromathérapie' pour décrire les propriétés curatives des HEs lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main. En 1964, le docteur français Jean Valunet a connu un certain succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie avec des HEs. Aujourd'hui, nous reconnaissons que les HEs ont des effets thérapeutiques, psycho-actifs et physiologiques sur l'homme (**Garneau, 2004**).

L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage des HEs en médecine douce. Leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années (International Trade Centre, 1993) et les industries de la parfumerie, des arômes et de la cosmétique consomment des dizaines de milliers de tonnes par an de plantes à HEs (**Bruneton, 1993**).

## **7.3. Propriétés physiques**

Les huiles essentielles sont des substances volatiles, liquides à température ambiante, de nature hydrophobe, rarement colorées, et fortement odorantes. Elles ont un indice de réfraction élevé (**Bousbiaa, 2011**), peu miscibles à l'eau, et solubles dans les solvants organiques (**Ouis, 2015**) Tableau (4).

Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique et sont en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes.(**El Kelamouni,2010**).

**Tableau 4.** Principales caractéristiques physiques de quelques terpènes.

(El Kalamouni,2010)

<b>Terpène</b>	<b>Poids moléculaire</b>	<b>Odeur</b>	<b>Solubilité dans l'eau</b>	<b>Solubilité dans les solvants</b>
<b>Limonène</b>	163.23	Citronnée agréable	Très peu soluble	Miscible dans l'alcool
<b>Menthol</b>	156.26	Agréable fraîche	Légèrement soluble	Miscible dans l'alcool, l'éther et le chloroforme
<b>Thujone</b>	152.23	Forte aigue	Quasi insoluble	Miscible dans les solvants organiques

#### 7.4. Propriétés chimiques

Les huiles essentielles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables. Les poils sécréteurs épidermiques rencontrés souvent chez les Lamiacées, Géraniacées et Verbénacées. Ils produisent les essences dites superficielles. · les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les *Myrtacée*, *Rutacées*, ainsi que des canaux sécréteurs chez les Apiacées.

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier considérablement :

- dans une même plante selon les organes (feuille, fleur, fruit, bois)
- dans l'année selon la saison pour une même plante,
- selon les conditions de culture pour une même espèce végétale (ensoleillement, humidité, longueur du jour, fertilité du sol),
- selon les races chimiques (ou chemotypes) pour une même espèce (l'exemple classique est le thym avec 7 races chimiques).(El Kalamouni,2010).

L'obtention des HES à partir du matériel végétal est généralement réalisée par distillation, une technique développée par les Arabes en moyens âges (**Bakkali et al.,2008**). En effet, l'hydrodistillation des HES est utilisée à ce jour tant que la méthode recommandée par la pharmacopée européenne (**European–Pharmacopoeia, 2005**).

D'autres techniques sont également appliquées pour l'extraction des HES telles que l'enfleurage (**Eltz et al., 2007**), l'extraction par fluide supercritique (**Moyler, 1993**) et l'extraction aux microondes sans solvant (**Lucchesi et al., 2004**).

D'autre part, l'obtention des HEs par les différentes techniques est influencée par le séchage du matériel végétal. L'effet du séchage sur les HEs a été bien discuté dans plusieurs travaux (**Okoh et al., 2008; Figiel et al., 2010; Al-Jaber et al., 2012**). Généralement, le séchage des plantes aromatiques affecte significativement le rendement ainsi que les activités biologiques de leurs HEs (**Benbelaïd et al., 2013**).

Une huile essentielle n'a rien à avoir avec les huiles végétales obtenue par pression, en effet les HEs, ne contiennent pas de corps gras. (**Ouis, 2015**).

#### **7.4.1. La composition chimique des huiles essentielles**

La composition de nombreuses HEs a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (**Burt, 2004**).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (**Guinoiseau, 2011; Sebaa et al., 2015**). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles. Les principaux constituants des huiles essentielles, connues pour leur activité antibactérienne, sont présentés dans le tableau. (**Guinoiseau, 2011**).

Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% de l'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces (**Guinoiseau, 2011**).

#### **7.4.2. Constituants et structures**

Les huiles essentielles sont caractérisées par des composants majeurs à hautes concentrations avec d'autres composants présents en traces ou en moindre pourcentage.

Elles sont composées de deux groupes principaux d'origine biosynthétique distincte, de poids moléculaire bas à savoir les terpènes et l'autre groupe est composé de constituants aromatiques et aliphatiques dérivés du phénylpropane et des composés spécifiques contenant du soufre ou de l'azote (**Bakkali et al., 2008**).

##### **a- terpènes et terpénoïdes**

Les terpènes forment structurellement et fonctionnellement différentes classes. Ils sont faits de la combinaison de plusieurs unités de 5 carbones-bases appelés isoprène ( $C_5H_8$ ) et peuvent être à chaîne ouverte ou cyclique (**Bakkali et al., 2008**).

Les principaux terpènes sont les monoterpènes ( $C_{10}$ ) et les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ), mais on trouve aussi des hémiterpènes ( $C_5$ ), diterpènes ( $C_{20}$ ), des triterpènes ( $C_{30}$ ) et des tétraterpènes ( $C_{40}$ ). La synthèse se fait via la voie de l'acide mévalonique à partir de l'acétyl-CoA (**Hyldgaard et al., 2012**).

Un terpène contenant un oxygène est appelé terpénoïdes (**Cowan, 1999**). Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les molécules les plus représentatifs dans le règne végétal. On peut distinguer:

- Les monoterpènes hydrocarbonés: Tels que pinène, 3-carene, myrcène, sabinène
- Les monoterpènes oxygénés ou monoterpénoïdes :

Alcools : géraniol, linalol, menthol, bornéol etc.

Aldéhydes : néral, gèranial etc.

Esters : Acétate de linalyl, acétate de myrthenyl, acétate de gèranyl etc.

Ethers : 1,8 cineole (eucalyptol) etc.

Phénols : thymol, carvacrole etc.

Cétones : pulegone, menthone, camphre, carvone etc.

- Les sesquiterpènes hydrocarbonés : Tels qu'azulène, elemène,  $\beta$ -caryophyllène etc
- Les sesquiterpènes oxygénés ou sesquiterpénoïdes : Tels que cedrole, cadinène,

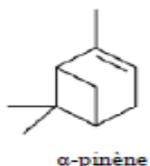
germacrone, caryophyllène oxyde etc.

#### **b - Composés aromatiques dérivés du phénylpropane**

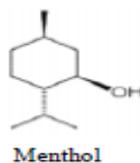
Ils dérivent du phénylpropane et sont moins fréquents que les terpènes (**Bakkali et al., 2008**). Ils sont caractérisés par un noyau aromatique lié à une chaîne de trois atomes de carbone propène (**Hyldgaard et al., 2012**). Cependant, ces composés sont importants sur le plan qualitatif et quantitatif chez certaines espèces; le cinnamaldéhyde est le constituant majoritaire de l'huile essentielle du *Cinnamomum verum* (cannelle) et l'anéthole composant majoritaire de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* (anis) (**Rodrigues et al., 2003**) et ceux qui ont été le mieux étudiés sont l'eugénol, l'isoeugénol, la vanilline, le safrole et le cinnamaldéhyde. Certaines huiles essentielles peuvent contenir des composés spécifiques contenant du soufre ou du nitrogène tel que l'allicin et allyl-isothiocyanate (**Svoboda, 1999**).

## Monoterpènes

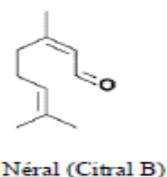
### **Monoterpènes Hydrocarbonés**



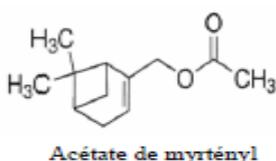
### **Alcools**



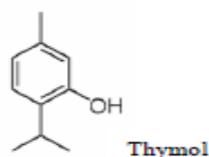
### **Aldéhyde**



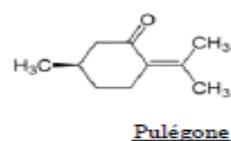
### **Esters**



### **Phénols**



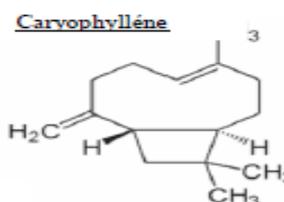
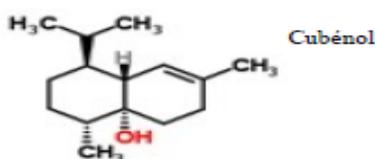
### **Cétones**



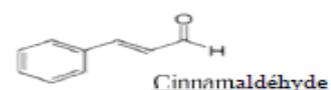
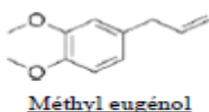
### **Ethers**



## Sesquiterpènes



## Dérivés du phénylpropane



**Figure 11.** Structure chimique de quelques composants des huiles essentielles

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées.

Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol (Figure 11), sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, d'origan et de clou de girofle, démontrent les plus hautes activités antibactériennes (**Guinoiseau, 2011**).

#### **a. Composés d'origine variés :**

En général ce sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée, et portant différentes fonctions. On peut citer : l'heptane, la paraffine, des esters cycliques, des alcools ....etc. (**Sebaa et al., 2015**).

### **7.5. Les activités biologiques des huiles essentielles**

Le rôle physiologique des huiles essentielles pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés (**Guinoiseau, 2011**).

En général, et étant donné que les HEs sont principalement des terpénoïdes, presque tout ce qui a été écrit sur l'importance commerciale et médicinale des terpénoïdes s'applique aux HEs. Les HEs étant des mélanges complexes, elles sont douées d'effets biologiques variés comme : des effets antiseptiques (antibiotiques) (**Pellecuer et al., 1980**), antihistaminiques, antioxydants (**Karioti et al., 2006**), analgésiques, calmants, sédatifs, antispasmodiques, diurétiques, laxatifs, antihypertenseurs, vasopresseurs, antipyrétiques et anti-inflammatoire (**Siani et al., 2004**). Tableau (5).

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles comme contre les dermatophytes (**Chaumont et Leger, 1989**) ou contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence (**Candan et al., 2003**).

Certaines HEs présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. Ils ont démontré une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (**Mbarek et al., 2007** et **Bouyahia et al., 2016**). Et une efficacité contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques HL-60 et K562 (**De Souza et al., 2004**). D'autres applications médicales sont étudiées. Les travaux de **Jafri et al., (2001)** ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de cardamome à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol (**Jafri et al., 2001**). Il a également été démontré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'oestradiol (**Monti et al., 2002**). Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement (**Umezu, 1999**) ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues, comme la nicotine (**Zhao et al., 2005**).

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes, et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**Bakkali et al., 2008**). **Pibiri (2005)** a montré que les huiles essentielles (testées à l'état gazeux ont contribué à l'assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation. Le pouvoir antifongique, insecticide et antiparasitaire d'un grand nombre des huiles essentielles rend avantageux la possibilité de leurs application comme une alternative naturelle dans le stockage de céréales, et contre la détérioration par les moisissures (**Belyagoubi, 2005**). Les HEs peuvent être utilisés comme des biopesticides dans la gestion de la résistance des insectes ravageurs aux pesticides (**Govindarajan, 2011**).

**Tableau 5.** Activité biologique des molécules aromatiques selon leur fonction chimique (**Hernandez, 2005**).

<b>Composés aromatiques</b>	<b>Propriétés</b>
<b>Phénols (Carvacrol, Eugénol)</b>	Stimulantes, Toniques, Antiseptiques, Bactéricides, Fongicides, Anti-virale, Antiparasitaires, Irritantes
<b>Alcools terpéniques (Géraniole, Citronellol)</b>	Anti-inflammatoires, Antiseptiques, . Bactéricides, Fongicides, Anti-virale, Neurotoniques
<b>Aldéhydes terpéniques (Citronellal, Citral)</b>	Antifongiques, Sponcidas, Toxicité liée à la présence du groupe aldéhyde, Insecticide
<b>Ether-oxydes, peroxydes (Cinéole)</b>	Antibactériens, Antifongiques, Insecticides
<b>Cétones (Carvone)</b>	Calmantes, Antivirales, Antifongiques Neurotoxiques, Anti-épileptique
<b>Hydrocarbures monoterpéniques (limonène), sesquiterpènes</b>	Fongistatiques, Bactériostatiques, Insecticides

## 7.6. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles

Plusieurs études considèrent les HEs sont parmi les métabolites secondaires les plus actifs vis-à-vis des microorganismes.

C'est en 1875 que Buchholtz avait mis en évidence, pour le premier foie, que les HEs sont douées d'une activité biocide envers les microorganismes (**Benbelaid et al., 2015**).

Et en 1881 Delacroix a mis en évidence l'action antibactérienne des HEs depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt, 2004**).

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques, mais aussi vis-à-vis des champignons et les virus (**Burt, 2004; Edris, 2007**). Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Les HEs agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives seraient moins sensibles à leur action et ceci est lié directement à la structure de la paroi cellulaire de ces bactéries (**Burt, 2004**). Toutefois il existe quelques exceptions montrant que : *Aeromonas hydrophila* (**Wan et al., 1998**) et *Campylobacter jejuni* (**Wannissorn et al., 2005**) sont particulièrement sensibles à l'action des HEs, même si elles sont des bactéries Gram négative. *P. aeruginosa* est la bactérie la moins sensible aux effets des HEs (**Dorman et Deans, 2000**).

La croissance des bactéries résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines HEs. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) ; et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (**Guinoiseau et al., 2011**).

Les HEs isolées de deux espèces de thym de Corée, soit le *Thymus magnus* et le *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* et *S. aureus* (**Shin et Kim, 2005**).

L'effet des HEs est encore plus important envers les champignons (**Burt, 2004**). Cette affinité du potentiel antimicrobien contre les champignons est expliquée par le fait que les plantes sont beaucoup plus attaquées par les champignons que par les bactéries (**Agrios, 2005**).

## **7.7. Activité anti biofilms des huiles essentielles**

La connaissance des biofilms microbiens nous a permis de savoir qu'ils sont difficiles à éradiquer par les agents antimicrobiens standards, tels que les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques

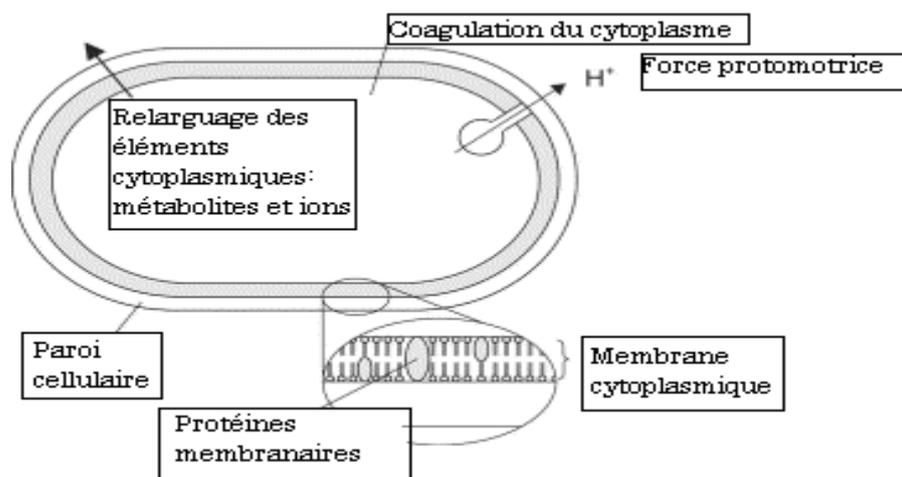
(Kavanaugh et Ribbeck, 2012). Par contre, à travers des recherches effectuées récemment, les HEs semblent efficaces vis-à-vis des biofilms microbiens, où elles peuvent agir de plusieurs façons.

D'après Niu et Gilbert (2004), les HEs à faible concentration inhibent la formation des biofilms bactériens par plusieurs mécanismes. Notamment, l'activation des gènes de réponse contre le stress qui à leur tour diminuent la production des polysaccharides extracellulaires (le constitue majoritaire de l'EPS). En plus, les HEs peuvent interagir avec les protéines des surfaces bactériennes ce qui inhibe leur fixation et par conséquent la formation du biofilm.

Les HEs semblent agir directement sur des biofilms déjà formés, contrairement à la majorité des agents antimicrobiens. D'après Niu et Gilbert (2004), les HEs ont la possibilité d'éradiquer les biofilms microbiennes par solubilisation de leur matrice extracellulaire. D'autres études indiquent que les HEs peuvent diffuser à travers la matrice polysaccharidique du biofilm et de la déstabiliser, en raison de leur forte propriété antimicrobienne intrinsèque (Ouhayoun, 2003).

### 7.8. Mécanisme d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Burt, 2004). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Figure12).



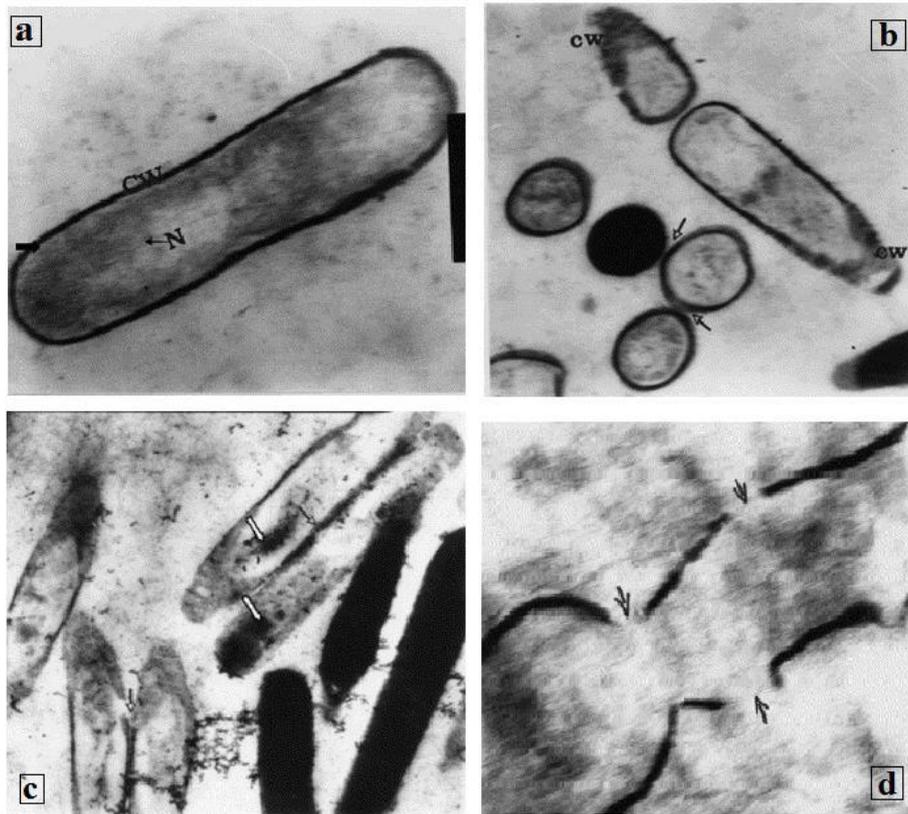
**Figure 12.** Schéma des principaux sites et mécanismes d'action des huiles essentielles et de leurs composants dans la cellule bactérienne (Burt, 2004).

**Dégradation de la paroi cellulaire** (Thoroski *et al.* 1989;. Helander *et al.* 1998), **Endommagement de la membrane cytoplasmique** (Knobloch *et al.* 1989;. Sikkema *et al.* 1994;. Oosterhaven *et al.* 1995;.. Ultee *et al.* 2000a, 2002 ), **Endommagement des protéines membranaires** (Juven *et al.* 1994;.Ultee *et al.* 1999); **Relarguage du contenu cellulaire** (Oosterhaven *et al.* 1995;. Gustafson *et al.* 1998;. Helander *et al.* 1998;. Cox *et al.* 2000;. Lambert *et al.* 2001);. **Coagulation du cytoplasme** (Gustafson *et al.* 1998) et de **l'épuisement de la force motrice de proton** (Ultee et Smid 2001; Ultee *et al.* 1999).

La propriété hydrophobe qui caractérise les molécules présentes dans les huiles essentielles, permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (**Sikkema *et al.* 1994**). Ces modifications entraînent une fuite d'ions, de composés intracellulaires et l'inhibition des enzymes membranaires intégrées (**Souza *et al.* 2013 ; Trombetta *et al.* 2005 ; Carson *et al.* 2002 ; Ultee *et al.* 2002 ; Cox *et al.* 2000, Lambert *et al.* 2001, Skandamis *et al.* 2001**). Dans le cas où les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie ou si la perte de matériel est trop importante, cela entraîne la mort cellulaire (**Burt 2004**).

Quelques investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HE ou de leurs constituants ont été décrites dans la littérature :

Des observations en microscopie électronique à transmission réalisées par **Rasooli *et al.* 2006** sur des bactéries de *Listeria monocytogenes*, exposées à des huiles essentielles de *Thymus x porlock*, ont mis en évidence une diminution de la taille des bactéries, moyen probablement employé pour survivre, (figure 13 b), une altération de la paroi bactérienne (figure 13b, 13c et 13d), une agrégation du cytoplasme (figure 13 c) et un rapprochement des cellules (figure 13b et figure 13 c).



**Figure 13.** Des observations en microscopie électronique à transmission réalisées par **Rasooli et al. 2006** sur des bactéries de *Listeria monocytogenes*

**(a):** microphotographie électronique ( $\times 50\ 000$ ) de *L. monocytogenes* (contrôle) avec N: chromosome, CW: paroi cellulaire.

**(b):** microphotographie électronique ( $\times 80\ 000$ ) de *L. monocytogenes* exposée à l'huile essentielle de Thymus xporlock (dilution 1/16). Les cellules présentent une diminution de la taille (probablement pour la survie). La paroi cellulaire (CW) subit des changements dégénératifs. Les cellules se rapprochent les unes des autres (flèches).

**(c):** microphotographie électronique ( $\times 30\ 000$ ) de *L. monocytogenes* exposée à l'huile essentielle de Thymus xporlock (dilution 1/8), le cytoplasme a perdu sa distribution montrant même une agglutination de matériel cytoplasmique (flèches blanches). Les cellules se rapprochent les unes des autres (petites flèches noires).

**(d):** microphotographie électronique ( $\times 80\ 000$ ) de *L. monocytogenes* exposée à l'huile essentielle de Thymus xporlock (dilution 1/8). La cellule présente de graves endommagements de la paroi et organites cellulaires

L'influence du carvacrol et du thymol sur des souches de *Staphylococcus aureus* a été étudiée par **Sousa et al. 2013**. Ils ont conclu que les concentrations sublétales du carvacrol et du thymol (0,3 et

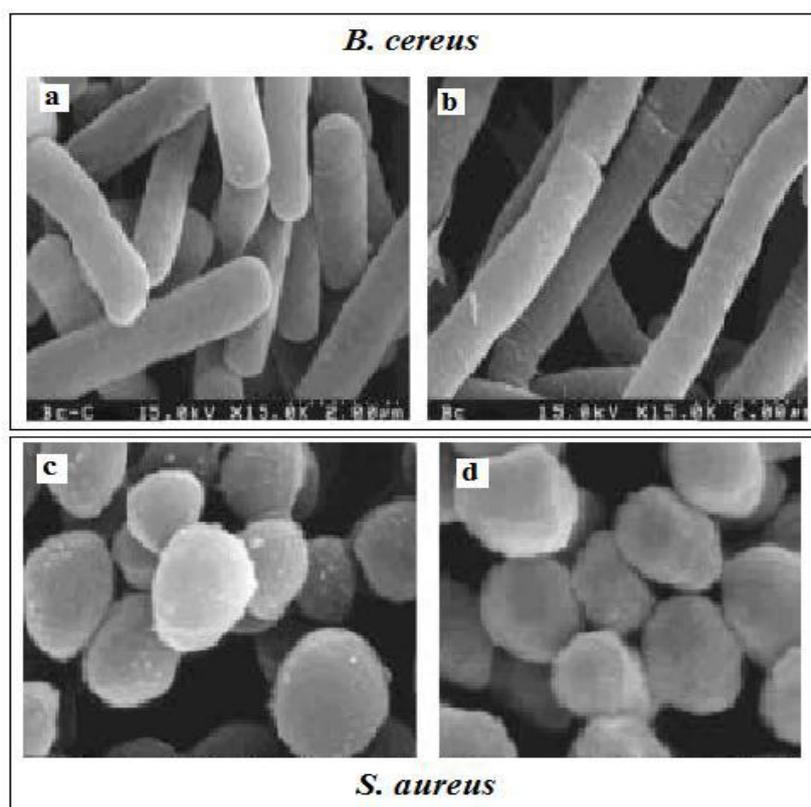
0,15 µL/mL) inhibent l'activité enzymatique de la coagulase et la lipase, entraînent une suppression totale de la production d'entérotoxine et une diminution de la tolérance au sel. Une perte d'ions potassium et de matériel absorbant à 260 nm a eu lieu immédiatement après l'addition de 0.6 µL/mL de carvacrol et 1.2 µL/mL de thymol.

Des observations au microscope électronique à balayage ont montré des déformations cellulaires de *S. aureus*. Le largage du matériel cellulaire et l'altération de la surface cellulaire suggèrent un endommagement de la membrane cytoplasmique cellulaire, ce qui entraîne une perturbation de la sécrétion de protéines et pourrait être responsable des propriétés anti-staphylocoques du carvacrol et du thymol (**Sousa et al. 2013**).

Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *Bacillus cereus*. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. Chez les bactéries exposées au carvacrol, on observe une diminution de l'ATP intracellulaire, mais aussi une diminution du potentiel membranaire. Ainsi, le carvacrol, en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, n'entraîne pas une fuite d'ATP mais une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et, donc, de la synthèse d'ATP. Cette information est confirmée par la mesure du gradient de pH à travers la membrane plasmique. Le carvacrol formerait des canaux dans la membrane favorisant la fuite des ions (**Zenasni et al. 2014**). Le carvacrol est capable de réduire la croissance du microorganisme et d'inhiber la production de toxines chez *B. cereus*. Deux hypothèses ont été présentées : soit l'exportation active des toxines hors de la cellule n'est plus possible à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force protomotrice, soit le faible taux d'ATP restant dans la cellule est utilisé par la bactérie pour survivre (**Guinoiseau et al., 2011**).

Le cinnamaldéhyde, principal constituant de l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*) est très actif contre de nombreuses bactéries Gram positives et Gram négatives (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* sp). Il inhibe les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire (**Zenasni et al., 2014**).

**Kwon et al. 2003** ont effectué des observations en microscopie électronique à balayage sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Les *B. cereus* traitées avec le cinnamaldéhyde apparaissent plus allongées et ont une forme filamenteuse (figure 14 b) que les cellules non traitées (figure 14 a), le cinnamaldéhyde empêche la formation complète de septum de division et entraîne une modification de la morphologie cellulaire. Chez *S. aureus*, il n'y a aucune modification de la morphologie cellulaire (figure 14 c et 14 d) mais un relargage des protéines cytoplasmiques, qui se traduit par une forte diminution de la densité cellulaire.



**Figure 14.** Micrographies électroniques à balayage de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Kwon *et al.*, 2003).

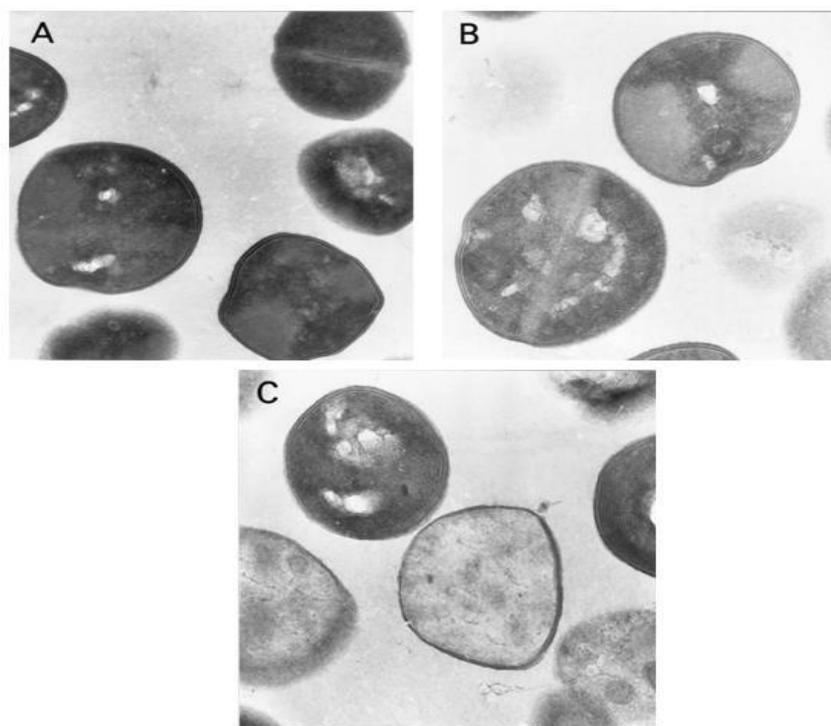
(a et c) : témoins, (b et d) : traitement au cinnamaldéhyde.

L'eugénol est le principal composant de l'huile essentielle de clou de girofle. Comme le carvacrol, il provoquerait une dégradation de la paroi cellulaire entraînant une inhibition de l'activité des ATP synthétases membranaires (Gill et Holley, 2006). Une concentration sublétales d'eugénol entraîne une inhibition de la production d'amylases et de protéases chez *B. cereus* (Thoroski *et al.*, 1999).

Le spectre d'action de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé) est très étendu. Cette huile agit sur de nombreuses espèces bactériennes, comprenant des bactéries Gram positives et Gram négatives, et se révèle très efficace contre les infections aux SARMs.

Cette activité est attribuée au terpinène-4-ol, qui est le composé majoritaire de l'huile (Hammer *et al.*, 1996). L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* perméabilise des liposomes modèles (Cox *et al.*, 2000). Ainsi, cette huile serait capable de perméabiliser les membranes plasmiques, entraînant chez *S. aureus* une perte d'ions potassium (Cox *et al.*, 2000) et de matériel absorbant à 260 nm

(Carson *et al.*, 2002). L'huile essentielle ne lyse pas les bactéries comme cela a été démontré par mesure de l'absorbance à 260 nm des filtrats bactériens (Carson *et al.*, 2002) et observé en microscopie électronique (Reichling *et al.*, 2009). Une perte de matériel cytoplasmique et la formation de structures ressemblant à des mésosomes (Figure 15), structures retrouvées après un traitement à la vancomycine, sont observées avec le terpinène-4-ol (Carson *et al.*, 2002). De plus, cette huile est plus efficace sur les bactéries en phase exponentielle de croissance que sur les bactéries en phase stationnaire (Gustafson *et al.*, 1998), suggérant l'implication d'autres cibles que la membrane.



**Figure 15.** Micrographies en microscopie à transmission de *Staphylococcus aureus* contrastés à l'acétate d'uranyle (Guinoiseau., 2011).

(A) : sans traitement, (B et C) : après traitement avec 0,3 % de terpinène-4-ol. Grossissements :  $\times 11\,500$  (A) et  $\times 14\,200$  (B et C)

### 7.9. Activité antioxydante des huiles essentielles

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

l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène.(**Toure,2015**).

### **7.9.1. Le stress oxydatif**

Les fonctions organiques et corporelles reposent sur des réactions d'oxydation qui produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme sous-produits ou de produits intermédiaires au cours du métabolisme normal. Dans des conditions normales, cette production est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense (**Mohammedi, 2006**). Le terme ERO est utilisé pour inclure à la fois des radicaux libres et certains dérivés non radicalaires réactifs de l'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**Nickavar et al., 2008**).

Un équilibre entre la formation et l'élimination de ces molécules est nécessaire pour maintenir les fonctions physiologiques normales. Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs.

#### **1. Les radicaux libres**

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (**Vansant, 2004**). Les principaux radicaux libres présents sont l'anion peroxyde, le radical hydroxyl, le radical peroxyde et l'oxygène singulier. Ils sont impliqués dans divers mécanismes physiologiques importantes. En effet, ils jouent un rôle dans la destruction des bactéries dans les cellules phagocytaires (**Garret et Grisham, 2000**). Ils entrent aussi dans la signalisation cellulaire et la régulation de nombreuses fonctions cellulaires létales telle que l'apoptose (**Favier, 2003; Beaudeau et al., 2006**). D'autres sources des radicaux libres sont les mécanismes des cycles redox que produisent certaines molécules dans l'organisme,. Les rayonnements, les particules toxiques et l'alcool sont aussi capables de générer des radicaux libres.

#### **2. Les conséquences du stress oxydatif**

Une production excessive et prolongée des ERO peut causer de graves problèmes puisqu'elles peuvent réagir avec des molécules biologiques provoquant des lésions directes au niveau de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides. Ces lésions entraînant des dommages tissulaires et cellulaires responsables de différentes pathologies (**Nickavar et al., 2008**).

Les lipides et principalement les acides gras sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle ; réaction appelée peroxydation lipidique. Les conséquences de cette attaque sont graves pouvant induire des maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**). Les radicaux libres peuvent aussi induire des effets mutagènes à l'ADN et l'oxydation du glucose très dangereuse dans le cas des personnes diabétiques.

Les radicaux libres ont un rôle principal dans divers pathologies telle que l'athérosclérose, le cancer, les troubles inflammatoires et neuro-dégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (**Galvez et al., 2005**).

### **7.9.2. Les antioxydants**

L'une des manières d'éliminer les radicaux libres et de les maintenir sous contrôle est l'action des systèmes antioxydants bio-synthétisés par l'organisme ou apportés par l'alimentation.

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui retarde, prévient ou élimine les dommages oxydatifs d'une molécule cible (**Ebrahimabadi et al., 2010**). Les molécules impliquées dans la défense antioxydante peuvent être endogènes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase ...) et naturels (vitamine E, vitamine C, les caroténoïdes, des composés phénoliques, huiles essentielles...). Un régime alimentaire riche en antioxydants naturels peut jouer un rôle primordial dans le système de défense antioxydant (**Cox et al., 2004**).

Les antioxydants ont été largement utilisés comme additifs alimentaires pour fournir une protection contre la dégradation oxydative des aliments, la rancidité, la décoloration et pour prolonger la durée de vie surtout les aliments gras. Les antioxydants les plus utilisés commercialement sont synthétiques ex. hydroxytoluène butylé (BHT) et hydroxyanisole butylé (BHA) et le butyle hydroquinone tertiaire (TBQH). Toutefois, ces antioxydants peuvent provoquer des effets secondaires toxiques sur la santé (**Dorman et Hiltunen, 2004; Tepe et al., 2006; Nickavar et al., 2008**). Récemment, la recherche d'antioxydants naturels à

partir de plantes a largement augmenté et apparait comme une alternative attractive pour substituer les antioxydants synthétiques. Une grande variété des huiles essentielles et des extraits des plantes aromatiques et médicinales ont été étudiées pour leurs propriétés antioxydantes.

Les HEs et les extraits de plantes sont connus pour leur habilité à montrer divers degrés d'activités antioxydantes. La littérature montre de nombreux rapports sur les HEs montrant un fort potentiel antioxydant (**Ozen et al., 2007; Descalzo and Sancho, 2008; Sarikurkcu et al., 2010**). Certains ont été rapportés être plus efficace que les antioxydants synthétiques (**Mimica-Dukic et al., 2004; Tepe et al., 2006; Hussain et al., 2008; Liu et al., 2008**). Il a été montré aussi que les composés phénoliques tels que le

carvacrol et le thymol témoignent d'un fort potentiel antioxydant (**Ruberto et Baratta, 2000; Tepe et al., 2005; Ebrahimabadi et al., 2010**).

D'autres travaux ont porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante des HEs dans des systèmes alimentaires afin de mettre en évidence leur efficacité contre la détérioration oxydative des aliments. Des huiles essentielles tel que l'origan, la sauge et le romarin ont montré leur efficacité à réduire l'oxydation de la viande (**Wong et al., 1995; Tanabe et al., 2002; Fasseas et al., 2007**). L'ajout de

l'huile essentielle de *Satureja cilicica* inhibe significativement l'oxydation des lipides dans le beurre (Ozkan et al., 2007).

D'autre part, des études ont prouvé que l'administration d'huiles essentielles à activité antioxydante dans l'alimentation de certains animaux a un effet bénéfique sur la qualité de la viande issues de ces animaux (Lopez-Bote et al., 1998; Sárraga et Regueiro, 1999; Botsoglou et al., 2003; Govaris et al., 2007).

#### **7.10. La toxicité des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie.

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde ou phototoxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarine. D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique. (Cherrat ,2013 ). Les cétones comme l' $\alpha$ -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers. C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le safrole (*Sassafras*), l'estragole (*Artemisia dracunculus*), la  $\beta$ -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hepatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs.

Le safrole et l'estragole, par exemple, sont métabolisés par les microsomes au niveau du foie des rats et des souris en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui eux sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines, Toutefois, ces résultats sont controversés car il existe des différences chez l'Homme dans le processus de métabolisation de ces composés. Le safrole, par exemple, est métabolisé chez l'humain en dihydroxysafrole et trihydroxysafrole non cancérigènes De plus, tout dépend de la dose administrée lors des expériences et bien souvent la dose absorbée par l'animal est loin de correspondre à celle qu'un homme est susceptible d'ingérer par jour. (Piochon, 2008).

## *Chapitre 3: Etude des plantes utilisées*

### **1- La menthe poivrée ( *Mentha x piperita* )**

#### **1.1 Présentation**

##### **1.1.1. Origine et culture**

La menthe poivrée est originaire du Moyen-Orient et vraisemblablement d'Asie. En effet, elle se rencontre sur tous les continents et s'adapte à tous les climats hormis les plus extrêmes. Elle aime les terrains frais, argileux et calcaires (**Zybak, 2000**).

Cette plante est presque cultivée dans l'ensemble des régions du monde : en Europe, en Asie (Russie, Kirghizstan, Turkménistan, Chine, Japon, Inde), en Australie, en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Kenya, Tanzanie, Angola) et en Amérique (Canada, États-Unis, Brésil, Argentine, Chili). Sa culture est faite essentiellement pour produire de l'huile essentielle. Les quatre principaux pays producteurs d'huile essentielle de la menthe poivrée sont : l'Inde, l'Italie, l'Argentine et l'Australie (**Looliaie et al.,2017**).

L'huile essentielle de *Mentha piperita* occupe a elle seul la 6<sup>ème</sup> place dans la production mondiale estimée à 2092 tonnes /an (**Abadlia et al.,2014**).

##### **1.1.2. Bref historique sur l'utilisation de la plante**

La menthe poivrée est utilisée depuis des millénaires par l'Homme, et voici quelques exemples d'utilisations anciennes :

- Chez les Égyptiens, elle était conseillée contre les nausées. Il suffisait de passer un peu de menthe sous les narines.
- Chez les Romains, elle est utilisée pour aromatiser du vin et des sauces mais également pour soulager les maux de tête et d'estomac.
- A la Renaissance, on l'utilisait contre les vomissements et les maux de tête.
- Depuis toujours, les Arabes boivent du thé à la menthe pour calmer la soif et pour ses vertus antiseptiques.
- Hippocrate l'utilisait comme anaphrodisiaque (calmant, anesthésiant). (**Kumar et al.,2015 ; Balakrishnan et al.,2015**).

##### **1.1.3. Description botanique**

*Mentha x piperita* est un hybride issu d'un croisement spontané entre *Mentha aquatica* (la menthe aquatique) et *Mentha spicata* (la menthe verte), c'est à ce titre qu'une petite croix sépare le nom de genre (*Mentha*) du nom de l'hybride issu du croisement (*piperita*).

Elle doit son nom latin (*piperita*) à son odeur très caractéristique fortement poivrée et froide, en raison de l'huile essentielle que contiennent ses feuilles (Fejér *et al.*,2018 ; Loolaie *et al.*,2017 ; Uribe *et al.*,2016).

C'est une plante sauvage, herbacée vivace, qui appartient à la famille des *Lamiacées*, grande famille de plantes souvent productrices d'huiles essentielles largement répandues dans le monde. Elle est rampante, à tiges quadrangulaires, ascendantes, pouvant atteindre 1,20 m de haut, ses feuilles sont opposées, ovales, aiguës et dentées, généralement d'une belle couleur verte, souvent ridées, parfois duveteuses, à partir desquelles se dégage une forte odeur caractéristique facilement reconnaissable. Les fleurs, qui poussent en grappes à l'aisselle des feuilles sont de couleur rose, les tiges sont de couleur pourpre (Figure 16) (Benayad,2013 et Loolaie *et al.*,2017 ).



**Figure 16.** Feuilles et tiges de la menthe poivrée

#### **1.1.4. Position systématique**

Groupe : Dicotylédones.

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Mentha*

Espèce : *Mentha x piperita*

### 1.1.5. Appellations

La Menthe poivrée possède plus de 101 noms locaux dans différents pays (**Baudoux ,2002**) .

Arabe : Nana ;

Amazigh : Nana

Français : Menthe

Anglais : Brandy mint, Peppermint ;

Espagnol: Mentainglesa

Portugais: Hortelana pimentosa

Chinois : Po Ho

Indien :Urdu, mint, Pudina, Pudyana, Puthina

Russe : Myata perechnaya

Allemand : Peppermint

Mexicain : Menta piperita

### 1.2. L'huile essentielle de la menthe poivrée

Agréablement adaptée à une abondance de propriétés et d'utilisations topiques et orales, la menthe poivrée peut être l'huile essentielle la plus polyvalente. Elle prête à une saveur délicate et une couleur vert-jaune ou vert clair rafraîchissante (**Abadlia et Chebbour, 2014**).

Son rendement selon la norme AFNOR, qui est calculé par rapport à 100 g de tiges et feuilles de menthe poivrée varie entre 0.38 et 1.2.

La composition chimique de l'huile essentielle extraite de *Mentha x piperita* est très complexe, elle a fait l'objet de plusieurs études. D'après **Aflatuni (2005)**, plus de 200constituants ont été identifiés par (**Chialva et al., 1993**).

Les principaux constituants sont : Le menthol (monoterpénol) : 35 à 70 % et le menthone(cétone) : 20 à 30 %, et d'autres composés minoritaires tels que la menthofuranne : 1 à 2%, les monoterpènes : 2 à 18 %, les sesquiterpènes : 6 %, les esters (Acétate de menthyle) :2 à 10 %, les oxydes (cinéole) : 5 à 10 %, entre autres (**Abadlia et Chebbour, 2014 et Fejér et al.,2018**).

Cependant, la composition chimique de la menthe poivrée est susceptible d'évoluer en fonction des conditions de production (assises de sol, régions, conditions climatiques et environnementales...etc), (**Medjeber, 2002 et Fejér et al.,2018**) ; a cet effet, les jours longs avec des nuits tempérées conduisent à des rendements d'HE plus élevés et à une augmentation de la teneur en mentofuranne ; a contrarier des nuits froides favorisent la formation de menthol (**Lahreche,2010**).

### 1.3. Utilisations et propriétés biologiques

*Mentha x piperita* présente des vertus médicinales connues depuis l'antiquité. De nos jours, son huile essentielle est utilisée en médecine traditionnelle, dans les préparations alimentaires, en cosmétique, et récemment des études scientifiques montrent un intérêt promoteur quant à son utilisation en pharmacologie et médecine moderne.

L'huile de *Mentha x piperita* est largement utilisée pour les maux de tête, douleur de nerf, de dents, de la bouche, inflammation des articulations, prurit, éruption allergique, à repousser les moustiques, les rhumatismes, les douleurs musculaires, etc.. (**Loolaie et al., 2017 et Fejér et al., 2018**).

### 1.4. Effets thérapeutiques – aromathérapie

#### - Pulmonaires

L'huile essentielle de la menthe poivrée est souvent utilisée pour traiter les inflammations des voies respiratoires (toux, rhume, sinusite) ou en cas de fièvre. Sa vapeur inhalée est utilisée pour traiter les congestions nasales et bronchiques (**Balakrishnan et al., 2015; Shah-Punit et D'Mello, 2004**). Elle est même utilisée dans le traitement de la tuberculose pulmonaire (**Rita et Animesh, 2011**).

#### - Cardiologique

En application externe, l'huile de la menthe poivrée est traditionnellement connue pour ses effets de dilatation des vaisseaux sanguins, causant un surplus de circulation sanguine dans les parties pouvant être affectées. Des travaux ont montré un effet de vasodilatation chez certains animaux (**Balakrishnan et al., 2015**).

#### - Dermatologiques

Sur la peau, elle a une action apaisante et antiseptique, souveraine en cas de dermatite, d'acné et de démangeaisons par son effet refroidissant et analgésique (**Balakrishnan et al., 2015**). Quand l'huile essentielle de la menthe poivrée est appliquée à petite dose elle procure une sensation de froid et calme la douleur, mais appliquée à grande dose elle peut provoquer des irritations et une anesthésie locale (**Shah-Punit et D'Mello, 2004**).

#### - Gastro intestinales

La menthe poivrée est utilisée pour le traitement de la dyspepsie non obstructive sans effets secondaires connus. Elle a un effet antiémétique se traduisant par la réduction de la nausée postopératoire pour les patients très sensibles.

#### - **Neuro psychiatriques**

Certaines études ont démontré que la menthe poivrée est un stimulant du système nerveux central. Des études ont été menées sur l'efficacité d'arômes sur les performances cognitives, la perception de la charge de travail physique, et la réponse à la douleur.

#### - **Endocriniens**

Certaines recherches ont observé une augmentation statistiquement significative de sécrétions d'hormones. Une étude a même noté une maturation segmentaire dans les tubes séminifère (**Balakrishnan et al.,2015**).

#### - **Anti inflammatoire**

En application locale le menthol a des effets anti-inflammatoires ; et dans une étude, il a été avancé qu'il pourrait inhiber l'anaphylaxie cutanée (**Baudoux,2002**).

#### - **Antimicrobiens**

Le menthol est virucide contre la grippe, l'herpès et d'autres virus in vitro. L'extrait aqueux et l'huile de menthe poivrée ainsi que le menthol ont un effet antibactérien contre les bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs.

Les extraits de menthe poivrée sont bactériostatique pour *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. et bactéricide contre les souches comme *Staphylococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, et *Mycobacterium avium*.

Le menthol et l'huile de menthe poivrée sont fongicides : contre *Candida albicans*, *Aspergillus albu*, et les champignons responsables de dermatophytes (**Singh et al., 2011 ; Iboudo et al.,2016 et Balakrishnan et al.,2015**).

L'huile essentielle de menthe poivrée a également montré l'activité in vitro sur l'inhibition de l'adhésion cellulaire de bactéries *E. coli* et *S. aureus* (**Bazargani et al.,2015**) et sur *L.monocytogenes* (**Sandasi et al.,2008, Bupesh et al.,2007**) ont montré que des extraits de feuille bio de menthe poivrée possèdent une activité antibactérienne à large spectre contre un large éventail de bactéries ; Cette activité a été attribuée à la présence de puissants composés tel que : le menthol, le menthone, le méthyle d'acétate et le menthofuran (**Sandasi et al.,2011**).

#### - **Antioxydants**

L'huile de menthe poivrée peut être utilisée comme un bon agent de conservation par l'inhibition de certains agents pathogènes d'origine alimentaire du fait qu'elle a présenté une activité antioxydante intéressante. (**Singh et al., 2011 et Uribe et al.,2016**).

## - **Autres usages**

Grâce à ses vertus calmantes et antibactériennes, l'huile essentielle de la menthe poivrée trouve naturellement sa place dans la composition de produits de beauté pour le visage, le corps et les cheveux (eau florale pour démaquillage, eau après rasage, lotions pour visage, champoings, dentifrices, ...). Utilisée en bains de bouche ou en gargarismes, Le goût et le parfum de la menthe poivrée, frais, fort, pénétrant et typiquement mentholé lui donne une place de choix.

On retrouve son utilisation en cuisine, comme arôme et parfois dans la préparation de quelques plats où elle est finement hachée. Mais c'est plutôt son huile essentielle qui est utilisée dans l'industrie alimentaire pour parfumer bonbons, chocolats, chewing-gums et boissons.

### **1.5. Toxicité**

L'huile essentielle de la menthe poivrée utilisée à doses réduites n'est pas toxique et ne cause pas d'irritation. Mais elle peut être dangereuse et même mortelle si certaines règles ne sont pas respectées et surtout en cas de surdosage.

Du fait de la neurotoxicité des cétones, l'huile essentielle de la menthe poivrée est strictement contre indiquée chez les enfants de moins de 7 ans, les femmes enceintes ou allaitantes, chez les personnes âgées et les épileptiques au système nerveux fragilisé (**Alankar, 2009 ; Cazau-Beyret, 2013**).

La sensation de froid de la menthe poivrée génère une vasoconstriction des vaisseaux sanguins, de ce fait, elle doit être utilisée sur de petites surfaces corporelles (même si elle est diluée), et ne doit jamais être utilisée en bain aromatique. Il y aurait un réel risque de collapsus cardiovasculaire, d'hypothermie et même de décès (**Cazau-Beyret, 2013**).

Les signes d'une intoxication par usage per os sont : vertiges, sensation de malaise, désorientation puis convulsions, s'aggravant en coma et décès par dépression du système nerveux central (**Nath et al., 2012, Balakrishnan (2015)** rapporte le cas d'un garçon de 13 ans qui après inhalation d'une préparation contenant 200 mg de menthol au lieu des quelques gouttes recommandées, a eu des problèmes de coordination des mouvements, des nausées, des confusions avec euphorie ainsi que des problèmes cardiaques.

En conclusion, s'il est admis que l'usage des feuilles de Menthe poivrée en tisane ne présente aucun danger, tel n'est pas le cas pour son huile essentielle qui est à utiliser avec précautions et sur avis de spécialistes.

## **2. Le bigaradier ( *Citrus aurantium* )**

### **2.1. Présentation**

#### **2.1.1. Origine et culture**

L'orange sous le nom pome orange apparaît au XIIIe siècle désignant l'orange amère ou bigarade, le nom vient de l'arabe نارنج (naranj), qui lui-même prend son origine dans le persan « narang ». L'origine exacte semblant être le nord de l'Inde. En 1600 on peut lire que le bigarrat est l'arbre qui produit des oranges amères. En provençal bigarrado désigne « l'espèce d'orange aigre »( **Lahmar et al.,2017**).

#### **2.1.2. Bref historique sur l'utilisation de la plante**

Le bigaradier est originaire d'Asie mineure et il a été introduit dans toute l'Europe et sur le pourtour méditerranéen. Il est maintenant cultivé dans le sud de l'Europe, le littoral méditerranéen et dans d'autres régions subtropicales notamment dans le sud de la France, en Italie, Espagne, Tunisie, Algérie, Côte d'Ivoire, Haïti, États-Unis, Brésil, etc. La Tunisie est le principal producteur mondial. Les fleurs donnent l'essence de Néroli du nom de Marie-Anne de La Trémoille, princesse des Ursins et de Nérola, qui la popularisa et dont la légende dit qu'elle l'utilisa durant la peste au XVIIe siècle en Italie.

#### **2.1.3. Description botanique**

C'est une espèce résistante servant souvent de porte-greffe à tous les citrus. Il est possible que l'oranger amer soit un hybride entre *C. reticulata* et *C. maxima*.

Arbuste atteignant 5 m à 8 de haut, à tronc ramifié et feuillage toujours vert brillant et à la floraison abondante. Les feuilles sont entières, elliptiques, persistantes. Les fleurs actinomorphes d'un blanc très pur, d'odeur agréable, sont groupées par 2 à 3 à l'aisselle des feuilles et possèdent 5 à 8 pétales charnus ponctués de poches sécrétrices à huile essentielle. De nombreuses étamines présentent un filet fusionnant en larges faisceaux dans la partie basale. La récolte des fleurs a lieu de mars à fin avril. Le fruit est une baie globuleuse multiloculaire récolté de janvier à mars. Il possède une partie blanche ou mésocarpe plus épaisse que celle de l'oranger doux (Figure 17). La récolte des feuilles et des rameaux se fait de mai à juin.



**Figure 17.** Fleurs, feuilles et fruits de *Citrus aurantium*

#### **2.1.4. Position systématique**

Règne : Plantae (Végétal)

Superdivision : Embryophyta

Division : Magnoliophyta (Tracheophyta)

Subdivision : Spermatophytina (spermatophytes, phanérogames)

Classe : Magnoliopsida

Super ordre : Rosanae

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : Citrus L.

Espèce : *Citrus aurantium* L. var *amara*

#### **2.1.5. Appellations**

Français : bigaradier, oranger amer

Anglais : Bitter orange, Seville orange, sour orange, bigarade orange

Allemand : Bitterorange , Pomeranze, Sevilla Orange

Italien : arancio, melangolo

Espagnol : naranjo amargo

Portugais : laranja-azeda ou laranja-amarga

Arabe : نارنج (naranj),

Amazigh : tharanjats

Japonais : ダイダイ (daidai)

Chinois : 苦橙 (kū chéng)

Persan : darakt i nârinj

## **2.2. L'huile essentielle du bigaradier**

Il existe trois types d'huiles essentielles obtenues à partir de du bigaradier. L'huile essentielle de petit-grain est obtenue à partir des feuilles, et des fruits naissants lorsqu'ils ont la taille de « petits grains ».

L'huile essentielle ou essence de bigarade est obtenue par expression à froid du péricarpe et des fruits à leur taille adulte, mûrs ou verts. L'huile essentielle de néroli est obtenue par distillation à la vapeur d'eau de la fleur fraîche.

L'eau de fleur d'oranger ou hydrolat est un coproduit de la distillation de la fleur.

## **2.3. Utilisations et propriétés biologiques**

Dans la médecine traditionnelle, les feuilles, les fleurs et les produits qui en dérivent (huiles essentielles et l'eau distillée de fleur d'oranger) sont sédatifs, antispasmodiques et légèrement hypnotiques. Ils sont utilisés pour traiter la nervosité, l'insomnie avec difficultés d'endormissement, le hoquet et les troubles digestifs divers (dyspepsie, ballonnements, crampes d'estomac, spasmes...). En usage externe, l'huile essentielle de petit grain bigaradier et l'huile essentielle de néroli bigarade, diluées dans un véhicule approprié, peuvent être utilisées en massage (poignets, colonne vertébrale, plexus solaire) ou en bain, pour leur effet calmant et relaxant, et également comme antimicrobien et anti-acarien en diffusion.

L'écorce est principalement préparée sous forme de sirop ou de teinture à diluer avec de l'eau ou de la tisane. (**Lahmar et al.,2017**).

Elle est considérée traditionnellement comme un amer aromatisant, un tonique, un stimulant de l'appétit et des sécrétions gastriques.

Les huiles essentielles et l'eau distillée des fleurs d'oranger sont largement employées comme aromatisants dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire et comme agents parfumant dans des produits d'hygiène et cosmétiques.

De par la présence de synéphrine, l'orange amère rentre dans la formule des produits diététiques à visée amincissante. (**Alias et al.,2011**).

Dans la tradition maghrébine, on retrouve l'usage de son hydrolat pour parfumer le café noir.

## **2.4. Effets thérapeutiques – aromathérapie :**

- **Sur l'hépatite**

Deux substances isolées des fleurs du bigaradier, à savoir le 5-Hydroxy-6,7,3',4'-tétraméthoxyflavone (HTF), et l'acide limonexique (LA) et leur effet sur des hépatocytes humains HL-7702 agressés par le CCl<sub>4</sub> (tétrachlorure de carbone) a été testé : Les résultats montrent que le prétraitement avec ces deux substances permet d'induire une réversibilité des lésions cellulaires entraînées par le CCl<sub>4</sub>. ((Lahmar *et al.*,2017).

- **sur des œdèmes**

Chez le rat l'extrait hydro-alcoolique de péricarpe de *C. aurantium* inhibe significativement ( $p < 0,05$ ) l'œdème induit par l'histamine et le dextrane de manière concentration-dépendante (IC(50) = 119,6 et 118,3 mg/kg.( Chizzali *et al.*,2011).

- **Radioprotecteur**

L'injection intra péritonéale de 250, 500, 1000 mg/kg de poids d'extrait d'oranger amer 1 heure avant l'exposition aux rayons gamma (1.5 Gy) réduit la fréquence d'érythrocytes micronucléés polychromatiques et d'érythrocytes monochromatiques dans la moelle osseuse de souris. Les flavonoïdes possèderaient un effet préventif de la moelle contre l'irradiation et ses effets clastogéniques. (Hosseinimehr *et al.*,2003).

- **Antidiabétique**

Des rats chez lesquels a été provoqué un diabète par la streptozotocine ont reçu 100 et 200 mg/kg d'un extrait alcoolique de peau d'orange pendant quatre semaines. Le traitement avec 200 mg/kg a permis de voir que cet extrait protégeait le tissu rénal dans ce type de diabète induit. La tangérine, la naringérine et la néohespéridine (flavanones) sont des substances extraites du citron ou de l'orange qui montrent des effets antidiabétiques. ((Lahmar *et al.*,2017).

- **Gastrique :**

Des examens biologiques ont été réalisés in vivo avec l'huile essentielle de *C.aurantium* et sa composante majoritaire le limonène afin d'évaluer leur effet sur la muqueuse gastrique ; avec des concentrations respectives de (250 mg/kg) et (245 mg/kg) une efficacité à 99 % est démontrée dans la protection de la muqueuse gastrique contre l'ulcère induit.( Moraes *et al.*,2009).

- **Anticonvulsivant :**

L'huile essentielle de néroli à 20 et 40 mg/kg montre une inhibition de la convulsion tonique induite par l'électrochoc et réduit la mortalité chez les rats.( (Lahmar *et al.*,2017et Anwar *et al.*,2016).

- **Antioxydant**

L'huile essentielle des vieilles feuilles de l'oranger amer a l'effet antioxydant le plus élevé, suivi des fleurs, des jeunes feuilles et de la peau. Les expérimentations sur l'effet antalgique du néroli montrent que le néroli réduit significativement l'œdème de la patte induite par la carragénine (à 40

mg/kg) ce qui est proche d'un effet de 50 mg/kg de diclofenac. (Sarro et al.,2013 et Lahmar et al.,2017).

Le néroli semble posséder les constituants chimiques qui peuvent avoir un effet significatif sur l'inflammation, et un effet antinociceptif central et périphérique (Lahmar et al.,2017)

- **Antimicrobien**

L'huile essentielle de néroli a un effet antimicrobien marqué sur le *Pseudomonas aeruginosa* comparé à la nystatine ; et un effet antifongique intéressant t a été rapporté ( Kirbaslar et al.,2009, Anwar et al.,2016, Zarrad et al.,2015 et Deshmukh et al.,2017).

- **Autres usages :**

(Zarad et al.,2015) rapportent une activité insecticide et anti-acétylcholinestérase de l'HE du bigaradier.

Des travaux sur des systèmes revêtements alimentaires a base de chitosane a montré que l'incorporation des HEs dont celui du bigaradier, améliore considérablement la conservation des aliments (viandes ; poissons et fruits) grâce a leur propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongique. Ce qui s'avère très prometteur pour l'industrie alimentaire et l'environnement. (Yuan et al.,2016).

## 2.5. Toxicité

L'administration par voie orale d'extraits de *C. aurantium* (2.5% p-synephrine, 300– 5000 mg/kg) chez la souris entraîne une réduction de l'activité locomotrice. La p-synephrine(150–2000 mg/kg) produit une pilo érection, le halètement, une salivation, une exophtalmie et une réduction de l'activité locomotrice confirmée par le test de l'activité locomotrice spontanée.

- En usage externe

On note une sensibilisation cutanée si l'HE est oxydée. La quantité maximale à appliquer en usage externe : préparations jusqu'à 1.25% hormis préparations pour bain, savon et autres produits subissant un lavage.

L'huile essentielle d'oranger amer est faiblement irritante ou sensibilisante chez l'homme. Sur 200 tests cutanés, uniquement 1,5% se révèlent sensibles à 2% d'orange amère.

Chez des patients traités pour dermatophytose pendant 1 à 3 semaines il n'a été observé aucun effet secondaire hormis une irritation légère. Il n'y a pas de risque par voie externe chez la femme enceinte.

- Par voie interne

Pas de toxicité aigüe. La LD50 orale chez le rat est supérieure à 5 g/kg (LD50 par voie externe chez le lapin est supérieure à 10 g/kg) .

Pas d'effet mutagène sur le test Ames. L'huile essentielle d'orange amère (pas de spécification) induit une augmentation de l'activité de la glutathion Stransférase hépatique et muqueuse (intestinale) chez la souris.

Et inhibe le néoplasie induit par le B [a]P (benzo [a]pyrène) dans les poumons et l'étage oropharyngé (38). Elle a une activité préventive contre le carcinome mammaire induit par la N-nitrosodiéthylamine ( **Deshmukh *et al.*, 2017**).

## Chapitre 1: Caractérisation et composition des huiles essentielles

La composition en métabolites secondaires varie d'une espèce végétale à une autre voire, même au sein d'une même espèce, sous l'influence de divers facteurs génétiques et abiotiques (édaphiques, climatiques, etc.) (El Kalamouni, 2010).

L'identification des constituants des HEs et leur propriétés passe obligatoirement par l'analyse chimique de ces essences, ce qui permet la caractérisation qualitative et quantitative de leur composants et une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'actions et leurs utilisations potentielles.

C'est dans ce contexte que nous aborderons dans ce chapitre intitulé le criblage phytochimique l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des espèces sélectionnées.

### 1- Matériel végétal et extraction des huiles essentielles

La provenance des plantes étudiées est la localité algérienne : La Chiffa - Blida (362800N, 2 45 00E) au centre nord du pays. (Figure 18).



**Figure 18.** Situation géographique du site de récolte  
(<http://www.maplandia.com/algeria/blida/chiffa/>)

Les huiles essentielles de *Mentha piperita* et de *Citrus aurantium* proviennent de la société « Extral-Bio® » spécialisée dans la production des huiles essentielles et cosmétiques Bio, qui se situe dans la localité de la Chiffa (Blida, Algérie).

L'HE de *Mentha x piperita* a été extraite de la partie aérienne fraîche de la plante (tige et feuilles) au mois de Mai 2016.

L'HE de *Citrus aurantium* a été extraite à partir des fleurs de la plante au mois d'avril 2016. L'identification botanique de la plante a été faite antérieurement au niveau du laboratoire de botanique du département de biologie de l'université Badji Mokhtar- Annaba.

Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à une échelle industrielle (Figure19). Dans la distillerie Extral-Bio®, les huiles sont extraites, par distillation sous pression à la vapeur d'eau, Les parties de plantes sélectionnées sont insérées dans un système classique d'extraction constitué par :

- Un alambic en acier inoxydable, de capacité de 2000 litres, qui se compose d'une grille pour la matière première ; le chauffage de l'alambic se fait par la vapeur provenant d'une chaudière.
- Un chapiteau ou circule le mélange vapeur eau-essence pour aller vers la partie suivante
- Un réfrigérant ou condenseur à serpentin horizontal avec une légère inclinaison ;
- Un essencier ou un vase florentin où l'HE se sépare de l'hydrolat par différence de densité.

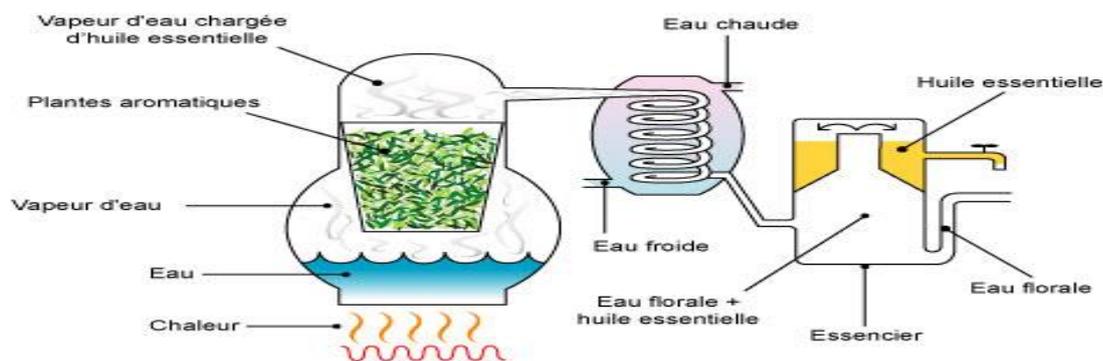
La vapeur condensée obtenue conduit à deux phases :

- 1- Une phase huileuse (HE) qui est séparée de l'eau par simple décantation afin d'éliminer toute trace d'eau.
- 2- Une phase aqueuse (eau aromatique ou hydrolat) qui contient une quantité non négligeable d'essence, soit sous forme solubilisée ou sous forme de fines gouttelettes dispersées.

Les HEs sont certifiées « 100 % naturelles » n'ayant été additionnées ou mélangées à aucun solvant organique durant la phase de production.

Elles sont aussi certifiées « Biologiques » car provenant d'une culture de *M.piperita* et *C.aurantium* où aucun engrais ou pesticide chimique n'ont été appliqués durant la phase de culture.

Les HEs ont été conservées dans des flacons stériles teintés, à 4 °C, à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail et ce pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.



**Figure 19.** Schéma d'un distillateur pour extraction d'huiles essentielles.

(<http://tpejbs2012.canalblog.com/archives/2012/02/13/23515420.html>)

## 2- Détermination des indices physico-chimiques des HEs

Les HEs sont caractérisés par leurs propriétés physico chimiques (densité, pH, miscibilité etc....) permettant ainsi une évaluation de la nature des composés organiques présents dans ces essences. Nous avons évalué certaines de ces propriétés physico chimiques en se référant à la pharmacopée Européenne et la commission française de normalisation (**Ouis, 2015**).

### 2.1. Caractéristiques organoleptiques

Les propriétés organoleptiques des deux HEs (aspect, couleur, et odeur) sont récapitulées dans le (Tableau 6).

### 2.2. Détermination du pH

Le pH ou « potentiel hydrogène », est la mesure de l'activité des ions hydrogènes  $H^+$  dans une solution. Le pH révèle l'acidité ou la basicité d'une solution ; son principe consiste à introduire l'électrode du pH -mètre dans le produit après le réglage de la température d'étalonnage. La lecture des résultats se fait directement sur l'afficheur du pH-mètre. C'est ainsi qu'on a pu déterminer les pHs des HEs .

### 2.3. La densité relative

La densité des HEs est déterminée par le rapport de la masse d'un certain volume de l'HE et la masse du même volume d'eau distillée (prise à la même température).

### Mode opératoire

A la place d'un pycnomètre, nous avons utilisé une seringue de 1ml .Le volume prélevé était de 0.2 ml pour chaque huile, et idem pour l'eau distillée.

La densité de chaque HE a été calculée selon le rapport :

$$d_{20} = \frac{m_1 - m_0}{m - m_0}$$

Ou :

$m_1$  : masse de la seringue contenant 0.2 ml d'HE

$m_0$  : masse de la seringue vide

$m$  : masse de la seringue contenant 0.2 ml d'eau distillée.

#### 2.4. La miscibilité à l'éthanol

La miscibilité dans l'alcool voire l'éthanol est déterminée par le volume(v) de l'alcool ajouté à 0.5ml de l'HE afin d'avoir un mélange homogène.

##### Mode opératoire

0.5ml de méthanol est ajouté au volume de 0.5ml de chaque HEs, on mélange vigoureusement et on observe si la solution est limpide, un ajout de 0,5 ml de méthanol est effectué dans le cas contraire jusqu'à ce que la solution devient limpide. Est noté le volume ajouté.

#### 2.5. L'indice acide

L'indice acide exprime le nombre de mg d'hydroxyle de potassium (KOH) nécessaire à neutraliser les acides libres dans 1g d'HE.

L'hydroxyde de potassium agit avec l'acide selon la réaction :



##### Mode opératoire

1g d'HE est pesé a l'aide 'une balance analytique et 5ml d'éthanol à 96% sont mélangés dans un erlen meyer avec 5 gouttes d'indicateur coloré ( phénolphtaline). Ensuite , une titration par une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.1N jusqu 'a ce que la solution vire au rose.

L'indice acide est calaculé selon la formule :

$$Ia = v \cdot c \frac{56.1}{m}$$

v : volume en mL de la solution KOH utilisé pour le titrage

c : concentration en mol/L de KOH

m : masse en gramme de l'échantillon a tester

### 3- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées. La diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces. La CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**).

Dans une CPG, la séparation des composés est réalisée de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. La CPG permet l'individualisation et la quantification des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Barboni, 2006**).

Mode opératoire

Les HEs de *M.piperitaa* et *C.aurantium* ont été caractérisée par chromatographie en phase gazeuse (GC). La caractérisation a été réalisée par comparaison des indices de rétention sur colonnes polaires et non polaires, spectres de masse et co-injection des normes authentiques (**Adams, 2007**). Une solution standard de n-alcanes (C8-C28) a été utilisée pour obtenir les indices de rétention. Les spectres de masse ont été obtenus sur un modèle MASTER GC DANI, équipé d'un injecteur split splitless et un auto-échantillonneur.

#### 3.1. Conditions analytiques

Un chromatographe en phase gazeuse, de type Master Dani, équipé par :

- Un détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne capillaire Type : HP-5, (long. 30 m, D. int. 0.25mm, épaisseur du film : 0.25 µm).
- Une phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane.
- La température du four est programmée à 60°C pendant 8 min, 2°C/min jusqu'à 240°C, isotherme pendant 10min.
- La température de l'injecteur et du détecteur est de 250°C et 260°C, respectivement. L'azote est utilisé comme gaz vecteur, avec un débit de 0.5 ml/min.
- Un volume de 0.2 µL a été injecté manuellement, en utilisant un mode splitless (50:1).

### 3.2. Identification des composés

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane C8- C28) (voir annexes).

L'indice de rétention de chacune des molécules détectées d'une huile essentielle est calculé selon leurs temps de rétention par rapport à ces alcanes en utilisant la formule suivante :

$$I_i = 100 \cdot \left( \frac{t_r(i) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right) + 100 \cdot n$$

Où :

$I_i$  : indice de rétention

$t_r$  : temps de rétention

$n$  : le nombre d'atomes de carbone dans le plus petit  $n$ -alcane ;

$n+1$  : le nombre d'atomes de carbone dans le plus grand  $n$ -alcane

Partant de là, avec une banque de données ou la littérature, on peut identifier les molécules grâce à leur indice de rétention. Chaque composé a été identifié par comparaison avec la littérature et les bases de données **d'Adams (2007)**.

## 4- Résultats

### 4.1. Propriétés physico chimiques

Les résultats de la détermination des propriétés physico chimiques des HEs obtenues par hydro distillation sont répertoriés dans le (Tableau 6).

**Tableau 6.** Caractéristiques physico- chimiques des HEs étudiées

Paramètres analytiques	<i>M.piperita</i>	<i>C.aurantium</i>	Unité
Aspect	Liquide huileux homogène	Liquide huileux homogène	/
Couleur	Orangeâtre	Jaunâtre	/
Odeur	Caractéristique	caractéristique	/
pH	2.93	3.75	/
Densité à 25°C	0.9090	0.8650	/
Solubilité dans l'alcool à 70°	Soluble	Soluble	/
Indice de réfraction	1.460	1.459	/
Indice d'acide	3.61	1.81	mg de KOH/g d'huile

### 4.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les résultats de l'analyse chimique complète des huiles essentielles étudiées par CG-FID sont donnés aux tableaux (1 et 2) en (Annexes).

L'identification des composants est basée sur la comparaison de leurs indices de rétention par rapport au temps de rétention d'une série de n-alcanes avec une interpolation linéaire, avec les composés authentiques ou des données de la littérature.

Une première lecture de ces résultats montre que ces HEs représentent des mélanges complexes de composés chimiques (terpènes et dérivés, alcools, aldéhydes, phénols, etc.).

### 4.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les composés majoritaires des HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* sont rapportés dans les (tableaux 7 et 8).

Dans l'HE de *M. piperita*, 30 composants ont été identifiés, constitués de 29,48% des monoterpènes , 32,93% monoterpénol, 1,19% d'hydrocarbures sesquiterpeniques et sesquiterpènes oxygénés à 2,90%, soit environ 97,00% du total des constituants. Une portion de (3%) de la composition totale n'a pas été identifiée.

Les principaux constituants de l'huile étaient le menthol (32,93), le menthone (24,41%), cis carane (8,08%), l'iso-menthanol (8,8%), 1,8-cinéole (7,89%),  $\beta$ -charoophyllène(2,90%),  $\beta$ -pinène (1,5%) , pulegone (1,49%), isopipéritenone (1,23%), et germacène D (1,19%) ; D'autres composants étaient présents représentant un taux de 13,3%.

**Tableau 7.** Les constituants majoritaires de l'HE *M.piperita*

Rt min)	Nom du Composé	Famille	%
7.77	$\beta$ pinene	Monoterpène	1.54
10.35	1,8 Cinéole	Ether cyclique	7.89
17.97	Menthone	Monoterpénone	24.41
18.05	Isopulegone	Monoterpénone	1.49
20.47	Menthol	Monoterpénol	32.93
22.61	Pulegone	Monoterpénone	1.49
23.47	Isopiperitenone	Terpénone	1.23
25.95	Cis carane	Monoterpénoïdes bicycliques	8.08
32.64	$\beta$ Charyophyllène	Sesquiterpène	2.90
36.08	Germacène D	<u>Hydrocarbure sesquiterpénique</u>	1.19
18.05	Isopulegone	Monoterpénone	1.02

La composition chimique de l'huile essentielle de *C. aurantium* est présentée dans le tableau (8). Au total, 30 composés identifiés. Les principaux constituants de l'HE *C. aurantium* représentent 97,23% de la fraction totale, ou les esters étaient les composants prédominants (58,72%), suivi des monoterpènes (12,1%), des hydrocarbures monocycliques ou terpéniques (11,8%), et des alcools terpéniques (14,61%).

**Tableau 8.** Les constituants majoritaires de l'HE *C.aurantium*

Rt min	Nom du composant	Famille	%
4.30	Beta pinene	Monoterpène	3.00
4.59	Sabinene	Monoterpène	5.01
5.62	Mycene	Hydrocarbure monocyclique	2.37
6.38	Limonene	Hydrocarbure terpénique	1.61
6.77	Beta phellandrene	Hydrocarbure monocyclique	8.82
8.03	Trans beta ocimene	Monoterpène	3.54
18.63	Linalol	Alcool terpénique	10.89
18.94	Acetate de linalyle	Ester monoterpénique	55.56
23.54	Alpha terpinol	Alcool monoterpénique	2.19
24.81	Acetate de neryle	Ester terpenique	1.52
25.89	Actetate de geranyle	Ester terpinique	2.46
28.96	Geraniol	alcool terpénique	1.53
34.98	N methylanthranilate de methyle	Monoterpène	2.55

## 5- Discussion

D'après William Naves (1874-1936) : Aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision : La meilleure et la plus générale est peut-être la suivante : les huiles essentielles sont des mélanges de divers constituants issus d'une espèce végétale, ces mélanges passent avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau (**Boughendjioua, 2001**).

- Les essences obtenues sont des substances odorantes volatiles (**Paris et Moyse, 1976**), ( $M < 400$  daltons), dont la tension de vapeur sous pression atmosphérique et la température ambiante est suffisamment élevée pour qu'elles se trouvent à l'état de vapeur dans l'atmosphère et puissent, au contact de la muqueuse olfactive, provoquer un stimulus. (**Richard et Giampoali, 1992**). L'HE est peu soluble dans l'eau, solubles dans l'alcool et les solvants organiques (**Paris et Hurabielle, 1980**).

Leur volatilité les oppose aux huiles fixes qui sont des lipides. Ces huiles essentielles sont des mélanges de constituants plus ou moins nombreux, généralement liquides (**Paris et Moyse, 1976**).

- Les HEs extraits de *M.piperita* ou de *C.aurantium* ont des pH acides ( $pH < 7$ ). Il est à souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques influençant ainsi les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle (effets antioxydant et antimicrobien). Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère

stabilisant contre les microorganismes ; ce qui permettra à ces HEs de jouer le rôle de conservateurs dans les produits alimentaires (**Ouis, 2015**).

- La densité d'une HE constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une HE dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, chimique, etc.). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité du produit ainsi que les tentatives de fraudes et d'altération. La densité des deux HEs est inférieure à celle de l'eau.

-L'indice de réfraction indique la capacité des HE à réfléchir la lumière. Les valeurs de l'indice de réfraction des deux HE que nous avons utilisé avec nos expériences correspond aux normes AFNOR. Elles indiquent leur faible réfraction à la lumière. Les deux HEs ont un indice de réfraction similaire.

- Les valeurs des indices d'acide sont faibles (inférieur à 2). L'acidité d'une HE est un critère d'estimation de sa qualité. Un indice d'acide faible indique que les huiles essentielles sont stables et ne provoquent pas d'oxydation car l'huile essentielle, en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acidité (**De Cliff et Harerimana,2013**). Les résultats obtenus sont que les HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* présentent un faible indice acide. Ces résultats concordent avec les pH acides enregistrés de ces essences. (Tableau 9).

**Tableau 9.** Comparaison avec les normes AFNOR

Paramètre	<i>M.piperita</i>	AFNOR	<i>C.aurantium</i>	AFNOR
Densité	0.909	0.820-0.990	0.8650	0.882 – 0.894
Indice de réfraction	1.460	1.4600-1.500	1.459	1.455 –1.463
Indice acide	3.61	> 4	1.81	>4

Les HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* originaires de la région de la Chiffa- Blida et issues respectivement des parties aériennes et fruits sont obtenues par hydrodistillation industrielle ont des caractéristiques physico chimiques suffisamment proches des normes de qualité rapportées par la littérature (**Ouis,2015**).

Les analyses GC montrent la présence de 30 composés dans l' H.E de *M.piperita* de la famille des Lamiacées, dont Les principaux composants avec leurs pourcentages étaient : lementhol (32.93 %), le menthone (24.41%), le carane (8.08 %), le 1,8-cineole (7.89%) et l'acétate de menthyle (0.46%). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Mahboubi et al, (2013)** montrant que le menthol représentait (36.9%) de la fraction, le menthone (28.8%), l'acetate de methyle (4.5%), le 1,8-cineole (3.8%) et le limonene (3.29%).

Une autre étude **Benchikha et al.,(2008)** montrait que parmi les 23 composés identifiés dans l'huile de *M.piperita* il y a le menthol (51%), le menthone (25%), le 1,8-cineole (7%) et l'acétate de menthyle 6% .**Saharkhiz et al., (2012)** montraient que parmi les 17 composés identifiés, le menthol représente la plus grande fraction avec 53.28%. Ce taux élevé de menthol est rapporté précédemment par **Schmidt et al., (2009)** ou sur les 39 constituant de HE, le menthol représentait (40.7%), le menthone (23.4%),le 1,8-Cineole 5.3 %, l'actetate de menthyle (4.2%),et l'isomenhone (3.7%) .

L'ensemble de ces travaux, et bien d'autres montrent que l 'H.E de la *M.piperita* suscite beaucoup d'intérêt, mais aussi beaucoup de variabilité qui peut-être due à différents facteurs dont l'âge de la plante, le lieu de culture, le période de la récolte, le processus d'extraction, etc. (Tableau 10). En effet, **Sokovic et al., (2009)** ont rapportés que l'acétate de menthyle (17,4%) et le menthone (12,7%) étaient les principa.ux composants dans l'huile de *M.piperita* d'origine de la Serbie. **Tyagi et Malik, (2011)**, ont montré que l'huile essentielle de *M.piperita* contenait 47 composés et que les principaux constituants étaient le menthol (19,1%), isomenthone (14,8%), le limonène (10,6%), iso-menthanol (8,8%), acétate de menthyle (6,6%),  $\beta$ -pinène (5,6%),  $\alpha$ -pinène (4,8%), 1,8-cinéole (3,5%), isopulégol (3%), pulégone (2,3%), pipéritone (2,1%), et  $\beta$ -phellandène (2,8%). L'étude de **Fatma et Jaime (2012)** a rapporté un taux de 40,47% de néomenthol dans l' H.E d'origine Égyptienne.

Pareillement et selon les travaux de **IúSüCAN et al.,(2012)** effectués sur 04 HE de *M.piperita* d'origine différentes : 12 composés majeurs ont été identifiés ; les échantillons contenaient du menthol (28-42%) et du menthone (18-28%)comme constituants principaux. Ces variations dans la composition chimique peuvent être attribuées à différents facteurs écologiques et environnementaux prenant en compte que l'HE est un produit métabolique de cellules végétales et sa composition quantitative et qualitative peut être influencée par les conditions climatiques(**Grulova et al.,2015**),, le type de sol, le patrimoine génétique, la période de la récolte, voire l'heure de celle-ci (**Yayi-Ladekan et al.,2011**), le stade de développement de la plante et la méthode d'extraction .(**Figueiredo et al.,2008 ; Fatma et Jaime, 2012 ; Desam et al., 2017 ; Fejér et al.,2018**).

**Tableau 10.** Variation de la composition chimique de l'HE de *M.piperita* suivant les régions

Composés	Constantine [Abadlia et al.,2014]	Tarf [Benabde llah,2017 ]	Ouargla [Goudjil et al.,2015]	Burkina faso [Bayala,2 015]	Maroc [Barchan et al.,2016]	Slovaquie [Fejer et al.,2015]	Iran [Saharkhiz., 2012]	Turquie [LúSüCA N et al.,2012]	Colombie [Zapata et al.,1999]	Brésil [Sartorra to et al.,2004]
Menthol	38,51	49,89	--	39,3	46,32	64,01	53,28	27,5	0,74	0,84
Menthone	23,01	20,8	-	25,2	7,42	23,43	2,45	27,9	26,15	-
β Pinène	-	1,59	1,66	-	0,43	0,43	1,26	-	0,19	1,50
1,8 cineole	3,65	6,73	-	4,1	6,06	6,81	6,69	5,3	0,28	2,41
Plugeone	1	0,42	-	-	-	-	-	6,4	44,54	-
Thymol	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-
Caravone	-	-	51,04	-	1,02	-	-	-	-	-
Carane	-	4,99	-	-	-	-	-	-	-	-
BCaryophyllene	-	-	-	-	0,55	-	3,05	4,2	0,63	-
Limonene	-	2,97	36,37	-	3,01	-	-	-	2,24	37,18

L'HE du *Citrus aurantium* (*Rutaceae*) est très connue pour son utilisation en parfumerie et en cosmétologie contre les rides et comme cicatrisante (**Jyotsna et al.,2011**). Elle est utilisée comme remède dans le traitement des troubles respiratoires : toux spasmodiques, asthme, oppression respiratoire spasmes musculaires d'origine nerveuse (**Moraes et al.,2009**, **Carvalho et al., 2012**, **El-Akhal et al., 2014**).

Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* ont fait l'objet de travaux décrivant leurs compositions chimiques très variées. Dans cette étude les analyses chimiques de l'HE de *Citrus aurantium* en provenance de la région de Chiffa- Blida-Algérie , a permis d'identifier 30 composés. L'HE de *Citrus aurantium* est caractérisée par un pourcentage élevé d'ester monoterpénique, d'alcool terpénique, d'hydrocarbure monocyclique, dont les éléments majoritaires étant l'acétate de linalyle (55.56 %), le linalol (10.89 %), le Beta phellandrene (8.82%) et le Sabinene (5.01%),le Trans beta ocimene (3.54%), et le Limonène (1.68%).

Nos résultats de l'analyse GC-MS sont en accord avec ceux rapportés précédemment **Boussaâda et Chemli., (2006)**, **Zandi-Sohani et al., (2012)**, **Azhdarzadeh et al.(2016)** ,qui indiquent que les principaux groupes chimiques étaient les monoterpènes et les hydrocarbures monoterpénique dans l'huiles extraite des feuilles. Plus spécifiquement, **Boussaâda et Chemli (2006)** ont rapporté que les constituants majoritaires de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* étaient le linalol (34.4%),acétate de linalyle (11.3%) et le limonène (10.9%).**Hsouna et al.,(2013)** ont rapporté que le limonène (27,5%) était le composant principal, suivi de l'E-nérolidol (17,5%),l 'α-terpinéol (14%), de l'α-terpinyl acétate (11,7%) et l' E-farnésol (8%). Dans une autre étude sur une espèce de provenance

de Grèce, les procédures analytiques ont permis la détermination quantitative de 26 composants ou on trouve le limonène (94,67%), le myrcène (2%) et le linalol (0,67%) dans l'HE extraite fleurs de *C.aurantium* (Sarrou et al., 2013).

Les travaux de (Ouedrhiri et al.,2015), ont révélé au niveau des feuilles de *Citrus aurantium* le linalyl 2-aminobenzoate (41.87%), le  $\beta$ -Linalool (32.99%),et l'  $\alpha$ -Terpineol (10.53%).Les travaux de Zarrad et al,(2015), qui utilisaient les pelures de *Citrus aurantium*, ils démontraient que le limonene représente une fraction quasi-totale avec 87.523%,suivi du linalool 3.36%,  $\beta$ -Myrcene 1.62%, et le terpineol (0.928%).

Dans d'autres études et contrairement aux résultats obtenus, les huiles essentielles de *C. aurantium* ont indiqué que le limonène (96,86%), le  $\beta$ -pinène (1,37%), le sabinène (0,28%) et le pinène (0,27%) étaient les principaux composants (Hosni et al., 2010). Du limonène (97,5–98%), du myrcène (1,2–1,45%) et de l'octanol (0,34–0,54%) ont été trouvés comme composants prépondérants dans les huiles de zeste de *C. aurantium* au Brésil (Moraes et al., 2009).

Les huiles d'écorce d'orange amère d'Italie comprennent principalement du limonène (94,3%), du myrcène (1,88%), du linalol (0,78%) et du pinène (0,4%), selon Caccioni et al., (1998). En outre, Dugo et al.,(1993) ont noté que les hydrocarbures monoterpene (97%) dominaient dans les huiles essentielles, tandis que les alcools, les aldéhydes et les esters représentaient les composés oxygénés ayant les pourcentages les plus bas, variant de 1,80 à 2,20%.

De la même manière que pour l'HE *M.piperita* , il en ressort pour l'HE *C.aurantium* que ces différences qualitatives et quantitatives dans la composition des huiles dépendaient de divers facteurs tels que l'origine géographique de la plante, la technique d'extraction, la partie de la plante choisie pour l'extraction, le temps de récolte (Azhdarzadeh et al.,2016 ) , ainsi que le génotype, la saison, le stade de maturation et les facteurs pédoclimatiques (Boussaada et al., 2007).

## ***Chapitre 2: activité biologique des huiles essentielles *M.piperita* et *C.aurantium****

Le stress oxydant a été évoqué comme un facteur étiologique crucial engagé dans diverses affections chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et neuro dégénérative, inflammation, diabète, le cancer, et vieillissement (Uttara et al.,2009). Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort cellulaire ( Hung et al.,2014) .

Les antioxydants synthétiques comme l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) s'avèrent être inadéquats pour la consommation humaine à long terme. Les publications récentes ont relevé leurs propriétés toxiques éventuelles pour la santé humaine et l'environnement (Edziri et al., 2012) d'une part. D'autre part, la résistance aux antibiotiques des microorganismes pathogènes (bactéries, virus, mycètes) est devenue un problème grave car ces contaminations microbiennes touchent toujours la santé publique (Edziri et al., 2012).

Par conséquent, l'intérêt pour les antioxydants (non toxiques) normaux et les antimicrobiens, particulièrement d'origine végétale, a considérablement augmenté ces dernières années. (Hung et al., 2014)

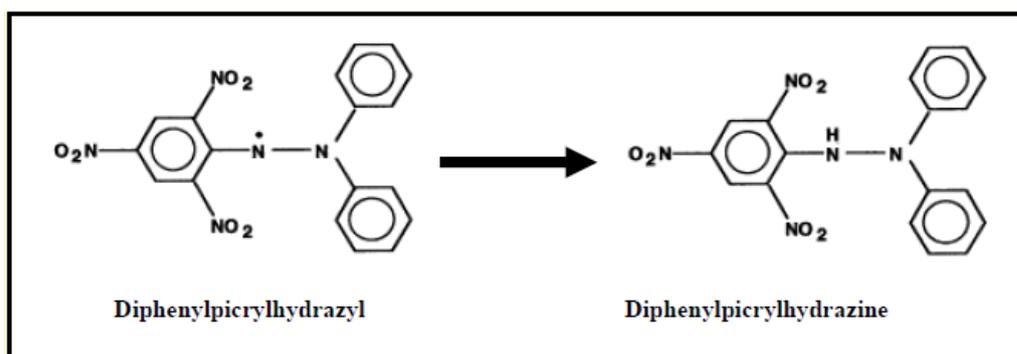
Compte tenu de cela, l'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée *in vitro* par deux méthodes, soit le piégeage du radical 2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (Ferric Reducing Antioxydant Power. (FRAP).

### **1. Evaluation de l'activité antioxydante**

#### **1.1. Essai de piégeage du radical libre le 2,2-diphényl 1picrylhydrazyl(DPPH)**

##### **Principe**

Le DPPH est un radical libre stable qui est couramment utilisé pour évaluer la capacité des composés à agir comme piègeurs de radicaux libres ou des donneurs d'hydrogène et de mesurer l'activité antioxydante des extraits. La réaction du DPPH avec un antioxydant ou un composé réducteur peut être suivie par le changement de couleur de pourpre au jaune (absorbance à 515 – 528nm) (Arulpriya et al., 2010).



**Figure 20.** Réaction du DPPH avec un antioxydant (Molyneux, 2004)

### Mode opératoire

Dans ce test, le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, (Figure 20) dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu (**Amarti et al., 2011**). Le procédé expérimental s'opère comme suit :

1 ml d'une solution 1mM de DPPH (à 1 mM) dans du méthanol a été mélangé avec 3 ml d'huile essentielle à analyser. Avant utilisation, l'huile essentielle a été préparée par dissolution dans le méthanol à raison de 500µg/ml. Cette solution, dite solution mère, a subi ensuite des dilutions pour avoir les concentrations suivantes : 250, 125, 62.5, 31.25µg/ml. Ces mêmes concentrations ont été préparées avec l'hydroxytoluène butylé (BHT), et l'acide ascorbique qui seront utilisés comme témoins positifs. Les essais ont été réalisés en triplicata. Les échantillons sont ensuite laissés à l'obscurité pendant 30 minutes, et la décoloration par rapport au témoin négatif contenant uniquement la solution du DPPH est mesurée à 517 nm.

### Expression des résultats

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité Antioxydante (\%)} = 100 \times [(\text{Absorbance du DPPH} - \text{absorbance de l'échantillon}) / \text{Absorbance du DPPH}]$$

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle permet de déterminer IC<sub>50</sub>.

Une faible valeur d'IC<sub>50</sub> indique une forte capacité de l'extrait à agir comme piègeur du DPPH, ce qui indique une forte activité antioxydante.

## 1.2. La méthode de réduction de fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

### Principe

La méthode est basée sur la réaction de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en  $\text{Fe}^{2+}$ . La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. L'activité réductrice du fer des extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Pan et al., (2008)**.

### Mode opératoire

Nous mélangeons 1ml d'HE à différentes concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 mg/ml) avec 2.5ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ;  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  à 1%.

- Incuber les tubes à 50°C pendant 20 min
- Refroidir à la température ambiante pendant 5 min
- Ajouter 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% pour stopper la réaction,
- Centrifuger les tubes à 3000g pendant 10 min, et on récupère le surnageant,
- Ajouter 2.5 ml d'eau distillée et 500  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 1% au surnageant.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SECOCAM). L'acide ascorbique et l'hydroxyanisole butylé (BHA) sont utilisés comme contrôles positifs dans cette expérience aux mêmes concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 mg/ml, est-ce ces concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

### Expression des résultats

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des huiles testées.

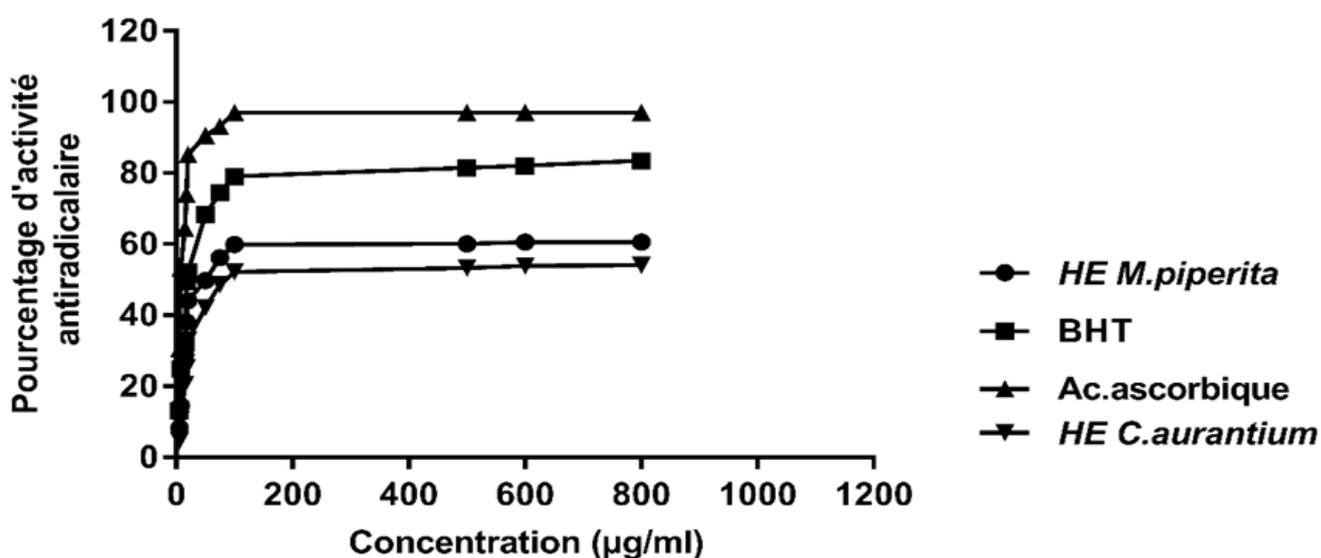
## 2. Résultats

### 2.1. Résultats de la méthode DPPH•

L'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode DPPH des HEs a permis de tracer la courbe représentée dans la figure ().

L'acide ascorbique (AS), et l'hydroxytoluène butylé (BHT) ont été utilisés comme standards.

La (Figure 21) illustre le taux d'inhibition en fonction de la concentration des échantillons en  $\mu\text{g/ml}$ , présentant ainsi la capacité de réduction du radical libre DPPH.



**Figure 21.** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les huiles essentielles de *M. piperita* et *C. aurantium*, l'acide ascorbique et le BHT.

Selon les résultats illustrés dans la (Figure 21), pour les différentes concentrations des deux HEs étudiées, nous observons que l'activité antioxydante augmente avec la concentration utilisée. Une meilleure activité pour l'HE *M. piperita* est révélée comparativement à l'HE de *C. aurantium*, néanmoins on a remarqué que le pouvoir antioxydant le plus élevé est celui des témoins : l'acide ascorbique, et le BHT.

L'HE de la *M. piperitaa* a montré un pourcentage de piégeage du radical DPPH plus important par rapport à l'HE *C. aurantium*. Ceci est indiqué par l'allure des graphes. Ces derniers tracent une courbe avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction

presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. Les pourcentages d'inhibitions sont de l'ordre de 60.50 % pour l'HE *M. piperita* suivi par l'HE *C. aurantium* avec un pourcentage de 54.07%.

L'allure de la courbe a permis de déterminer graphiquement la valeur de IC<sub>50</sub> qui correspond à la concentration d'huile essentielle, l'acide ascorbique ou BHT nécessaire à l'inhibition de 50% du DPPH présent dans le milieu (Tableau 11). Pour mettre en évidence le pouvoir anti-radicalaire de cette huile, son IC<sub>50</sub> a été comparée avec celle des standards de références, l'acide ascorbique (6,27µg/ml), le BHT (18.02 µg/ml). Notant que plus l'IC<sub>50</sub> est faible plus l'activité antioxydante du composé est importante. Les résultats des propriétés antioxydantes des HEs et de l'acide ascorbique sont présentés dans le (Tableau 11).

**Tableau 11.** IC<sub>50</sub> des huiles essentielles de *M. piperita*, *C. aurantium* et de l'acide ascorbique, le BHT

Echantillon	Acide Ascorbique	BHT	<i>M. piperita</i>	<i>C. aurantium</i>
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	6.25	18.02	47.86	110.05

## 2.2. Résultats de la méthode FRAP

Sur les graphes de la figure (22), nous rappelons que les standards (l'acide ascorbique et le BHA) ont été testés aux mêmes concentrations (0,1 à 1.25 mg / ml)

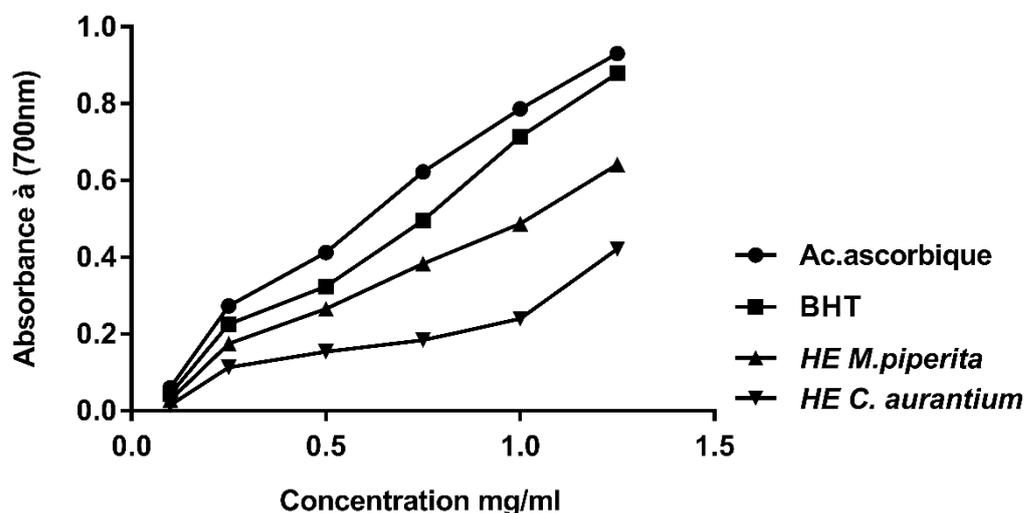
La capacité à réduire le fer varie de  $0,27 \pm 0,02$  mg / ml à  $0,930 \pm 0,06$  mg / ml pour l'acide ascorbique et entre  $0,201 \pm 0,03$  mg / ml à  $879 \pm 0,04$  mg / ml pour le BHA.

La réduction du fer pour les deux huiles étudiées varie de  $0,183 \pm 0,01$  mg / ml à  $0,642 \pm 0,023$  mg / ml pour l'HE *M. piperita*.

Pour l'HE *C. aurantium* cette capacité varie de  $0,146 \pm 0,004$  mg / ml à  $0,421 \pm 0,001$  mg / ml avec des concentrations allant de 0.25 à 1.25 mg / ml.

Il apparaît donc que le pouvoir réducteur est sensiblement affecté par la concentration des huiles testées : L'HE de la *M. piperita* a présenté des activités prononcées vis-à-vis de la réduction du fer et de celles des antioxydants de référence, l'acide ascorbique et le BHA (DO = 0,642) par rapport à celle de l'HE *C. aurantium*, reflété par les densités optiques obtenues à différentes concentration (DO maximale = 0,421 à la concentration de 1,25mg/ml). Tandis que les antioxydants de référence à savoir l'acide ascorbique et le BHA

ont donné des DO de 0,930, et ; DO= 0,879, respectivement pour la même concentration 1,25mg/ml.



**Figure 22.** Pouvoirs réducteurs des huiles essentielles de la *M. piperita* et du *C. aurantium*, l'acide ascorbique et le BHT.

### 3-Discussion

Les évaluations des propriétés antioxydantes des composés naturels sont très importantes du fait de leurs utilisations en médecine, dans les secteurs alimentaires et en cosmétiques (Mishra et al., 2012).

Dans la présente étude, la méthode du DPPH a été développée pour évaluer le pouvoir antioxydant des deux HES préparée à partir de la *M. piperita* et du *C. aurantium*.

L'acide ascorbique et le BHT ont été inclus dans nos analyses, comme antioxydants de références. Les résultats ont été exprimés par la mesure de la concentration efficace (IC<sub>50</sub>).

Cette dernière est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH, Ces concentrations sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Villano et al., 2007).

L'HE de la *M. piperita* révèle une activité antioxydante modérée. Elle est inférieure à celles des antioxydants de références. On remarque que l'HE a un IC<sub>50</sub> de 47.86 ± 0.56 µg/ml tandis que l'acide ascorbique montre un IC<sub>50</sub> de 6.27 µg/ml, suivi du BHT qui a un IC<sub>50</sub> de

18.02 µg/ml. L'activité antioxydante de l'HE est attribuée entre autre à la présence du (+) menthol (32.93%) suivi de la menthone (24.94%), le carane avec (8.08%) et le 1,8-cineole (7.98%). Nos données confirment ceux rapportés par **Mimica-dukić et al.,(2003)** indiquant que l'activité antioxydante de *M. piperita* peut être attribuée au menthone. Nos résultats sont similaires à ceux de **Fatma et Jaime, (2012)** qui ont rapporté que l'IC<sub>50</sub> de l'huile essentielle de *M. piperita* était de 59.19 µg/ml, et de **Yang et al., (2010)** qui ont obtenu un IC<sub>50</sub> de 57.9µg/ml. Cependant, nos résultats ne supportent pas ceux publiés par **Mimica-dukić et al.,(2003)** qui ont rapporté une forte capacité antioxydante de l'HE de la *M.piperita* IC<sub>50</sub> = 2,53 µg / ml.

Dans l'étude de **Goudjil et al.,(2015)**,un IC<sub>50</sub> de 32.94 µg / ml a été obtenue avec une HE *M.piperita* dont les composants majeurs sont le caravone à 51.04% et le limonene à 36.37%. Quand a **Schmidt et al.,(2009)**, ils ont montré unIC<sub>50</sub> très faible avec une valeur de 860.0µg / ml pour cette même HE.

Beaucoup de travaux ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (**Yildirim et al.,2001 ; Shahmohamadi et al., 2014 ; Fidrianny et al., 2018 ; Zhang et al., 2010**).

La présence des réducteurs dans les HEs provoque la réduction de Fe<sup>3+</sup>/ complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, le Fe<sup>2+</sup> peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de l'intensité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm.

Les résultats obtenus, pour une huile essentielle qui possède une grande activité antioxydante suggèrent que cette huile a un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux radicaux libres réactifs les convertissant en espèces non-réactives plus stables et terminant ainsi la réaction en chaîne des radicaux libres. Nous avons remarqué que l'HE de *M. piperita* présente des capacités importantes à réduire le fer comparativement à l'acide ascorbique et le BHT.

La figure montre que la réduction augmente avec la concentration de l'huile essentielle donnant une activité antioxydante comparable au contrôle. En effet, avec les valeurs entre 0,183 ± 0,01mg / ml et 0,642 ± 0,023mg / ml que nous avons obtenu supportent ceux rapportés préalablement par (**Goudjil et al.,2015**) : 0,487±0.016 mg / ml, et ceux obtenu par **Singh et al.,2015**) : 0.9 ± 0.3 mg / ml.

L'activité antioxydante de l'HEM. *piperita* serait probablement liée aux composants principaux; le limonène et le  $\beta$ -pinène qui présentent des propriétés antioxydantes importantes (**Tang et al.,2001**).

Pour l'HE de *C. aurantium*, de nombreuses études ont montré que certains constituants de cette huile présentent diverses activités biologiques telles que les activités antioxydantes, anti-coagulantes, et anti-tumorales (**Jabri-Karoui et al., 2012**).

Le limonène est un monoterpène qui existe dans les agrumes dont *C. aurantium* ; il est utilisé comme agent aromatisant dans les aliments. Il a été démontré que les monoterpènes possèdent une activité antioxydante puissante (**Roberto et al.,2010 ; Malhotra et al., 2009 ; Hussain et al., 2008, Majnnoni et al., 2012**). Les HEs monoterpéniques sont considérées comme des antioxydants naturels au même titre que le linalole (**Singh et al.,2010 ; Ouis,2015 ; Oke, 2009 ; Majnnoni et al., 2012**).

Nos résultats suggèrent que l'HEC. *aurantium* présente une activité antioxydante modérée et proportionnelle à la concentration de cette huile.

Même si nous avons démontré une activité antioxydante importante de l'HE de *C.aurantium* que nous avons utilisée, cette activité antioxydant demeure inférieure comparativement à celle obtenue avec l'acide ascorbique et le BHT. En effet, l'IC50= 110.05  $\mu$ g/ml de l'HE de *C.aurantium*, qui est faible par rapport à l'acide ascorbique (IC50=6.27  $\mu$ g/ml) et BHT (IC50= 18.02  $\mu$ g/ml).

Dans l'étude de **Ouedrhiri et al., (2015)** on retrouve pour cette HE a un IC 50 = 26.99  $\mu$ g / ml et 496.2 mg/ml respectivement pour le zeste du fruit et les feuilles. Une autre étude montre un IC50 et 190  $\mu$ g / ml pour la pelure, et de 97.05  $\mu$ g / ml pour le jus **Jabri karoui et al.,(2012)** démontrent la différence de l'activité antioxydante selon la partie de la plante .

### ***Chapitre 3: Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles *M.piperita* et *C.aurantium****

Il a été prouvé que les huiles essentielles et/ou certains de leurs constituants sont efficaces contre une grande variété d'organismes ; y compris les bactéries (**Baser *et al.*, 2006; Basile *et al.*, 2005 ; Majhenič *et al.*,2007**) et les champignons (**Pawar & Thaker,2006; Soylu *et al.*, 2006**).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits végétaux a constitué la base de nombreuses applications telles que la conservation des aliments et des produits pharmaceutiques, la médecine alternative et les thérapies naturelles (**Cosentino *et al.*, 1999; Bakkali *et al.*, 2008**).

La capacité cytotoxique des huiles essentielles, sur la base d'une activité pro-oxydante, peut, en faire d'excellents agents antiseptiques et antimicrobiens pour des usages personnels, tels que la purification de l'air, l'hygiène corporelle, la consommation par voie orale ou la préservation des cultures et des stocks alimentaires (effet insecticide) (**Bakkali *et al.*, 2008**). C'est pour ces raisons, que des études en cours visent la recherche de nouveaux agents antimicrobiens, soit par la conception et la synthèse ou bien la recherche de sources naturelles d'agents antimicrobiens originaux (**Cock, 2008**).

#### **1. Matériel**

##### **1.1. Les souches microbiennes**

Pour mettre en évidence le pouvoir antimicrobien des HEs *M.piperita* et *C.aurantium* un total de 26 souches microbiennes ont été utilisées (5 types/sortes de bactéries à Gram+ et 19 types/sortes de bactéries à Gram- et 2 souches de levures) ( Tableau 12).

Certaines souches utilisées sont de référence ATCC (American Type Culture Collection) obtenus de l'hôpital de Guelma- Algérie, alors que d'autres ont été isolées cliniquement.

Toutes les souches cliniques ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie du CHU de Annaba.

La croissance est réalisée à 37°C en milieu liquide Mueller-Hinton Broth (MHB, Oxoid®) et sur gélose Mueller-Hinton Agar (MHA bioMérieux®), les bactéries. Pour les levures, nous avons utilisé le milieu liquide (Yeast Peptone Dextrose : YPD) et gélose Saboureaud (Oxoid®) en milieu solide.

**Tableau12.** Souches microbiennes utilisées

Microorganisme	Caractéristique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC	Gram négatif
<i>Klebsiella oxytica</i>	Gram négatif
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram négatif
<i>Escherichia coli</i> BMR	Gram négatif
<i>Enterobacter sakazaki</i>	Gram négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	Gram négatif
<i>Proteus vulgaris</i>	Gram négatif
<i>Citrobacter Koseri</i>	Gram négatif
<i>Citrobacter freundii</i>	Gram négatif
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram négatif
<i>Salmonelle enteritidis</i>	Gram négatif
<i>Serratia marscences</i>	Gram négatif
<i>Streptomonas maltophilia</i>	Gram négatif
<i>Morgarina morganii</i>	Gram négatif
<i>Pasteurella multocida</i>	Gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram positif
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Gram positif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif
<i>Staphylococcus hominis</i>	Gram positif
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram positif
<i>Candida albicans</i>	Levure
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Levure

### 1.2. Les antibiotiques, antifongiques et solvants utilisés

L'antibiotique utilisé pour les essais de diffusion par gélose est la vancomycine (15 µg) (bioMérieux) ; et comme antifongique l'amphotericine B (100 µg) (fungizone) (biomérieux).

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma Aldrich, France) a été utilisé pour effectuer la dilution des HEs lors de différents tests. L'activité antibactérienne de ce solvant a été préalablement testée : Aux concentrations utilisées, ils sont sans effet sur la croissance bactérienne.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Pré-culture des souches microbiennes**

10 ml de milieu de culture stérile, (Coeur-Cervelle - CondaPronadisa™, Espagne):BHI pour les bactéries, et Bouillon Sabouraud (Fluka), pour les levures ont été inoculés à partir d'une colonie bien isolée, issue d'une culture de 24 heures.

Après 18 à 24 heures d'incubation, quelques gouttes de chaque suspension préalablement préparée ont été diluées dans 10ml d'eau physiologique stérile puis homogénéiser au vortex. L'inoculum est ajusté à 0,5 MacFarland (**Lahlou, 2004, Sifi 2017, et Negreiros et al..2016**); ce qui correspond à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625nm, ce qui correspond à une densité  $10^8$ UFC/ml (CLSI, 2006a), pour les bactéries et pour *C.albicans*.

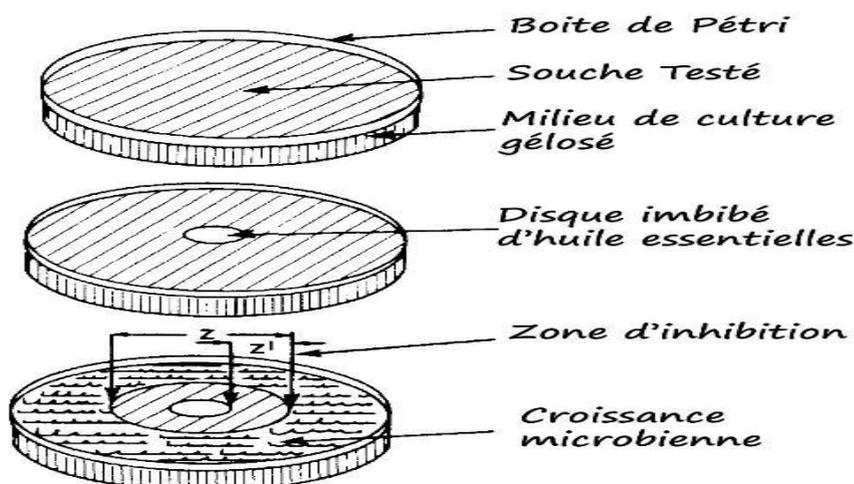
### **2.2. Évaluation de l'effet des HEs sur la croissance microbienne**

Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme a été réalisée à l'aide de la méthode de l'aromatogramme.

Cette méthode adoptée par certains auteurs **Rhayour,(2002) ;Guinoiseau,(2010) ; Sifi,(2017)** est la technique que nous avons utilisé pour évaluer dans un premier temps l'activité antimicrobienne des HEs en respectant les recommandations établies par le BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) et développées par **Andrews, (2001)**.

C'est une méthode qui repose sur le pouvoir migratoire des HEs sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Elle nous permet de mettre en évidence l'effet antimicrobien des HEs et en déduire ainsi la résistance ou la sensibilité de ces microorganismes vis-à-vis de ces molécules. Dans notre étude, nous avons utilisé des disques de papier Whatman N°3 de 6 mm de diamètre. Ces disques sont disposés dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis conservés à une température ambiante. Le disque sera déposé à l'aide d'une pince stérile au centre d'une boîte Pétri de 11 cm de diamètre contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. (Figure 23).

L'étude du pouvoir antimicrobien à l'aide de cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits d'HEs.



**Figure 23** .Schéma représentant la méthode de l'aromatogramme (Zaika, 1988)

A partir de la suspension microbienne préparée une densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) est donc réalisée, 20 mL de milieu gélosé (MHA pour les bactéries et Saboureaud pour *C.albicans*) sont coulés par boîte de Pétri. Un ml d'*inoculum* est déposé dans au centre de chaque boîte. Après une imprégnation de 5 minutes de la gélose, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration, puis les boites de Pétri ainsi inoculées sont incubées à 37°C pendant 20 minutes.

Ensuite, à la surface de chaque gélose, trois disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre sont déposés : un disque contenant 10 µL d'huile essentielle et les deux autres utilisés comme témoins : un témoin négatif avec 10 µL d'eau distillée stérile en présence de 10 % de DMSO et l'autre disque contient l'antibiotique comme témoin positif (la vancomycine 15). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Tous les tests ont été réalisés en triplicata.

Après incubation, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) est mesuré (disque inclut) et exprimé en millimètres (mm).

Les résultats exprimés en trois niveaux d'activité ont été notés : ( **De Billerbeck, 2007**)

- Résistant : Diamètre de zone d'inhibition < 6 mm
- Intermédiaire :  $6\text{mm} \leq \text{Diamètre de zone d'inhibition} \leq 13 \text{ mm}$
- Sensible : Diamètre de zone d'inhibition > 13mm

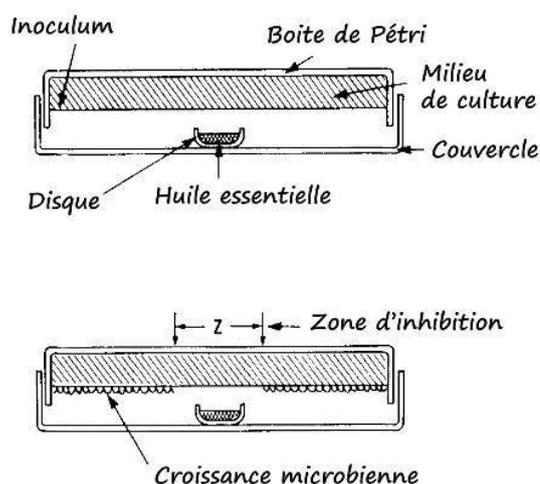
### 2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la technique de micro atmosphère

La technique de micro atmosphère permet d'évaluer l'activité antimicrobienne de la partie volatile des HEs, sans aucun contact direct avec les microorganismes (Soylu et al.,2010). Le protocole des micro-atmosphères est techniquement proche de celui de l'aromatogramme. Cette méthode, est réalisée en boîte de Pétri, constitue une première approche pour l'étude de l'activité antimicrobienne des vapeurs de produits volatils. Elle consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné de l'huile essentielle (10 µl) à tester au centre du couvercle d'une boîte de Pétri, sans que l'huile n'entre en contact avec la gélose ensemencée des micro-organismes ;

Dans des boites de Pétri de 9 cm de diamètre, 20 ml de milieu de culture sont coulés (Guiniseau,2010) après solidification du milieu. L'ensemencement se fait de la même manière que pour la méthode de contact direct. Ensuite un disque de papier Whatman N°3 est déposé au centre de la partie intérieure du couvercle de la boîte de Pétri. À l'aide d'une micropipette 10 µl d'HE sont déposés sur le papier. (Figure 24).

Les boites de Pétri sont fermées hermétiquement avec du Parafilm et incubées renversées (le couvercle vers le bas) à 37°C, pendant 18à 24 heures.

Des témoins positifs (d'ATB : vancomycine 15/Fongicide : amphotericin-B), et négatifs (eau distillée stérile) sont préparés de la même façon que les tests.



**Figure 24.** Schéma récapitulatif illustrant la méthode micro atmosphère (Zaika, 1988)

Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des HEs. Elle révèle seulement la sensibilité du microorganisme présent aux constituants volatils, à la température d'incubation (Sifi,2017).

#### **2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

Cette technique consiste à exposer une concentration standardisée d'un *inoculum* donné, à une gamme de concentrations décroissantes d'HE à tester. Après l'incubation et l'incubation, les analyses des résultats nous permettent de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance microbienne

##### **Technique de macro-dilution en milieu solide**

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) pour évaluer la sensibilité des bactéries micro aérophiiles aux agents antibactériens. Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution standard sur milieu gélosé MHA /Saboureaud.

Une gamme de dilution de base 2 est réalisée, dans du DMSO, à partir de 50 µL de l'HE à tester. 30 µL de chacune des dilutions de la gamme sont ajoutés dans des tubes stériles contenant 15 mL de milieu gélosé MHA/Saboureaud, maintenu en surfusion dans un bain-Marie thermostaté à 55°C.

La gamme de concentrations ainsi générée est comprise entre 1 et 0,03 mg.mL<sup>-1</sup>. Le contenu de chaque tube est immédiatement versé dans une boîte de Pétri stérile après une agitation de 15 secondes. Des spots de 2 µL d'un *inoculum* standardisé à 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (soit 2.10<sup>5</sup> UFC par spot) sont déposés sur les boîtes de gélose. L'Erythromycine et l'Amphotericin B sont utilisés comme contrôles positifs, le DMSO seul est utilisé comme contrôle négatif. Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C.

La CMI de l'HE est définie à partir de la première boîte de la gamme dépourvue de croissance microbienne.

Chaque condition est réalisée en triplicata. L'expérience est répétée trois fois de façon indépendante.

#### **2.5. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide/Fongicide (CMB)/(CMF) en milieu solide**

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) / Fongicide (CMF) correspond à la plus faible concentration en HE capable de tuer plus de 99,9 % de l'*inoculum* bactérien initial

(soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle. (Guinoiseau, 2010 ;Haddouchi *et al.*, 2009).

À partir de la première concentration ne montrant aucune croissance microbienne du test de la CMI, après les 24h d'incubation, un raclage est effectué avec un écouvillon sur toute la surface de la gélose ; puis déposés « en strie » sur la gélose appropriée pour chaque type de germe étudié (Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour levures). Les boîtes ensemencées sont incubées pendant 18 h pour les bactéries et 48 h pour les levures à 37°C. La CMB des HEs est déduite à partir de la première boîte dépourvue de croissance microbienne.

## 2.6. Essai de l'inhibition de la formation de biofilm

L'inhibition de la formation de biofilms a été déterminée selon la méthode de Merghni *et al.*,(2015) et Negreiros *et al.*,(2016) avec de minimes modifications. Après incubation de 24 h à 37°C sans agitation dans le milieu de culture BHI, pour les bactéries, Saboureaud additionné de 2% de glucose pour *Candida* sur des plaques de 96 puits à raison de 150 µl/ puit ; auxquels on a ajouté la concentration des HEs *M.piperita* et *C.aurantium* correspondant à la CMI relative pour chaque souche microbienne. Les puits témoins, seront additionnés de DMSO pour le témoin négatif, de vancomycine pour les bactéries et d'Amphotericin B pour *Candida* pour les témoins positifs. Une lecture des DO de la croissance est réalisée avant que les cellules microbiennes flottantes soient éliminées. Puis les puits sont lavés deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) afin d'éliminer les cellules faiblement adhérentes. Les plaques ont été séchées à l'air avant d'introduire le volume de 150 µl de cristal violet à 0,1 % et laissées pendant 30 minutes.

Les puits sont ensuite rincés quatre fois à l'eau distillée pour éliminer le cristal violet en excès. Le cristal violet fixé sur les parois des puits est solubilisé à l'aide d'une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25) dans chaque puits. La plaque est agitée pendant 10 min afin de libérer la coloration à partir des biofilms. Après 1 heure, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm avec le lecteur de microplaque «Filter Max F5, Molecular Devices, Inc, Autriche».

La masse microbienne accumulée au sein des biofilms formés est ainsi quantifiée. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées et le pourcentage d'inhibition obtenu des HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* est calculé selon la formule suivante:

$$\%D'inhibition = (DO\ contr\^ole - DO\ test) / DO\ contr\^ole \times 100$$

## 2.7. Evaluation de l'activité métabolique des biofilms (essai de réduction de MTT)

L'activité métabolique des biofilms a été évaluée à l'aide du test de la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). Ce test permet de mesurer l'activité des cellules vivantes en se référant à l'activité de la déshydrogénase mitochondriale. Ce test est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT en formazan. Ce dernier est mesuré par quantification spectrophotométrique après son extraction avec du propanol acide. (Denizot *et al.*, 1986).

Le test de réduction du MTT fournit une mesure à la fois de la masse cellulaire viable et de sa capacité métabolique sans tenir compte des agrégats de cellules.

L'essai a été effectué selon Negreiros *et al.*, (2016) avec quelques modifications. Une solution mère de MTT à (5 mg / ml) de (Sigma Aldrich, France) a été préparée dans du PBS et filtrée. Après 24h de culture dans les mêmes conditions précédemment cités (Essai de l'inhibition de la formation de biofilm) les cellules ont été centrifugées pendant 10 min à 12000 rpm et leur culot a été repris dans une solution de MTT à 10%, puis incubés pendant 4h à 37°C, à l'obscurité. Après une nouvelle centrifugation, le culot cellulaire a été repris dans 1 ml de DMSO suivi par une incubation supplémentaire pendant 30 mn à 37°C. Le formazan pourpre insoluble, obtenu par clivage de MTT faite par les enzymes déshydrogénases des cellules vivantes, a été dissoute avec du DMSO. Suite à une centrifugation pour éliminer les débris cellulaire, le surnageant de chaque échantillon a été prélevé et a été disposé dans une plaque 96 puits à fond plat à raison de 4 puits de 200 µl pour chaque échantillon. Les changements colorimétriques ont été finalement mesurés en se référant à l'absorbance lue à 550 nm, en utilisant un lecteur de plaques «Filter Max F5, Molecular Devices, Inc, Autriche».

En utilisant la moyenne des DO des contrôles et des essais, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition des HES à l'aide de la formule suivante:

$$\% D'inhibition = (DO\ contr\^ole - DO\ \acute{e}chantillon) / DO\ contr\^ole \times 100$$

## 2.8. Traitement statistique des résultats

Présentation des résultats sous forme de moyenne  $\pm$  écart type (**M $\pm$ ET**).

Les moyennes sont comparées aux témoins à l'aide du test t de Student.

Les différences ont été considérées comme :

- Significatives pour une valeur de probabilité **P < 0.05**.
- Hautement significatives comparant au témoin pour **P < 0.01**.
- Très hautement significatives comparant au témoin pour **P < 0.001**.

## 3. Résultats

### 3.1. Les Huiles essentielles de *M.piperita* et *C.aurantium* réduisent la croissance microbienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Mentha x piperita* et *Citrus aurantium* a été évaluée par la méthode de diffusion par disque.

La vancomycine est utilisée comme antibiotique de contrôle. La classification des souches bactériennes en catégories « Sensible, (S) » ou « Résistante, (R) » aux antibiotiques est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010). Les résultats de l'aromatogramme sur les souches microbiennes sélectionnées ainsi que celles de la CMI, CMB, et le rapport CMB/CMI sont illustrés dans le (Tableau13).

Tableau 13. Activité antimicrobienne des HEs de *M.piperita* et *C.aurantium*

Micro organisme	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		Antibiotique/ Antifongique	Valeurs CMI et CMB (µl/ml) de		Valeurs du rapport CMB/CMI	
	<i>M.piperita</i>	<i>C.aurantium</i>		<i>M.piperita</i>	<i>C.aurantium</i>	<i>M.piperita</i> / <i>C.aurantium</i>	
<b>Gram -</b>							
<i>P. aeruginosa</i>	16 ± 0.35	R	18 ± 0.20	4 / 10	-	2.5	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11 ± 0.71	R	09 ± 0.40	4 / 8	-	2.0	-
<i>K. pneumoniae</i>	46 ± 0.20	32 ± 1.2	R	8 / 12	8 / 32	1.5	4
<i>K. pneumoniae</i> E47	25 ± 1.40	R	R	2 / 2	-	1	-
<i>K. oxytica</i>	32 ± 0.58	06 ± 0.2	06 ± 0.80	1 / 2	1 / 8	2	8
<i>E.coli</i> ATCC 25922	15 ± 0.29	R	R	0.50 / 4	-	8	-
<i>E. coli</i> BMR	20 ± 0.71	20 ± 0.4	R	0.50 / 2	0.5 / 1	4	2
<i>E.sakazaki</i>	20 ± 1.80	12 ± 0.9	10 ± 0.62	0.25 / 2	1 / 8	8	8
<i>E.cloacae</i>	32 ± 0.35	25 ± 0.4	20 ± 0.55	1 / 6	4 / 16	6	4
<i>P. mirabilis</i>	38 ± 0.75	15 ± 0.2	R	1 / 4	4 / 4	4	1
<i>P. vulgaris</i>	50 ± 1.70	30 ± 0.2	32 ± 0.35	4 / 4	0.5 / 4	1	8
<i>C.Koseri</i>	45 ± 1.80	61 ± 0.4	51 ± 1.70	4 / 4	0.25 / 0.5	1	2
<i>C. frendii</i>	50 ± 0.80	45 ± 0.2	42 ± 0.00	1 / 8	1 / 2	8	2
<i>A. baumannii</i>	25 ± 0.95	23 ± 1.80	R	2 / 8	2 / 8	4	4
<i>S.entertiidis</i>	24 ± 1.20	12 ± 0.75	R	2 / 2	0.5 / 4	1	8
<i>S. Marscences</i>	60 ± 0.50	48 ± 0.35	R	1 / 8	2 / 2	8	1
<i>S.maltophilia</i>	20 ± 0.80	25 ± 0.60	R	4 / 4	8 / 32	1	4
<i>M. morgani</i>	23 ± 1.70	10 ± 1.40	R	2 / 4	6 / 16	2	2.66
<i>P.multocida</i>	35 ± 1.85	15 ± .96	R	0.5 / 8	8 / 16	16	2
<b>Gram+</b>							
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	R	R	R	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	R	21 ± 0.80	R	-	4 / 8	-	-
<i>S. aureus</i>	30 ± 0.20	40 ± .80	R	0.50 / 2	0.5 / 2	-	2
<i>S. hominis</i>	43 ± 2.20	52 ± 0.40	R	0.25 / 1	0.25 / 0.25	4	4
<i>E. faecalis</i>	45 ± 1.10	25 ± 0.20	30 ± 0.95	1 / 2	0.50 / 0.50	4	1
<b>Levures</b>							
<i>C. albicans</i>	+++++	+++++	13 ± 0.22	0.25/0.25	0.25 / 0.5	2	1
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	+++++	+++++	18 ± 0.10	0.25/0.25	0.25/ 0.5	1	2
						1	2

Ainsi, les résultats obtenus à l'aide de la méthode de Vincent (Aromatogramme), illustrent un large éventail de diamètres de zones d'inhibition, allant de 11 à 60mm avec l'HE *M.piperita* et de 6 à 61 mm pour l'HE de *C.aurantium*. Avec une action remarquable sur les deux souches de *C.albicans*, ou aucune croissance n'a été observé avec nos deux HEs.

Au contraire, les résultats révélés par la souche *S.aureus* ATCC 25923 montrent une résistance marquée pour les deux HEs. (Photos en annexes 7 et 8).

Quand à *S.aureus* ATCC 29213, la souche a montré une résistance contre l'HE de *M.piperita*, mais elle était sensible à l'HE de *C.aurantium*, et cela contrairement aux souches de *P.aeruginosa*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *K. pneumoniae* E47 qui se sont avérées résistantes à l'action de l'HE de *C.aurantium*.

L'action de la (vancomycine) qui a servi de témoin positif, a été très faible pour plusieurs bactéries (14 type/souches), mais s'est avéré très forte pour 9 souche/types de bactéries.

### **3.2. Evaluation des CMI/CMB et CMF**

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que les CMI et CMB obtenus après diffusion des HEs, révèlent une nette et importante activité antimicrobienne à l'encontre des souches testées. Les souches les plus sensibles étant *C.albicans* avec une inhibition quasi complète de la croissance. De plus il n'existe pas de différences quant à l'effet sur les souches bactériennes à Gram (+) ou les souches à Gram (-).

Les valeurs de la CMI et de la CMB : (Tableau 13) confirment l'effet inhibiteur important sur la croissance microbienne, les résultats obtenus indiquent la sensibilité des différents microorganismes au traitement par les HEs avec des valeurs qui ne dépassent pas les 8 µl/ ml comme CMI, et 12 µl /ml en CMB pour *M.piperita*, et 8 µl /ml CMI et 32 µl /ml en CMB pour l'HE de *C.aurantium*.

Les rapports CMB/CMI des huiles de *M.piperita* nous indiquent un effet bactéricide de cette huile sur 11 souches bactériennes testées /et bactériostatique pour 9 souches.

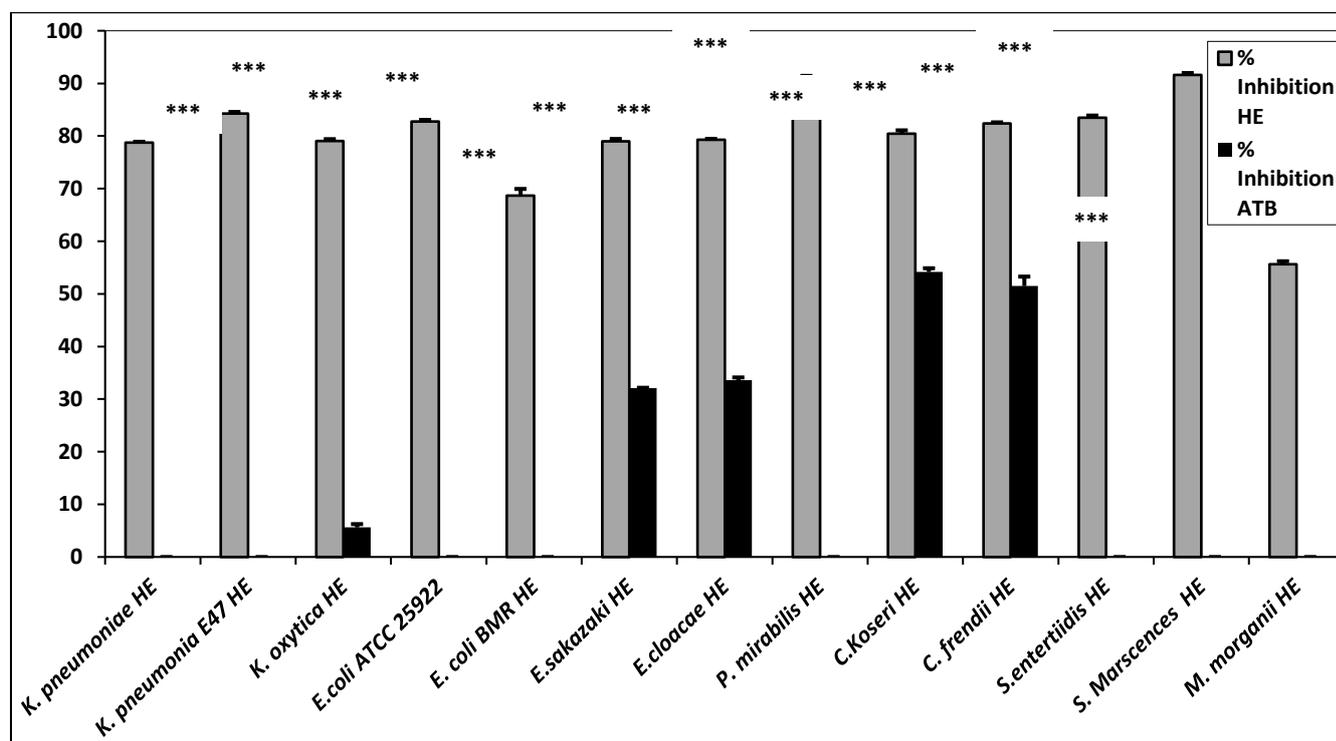
L'HE *C.aurantium* exerce une action bactéricide contre 10 souches microbiennes et un effet bactériostatique sur 9 souches.

Par ailleurs, et pour les deux souches de *C.albicans* , l'effet fongicide de nos deux HEs est très perceptible.

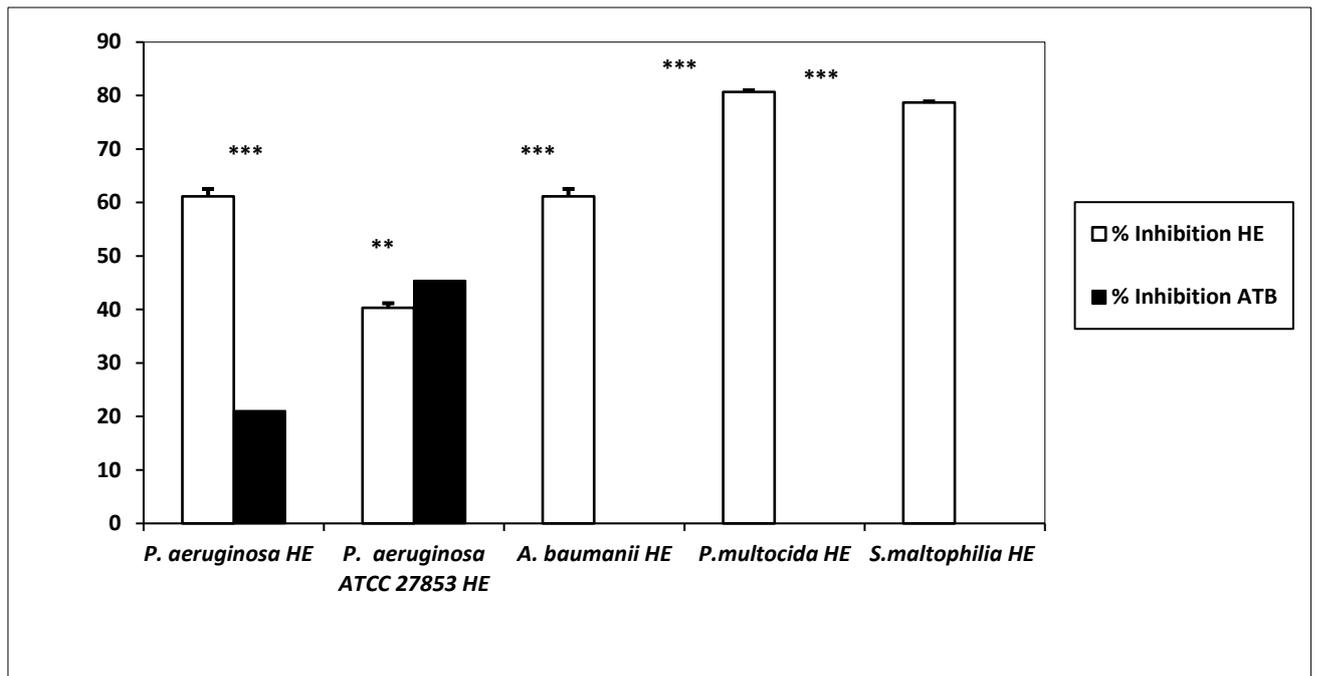


### 3.4. Les Huiles essentielles de *M.piperita* et *C.aurantium* réduisent la formation de biofilm

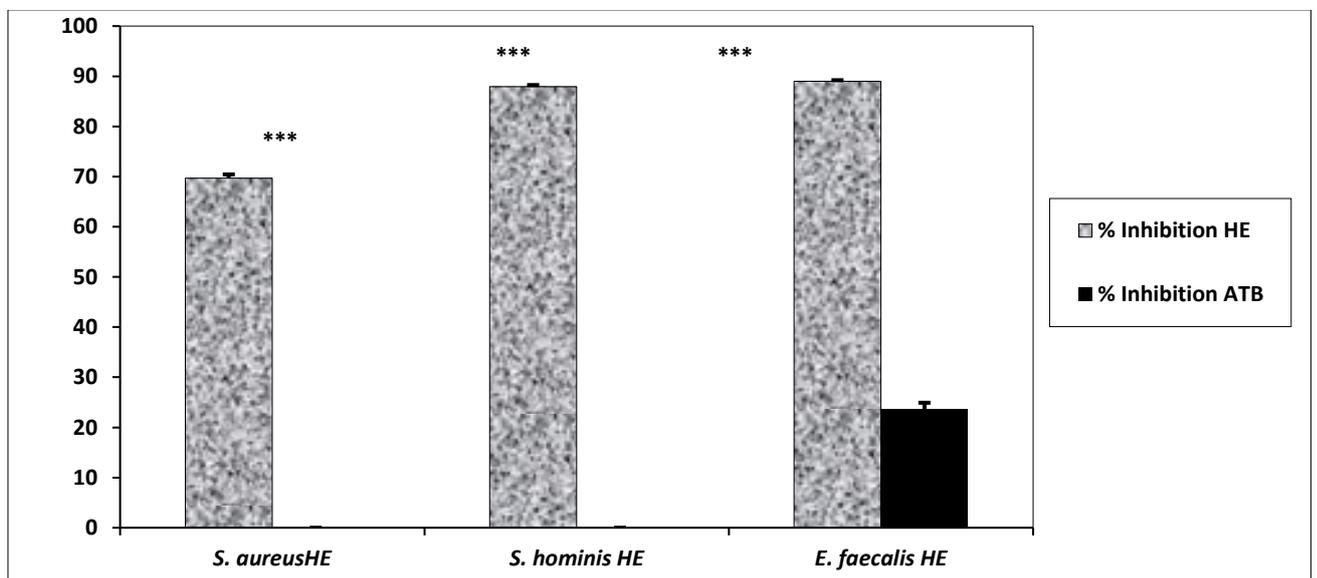
Les résultats obtenus révèlent des pourcentages de réduction de biofilms assez importants. En effet, des pourcentages de réduction variant en moyenne de 40.30% à 92,85% ont été obtenus avec l'HE de *M. piperita* et de 23.66 % à 91.49 % avec l'HE de *C.aurantium* contre seulement 5.61 % à 54.38% obtenus avec les différents traitements (antibiotique : vancomycine et antifongique : amphotericin B. Figures (25,26,27,28,29,30,31,32 ).



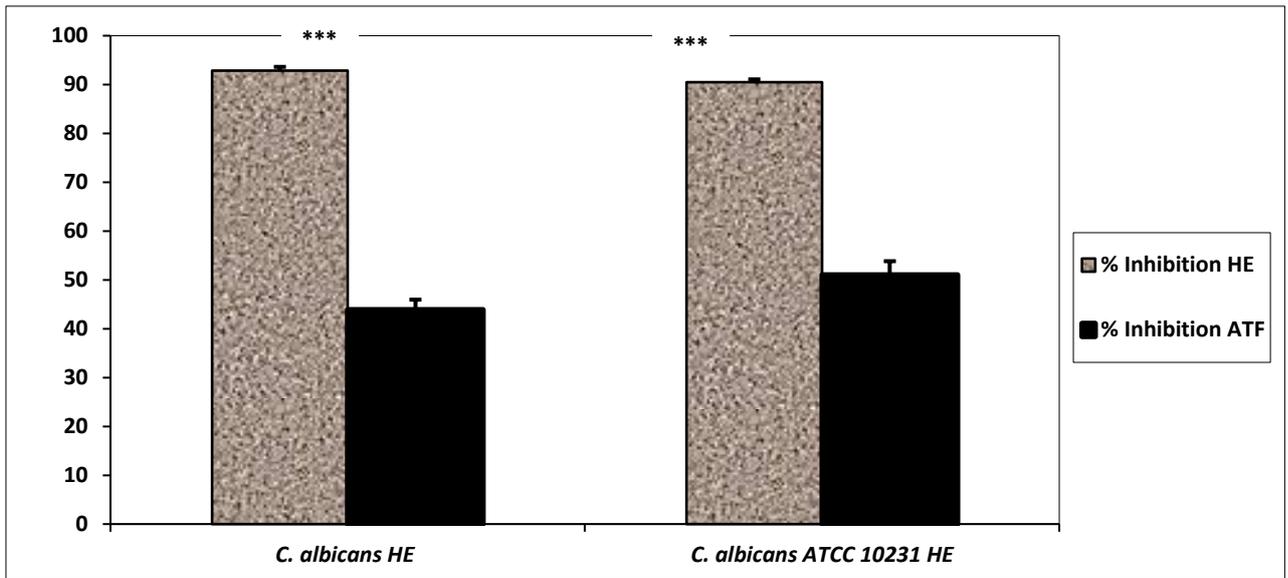
**Figure 25 .** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur la formation de biofilms pour les bactéries à Gram négatif (Entérobactéries).



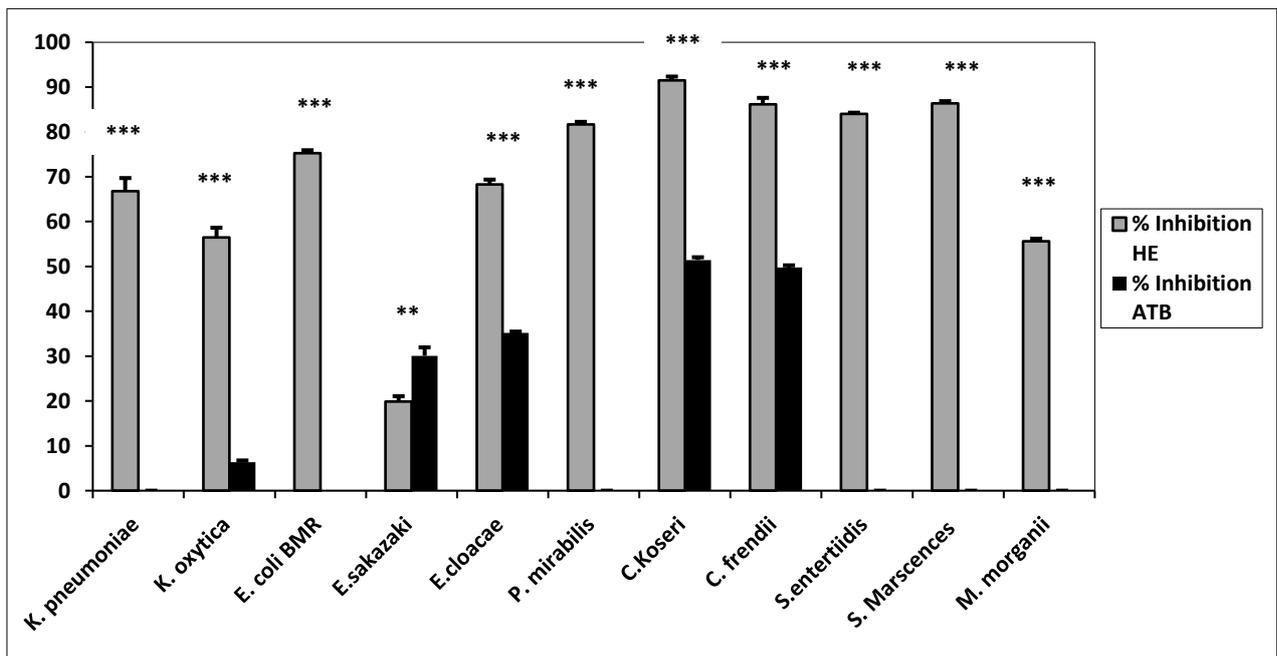
**Figure26.** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur la formation de biofilms pour les bactéries à Gram négatif (Non fermentaires).



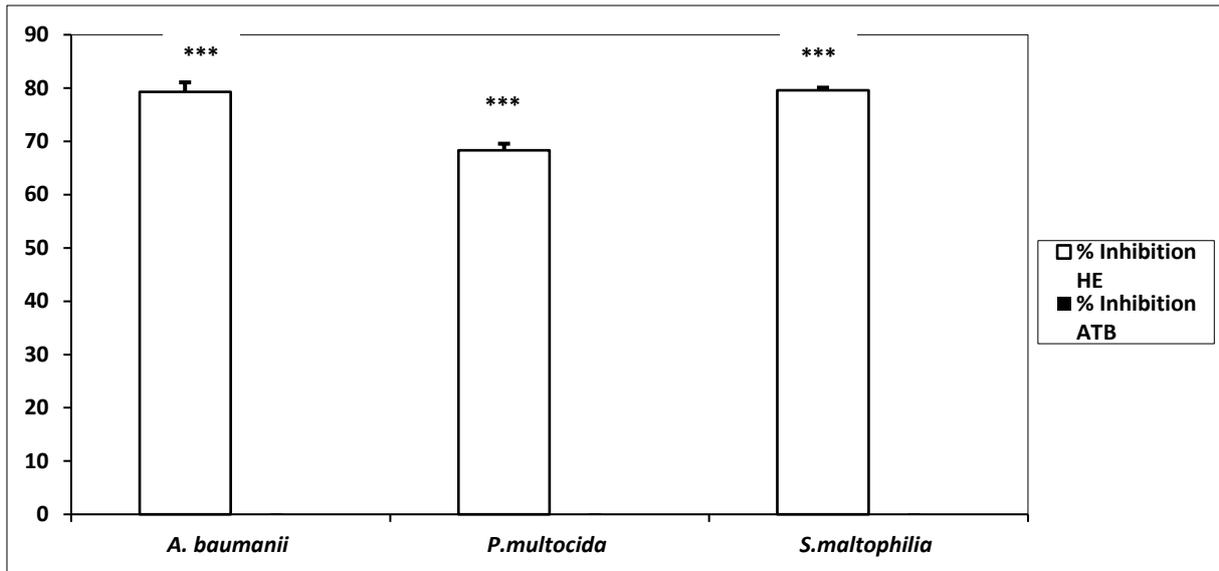
**Figure27.** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur la formation de biofilms pour les bactéries à Gram positif.



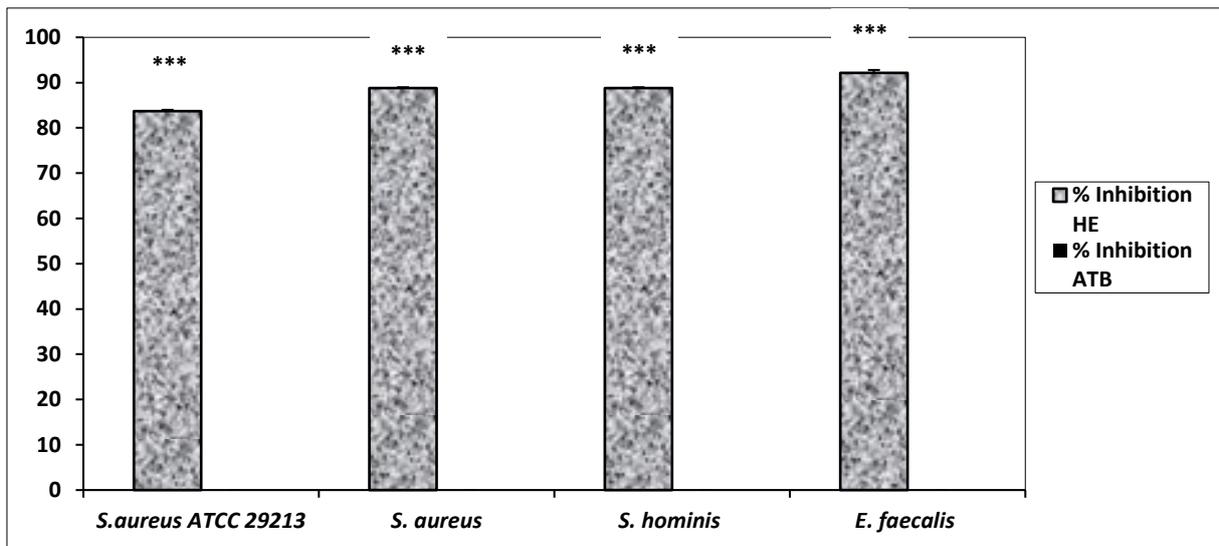
**Figure 28.** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur la formation de biofilms pour les levures.



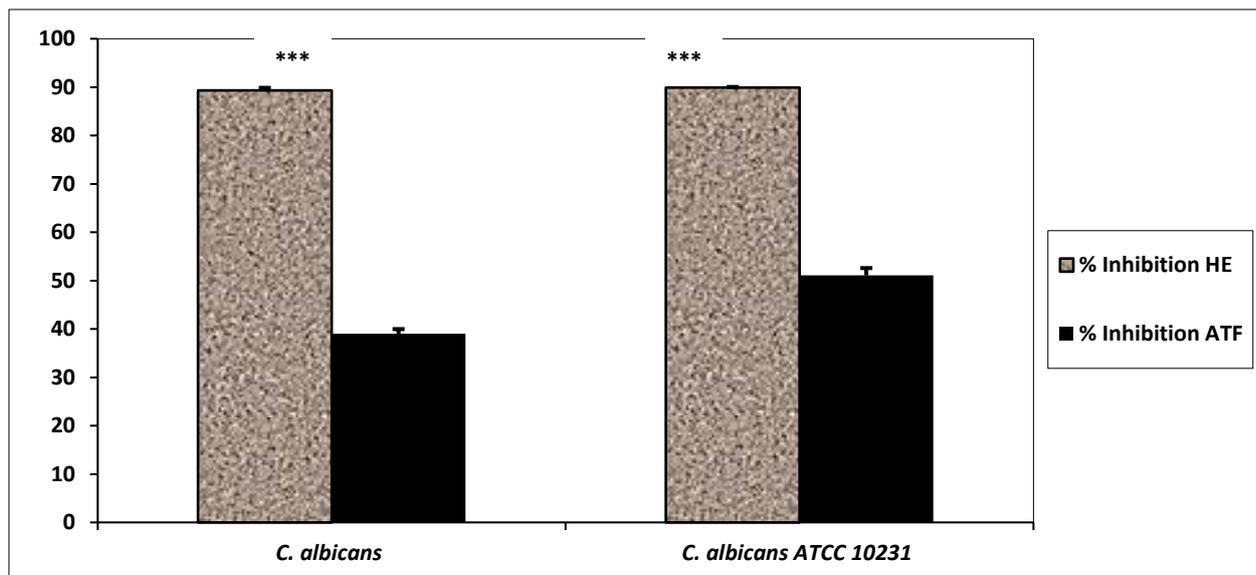
**Figure 29.** Evaluation de l'effet de l'HE *C. aurantium* sur la formation de biofilms pour les bactéries à Gram négatif (Entérobactéries).



**Figure 30.** Evaluation de l'effet de l'HE *C.aurantium* sur la formation de biofilms pour les bactéries à Gram négatif (Non fermentaires).



**Figure 31.** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur la formation de biofilms pour les bactéries à Gram positif.



**Figure 32** .Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur la formation de biofilms pour les levures.

### 3.5. Analyses statistiques des résultats de l'inhibition des biofilms

#### - l'HE *M.piperita*

L'analyse des valeurs obtenues montre une augmentation très hautement significative ( $P < 0.001$ ) de l'inhibition de la quasi-totalité de souches bactériennes et fongiques par l'HE comparativement à l'inhibition par l'ATB ou l'ATF, sauf pour le cas de la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853, on note une diminution hautement significative ( $P < 0.01$ ) en comparaison avec l'inhibition après un traitement d'ATB.

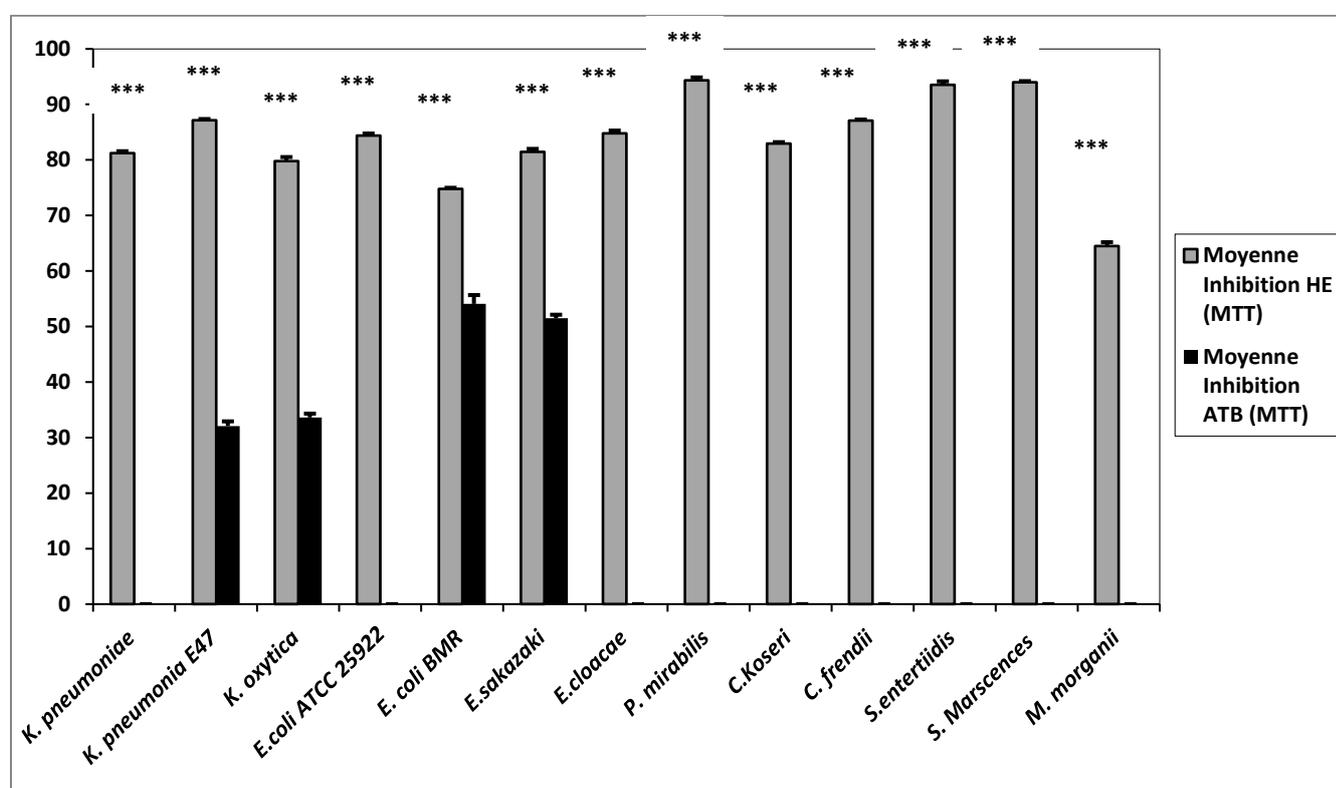
#### - l'HE *C.aurantium*

L'analyse des valeurs obtenues montre une augmentation très hautement significative ( $P < 0.001$ ) de l'inhibition de la formation de biofilm chez la quasi-totalité de souches bactériennes et fongiques par l'HE comparativement à l'inhibition par l'ATB ou l'ATF, sauf pour le cas de la souche *E.sakasaki*, on note une régression hautement significative ( $P < 0.01$ ) en comparaison avec l'inhibition après un traitement d'ATB.

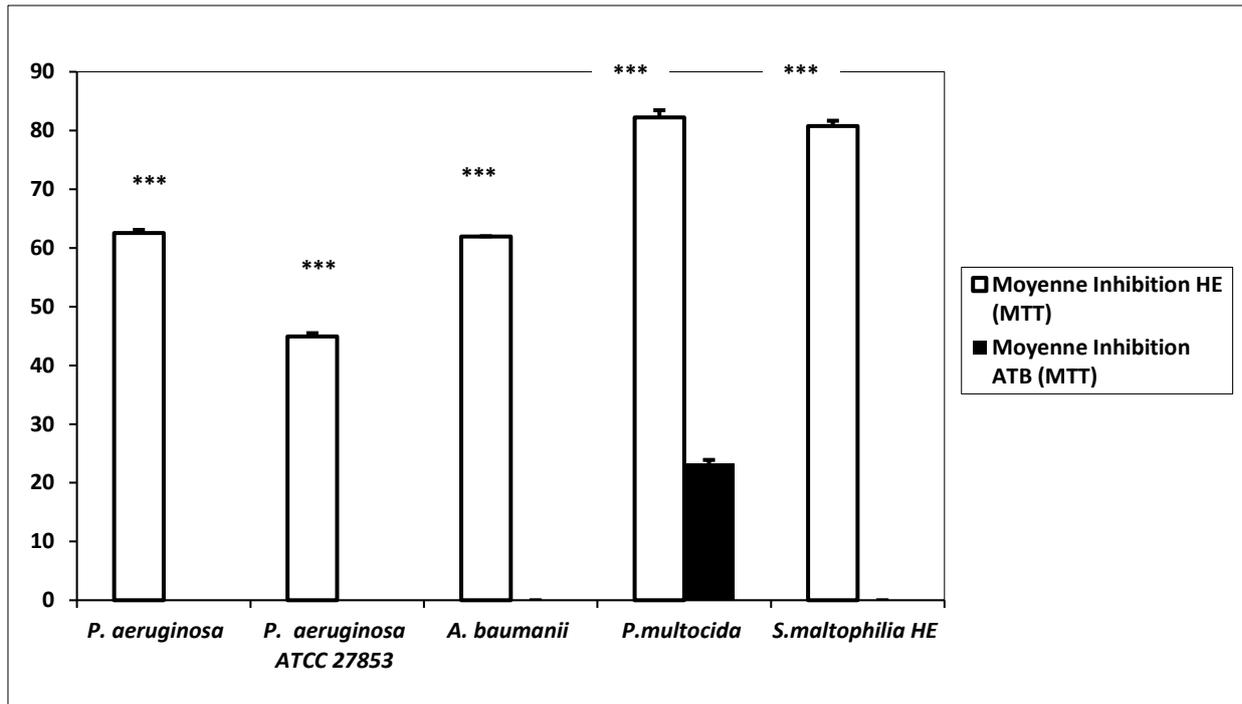
### 3.6. Les Huiles essentielles de *M.piperita* et *C.aurantium* réduisent l'activité métabolique des microorganismes testés

Les résultats obtenus relatifs à la réduction du MTT, Figures (33,34,35,36,37,38,39,40), montrent que les HEs ont une activité importante réduisant l'activité métabolique des microorganismes formant les biofilms.

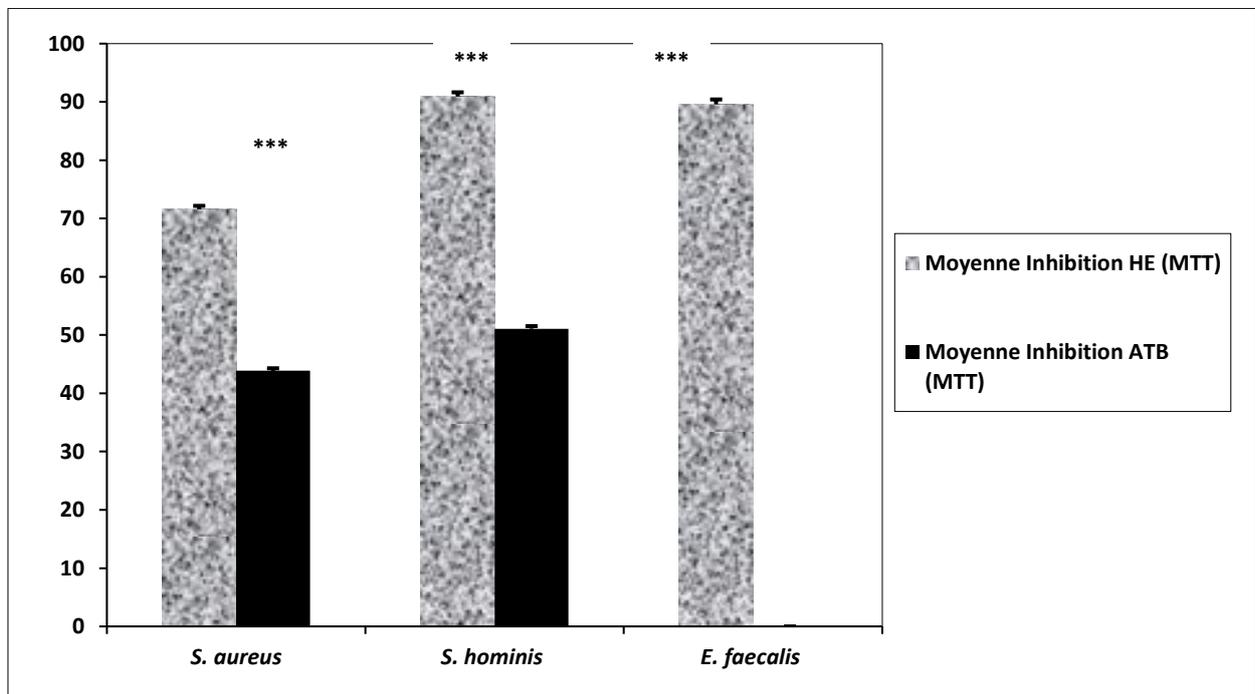
En effet, des pourcentages d'inhibition de la formation de biofilms, variant de 44,93% à 98,07% ont été obtenus avec cette HE *M.piperita* et de 44,48% à 93,67 % de taux d'inhibition pour l'HE de *C.aurantium* .En revanche des taux allant de 5,88 jusqu'à 50,37% ont été obtenus avec le traitement.



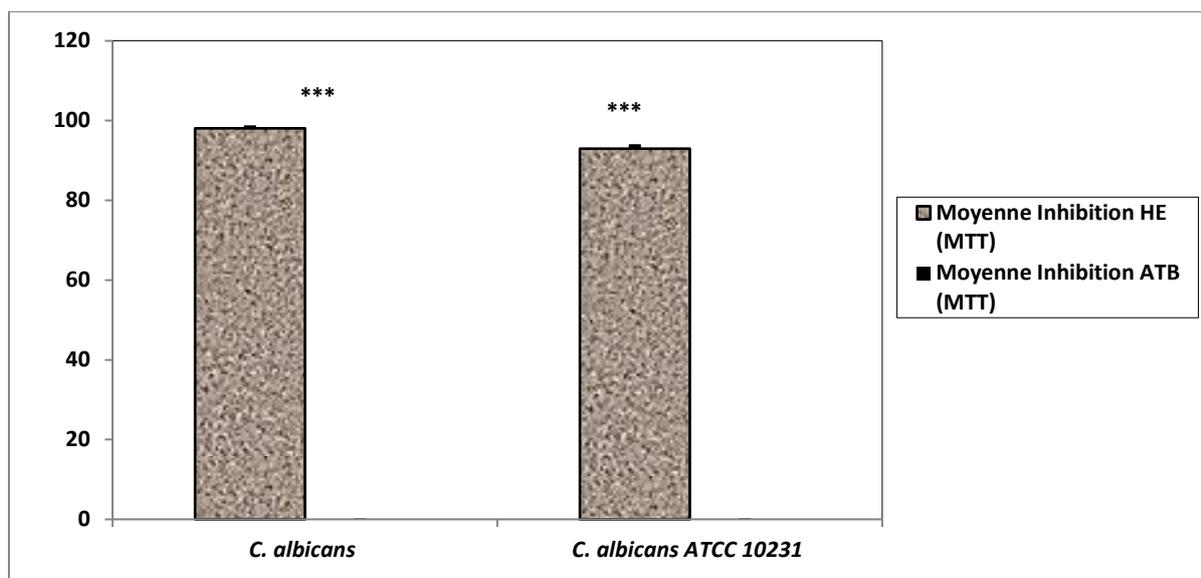
**Figure 33.** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur l'activité métabolique pour les bactéries à Gram négatif (Entérobactéries).



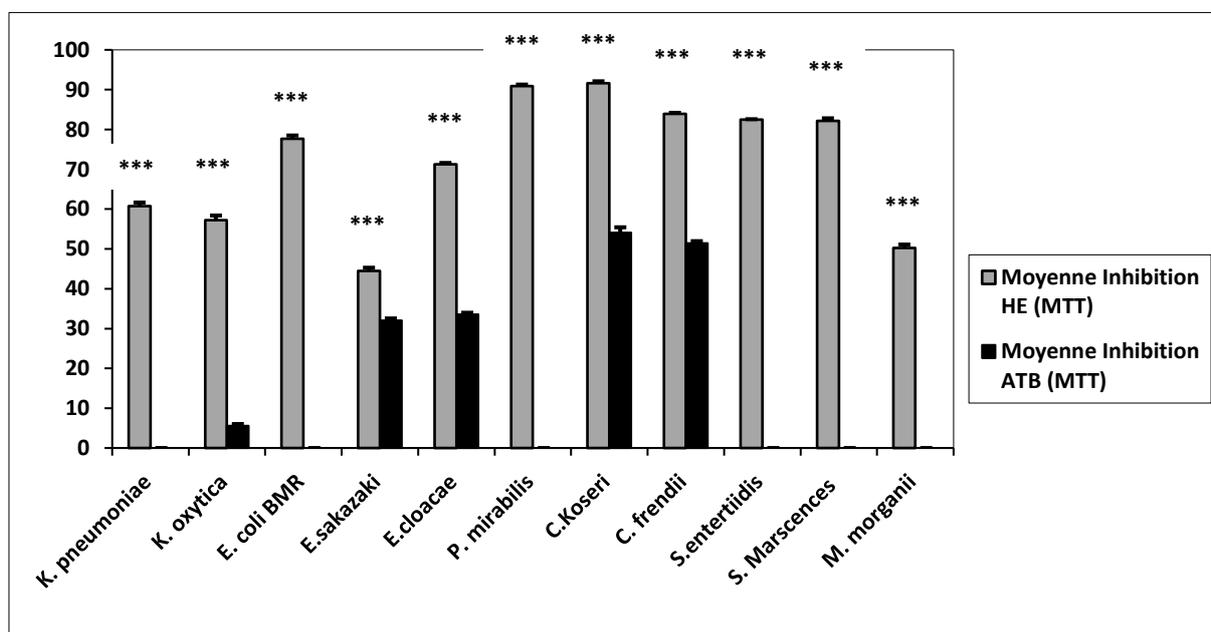
**Figure 34.** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur l'activité métabolique pour les bactéries à Gram négatif (Non fermentaires)



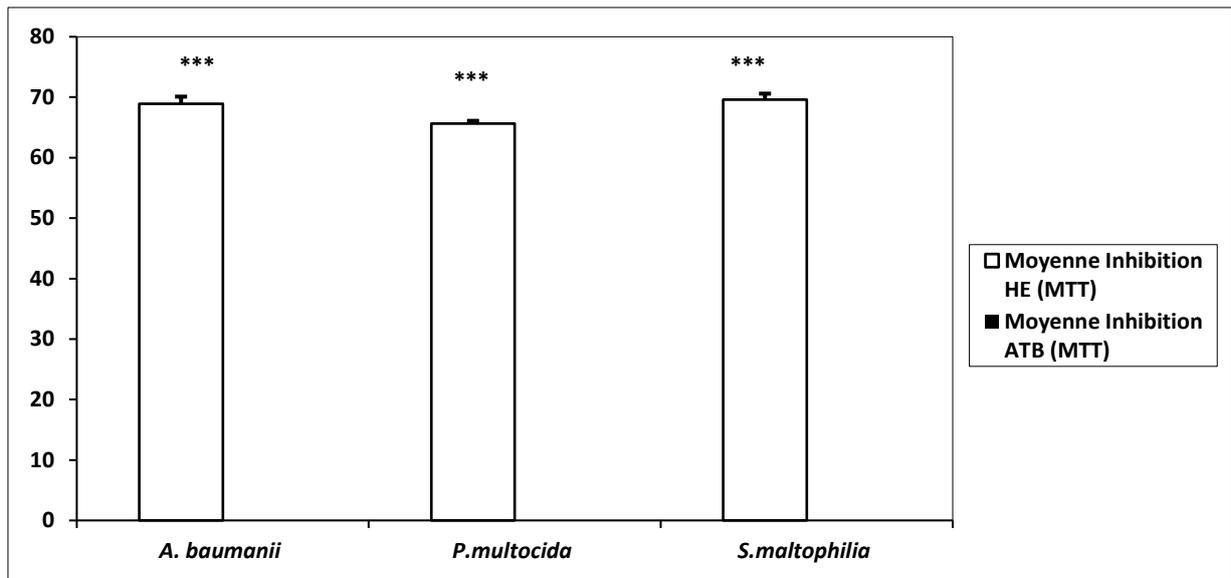
**Figure 35.** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur l'activité métabolique pour les bactéries à Gram positif



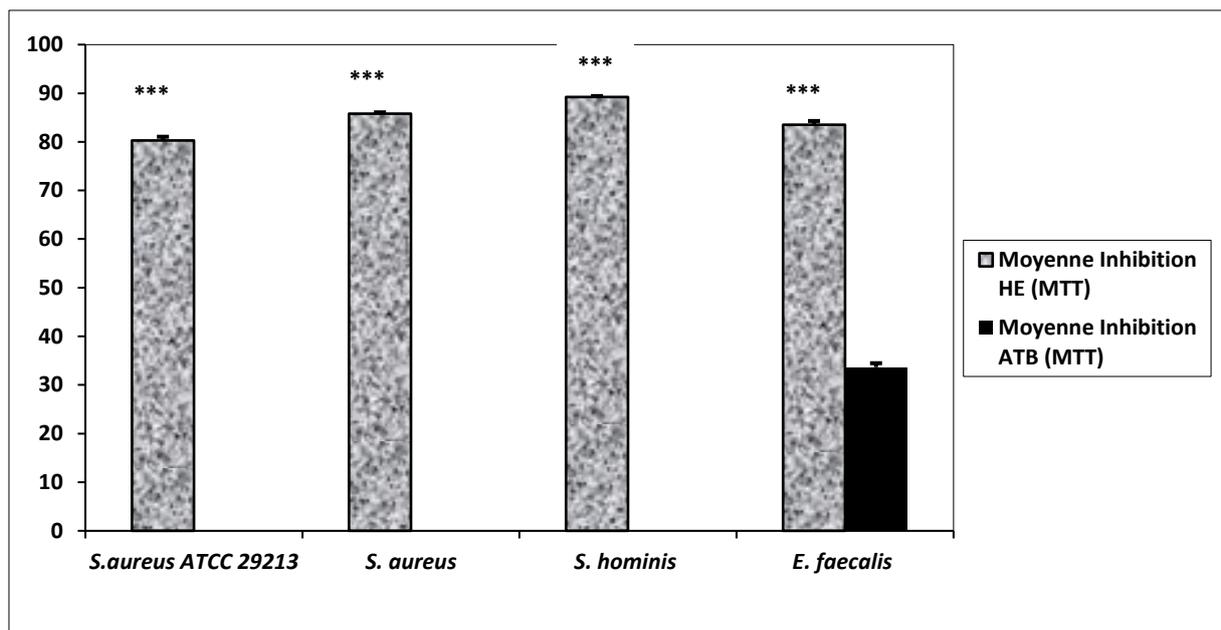
**Figure 36.** Evaluation de l'effet de l'HE *M. piperita* sur l'activité métabolique pour levures.



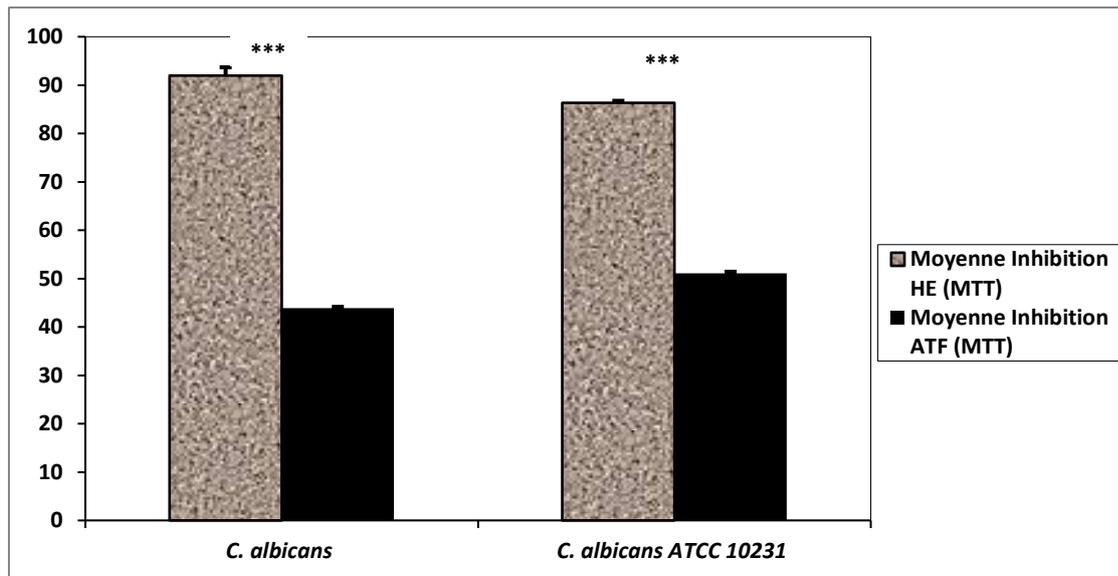
**Figure 37.** Evaluation de l'effet de l'HE *C. aurantium* sur l'activité métabolique des bactéries à Gram négatif (Entérobactéries)



**Figure 38.** Evaluation de l'effet de l'HE *C.aurantium* sur l'activité métabolique des bactéries à Gram négatif (Non fermentaires)



**Figure 39.** Evaluation de l'effet de l'HE *C.aurantium* sur l'activité métabolique les bactéries à Gram positif



**Figure 40.** Evaluation de l'effet de l'HE *C.aurantium* sur l'activité métabolique pour les levures

### 3.7. Analyses statistiques des résultats de l'inhibition de l'activité métabolique

#### - l'HE *M.piperita*

Par comparaison avec le traitement ATB/ATF, une diminution très hautement significative ( $P < 0.001$ ) de la moyenne d'inhibition par l'HE suivant le test MTT a été noté pour toutes les souches bactériennes et fongiques testées.

#### - l'HE *C.aurantium*

Par comparaison avec le traitement ATB/ATF, une augmentation très hautement significative ( $P < 0.001$ ) de la moyenne d'inhibition par l'HE suivant le test MTT a été noté pour toutes les souches bactériennes et fongiques testées.

## 4. Discussion

### 4.1. Effet sur la croissance microbienne

En 1881, Delacroix a mis en évidence pour la première fois l'activité antibactérienne des HEs. Depuis ce temps, il a été démontré que les spectres d'action des HEs sont très larges puisqu'ils agissent aussi bien sur les Gram positifs que sur les Gram négatifs. Cette activité est par ailleurs variable d'une HE à une autre, et d'une souche bactérienne à une autre (**Guinoiseau et al., 2011**).

D'une manière globale les HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* sont capables d'inhiber la croissance de différentes espèces microbiennes (bactérie à Gram positive ou à Gram négative, et levures).

Les différences observées pour les valeurs des diamètres des zones d'inhibition que nous avons obtenus, ainsi que dans les manifestations de résistances peuvent s'expliquer par la différence dans les pourcentages de composés antibactériens dans chaque HE que nous avons testé. Ces observations sont corroborées par les précédents travaux. En effet, **Lawrence,(1993 )** et **Merghni et al.,(2015)** montraient que la variabilité du pouvoir bactéricide des HEs serait due à la sensibilité des microorganismes aux différents composés chimiques qui dépendent de la nature de l'espèce végétale, des chémotypes et des conditions climatiques.

Selon **Benabderrahmane et al.,(2009)** cette différence n'est pas due, seulement, à la variation dans la composition chimique des HEs, elle est aussi due aux limites techniques du test utilisé pour déterminer l'activité.

Les HEs sont souvent utilisées dans l'industrie alimentaire comme arôme dans l'industrie cosmétique comme parfums, et en industrie pharmaceutique pour leurs propriétés fonctionnelles (principes actifs). Les propriétés antimicrobiennes des HEs sont conférées par des monoterpènes, des diterpènes et des hydrocarbures avec divers groupes fonctionnels (**Guinoiseau et al., 2011**).

Ces activités antimicrobiennes révélées sont principalement expliquées par la présence de composés terpéniques C10 et C15, et les phénylpropanoïdes qui sont capables de former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes cibles, bien que d'autres terpènes actifs, ainsi que les alcools et les aldéhydes, et des esters peuvent contribuer à l'effet global antimicrobien des HEs (**Rabehaja,2013**).Plusieurs travaux montrent qu'il existe une relation entre les structures chimiques majoritaires

dans les extraits testés des HEs et leur activité antimicrobienne (**Sonboli et al.,2005** ; **Rabehaja,2014**) Utilisant des molécules de synthèse, les travaux de (**Sonboli et al.,2005**), suggéraient que l'activité antimicrobienne serait associée à certains composés majoritaires tels que  $\alpha$ -Pinène,  $\beta$ -Pinène, Germacén D, etc, déterminés dans nos HEs.

En revanche, plusieurs travaux **Lis-Balchin & Deans,(1997)** ; **Lachowicz et al.,(1998)** ; **Belaïche et al.,(1995)** ; **Cosentino et al.,(1999)** montrent que l'effet inhibiteur de certaines HEs de plantes aromatiques, sur les bactéries Gram positive, serait dû non pas à des constituants majoritaires mais à la présence de certains composés mineurs.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *M.piperita*, arbore les effets antimicrobiens de l'huile essentielle Tableau (13).En fait, une activité antimicrobienne contre les souches testées a été observée par des zones d'inhibition variant de 11 à 60 mm contre les souches bactériennes excepté pour *S.aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* ATCC 29213 qui ont présenté une nette résistance pour cette huile essentielle.

Dans l'étude de **Bassolé et al.,(2010)** l'HE de *M.piperita* affiche des diamètres d'inhibition de  $10,8\pm 1,1$ mm pour *E.coli* CIP 105182 jusqu'à  $27\pm 1,3$  mm pour *S.aureus* ATCC 9144, et affiche une résistance de la bactérie *P.aeruginosa*.

Nos travaux montrent une inhibition complète de croissance des espèces fongiques (*C. albicans*) ce qui concorde parfaitement avec les résultats de (**Tyagi et al.,2011**).

Selon les résultats l'huile essentielle de *M.piperita* expérimentée lors de cette présente étude est dotée d'une activité antimicrobienne nettement plus importante que celle observée avec les d'autres HEs de *M.piperita* à travers la littérature (**Loolaie et al., 2017**); avec un diamètre de zones d'inhibition allant de 11.58 mm à 17.24 mm .D'autres études réalisées avec différents extraits de *M.piperita* ont obtenu des diamètres d'inhibition allant jusqu'à +12mm(**Barchan et al., 2015**).

De plus, l'HE de la *M.piperita* affiche des degrés variables d'activité contre les souches pathogènes avec des valeurs de CMI allant de 0,25 à 8  $\mu$ l / mL (Tableau13). Ces résultats confirment la qualité significative de l'activité antimicrobienne, comparativement aux résultats de **Tyagi et al.,(2010)** , et **Bassolé,(2010)**.

Selon **Traoré et al., (2012)**, lorsque le rapport **CMB/CMI** d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre ( $\leq 4$ ) cette dernière est qualifiée de substance bactéricide cependant si ce rapport est supérieur à quatre ( $> 4$ ), alors elle est dite bactériostatique. Il permet de définir également la **tolérance** d'une souche bactérienne à un antibiotique bactéricide (**CMB/CMI  $\geq 32$** ). (**Cattoir,2006**).

Le caractère bactéricide de l'HE de *M.piperita* a été retrouvé dans cette présente étude pour 11 souches bactériennes et pour les souches de *Candida*. Nos résultats concordent avec ceux rapportés dans la littérature **Tyagi et al.,(2010)** ; **Catherine et al., (2012)** ; et **Yadegarinia,(2006)** montrant que cette HE exerce un effet plus bactéricide et/ou fongicide que bacteriostatique/fongistatique.

Cette huile renferme du 1,8-cinéole (7,89%) qui était reconnu pour conférer un effet microbicide sur *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* **Yadegarinia et al., (2006)**.

L'activité antimicrobienne exhibée par l'HE de *C.aurantium* s'avère être très intéressante avec une inhibition totale des deux souches de *C.albicans*, et des zones d'inhibition allant de  $6 \pm 0,4$ mm avec la souche *K. oxytica* jusqu'à  $61 \pm 0,2$  mm avec *C.koseri*. Tableau (13) Des résultats similaires ont également été rapportés par d'autres auteurs (**Benhsouna et al.,2013** ; **Bendaha et al.,2016** ; **Djenane et al., 2015** ; **Azhdarzadeh et al.,2015**).

Cette HE semble agir sur les Gram positif et Gram négatif sans aucune distinction, comme il a été mentionné dans l'étude de **Karamann et al.,(2003)**.

Cependant les souches de l'espèce *P.aeruginosa*, *K.pneumonia E47*, et *E.coli* ATCC 25922, ont montré une résistance à l'action de cette HE.Nos résultat ne supportent pas ceux rapportés par **Hadj Amar et al.,(2012)** montrant que HE *C.aurantium* avait un effet antimicrobien sur toutes ces souches avec des diamètres d'inhibition allant de 11mm à 19 mm pour les mêmes espèces bactériennes que nous avons testé.

Par ailleurs les résultats obtenus montrent que *S.aureus* ATCC 25923 ont révélé une résistance aux effets de l'HE de *C.aurantium* au même titre que *M.piperita*.

Les CMI retenues pour cette HE allaient de 0,25 $\mu$ l/ml jusqu'à 8  $\mu$ l/ml. Ils sont similaires à celles obtenues par **Azhdarzadehet al., (2015)**.

L'activité antimicrobienne de l'HE de *C.aurantium* pourrait être due à leurs principaux composés dont l'acétate de linalyle (55.56%) et le linalool (10.89 %) avec leur fonction alcool, connues pour leur l'activité antimicrobienne (**Hadj Amar et al.,(2012)**).

Cependant, , nous ne devons pas négliger les composants mineurs tel que l'Alpha terpinol présent dans notre étude avec 1,19% avec son action sur *E.coli* , *S.epidermis*, et *C.albicans* ( **Raman et al., 1995**), et Beta caryophyllene (1,21%) pour ces propriétés antibactériennes (**Magiatis et al.,2002**).

Une étude menée par **Ait-Ouazzou et al., (2011)** voulant évaluer l'activité antimicrobienne d'huiles essentielles dont une composée de trois monoterpènes hydrocarbonés :  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene et p-cymene ; et l'autre composée de cinq monoterpènes oxygénés :carvacrol, linalool, terpineol-4-ol,  $\alpha$ -terpinylacetateet 1,8-cineole) a montré que les monoterpènesoxygénés comme le carvacrol et terpineol-4-ol présentent une grande activité inhibitricecontre *S.typhimurium* et *E.coli*.

Cependant, **Bounatirou et al.,(2007)** ont, également, suggéré que des composants mineurs interagissent avec les composants majoritaires ; ce qui affecte les activités antimicrobiennes des huiles. Il est possible que l'activité des principaux composants soit régulée par les autres molécules mineures.

En outre, le spectre d'action du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles s'avère très étendu dans la mesure où il reflète, en quelque sorte, la diversité de leurs composés chimiques (**Sonboli et al., 2005; Carson et al., 2006**).

De plus, on ne peut écarter une possible action synergétique ou antagoniste de certains

composés monoterpéniques cités par plusieurs auteurs (**Didry et al., 1994; Belaïche et al.,**

**1995; Ultee et al., 2002; Koutsoudaki et al., 2005**).

## **2.2.Effet des vapeurs des HEs**

De nombreuses études ont été réalisées concernant l'activité antimicrobienne des HEs par la méthode de contact direct (aromatogramme).Des informations sur l'activité volatiles restent rares.

Les composés volatiles des HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* semblent avoir un effet antimicrobien fort intéressant. Tableau (14).

Au cours de notre travail, nous avons mis en évidence la capacité de la fraction volatile de nos HEs à exhiber une activité antimicrobienne (Figures en annexes 9 et 10).

Des zones d'inhibition résultant de l'exposition aux vapeurs des HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* dans la méthode de micro atmosphère était significative comparativement à la méthode de contact direct en phase liquide. Cela indique que des principes actifs existent dans les vapeurs des HEs qui sont responsables d'effet antibactérien.

**Pibiri, (2006)** a également démontré que les huiles essentielles de *Satureja Montana*, *Thymus*, *Origanum vulgare* et écorce de cannelle en phase gazeuse ont un effet létal sur *S.aureus* et *P. aeruginosa*, même à petites doses.

**Tyagi et al.,(2010)** démontré que l'HE *M.piperita* affiche une meilleure activité antimicrobienne à l'état de vapeur qu'à l'état liquide suggérant un changement de composition chimique entre la phase liquide et la phase vapeur de cette HE.

L'effet des vapeurs d'HE de *C.aurantium* sur les moisissures du pain a été démontré par **Sunil et al.,(2018)**. L'effet antifongique de cette vapeur d'HE de *C.aurantium* a été rapporté par **Delespaul et al., (2011)**.

Selon **Inouye et al., (2001)**, l'activité et la stabilité de l'huile essentielle sont variables ; que ce soit à l'état de vapeur ou bien en solution. Ainsi, certains composés d'huiles essentielles sont instables à l'état de vapeur, mais stables en milieu aqueux.

### **2.3. L'inhibition de la formation de biofilm**

Les micro-organismes forment des biofilms comme moyen de défense, et également pour faciliter les processus physiologiques. L'organisation en couches du biofilm protège les microorganismes des changements de pH et d'autres antimicrobiens. En outre, la formation de biofilm est renforcée par la co-agrégation, qui est l'adhésion de deux ou plusieurs espèces de micro-organismes. Le biofilm peut être jusqu'à 1000 fois plus résistant aux antimicrobiens que les cellules planctoniques de la même espèce. (**Tremblay et al.,2014**).

Afin de chercher des stratégies alternatives pour contrôler les biofilms, et au vu des précédents résultats et en raison de la résistance qu'ont affichée les traitements, nous avons jugé important d'évaluer l'effet antibiofilm des HE de *M.piperita* et *C.aurantium*.

Cette évaluation s'est faite selon deux méthodes : Le test de cristal violet ou les HES dévoilent différents effets sur le développement de biofilms avec des valeurs de réduction exprimées en pourcentage allant de 40,30 % à 92,85% .Ces résultats sont confirmés par la réduction du MTT ou l'HE de *M.piperita* affiche une activité importante avec des pourcentages d'éradication allant jusqu'à 98,07% figure (33,34,35,36,37,38,39,40 ).

Les résultats des 2 méthodes montrent une forte activité antibiofilm de l'HE de *M.piperita*, et *C.aurantium*, ce qui laisse suggérer, que les HES testées, pénètrent efficacement dans les biofilms microbiens.

Ces résultats sont en corrélation avec certaines études antérieures (**Husain et al.,2015**) qui révèlent que *M. piperita* perturbe fortement le quorum sensing au sein des biofilms, établi entre différentes bactéries pathogènes, notamment les *P.aeruginosa*. Cette révélation primordiale, ne peut qu'être raisonnablement exploitée dans l'industrie pharmaceutique.

Dans ce contexte, **Saharkhiz et al.,(2012)** montraient que cette huile essentielle contribue fortement à la réduction de biofilm fongique, et en occurrence sur *C.albicans*.

De la même manière, des résultats intéressants ont été observés avec l'application de l'HE de *C.aurantium* afin d'inhiber la formation de biofilms. Les effets d'HE de *C.aurantium* montre des taux d'inhibition allant de 19,85% pour *E.sakazaki* , 92,14% pour *S.hominis*, et jusqu'à 89,90% pour *C.albicans*.

Compte tenu de la réduction des biofilms, l'HE *C.aurantium* affiche une activité importante.

Ces données sont confirmées par le teste MTT montrant que l'HE de *C.aurantium* inhibe fortement la formation de biofilms de avec des pourcentages d'éradication allant de 45,01% avec la souche *E.sakazaki* à *S.hominis* avec 91,77% et jusqu'à 92,01% avec *C.albicans*.

Des résultats comparables ont été rapportés par **Castillo et al., (2014)** biofilm de *Campylobacter jejuni* par l'HE de *C.aurantium*. Il est intéressant de noter que l'étude de **Oliveira et al., (2013)** rapporte une inhibition de 100% du biofilm avec *E.coli* et *C.albicans* en utilisant l'HE de *C.aurantium*.

En comparant les résultats obtenus avec les HEs avec ceux obtenus avec le traitement (antibiotique /antifongique), les figures figure (25,26,27,28,29,30,31,32 ) démontrent clairement que les HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* ont une action inhibitrice sur les biofilms supérieure à celui des traitements (antibiotique ou antifongique seul).

## ***Chapitre 4: Les effets de l'huile essentielle de Mentha piperita sur C. albicans : Croissance, transition, formation de Biofilm, et l'expression des gènes***

Les champignons *Candida* sont des pathogènes fongiques opportunistes communs chez l'Homme. Des espèces comme : *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis* sont maintenant en train de devenir des agents infectieux importants dans les infections des muqueuses et systémiques (**Andes et al., 2016 ; Barbedo et al., 2015, Hirota et al., 2017**).

*C. albicans* étant l'espèce de levure la plus communément isolée dans la cavité buccale (**Samaranayake et MacFarlane, 1990**). Elle est l'agent pathogène le plus répandu dans les infections fongiques (**Hirota et al., 2017**) pour les individus ayant un système immunitaire faible/affaibli (**Klein et al., 1984**).

Ainsi, alors que le taux moyen de patients porteurs de *C. albicans* est de 38.1% chez les patients externes des habitations communautaires (**Odds, 1988**), un taux de 78% a été rapporté chez des patients âgés hospitalisés (**Cumming et al., 1990**) et même des taux plus élevés chez les patients infectés par le VIH (**Hauman et al., 1993**).

De plus, des études cliniques ont révélé que les symptômes de la candidose oropharyngée sont souvent une conséquence de la thérapie aux corticoïdes (**Knight et Fletcher, 1971**), de l'immunosuppression survenant après la transplantation (**Clift, 1984**).

La candidose est traitée avec des agents antifongiques tels que les polyènes, la fluocytosine et les azolés (**Bustamante, 2005**).

Actuellement, les antifongiques disponibles sont limités en nombre et en efficacité. De plus, les cibles spécifiques qui permettraient de discriminer les cellules fongiques eucaryotes des cellules de mammifères sont peu nombreuses. L'utilisation clinique de ces antifongiques est aussi entravée par les effets secondaires indésirables souvent associés à leur utilisation et par l'émergence d'une résistance aux antifongiques (**Pfaller et al., 2005**).

La résistance aux drogues antifongiques est devenue rapidement une préoccupation majeure à la vue du nombre croissant des individus immuno compromis et de l'augmentation dramatique de l'incidence des infections fongiques opportunistes.

L'accroissement de la résistance a donc suscité un grand intérêt pour le développement de nouvelles drogues antifongiques.

Au cours de l'initiation de la candidose systémique, les organismes à diffusion hématogène envahissent la paroi cellulaire endothéliale du système vasculaire pour infecter les tissus les plus profonds (**Grubb et al., 2008**). L'invasion fongique des cellules épithéliales orales superficielles est une caractéristique de la candidose oropharyngée (**Solis et al., 2017**). L'invasion des cellules hôtes et les dommages sont probablement des attributs de virulence critiques de *C. albicans* (**Rast et al., 2016**).

Le dimorphisme est la capacité de *C. albicans* à changer de morphologie selon son état physiologique ou son environnement. Deux formes principales peuvent être observées, la forme « levure » et la forme « mycélium ». Il s'agit d'une modification phénotypique réversible qui est considérée comme un facteur de virulence (**Soll,1997**). Le dimorphisme permet à la levure de s'adapter rapidement aux modifications environnementales (**Matthews et Burnie, 1992**) et de répondre aux pressions auxquelles elle fait face tout en échappant au système immunitaire.

Différentes conditions environnementales peuvent induire le changement de forme de *C. albicans*, telle la présence de sérum, d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), de GlcNAc ou de proline. L'augmentation du pH du milieu (de pH 4,5 à pH 7,0) peut également conduire à la transition de la forme levure vers la forme mycélienne(**Odds, 1988**). Ces modifications faciliteraient la pénétration des tissus par *C. albicans* (**Odds, 1994**).

Bien que ce lien soit controversé, l'association entre la virulence et le dimorphisme se retrouve chez plusieurs champignons pathogènes (**Smith et al.,2003**).

Les facteurs de virulence de *C. albicans* paraissant jouent un rôle-clé dans la pathogénèse de ce champignon opportuniste dont les Saps (secreted aspartyl proteinase). Ces protéinases sont codées par 10 gènes SAPs différents (**Naglik et al., 2003**).

Bien que les conséquences de la sécrétion de protéinase lors d'infections humaines ne soient pas connues avec précision, des études *in vitro*, animales et humaines, ont impliqué les protéinases dans la virulence de *C. albicans* de l'une des sept manières suivantes: (i) corrélation entre la production de SAP *in vitro* et *Candida* virulence, (ii) dégradation des protéines humaines et analyse structurale pour déterminer la spécificité du substrat de Sap, (iii) association de la production de Sap avec d'autres processus de virulence de *C. albicans*, (iv) production de protéines de Sap et réponses immunitaires de Sap aux infections chez l'homme et l'homme, (v) l'expression du gène SAP lors d'infections à *Candida*, (vi) la modulation de la virulence de *C. albicans* par des inhibiteurs d'aspartyl protéinase et (vii) l'utilisation de mutants perturbés par le SAP pour analyser la virulence de *C. albicans* **Felk et al.,2000 ;Naglik et al., 2003**).

L'expression différentielle des gènes SAPs a été observé dans de nombreuses conditions cliniques (**Hube et al.,1994 ; White et Agabian, 1995**) montrant que plusieurs gènes semblent être essentiels pour les infections des muqueuses (SAP1-SAP3) (**De Bernardis et al., 1999 ; Korting et al., 1999**) et les infections systémiques (SAP4-SAP6) (**Sanglard et al., 1997**).Ces gènes semblent également être impliqués dans l'adhésion de *C. albicans* (**Borg-vonZepelin et al., 1999**), les lésions tissulaires (**Ibrahim et al., 1995**) et l'échappement face à la réponse immunitaire de l'hôte (**Borg-von Zepelin et al., 1998**).

Les SAPs sont incriminés dans : la croissance (SAP2) de *C.albicans*, la transition phénotypique (SAP1et SAP1), la formation des hyphes (SAP4,SAP5, SAP6 et HWP1), et l'adhésion (SAP1à SAP6 ainsi que SAP9 et SAP10) (**Naglik et al.,2004**) d'*albicans*.

Le but de cette étude était d'évaluer *in vitro* les effets de l'HE *M.piperita* et de ses composés volatiles (vapeurs) sur la croissance et la transition de *C. albicans*.

Nous avons également étudié l'effet de cette HE sur la formation / dégradation du biofilm de *C. albicans* et l'expression de différents gènes impliqués dans sa pathogénèse.

## **1. Matériels**

La souche *C. albicans* utilisée dans notre étude est la souche ATCC SC5314.*C. albicans* a été mis en culture sur des boîtes d'agar dextrose Sabouraud (Oxoid®) à

30°C. Une colonie distincte de *C. albicans* a été inoculée dans 10 ml de bouillon Sabouraud (Oxoid®) additionné de glucose 0,1% et tamponné à pH 5,6. Les cultures ont été conduites pendant 18h à 24h à 30°C sous agitation.

## 2. Méthodes

### 2.1. Effet de l' HE de *M.piperita* sur la croissance de *C.albicans* en milieu liquide

Pour évaluer l'effet de diverses concentrations d'HE et de ses vapeurs sur la croissance de *C. albicans*, la levure a étéensemencée dans des tubes séparés ( $10^4$  *C. albicans* /tube) dans du milieu de culture Sabouraud additionné de l'HE *M.piperita* à diverses concentrations (0, 1, 3, 5 et 10 µl / ml).

Dans la première série d'expériences, l'HE a été ajouté directement à la suspension cellulaire de *C. albicans*. Dans la deuxième série d'expériences, et vu les résultats des tests de la micro atmosphère qui indiquent que cette HE pouvait potentiellement libérer des substances chimiques volatiles ayant des propriétés antimicrobiennes, nous avons étudié l'effet des vapeurs d'HE de *M.piperita* sur la croissance de *C. albicans*.

Pour le faire, *C. albicans* ( $10^4$ ) a été incubé en présence de 0, 1, 3, 5 et 10 µl / ml de HE de *M.piperita* est placé à une distance de 4 cm de la surface du milieu de culture. Dans ce second mode expérimental, seuls les produits chimiques volatiles (vapeurs) libérés par l' HE étaient en contact avec le *C. albicans*.

Une culture contenant des cellules non exposées à l'HE a été incluse comme contrôle négatif, tandis que les cellules exposées à l'Ampho-B 5 µg/ml ont été incluses comme témoin positif.

L'ensemble des séries est incubé à 37°C pendant 24h. Les changements de turbidité due à la croissance de *C.albicans* sont observés visuellement et en se référant à l'absorbance (densité optique, DO) à 550 nm en utilisant un lecteur de plaques (xMark microplate spectrophotometer, Biorad, Mississauga, ON, Canada).

A partir des cultures obtenues à 24h , l'inhibition de la croissance en milieu liquide de la croissance de *C.albicans* a été évaluée au moyen de l'essai (bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium) (MTT) ce test a été utilisé auparavant pour mesurer la sensibilité de *C. albicans* aux agents antifongiques thérapeutiques (Irimes,2010). De plus, il a été démontré que la réduction du MTT était corrélée à la viabilité des *Candida* traités par un agent antifongique (Décenis,2009) .

Une solution mère de MTT (5 mg / ml) a été préparée dans du PBS et filtrée.

Après 24h de culture, les cellules ont été centrifugées pendant 10 min à 12000 rpm et leur culot a été repris dans du milieu frais additionné de 1% de MTT, puis incubé pendant 4h à 37°C, dans l'obscurité sous agitation lente.

Après une nouvelle centrifugation, le culot cellulaire a été repris dans 1 ml d'isopropanol-HCl 0.04N suivi par une incubation supplémentaire pendant 30 mn à 37°C. Suite à une troisième centrifugation, le surnageant de chaque échantillon a été prélevé et a été disposé dans une plaque 96puits à fond plat à raison de 4 puits de 200 µl pour chaque échantillon. Les changements colorimétriques ont été mesurés en se référant à l'absorbance (densité optique, DO) à 550 nm en utilisant un lecteur de plaques (xMark microplate spectrophotometer, Biorad, Mississauga, ON, Canada).

Les résultats présentés ici correspondent à la moyenne de quatre expériences indépendantes ± SEM (erreur standard à la moyenne).

## **2.2.Effet de l'HE *M.piperita* sur la formation de biofilm de *C. albicans***

Les biofilms de *C. albicans* ont été obtenus en cultivant la levure dans une matrice de collagène poreux qui faciliterait la pénétration de *C. albicans* à travers les pores et son adhésion à l'échafaudage grâce à l'affinité du collagène. L'utilisation de cette matrice favorise la formation et la manipulation du biofilm sans perte de cellules, contribuant ainsi au maintien de la structure du biofilm. A cette fin, des échantillons de 5 mm x 5 mm d'échafaudage poreux ont été placés dans une plaque à 24 puits. Des échafaudages stériles ont étéensemencés avec *C. albicans* ( $10^5$  cellules) et incubés pendant 30 minutes à 30 ° C sans agitation pour permettre l'adhérence.

Du milieu frais de Sabouraud a été ajouté à chaque puits en présence ou non de 10 ul / ml d'HE de *M.piperita* qui sont soit ajouté au milieu, soit placé à une distance de 4 cm libérant sa vapeur. Deux contrôles ont été inclus dans cette étude: le contrôle négatif représenté par *C. albicans*ensemencés sans HE, alors que le contrôle positif était *C. albicans*ensemencés avec Ampho-B (5 µg / ml). Les échafaudagesensemencés avec *C. albicans* ont ensuite été incubés pendant 3 jours à 30 ° C. Le milieu, l'HE et l'Ampho-B ont été rafraîchis toutes les 24 heures. À la fin du troisième jour d'incubation, la formation de biofilm de *C. albicans* a été évaluée par dosage MTT, comme décrit précédemment.

### **2.3.Effet de l'HE de *M.piperita* sur la dégradation des biofilms matures de *C. albicans***

Des biofilms matures de *C. albicans* ont été obtenus en cultivant *C. albicans* ( $10^5$ ) sur une matrice de collagène 3D poreux pendant 3 jours à 30 ° C dans du milieu liquide Sabouraud additionné de 0,1% de glucose à pH 5,6. Le milieu de culture a été rafraîchi tous les jours. A la fin du troisième jour, les biofilms ont été traités (ou non) avec 10 µl / ml de l'HE de *M.piperita* soit en contact avec le milieu, soit en contact avec la vapeur.

Les biofilms traités à l'Amph-B (5 µg / ml) représentaient le témoin positif. Les biofilms ont ensuite été incubés pendant 24 h et ensuite évalués par dosage MTT, comme décrit ci-dessus.

### **2.4. Détermination de l'effet l'HE de *M.piperita* de sur le bourgeonnement cellulaire de *C. albicans***

Afin de déterminer l'effet des HES de *M.piperita* sur la transition levure-hyphes : une culture correspondant à ( $10^5$  cellules) *C. albicans* ont été mise en suspension dans 2 ml de bouillon Sabouraud dextrose additionné de 0,1% de glucose et de 10% de sérum fœtal bovin (FBS).

la transition de *C. albicans* a été favorisée par l'ajout de FBS 10% dans le milieu de culture (Li et al., 2012).

Dans la première série d'expériences, L' HE a été ajouté directement à la culture à une concentration de 10 µl pour 2 ml de milieu de culture, tandis que dans le second test, la même concentration d'HE a été ajoutée à un filtre stérile absorbant à une distance de 4 cm de la surface du milieu de culture.

Deux incubations ont été menées à 3 et 6 h à 30°C, après quoi les cultures ont été observées au microscope optique et photographiées afin de calculer le pourcentage de changement morphologique de *C.albicans* et ce en comptant puis divisant les hyphes/blatospores.

Une culture sans HE est le contrôle utilisé pour évaluer le bourgeonnement et une culture avec l'Ampho-B (5 µg / ml) ont été incluses comme témoin positif.

Cinq sections de chaque culture ont été photographiées et numérisées pour chaque point d'observation. Le pourcentage de transition a été déterminé en comptant le

nombre de blastospores et d'hyphes présents dans chaque section, puis en appliquant la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre d'hyphes} \times 100}{\text{Nombre de blastospores} + \text{Nombre d'hyphes}}$$

(Nombre de blastospores + Nombre d'hyphes)

La moyenne du pourcentage de transition a été calculée pour chaque échantillon et chaque temps d'incubation. Les résultats présentés ici correspondent à la moyenne de trois expériences  $\pm$  SD.

## **2.5. La microscopie électronique à balayage**

Afin de visualiser l'effet de notre HE sur les biofilm de *C.albicans*, nous avons opté pour l'observation au microscope électronique. Pour cela : une suspension de ( $10^7$  cellules) de *C. albicans* a été cultivée dans du milieu liquide Sabouraud en présence de 10  $\mu$ l en contact direct ou a la vapeur des HE de *M.piperita*.

*C. albicans* cultivés en l'absence des HE constitue le contrôle négatif; tandis que la levure cultivée avec 5  $\mu$ g / ml d'Amph-B représentait le contrôle positif.

Après une culture de 24 h, une suspension de *C. albicans* a été fixé dans du glutéraldéhyde à 3% (v / v) dans du PBS (pH 7,4) et déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol (10%, v / v, augmentations jusqu'à 100%).

Une goutte a ensuite été placée sur une lamelle de verre ronde pour le séchage au point critique (CPD 030, Balzers, Liechtenstein, Allemagne). L'échantillon a été monté sur une plaque d'aluminium en utilisant de la peinture à l'argent (Agar Scientific, Stansted, UK). Un revêtement par pulvérisation cathodique a été réalisé (S150B, Edwards, Londres, Royaume-Uni) et l'image a été visualisée au microscope électronique à balayage, modèle Jeol JSM 6360 LV (Soquelec, Montréal, QC, Canada). L'expérience a été réalisée en trois exemplaires.

## **2.6. Effet de l'HE de *M.piperita* sur l'activation / la répression des gènes de *C. albicans***

Une culture de *C.albicans* de ( $5 \times 10^6$  cellules) a été menée en présence ou en l'absence de 10  $\mu$ l d'HE de *M.piperita* (contact direct ou vapeur) à 30 ° C pendant 6 h. Après cette période d'incubation, les cultures ont été centrifugées 10 min à 13 000 tr / min. Les surnageants ont été jetés et chaque culot a ensuite été mis en suspension

dans 0,6 ml de tampon de lyse (1 M de glycérol, 0,1 M d'EDTA). Des billes de verre (0,425-0,6 mm de diamètre, 0,2 ml) ont ensuite été ajoutées à chaque culot en suspension avant sonication (4 x 1 min, suivie de 2 min d'incubation dans de la glace) en utilisant un batteur MiniBead (Biospec Products, Bartlesville, OK , ETATS-UNIS). Suite à la lyse cellulaire, l'ARN total a été extrait de chaque échantillon au moyen du kit Illustra RNAspin Mini (GE Health Care UK Limited, Buckingham, Royaume-Uni). La concentration, la pureté et la qualité de l'ARN extrait ont été déterminées en utilisant le système Experion et le kit d'analyse de l'ARN StdSens selon les instructions du fabricant (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Des ARN appropriés ont été utilisés pour effectuer une RT-PCR quantitative

### **RT-PCR quantitative en temps réel**

L'ARN (500 ng de chaque échantillon) a été transcrit de manière inverse en ADNc au moyen du kit de synthèse d'ADNc iScript (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Les conditions pour la préparation des matrices d'ADNc pour l'analyse PCR étaient 5 min à 25 ° C, 1 h à 42 ° C et 5 min à 85 ° C. Une PCR quantitative (qPCR) a été réalisée. La quantité de transcrits d'ARNm a été mesurée avec le système de détection par PCR en temps réel Bio-Rad CFX96 et les réactions ont été effectuées en utilisant un supermix PCR (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad). Des amorces (Tableau 15) ont été ajoutées au mélange réactionnel à une concentration finale de 250 nM. Cinq microlitres de chaque échantillon d'ADNc ont été ajoutés à un mélange de PCR de 20 ul contenant 12,5 ul du supermix SYQ Green iQ, 0,5 ul de primersACT1 spécifique, Sap1, Sap2, Sap3, Sap9, Sap10 et HWP1 (Invitrogen Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) et 7 pi d'eau exempte de RNase / DNase (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Chaque réaction a été réalisée dans un thermocycleur Bio-Rad MyCycler. Pour le qPCR, le CT a été automatiquement déterminé par le gestionnaire Bio-Rad CFX qui l'accompagne. Les conditions de thermocyclage pour ACT1, Sap1, Sap2, Sap3, Sap9 et Sap10 ont été établies à 5 min à 95 ° C, suivies de 30 cycles de 15 s à 95 ° C, 30 s à 60 ° C et 30 s à 72 ° C, avec chaque réaction effectuée en triple. Pour HWP1, les conditions de thermocyclage étaient de 3 min à 95 ° C, suivies de 30 cycles de 10 s à 95 ° C, 30 s à 54 ° C et 40 s à 72 ° C, chaque réaction étant également effectuée en triple. La spécificité de chaque paire d'amorces a été déterminée par la présence d'un seul pic de température de fusion. ACT1 a produit des niveaux d'expression uniformes variant de moins de 0,5 CT entre les conditions de l'échantillon et est ainsi devenu le gène de référence pour cette étude. Les résultats

ont été analysés en utilisant la méthode d'expression relative 2-AACt (Livak et al., 2001).

**Tableau 15.** Description des paires d'amorces utilisées dans les réactions de PCR quantitative

Amorce	Séquence (5' vers 3')	Taille de l'amorce (pb)	Position	Taille de l'amplicon (pb)
<b>ACT1</b>	Sens GACAATTTCTCTTTCAGCACTAGTAGTGA			87
	Antisens GCTGGTAGAGACTTGACCAACCA			
<b>SAP 1</b>	Sens TTTCATCGCTCTTGCTATTGCTT	23	146-168	86
	Antisens TGACATCAAAGTCTAAAGTGACAAAACC	28	204-231	
<b>SAP 2</b>	Sens TCCTGATGTTAATGTTGATTGTCAAG	26	288-313	82
	Antisens TGGATCATATGTCCCCTTTTGTT	23	347-369	
<b>SAP 3</b>	Sens GGACCAGTAACATTTTTATGAGTTTTGAT			87
	Antisens TGCTACTCCAACAACCTTTCAACAAT			
<b>SAP 4</b>	Sens AGATATTGAGCCCACAGAAATCC	24	165-188	81
	Antisens CAATTTAACTGCAACAGGTCCTCTT	25	222-246	
<b>SAP 9</b>	Sens ATTTACTCCACAGTTTATATCACTGAAGGT	30	478-507	85
	Antisens CCACCAGAACCACCCTCAGTT	21	543-563	
<b>SAP 10</b>	Sens CCCGGTATCCAATAGAATCGAA			78
	Antisens TCAGTGAATGTGACGAATTGAAGA			
<b>HWP1</b>	Sens GCTCAACTTATTGCTATCGCTTATTACA			67
	Antisens GACCGTCTACCTGTGGGACAGT			

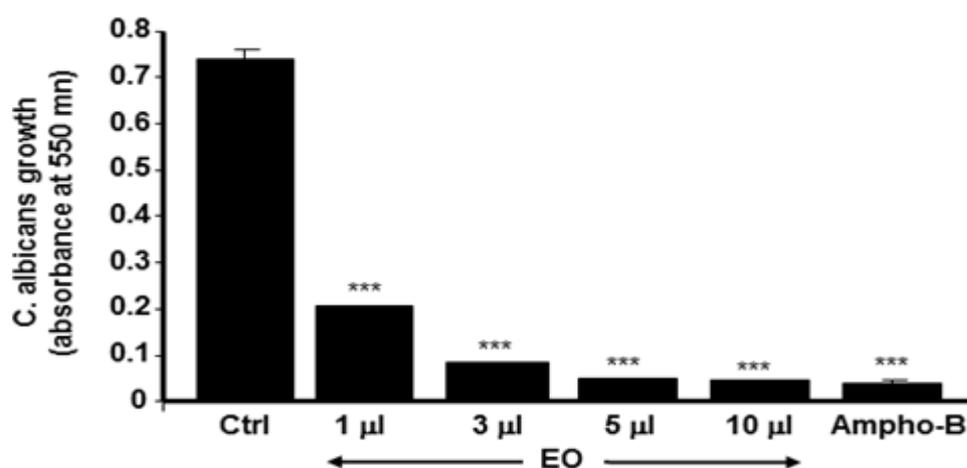
## 2.7. Analyses statistiques

Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois, avec des valeurs expérimentales exprimées en moyennes  $\pm$  écart-type. La signification statistique des différences entre les valeurs témoin (absence d'HE) et test (présence d'HE ou de sa vapeur) a été déterminée par ANOVA à un facteur. Les comparaisons postérieures ont été réalisées en utilisant la méthode de Tukey. Les hypothèses de normalité et de variance ont été vérifiées à l'aide du test de Shapiro-Wilk et du test de Brown et Forsythe, respectivement. Toutes les hypothèses ont été remplies. Les valeurs de P ont été déclarées significatives à  $\leq 0,05$ . Les données ont été analysées en utilisant le progiciel statistique SAS version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 3. Résultats

### 3.1. Effet de l'HE de *M.piperita* sur la croissance de *C.albicans* en milieu liquide

Afin de déterminer si l'HE *M.piperita* a un effet sur la viabilité cellulaire de *C.albicans*, les cultures de Candida ont été incubées pendant 24 h avec/sans cette HE. L'utilisation du test MTT permet de lier une DO élevée à la présence de cellules viables et métaboliquement actives. La viabilité cellulaire et le métabolisme de *C. albicans* sont affectés de manière très significative comme s'est révélé par la (Figure 41). L'addition de l'HE de *M.piperita* à la suspension de *C. albicans* réduit significativement la prolifération de la levure.



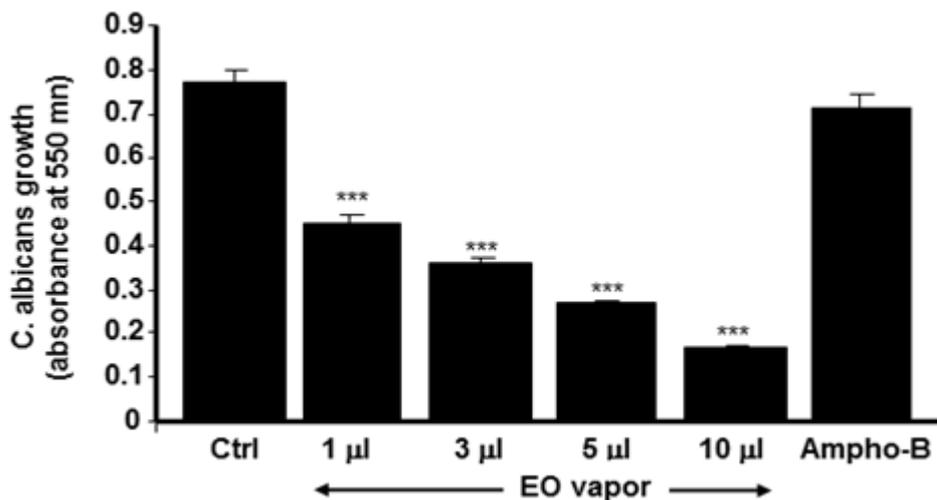
**Figure 41.** Effet des HE de *M.piperita* liquide sur la croissance de *C.albicans*.

Il est important de noter que même à une très faible concentration (1  $\mu$ l), l'HE est capable d'inhiber significativement ( $p \leq 0,01$ ) la croissance de *C. albicans*.

Avec une concentration de 10  $\mu$ l / ml d'HE, l'effet inhibiteur était comparable à celui de 5  $\mu$ g / ml d'Ampho-B.

### 3.2. Effet des vapeurs de l'HE de *M.piperita* sur la croissance de *C.albicans* en milieu liquide

Parce que l'HE *M.piperita* contient des composés volatiles qui peuvent affecter la croissance de *C.albicans*, ainsi la croissance a été également mesurée en exposant la levure à différentes concentrations de vapeur de l'HE.



**Figure 42.** Effet des vapeurs de l' HE de *M.piperita* sur la croissance de *C.albicans*

La (Figure 42) montre que la vapeur d'HE était également capable de diminuer la croissance de *C.albicans*. Il convient de noter que l'augmentation en concentration d'HE est proportionnelle à l'inhibition de la croissance de *C. albicans*.

Les données globales indiquent que l'HE *M.piperita* sous forme liquide ou sous forme de vapeur, est significativement inhibitrice de la croissance de *C.albicans*.

Au vu de ces résultats d'inhibition, la concentration de  $\mu$ l / ml a été retenue pour les tests antérieurs.

Bien que l'inhibition de la croissance produite avec la vapeur d'HE ait été inférieure à celle obtenue avec l'HE liquide, les effets de la vapeur sont néanmoins significatifs ( $p$

< 0,05), même à une faible concentration, l'HE *M. piperita* semble être en inhibant la croissance de *C. albicans*. Ces résultats suggèrent fortement que l'HE *M. piperita* est efficace contre la croissance fongique et peut être approprié dans les applications pour contrôler les infections à *C. albicans*. D'autres études sur l'effet synergique possible de l'amphotéricine-B et cette HE contre la croissance de *C. albicans* pourraient probablement fournir des indications sur la réduction possible de la quantité d'Ampho-B nécessaire pour contrôler la pathogénèse de cette levure.

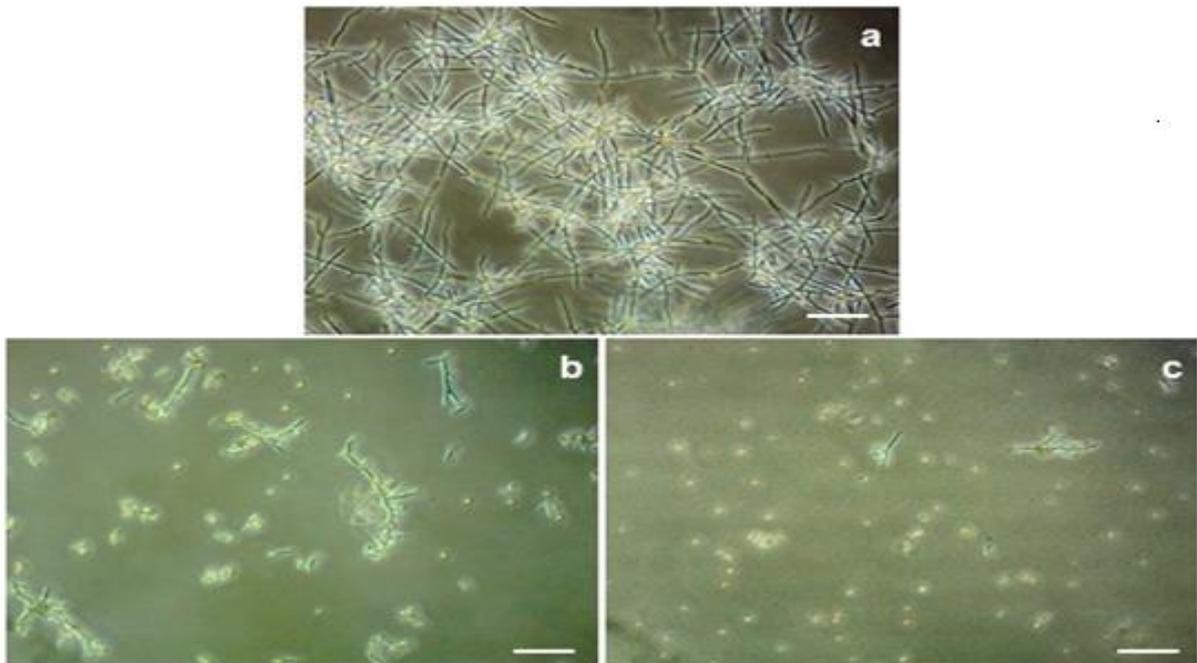
### **3.3. Effet de l'HE de *M.piperita* sur le bourgeonnement de *C.albicans***

Le sérum additionné aux cultures de *C. albicans* induit la transition de la forme levure de *C. albicans* vers la forme hyphes. Pour montrer l'activité de l'HE *M.piperita* sur la transition, l'HE a été ajouté aux cultures de *C. albicans*.

Après 3 h de culture, le bourgeonnement de *C. albicans* est déjà visible. Le bourgeonnement est plus évident en l'absence de l'HE. La différence observée pour le contact direct et l'effet de la vapeur n'est pas significative.

Après 6 h de culture, l'HE *M.piperita* bloque la transition (Figure 43) : l'inhibition semble presque totale, puisque seulement quelques hyphes sont présents.

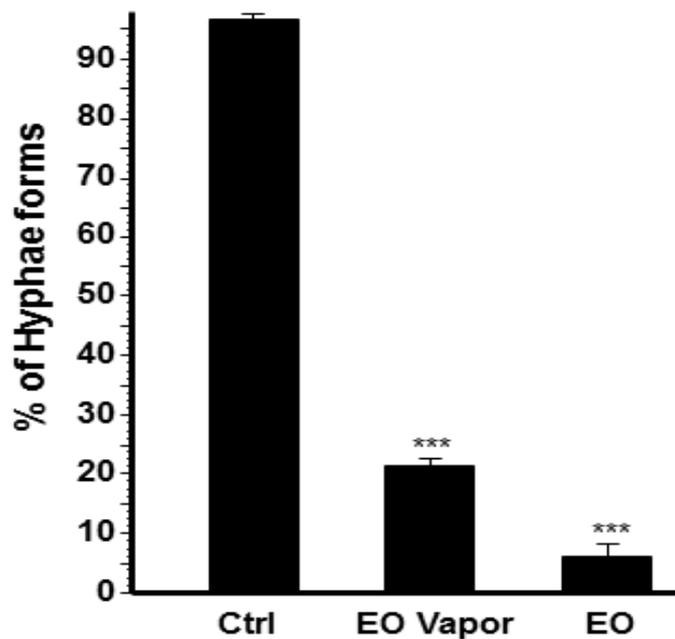
Afin de montrer précisément le blocage de la transition induit par l'HE *M.piperita*, nous avons compté le nombre d'hyphes et de levures présents dans la culture, pour chaque condition de culture. Le pourcentage de bourgeonnement est présenté dans la (Figure 44).



**Figure 43.** Observation microscopique de l'effet de l'HE *M.piperita* sur la transition de *C.albicans* après 6h.

*C. albicans* est mis en culture en milieu Sabouraud liquide additionné de FBS 10% afin de favoriser la croissance des hyphes. La culture a été incubée à 37°C, pendant 6 h. Les cellules ont été observées en microscopie inversée puis photographiées. La figure 43 illustre les quatre expériences indépendantes

Ce qui était visible en microscopie est ainsi confirmé. En effet l'HE *M.piperita* bloque efficacement le bourgeonnement .



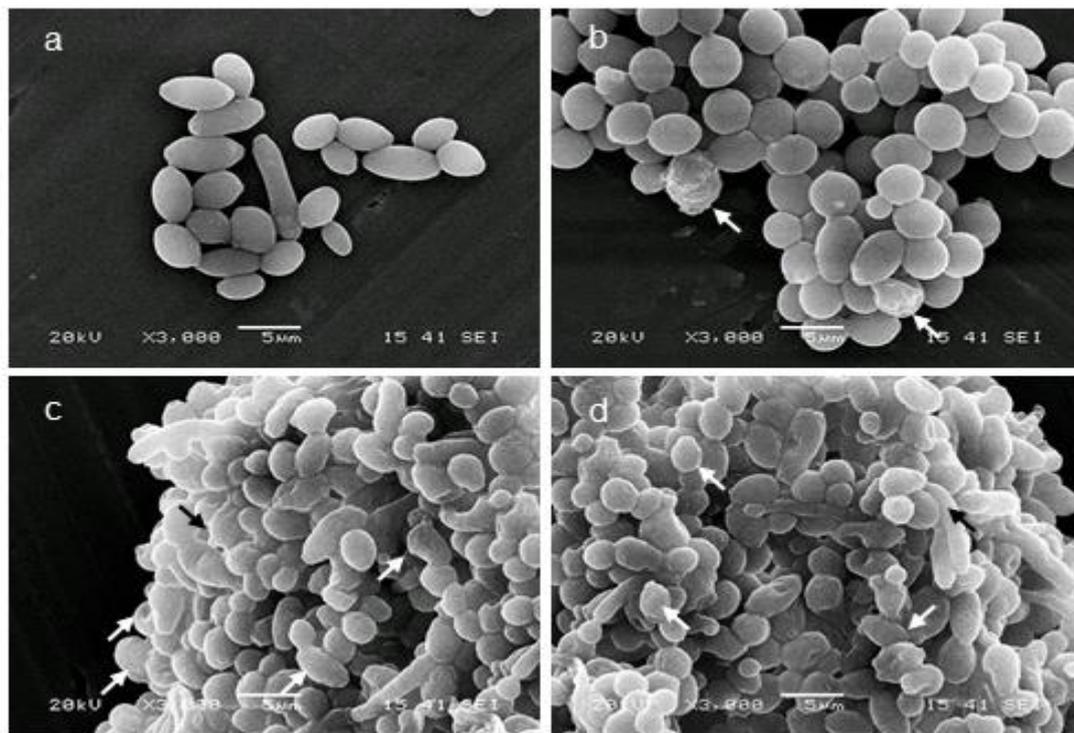
**Figure 44.** Effet de l'HE *M.piperita* sur la transition de *C.albicans*.

L'histogramme présenté ici correspond à la moyenne de quatre expériences du pourcentage d'hyphes dans la culture  $\pm$  SD. \* \* \*  $p < 0,001$  selon le test t de Student.

### 3.4. Effet de l'HE *M.piperita* sur la structure de *C. albicans*

L'analyse à la microscopie électronique à balayage MEB (Figure 45), la croissance aérobie des cellules de *C. albicans* a révélé des cellules de levure typiques présentant les cicatrices caractéristiques des bourgeons.

Aucun développement d'hyphes n'a été observé dans les différentes cultures en présence de l' HE ou avec Amph-B. Suite à l'ajout d'HE ou de sa vapeur, la morphologie externe des cellules n'apparaît pas aussi lisse que celle des cellules non traitées, ce qui indique une perte possible de volume cytosolique. En effet, l'HE et sa vapeur ont déformé la surface de la paroi cellulaire (figures 45 b et c, flèches). Ces caractéristiques cellulaires déformées étaient comparables à celles observées en présence d'Ampho-B (figure 45 d, flèches).

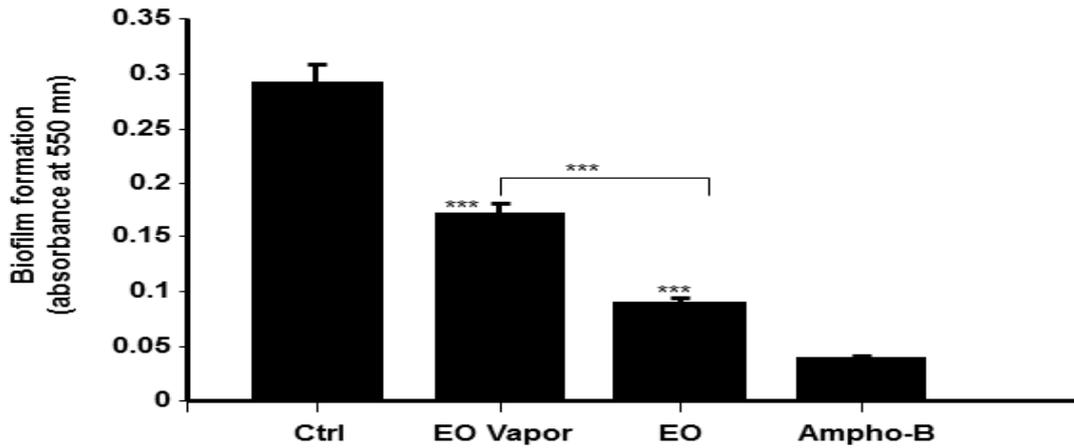


**Figure 45.** Observation au microscope électronique de l'effet de l'HE *M.piperita* sur *C.albicans*

### 3.5. L'Effet de l' HE de *M.piperita* et ses vapeurs sur la formation de biofilm

L'utilisation du test MTT, nous avons démontré que l'HE *M. piperita* inhibait la formation de biofilms de *C. albicans* (figure 46).

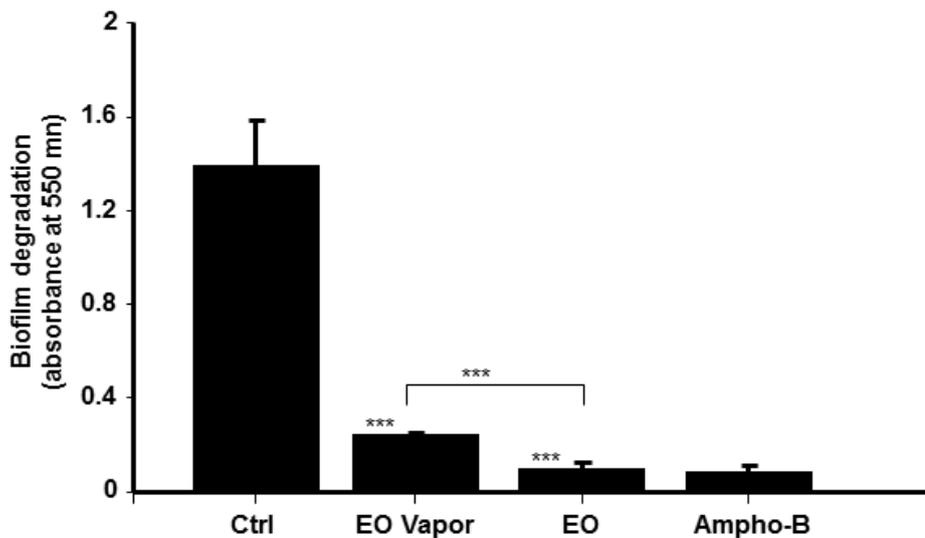
Les résultats montrent en effet qu'après 3 jours de culture, une forte densité cellulaire a été obtenue dans les biofilms non traités, alors que de faibles densités cellulaires ont été obtenues avec les cellules traitées par l'HE / vapeur, ainsi que dans les cultures traitées à l'Ampho-B. Il est intéressant de noter que l'effet de l'HE était similaire à celui de l'Ampho-B, confirmant ainsi l'efficacité de l'HE de *M.piperita* sur la formation du biofilm de *C. albicans*.



**Figure 46.** Effet de l' HE *M.piperita* et ses vapeurs sur la formation de biofilm

### 3.6. L'Effet de de l'HE *M.piperita* sur les biofilms matures de *C. albicans*

Après 3 jours de culture, des biofilms matures ont été générés, présentant des populations hautement denses de cellules de *Candida*, (Figure 47). La densité cellulaire était en effet significativement réduite en raison d'une perturbation des biofilms de *Candida* préformés suite au traitement par Ampho-B (5 µg / ml). De même, l'HE de *M.piperita* à 10 µl / ml et sa vapeur ont également contribué à la perturbation des biofilms matures. L'effet du contact de l'HE avec le milieu de culture était comparable à celui produit par Ampho-B .



**Figure 47.** L'Effet de de l'HE *M.piperita* sur les biofilms matures de *C. albicans*

### 3.7. L'effet de l'HE de *M.piperita* sur l'expression des gènes de *C. albicans*

Les (Figures 48 à 52) montrent que Sap1, 2, 3, 9 et 10 étaient significativement diminués lorsque l'HE était ajouté directement à la culture de *C. albicans*. En effet, l'expression inhibée de Sap1-3 était significative, comparée à celle observée chez le témoin. L'inhibition de Sap10 était également très élevée, tandis que celle de Sap9 était d'environ la moitié de celle observée chez le témoin. Nous avons ensuite analysé l'expression du gène Sap lorsque les cultures de *C. albicans* ont été exposées à la vapeur d'HE. Les figures 6, 7 et 8 montrent également que la vapeur d'HE de *M.piperita* inhibait significativement certains gènes Sap.

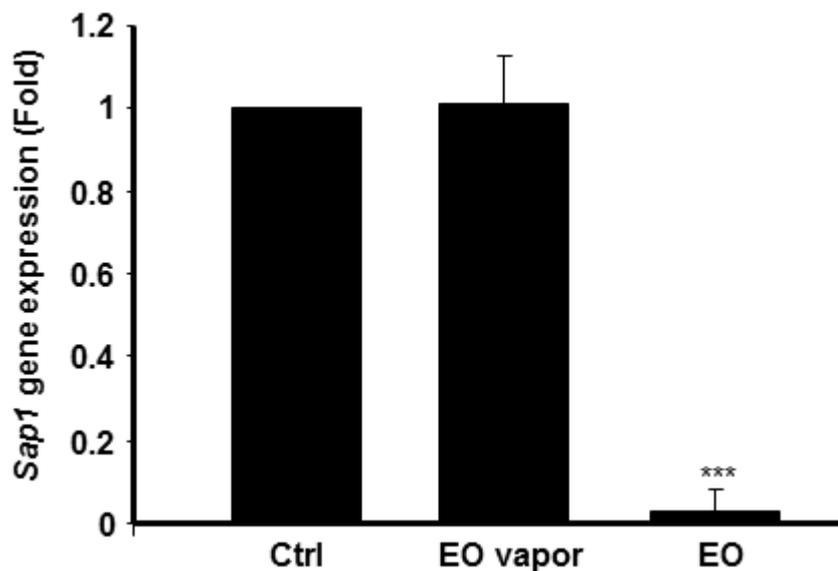
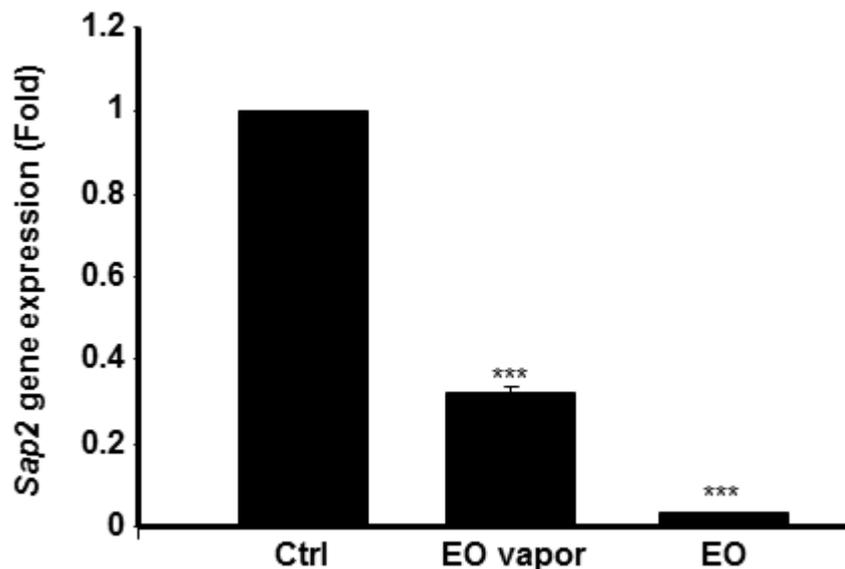
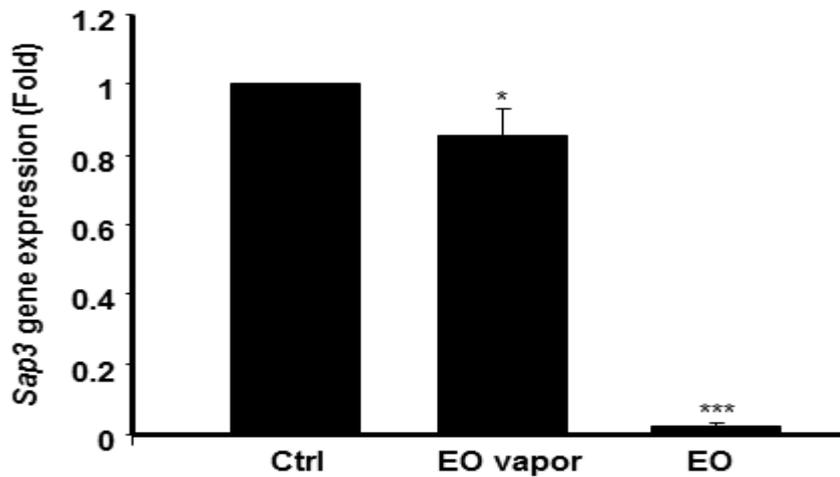


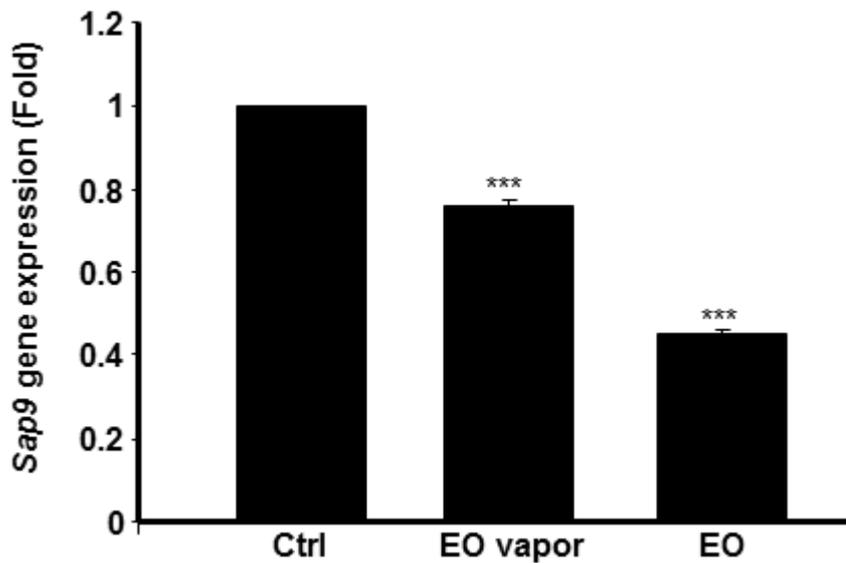
Figure 48. Effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 1 de *C. albicans*



**Figure 49.** Effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 2 de *C. albicans*

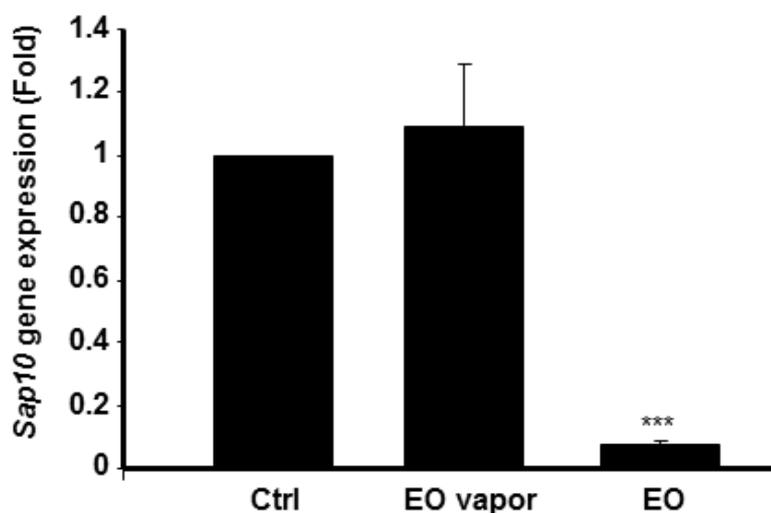


**Figure 50.** Effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 3 de *C. albicans*



**Figure 51.** Effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 9 de *C. albicans*

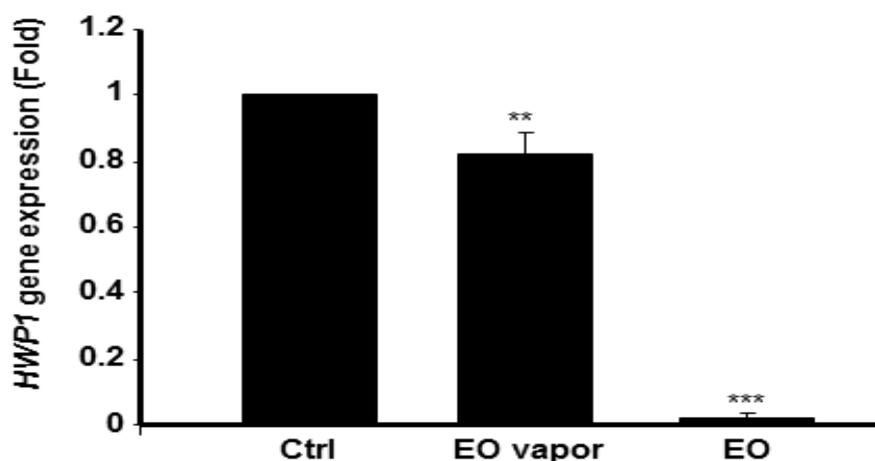
L'expression du gène Sap2 a été inhibée d'au moins 3 fois, comparée à celle observée chez le témoin, tandis que l'expression de Sap3 était légèrement mais significativement inhibée ( $p < 0,05$ ). L'expression du gène Sap9 a été inhibée de 20% par rapport à ce qui a été observé chez le témoin. Aucun effet n'a été observé sur l'expression de Sap1 et Sap10.



**Figure 52.** L'effet de l'HE sur l'expression des gènes Sap 10 de *C. albicans*

Les aspartyl proteinases sécrétées ne sont pas les seuls gènes impliqués dans la virulence de *C. albicans*. Le gène HWP-1 code pour la protéine de la paroi cellulaire hyphale, qui est une adhérence spécifique des hyphes essentielle à la formation et à la pathogenèse du *C. albicans* et son biofilm (Nobile et al., 2006). Nous avons donc étudié l'effet de cet HE sur l'expression du gène HWP-1.

Les résultats présentés dans la (Figure53) confirment que l'HE *M.piperita* inhibe significativement l'expression de HWP-1 et que cette inhibition est presque complète comparée à celle du témoin. La vapeur de l'HE inhibe également de façon significative l'expression du gène HWP-1, bien que cette inhibition ait été estimée à environ 20%, comparée à celle du témoin.



**Figure 53.** L'effet de l'HE sur l'expression des gènes HWP1 de *C. albicans*

#### 4. Discussion

Il a été démontré que l'HE *M.piperita* réduisait de façon significative la croissance de *C.albicans* et que cet effet réducteur était également obtenu avec la vapeur d'HE.

Bien que l'inhibition de la croissance produite avec la vapeur d'HE ait été inférieure à celle obtenue avec l'HE liquide ajoutée au milieu de culture, les effets de la vapeur sont néanmoins significatifs ( $p < 0,001$ ). L'HE et sa vapeur ont tous deux diminué la croissance de *C.albicans* d'une manière dépendante de la dose. Fait intéressant, l'effet de HE à 5 et 10  $\mu\text{l}$  ajouté au milieu de culture était comparable à celui observé avec Ampho-B à 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Ainsi, même à faible concentration l'HE *M.piperita* était efficace pour inhiber la croissance de *C. albicans*. Ces résultats appuient ceux d'autres études montrant que l'HE *M.piperita* présente une activité antimicrobienne contre différentes bactéries telles que *E.coli* et *S.aureus* (**Yadegarinia et al., 2006**), et qui sont cités dans la partie précédente.

L'effet des HES sur la croissance de *C. albicans* peut se produire par la cytolysse ou la rupture de la membrane cellulaire, entraînant la mort cellulaire (**Singh et al., 2016**). En effet, il a été démontré que la citronnelle, une plante essentielle de la famille des Cymbopogon, interférait avec l'homéostasie membranaire de *C. albicans* (qui est la cible principale des médicaments antifongiques connus) en augmentant l'hypersensibilité des champignons aux agents perturbateurs membranaires, en plus de réduire les niveaux d'ergostérol et la diminution de l'extrusion de  $\text{H}^+$  induite par le glucose (**Singh et al., 2016**).

(**Samber et al., 2015**) suggèrent que l'HE de *M.piperita* et ses composés principaux à savoir : le menthol, le menthone et le carvol exercent une activité antifongique en réduisant les niveaux d'ergostérol, en inhibant la PM-ATPase conduisant à la formation intracellulaire d'acide, et finalement la mort cellulaire de façon plus importante que celle observée avec les antifongiques classiques utilisés.

Aussi au cours des travaux de (**Boni et al., 2016**), l'HE de *Mentha sppa* été testé pour son activité anticandidosique ainsi que ses différents composés majoritaires : comme le Carvone, le Menthone, le Menthofuran, et le Pulegone, ses résultats indiquent un potentiel antifongique intéressant pour toutes ces molécules avec un effet plus important de la carvone et du pulegone. Les résultats obtenus avec le fluconazole

antifongique du commerce ne présentaient pas d'activité antifongique contre certaines espèces testées, y compris les isolats cliniques. Ces résultats corroborent avec ceux de **Ramesh et al., (2010)** démontrant que des isolements cliniques de souches de *Candida* spp. étaient résistants au fluconazole.

Ces résultats suggèrent fortement que l'HE *M. piperita* est efficace contre la croissance fongique et peut convenir à des applications de contrôle des infections par *C. albicans*. D'autres études portant sur un effet synergique possible de l'amphotéricine-B et cette HE contre la croissance de *C. albicans* comme celle de **(Samber et al.,2015)** pourraient être une ébauche a d'autres études afin de fournir des indications sur la réduction possible de la quantité d'Ampho-B nécessaire pour contrôler la pathogénèse de cette levure.

La pathogénèse de *C. albicans* peut se produire à travers la transition blastospore-hyphe **(Raines et al., 2013 ; Mayer et al.,2013 ;Jacobsen et al.,2012 )** ; nos résultats montrent en effet que l'HE, soit en contact direct avec le milieu, soit en tant que vapeur, inhibe significativement la transition de *C. albicans*.

Ces données sont les premières à montrer un effet significatif de l'HE sur la transition de *C. albicans*, donc sa pathogénèse. Cette étude est en accord avec d'autres études utilisant des peptides antimicrobiens d'origine naturelle : par exemple, les  $\beta$ -défensines **(Décanis et al., 2009)** ou la Dermaseptin -1 **(Belmadani et al.,2018)**, qui ont été montrés efficaces pour bloquer la transition morphologique de la levure *Candida* à la forme d'hyphe. Par conséquent, l'HE *M.piperita* peut, éventuellement, contribuer à contrôler l'infection à *C. albicans* en réduisant la croissance et la transition cellulaire.

La croissance de *C. albicans* et sa transition de la forme blastospore à la forme hyphale sont particulièrement importantes pour la formation de biofilm, et la virulence de la levure. En outre, une variété de mutants de *C. albicans* connus pour être incapables de former des hyphes montrent également des dommages lorsqu'elles sont organisées en biofilm **(Ramage et al., 2001; Banerjee et al., 2013)**. Comme cette HE était efficace pour réduire significativement la croissance et la transition de *C. albicans*, cela suggère que l'HE pourrait réguler à la baisse la formation de biofilm de *C. albicans*.

Les résultats obtenus confirment que l'HE *M.piperita* était en effet capable de réduire la formation de biofilm similaire à l'activité de l'amphotéricine B. Il est également intéressant de noter qu'une inhibition significative de la formation de biofilm de *C. albicans* a été obtenue avec une concentration d'HE aussi faible que 10 µl / ml. Ces résultats utiles sont comparables à ceux d'autres études montrant l'action positive des HE d'origine végétale dans le contrôle et la prévention de la formation de biofilms microbiens **Peixoto et al., (2017); Singh et al.,(2006)** , et particulièrement ceux de **Boni et al.,(2016)** pour l'HE de *Mentha.spp.*

Par conséquent, à la lumière de son impact significatif dans la réduction de la formation de biofilm de *C. albicans*, l'HE *M.piperita* peut présenter un potentiel pour plusieurs nouvelles applications dans des contextes cliniques ou alimentaires. D'autres investigations permettront d'élucider ce potentiel.

La formation de biofilm peut être contrôlée avec des molécules anti-biofilm avant son développement. Cependant, ce n'est pas le cas dans les applications cliniques, car les molécules antifongiques ne peuvent pas être utilisées systématiquement pour empêcher la formation de biofilm. Une molécule efficace devrait idéalement être capable d'empêcher la formation de biofilm, mais plus important encore, perturber les biofilms qui sont déjà formés. Nous avons donc étudié si l'HE *M.piperita* était capable de perturber le biofilm mature de *C. albicans*.

Les résultats obtenus ont révélé une perturbation significative de ces biofilms suite au contact avec l'HE, suggérant ainsi l'utilisation possible de cette HE comme antimicrobien pour réduire / éliminer les biofilms matures. D'autres études devraient confirmer ces observations et fournir de nouvelles connaissances sur la façon dont l'HE réduit ou perturbe les biofilms de *C. albicans*.

Une fois qu'il atteint la cellule, l'HE peut potentiellement agir sur la membrane cytoplasmique, ainsi que sur les cibles intracellulaires, comme cela a été montré avec d'autres molécules (**Beckloff et al., 2007, Patrzykat et al., 2002**) et avec l' HE d'autres plantes (**Peixoto et al., 2017**).

Les analyses des images de la microscopie électronique ont montré des changements dans les cellules en tant que présence de pores et de crêtes dans l'enveloppe de la cellule et extravasation de contenus cellulaires confirmant l'hypothèse que les

terpénoïdes sont connus pour déstabiliser les membranes cellulaires et augmenter la perméabilité cellulaire, ce qui permet la perturbation et la mort des microorganismes **(Zore et al., 2011)**.

L'effet de l'HE *M.piperita* contre *C. albicans* peut agir en modulant l'expression de certains gènes de *C. albicans* contrôlant sa croissance **(Bauerova et al., 2012)**, sa transition **(Cleary et al., 2012)** et la formation de biofilms **(Nobile et al., 2012)**. Nous rapportons ici que l'HE *M. piperita* était capable de diminuer l'expression des gènes de la famille des Sap.

Il est bien connu que la pathogenèse de *Candida* peut être établie en raison de sa croissance et de la morphogenèse de la levure à l'hyphe **(Naglik et al.,2003)**. Des gènes Sap spécifiques se sont révélés préférentiellement exprimés par des formes d'hyphes de *Candida* **(Staniszewska et al., 2016, Semlali et al ., 2014)**.

Le fait que l'HE a pu inhiber la croissance de *C. albicans* et la transition, cela peut être dû à une modulation de certaines gènes Sap. Nos résultats confirment que l'HE *M.piperita* était capable de diminuer l'expression de Sap1, 2, 3, 9 et 10 chez *C. albicans*, ce qui peut conduire à la réduction de la virulence de *C. albicans* **(Puri et al., 2012 ; Naglik et al.,2003)**.

Nous avons également démontré que l'HE était capable de diminuer l'expression de HWP1, un composant en aval de la voie PKA dépendante de l'AMPC qui est régulée par EFG1 **(Sharkey et al., 1999 ; Nobile et al.2006)**.

En effet, le niveau de transcription de HWP1 a diminué en présence d'HE ajouté au milieu sous forme liquide ou sous forme de vapeur. Ces résultats suggèrent que l'HE a le plus nettement influencé l'activité de la voie AMPC-EFG1 et conduit à une altération de la croissance et de la morphogenèse de *C. albicans* **(Nobile et al.,2006)**.

D'autres études sont donc nécessaires pour évaluer l'invasion / virulence de *C. albicans* traitée à l'HE. Notre étude établit ainsi, pour la première fois, un lien clair entre l'HE *M. piperita*, croissance / transition de *C. albicans* et les gènes de répression (Sap1, 2 ,3, 9, 10 et HWP1). Cela dit, les interactions précises entre HE et ces gènes au cours de la pathogenèse de *C. albicans* doivent être davantage explorées. Des études supplémentaires doivent donc se concentrer sur l'identification du rôle des gènes impliqués dans la pathogenèse de *Candida* ainsi que sur le rôle de l'HE

*M.piperita* dans le contrôle de la virulence / pathogénèse de *Candida* en conjonction avec les défenses de l'hôte.

En conclusion, notre étude démontre que l'HE *M.piperita* a un effet sur la croissance et la transition de *C. albicans*, entraînant une diminution de la formation de biofilm et une perturbation du biofilm mature.

Il est également intéressant de noter que ces effets peuvent se produire par la modulation de certains gènes de *C. albicans*.

Les résultats globaux confirment clairement le potentiel de l'HE *M. piperita* en tant que molécule antifongique.

## Conclusion

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent une ressource inestimable pour l'Homme. Leur importance dans le domaine de la santé publique s'est amplifiée au cours de ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent et à cause de la résistance fulminante qu'arborent les micro organismes pathogènes face aux différents traitements.

Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux ou alimentaires tels que les antimicrobiens, et les antioxydants.

L'objectif primordial de cette étude englobe dans ce même contexte : l'évaluation des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antibiofilm des huiles essentielles de *M.piperita* et *C.aurantium* de la région de la Chiffa , située au nord d'Algérie.

Le choix de ces plantes est basé sur quelques données ethno-pharmacologiques (traiter les maux d'estomac, la toux, le stress, anti-diarrhéique, désodorisant, cosmétiques et utilisations culinaires, etc.).(Sevindik et al.,2018)

Notre étude est composée de plusieurs parties. Dans la première partie nous avons analysé la composition chimique et les caractéristiques des huiles essentielles de *M.piperita* et *C.aurantium*

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antibiofilms.

A l'issue de notre étude, nous pouvons déduire que les HEs de *M.piperita* et *C.aurantium* en provenance de Chiffa , présenteraient vraisemblablement une potentielle source de composés bioactifs tels que le menthol, le menthone, le carane, 1,8-cinéole, qui peuvent être considérés comme des agents antimicrobiens.

Ces huiles ont une activité antioxydante modérée comparativement à l'acide ascorbique et le BHT, il existe toutefois, peu d'études à fournir des données sur huiles essentielles possédant des activités antibactériennes et antifongiques, avec de faibles capacités antioxydantes.

Etant donné les résultats remarquables obtenus avec *C.albicans*, une partie de cette étude était consacrée à l'effet de l'HE *M.piperita* et de ses composés volatiles (vapeurs) sur la croissance en milieu liquide par la mesure de l'activité métabolique, la transition de *C. albicans*, sachant que cette dernière est un indicateur de la pathogénicité

Nous avons étudié à ce titre, l'effet de cette HE sur la formation / dégradation du biofilm de *C. albicans* la transition, et l'expression de différents gènes impliqués dans sa pathogénèse. Nous avons pu démontrer que cette huile essentielle sous sa forme liquide ou vapeur possède un potentiel fort intéressant quand à son action sur l'inhibition de la croissance, la dégradation de biofilms matures, comme sur l'inhibition de la formation de biofilms, ainsi qu'un effet remarquable sur la transition cellulaire de *C.albicans*.

L'HE de *M.piperita*, serait responsable entre autre de perturbation des gènes responsable de la croissance, la transition, de l'adhésion et de la formation de biofilm chez *C.albicans*, ce qui fait l'originalité de cette investigation.

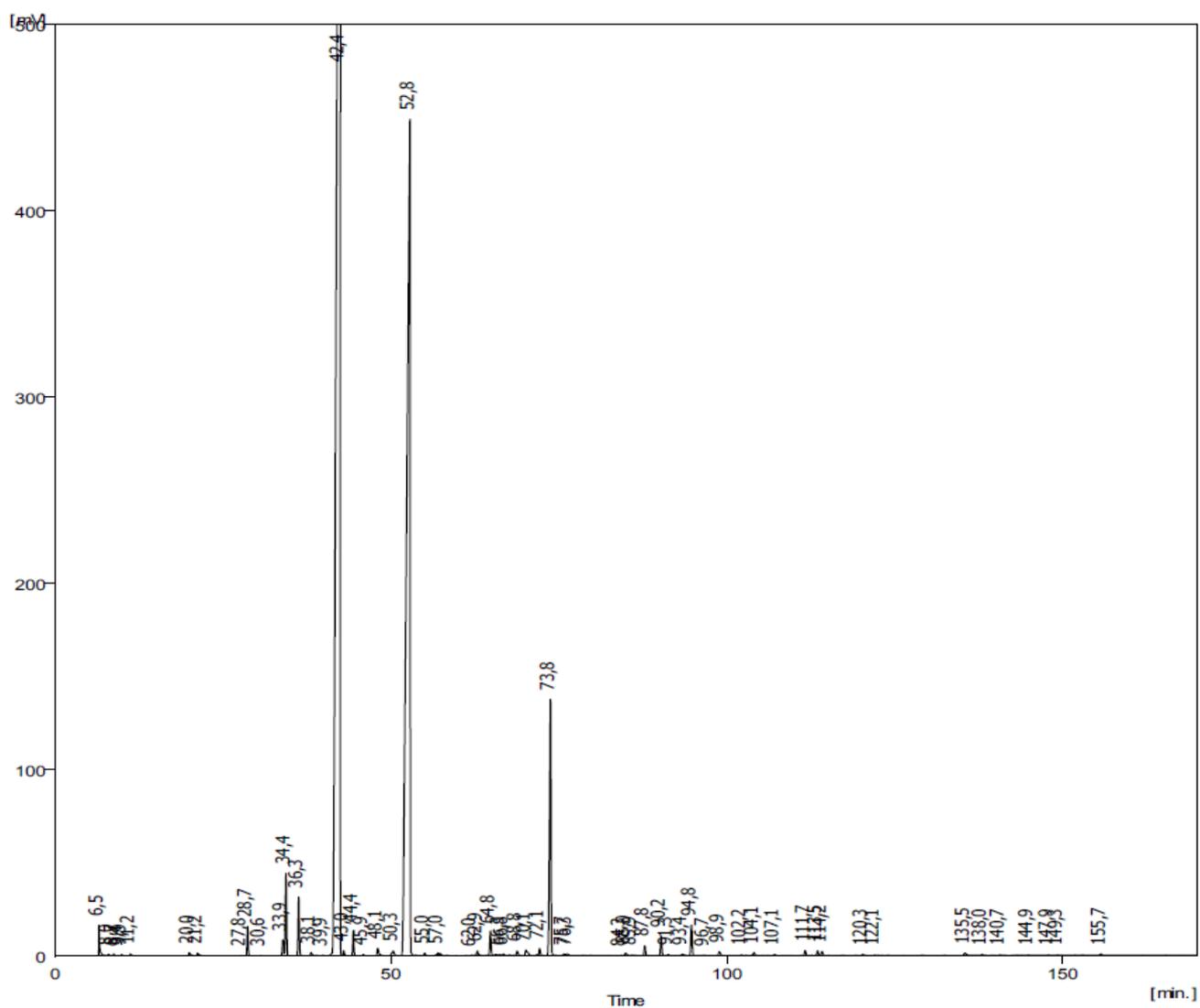
En conclusion, les HES de *M.piperita* et *C.aurantium* peuvent être qualifiées comme étant une excellente source naturelle à potentiel très diversifié et riche en molécules bioactives, ayant des effets antimicrobiens étendus ; ainsi qu'un effet considérable sur l'inhibition et l'éradication du biofilm. Ces HES pourraient contribuer grandement dans la limitation des infections microbiennes et nosocomiales.

**Annexe 1 : Tableau de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha x piperita***

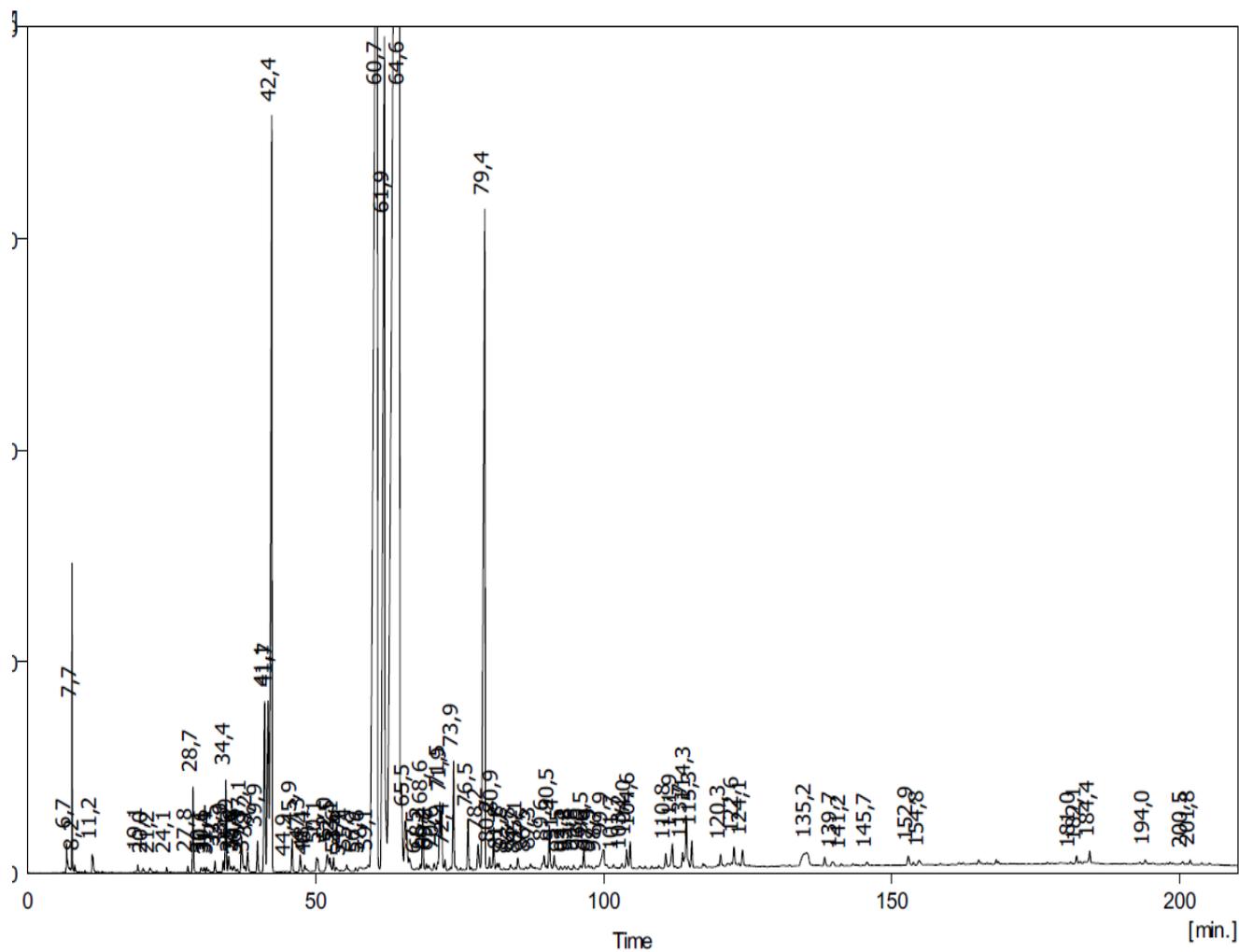
Pic	Composés	Tr ( min)	%
1	1- Butanol,3-methyl	2.50	0.15
2	$\alpha$ thujene	6.00	0.08
3	$\alpha$ pinene	6.27	0.91
4	$\beta$ pinene	7.77	1.54
5	$\beta$ myrcene	8.22	0.05
6	(+)-2- Caren	9.26	0.15
7	1,8 Cinéole	10.35	7.89
8	$\beta$ transOcimene	10.42	0.25
9	$\zeta$ Terpinene	11.28	0.33
10	Terpineol, Z- beta-	11.69	0.12
11	(+)- 4- Carene	12.69	0.14
12	Menthone	17.93	24.41
13	Isopulegone	18.05	1.02
14	Menthol	20.47	32.93
15	Pulegone	22.61	1.49
16	Isopiperitenone	23.47	1.23
17	Bicyclol(4.1.0)heptane,3,7,7-trimethyl	24.38	0.53
18	Carane	25.95	8.08
19	Menthol acetate	26.36	0.46
20	$\beta$ Bourbonene	30.45	0.71
21	$\beta$ Elemene	30.90	0.26
22	$\delta$ Elemene	31.87	0.13
23	$\beta$ Chlorophyllene	32.64	2.90
24	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	32.95	0.10
25	Germacrene D	33.78	0.06
26	4,7,10-Cycloundecatriene, 1,1,4,8-tetramethyl,cis,cis,cis	34.29	0.15
27	Bicyclol ( 4.4.0)dec-1-ene,2-isopropyl-5-methyl-9-methylene	35.02	0.06
28	Germacrene D	36.08	1.19
29	$\delta$ Elemene	36.91	0.41
30	$\delta$ Cadinene	38.40	0.17
31	Spathulenol	40.71	0.18
32	Caryophylleneoxide	40.86	0.27
33	$\tau$ Selinene	41.24	0.53

**Annexe 2 : Tableau de la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium***

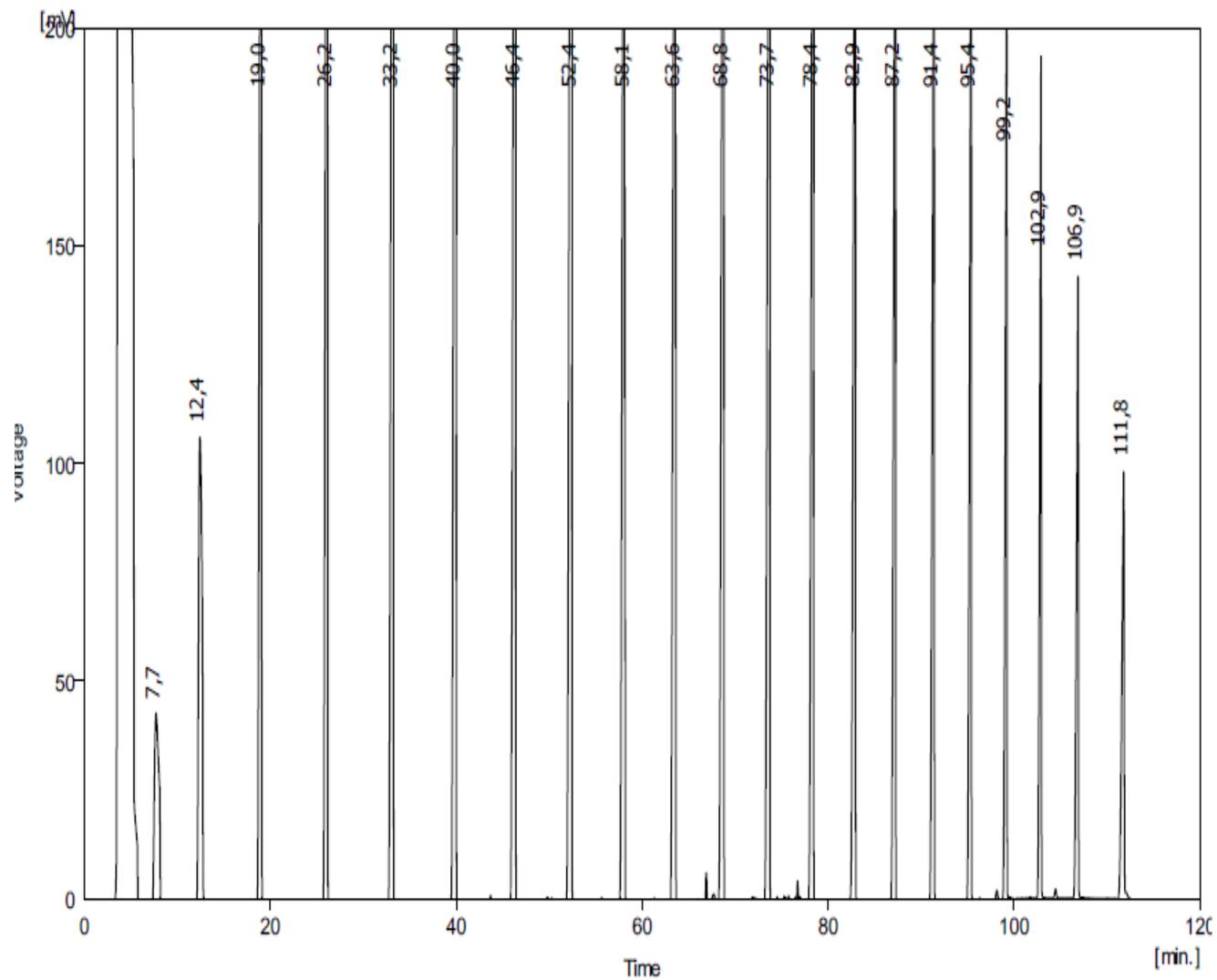
<b>Pic</b>	<b>Nom du composant</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Aire %</b>
1	Alpha pinène	2.99	0.63
2	Camphene	3.59	0.02
3	Beta pinene	4.30	3.00
4	Sabinene	4.59	5.01
5	Delta -3- carene	5.17	0.96
6	Alpha phellandrene	5.54	0.06
7	Mycene ou aphaellandrene	5.62	2.37
8	Alpha terpinene	5.89	0.17
9	Limonene	6.38	1.61
10	Cineol	6.59	0.18
11	Beta phellandrene	6.77	8.82
12	Beta ocimene	7.54	0.70
13	Gamma terpinene	7.71	0.64
14	Trans beta ocimene	8.03	3.54
15	Paracymene	8.39	0.10
16	Terpinolene	8.83	0.48
17	Citronelle	15.73	0.27
18	Linalol	18.63	10.89
19	Acetate de linalyle	18.94	55.56
20	Beta caryophyllene	19.73	1.21
21	Terpinen-4-ol	20.09	0.32
22	Alpha humulene	22.17	0.12
23	Neral	22.60	0.08
24	Alpha terpineol	23.54	2.19
25	Geraniai	24.43	0.26
26	Acetate de neryle	24.81	1.52
27	Acetate de geranyle	25.89	2.46
28	Citronellel	26.31	0.09
29	Nerol	27.29	0.51
30	Geraniol	28.96	1.53
31	N methylanthranilate de methyle	34.98	2.55
32	Nerollol	35.29	0.06



**Annexe 3 : Chromatogramme GC de l'huile essentielle *C.aurantium***



**Annexe 4 : Chromatogramme GC de l'huile essentielle *M. piperita***



**Annexe 5 : Chromatogramme GC la série d'alcane C8-C28**

## Annexe 6 : Composition des milieux de culture

### Milieu bouillon Saboureaud

Composition	(grammes/litre)
Hydrolysate tryptique de caséine	5,0
Peptone peptique de viande	5,0
Glucose	20,0
pH 5,7 ± 0,2	

### Milieu gélose Saboureaud

Composition	(grammes/litre)
Hydrolysate tryptique de caséine	5,0
Peptone peptique de viande	5,0
Glucose	20,0
pH 5,7 ± 0,2	

### Milieu BHI (Bouillon Cœur Cervele)

Composition	(grammes/litre)
protéose-peptone	10,0
infusion de cervelle de veau	12,5
infusion de cœur de bœuf	5,0
Glucose	2,0
chlorure de sodium	5,0
hydrogénophosphate de sodium	2,5
pH=7,4	

### Tampon PBS (phosphate Buffered saline) à 0,1N

Composition	(grammes/litre)
NaCl	4,93
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,19
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,29
pH=7,2	

### Milieu Mueller Hinton

<b>Composition</b>	<b>(grammes/litre)</b>
Extrait de viande de bœuf	2
Peptone de caséine	17,5
Amidon de maïs	1,5
Agar	17
pH=7,4	7,4

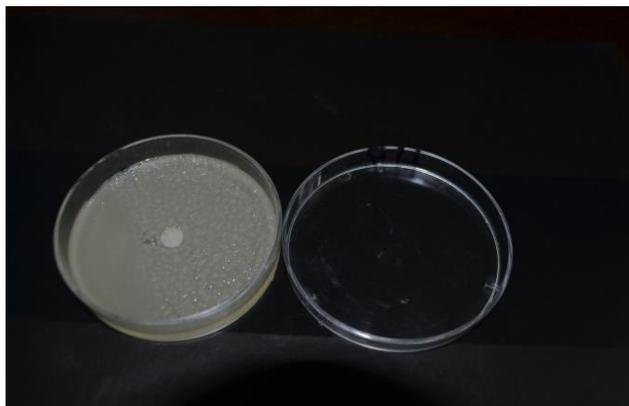
### Milieu YPG (Yeast-extract-Peptone-Glucose)

<b>Composition</b>	<b>(grammes/litre)</b>
Extrait de levure	10
Glucose	20
Peptone	10
pH=5	

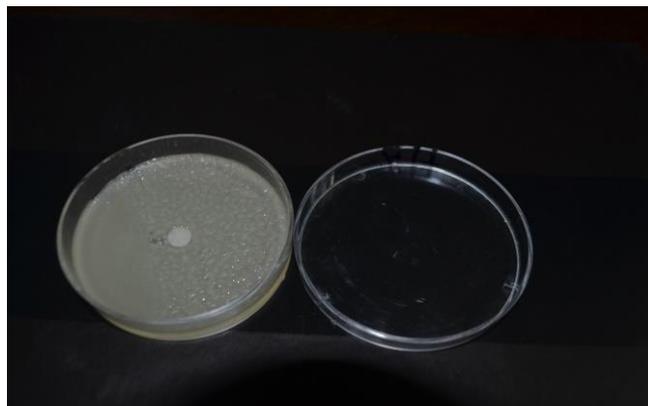
### Milieu Luria Bertani

<b>Composition</b>	<b>(grammes/litre)</b>
Peptone	10
Extrait de levures	5
Chlorure de sodium	10
pH=7,2	

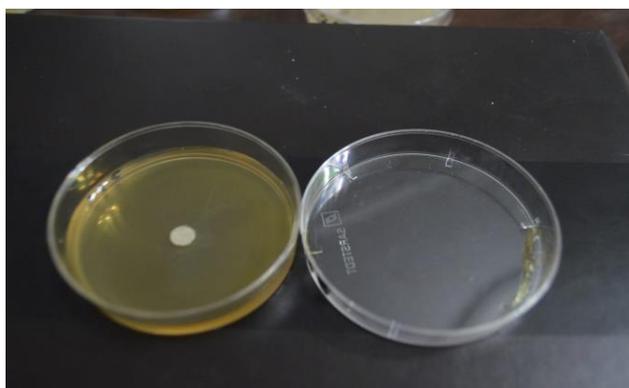
**Annexe 7 : Test de l'inhibition de la croissance microbienne avec l'HE de *M.piperita***



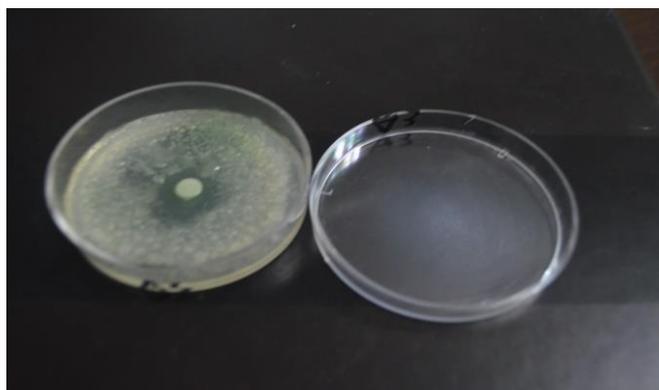
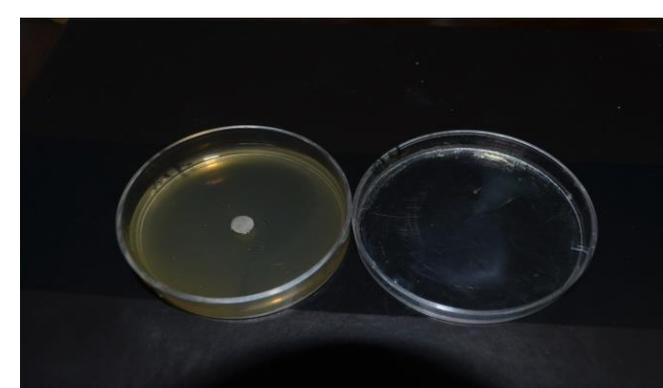
*S.aureus* ATCC 29213



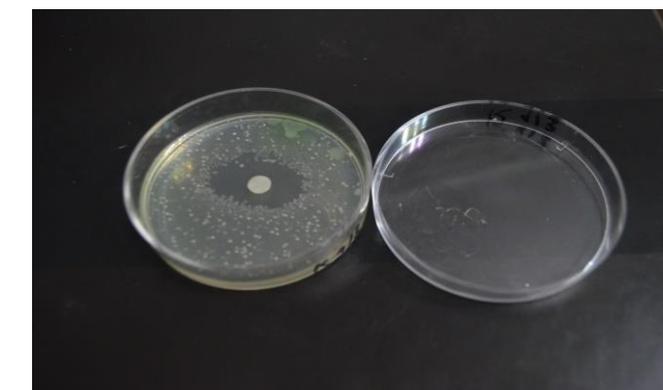
*S.aureus* ATCC 25923

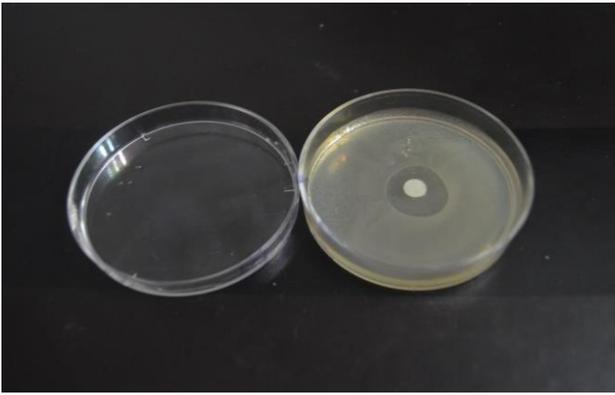


*C.albicans* *C.albicans* ATCC 10231

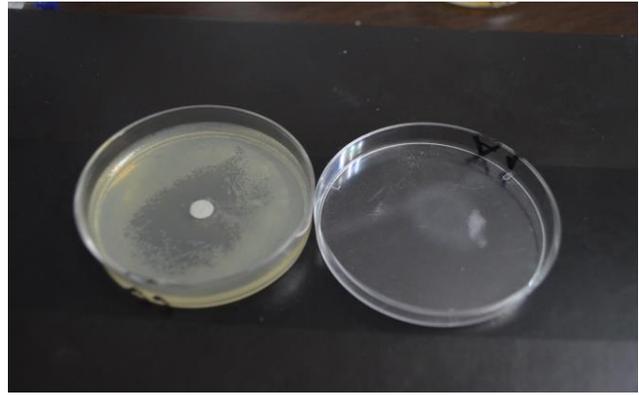


*K.pneumoniae* *S.hominis*

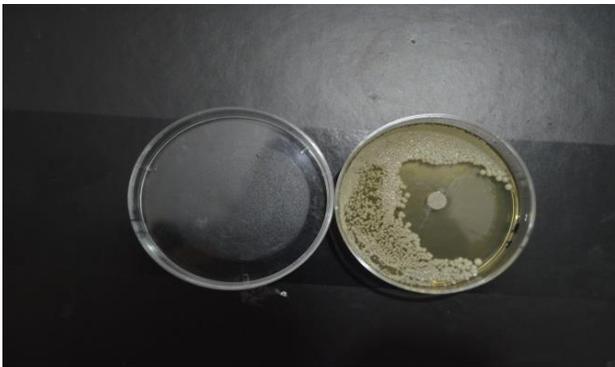




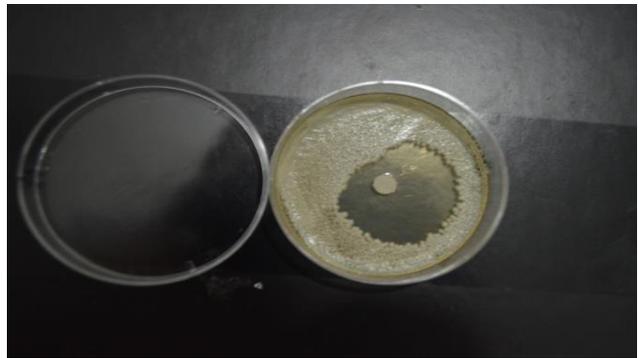
*E.coli ATCC 25922*



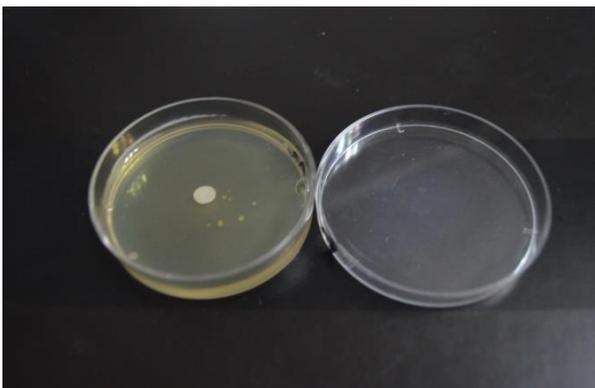
*P.mirabilis*



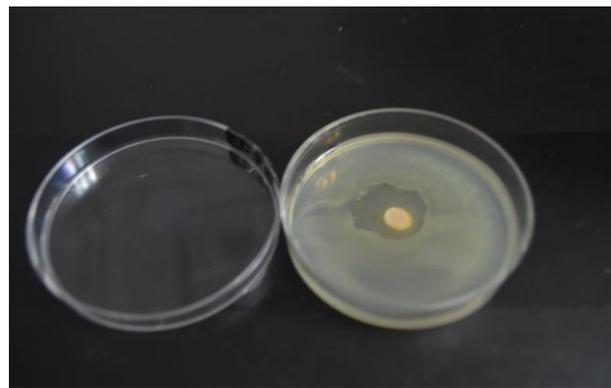
*P.vulgaris*



*C.koseri*

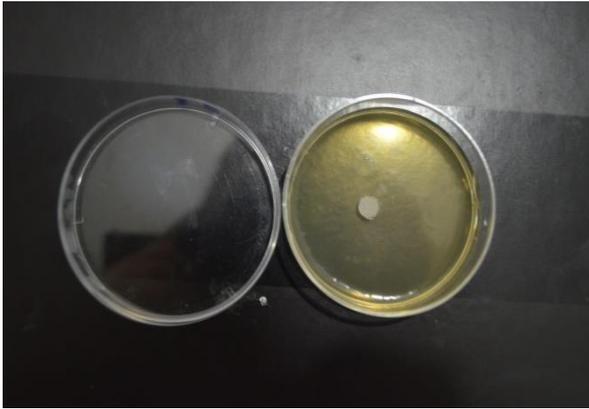


*S.enteritidis*

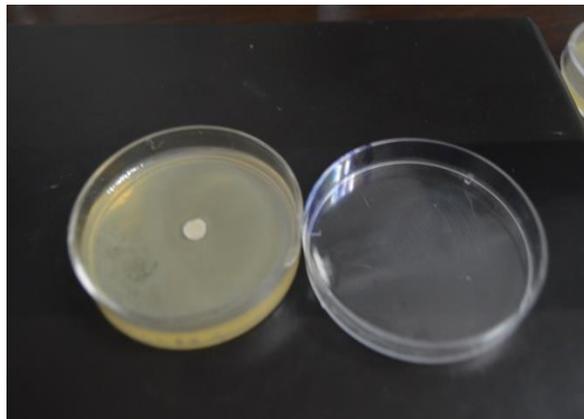
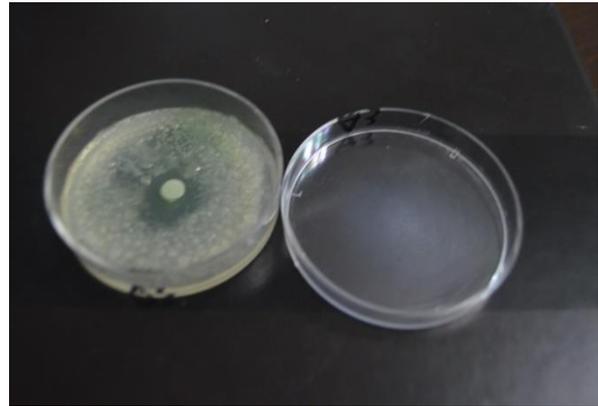


*A.baumannii*

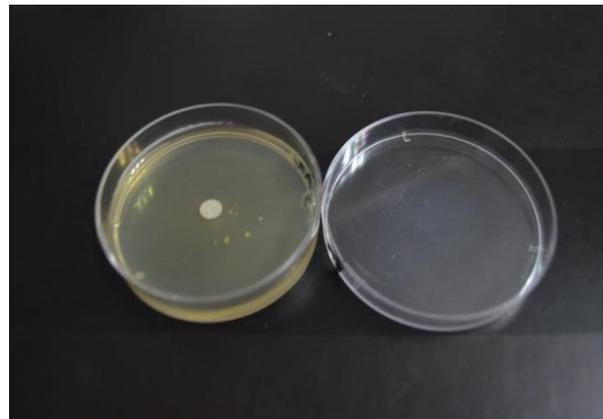
**Annexe 8 : Test de l'inhibition de la croissance microbienne avec l'HE de *C.aurantium***



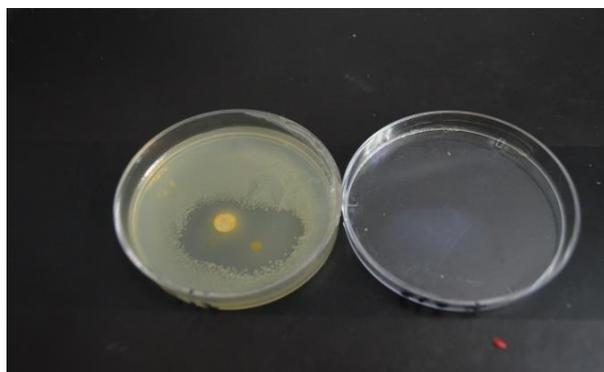
*C.albicans**P.mirabilis*



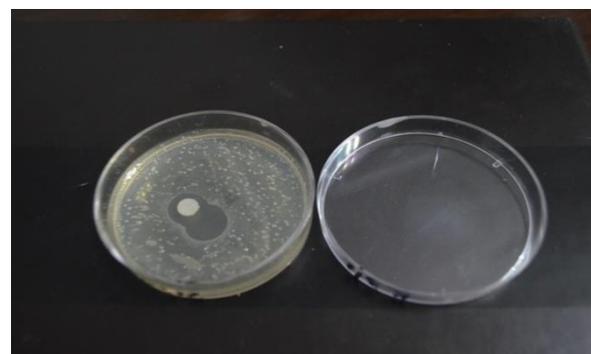
*P.aeruginosa*



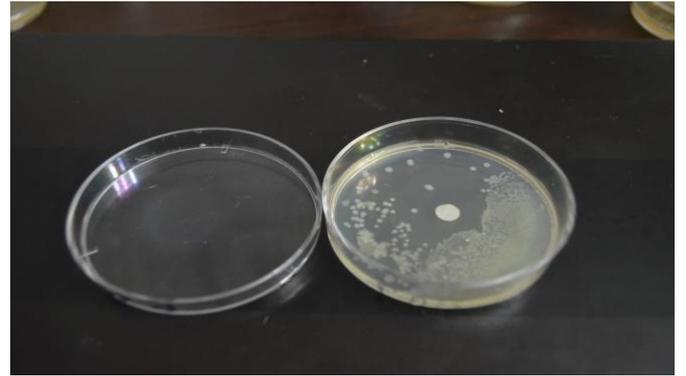
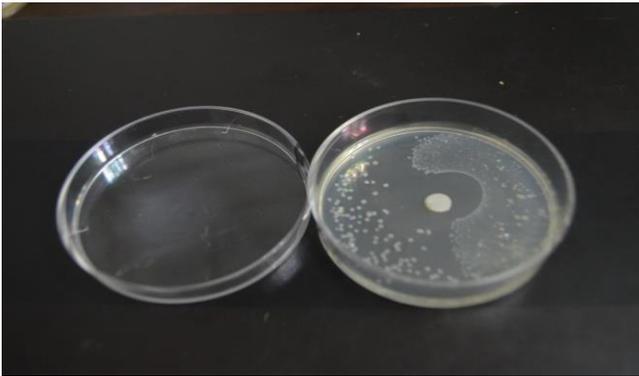
*P.vulgaris*



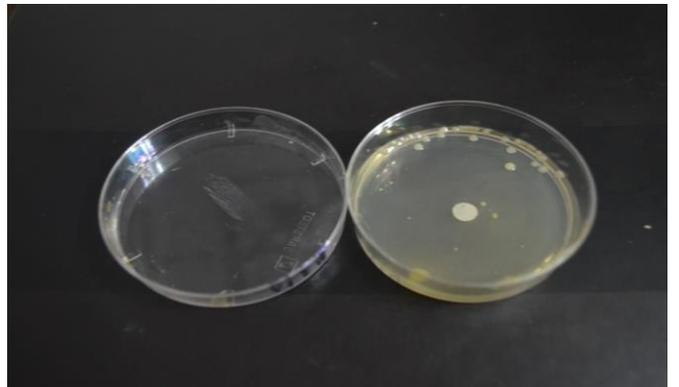
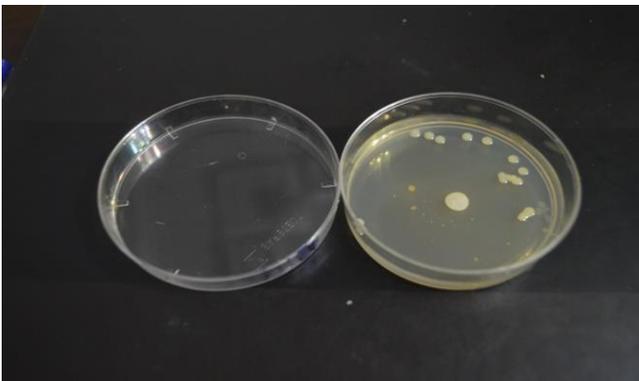
*S.aureus*



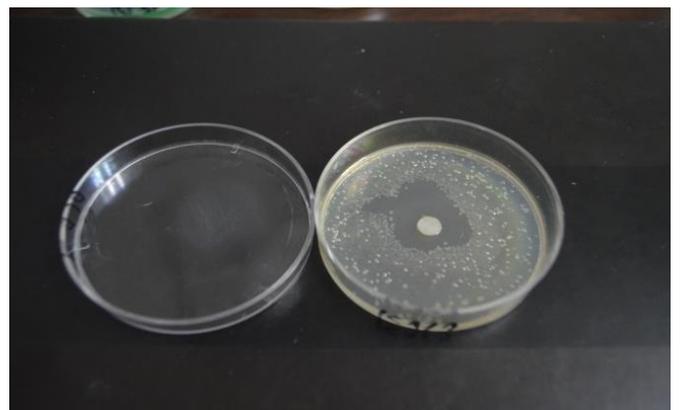
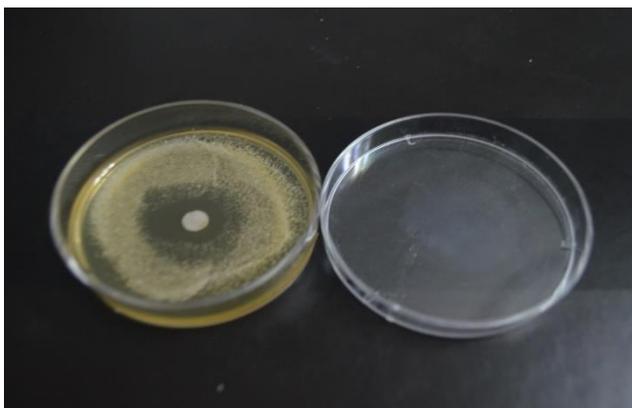
*S.aureus* ATCC 29213



*S. enteridis* *C. koseri*

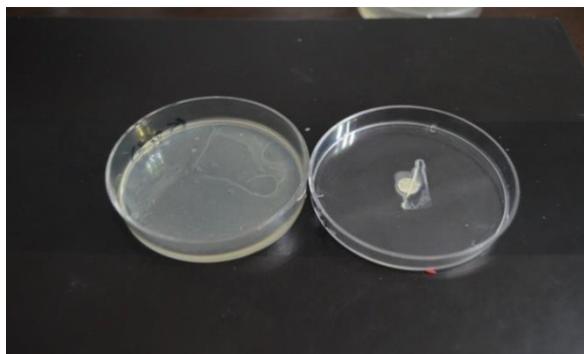


*K. pneumoniae* *S. hominis*

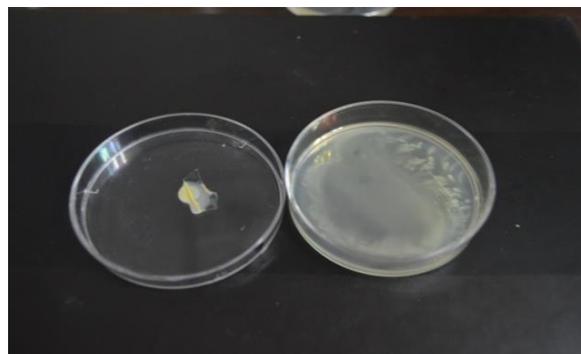


*C. freundii* *A. baumannii*

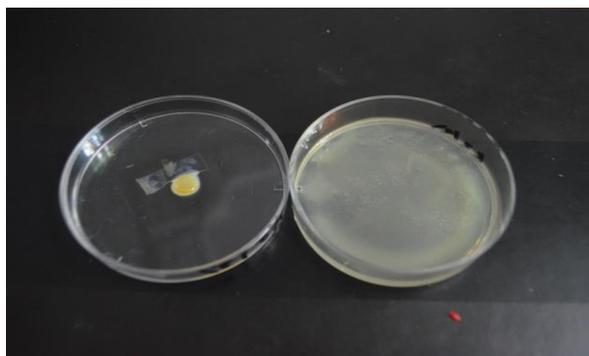
**Annexe 9 : Test de l'inhibition de la croissance microbienne par la vapeur de l'HE de *Citrus aurantium***



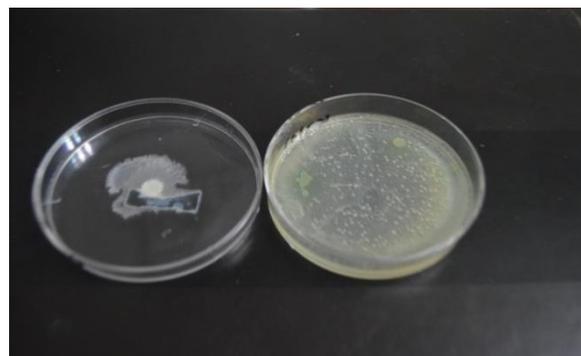
*E.coli BMR*



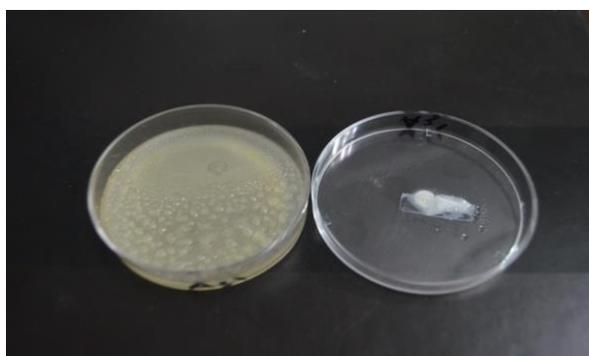
*K.oxytica*



*S.aureus*



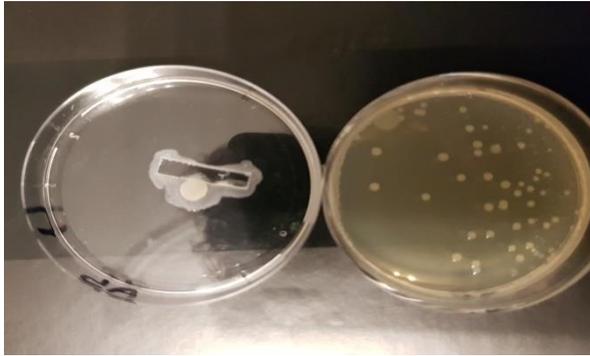
*P.aeruginosa*



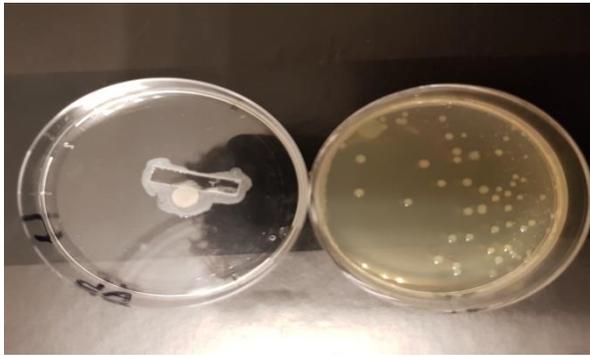
*P.aeruginosa ATCC 27853*



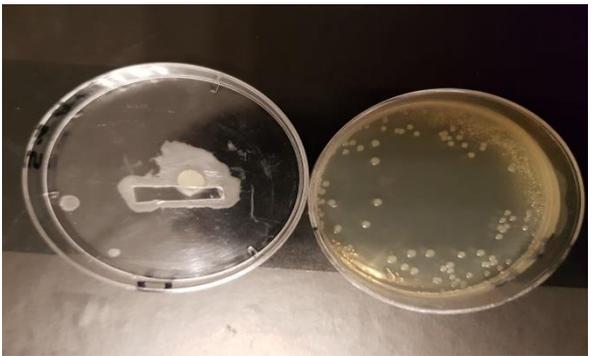
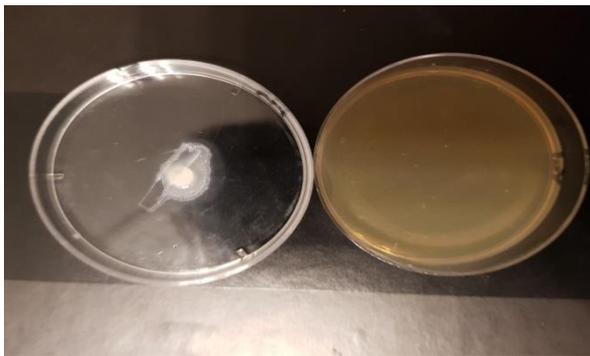
*C.albicans*



*K.pneumoniae* E47*S.morganii*

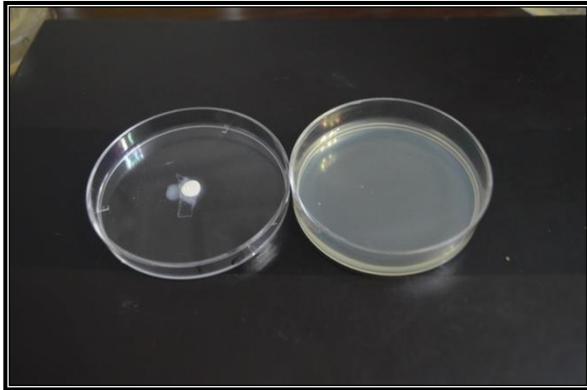


*E.faecalis**C.albicans*ATCC 10231



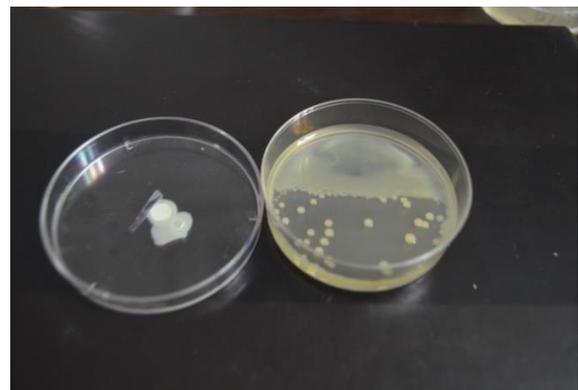
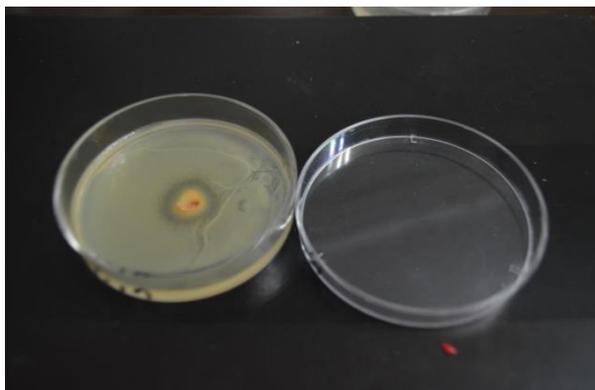
*S.hominis**S.marscences*

**Annexe 10 : Test de l'inhibition de la croissance microbienne par la vapeur de l'HE de *M.piperita***

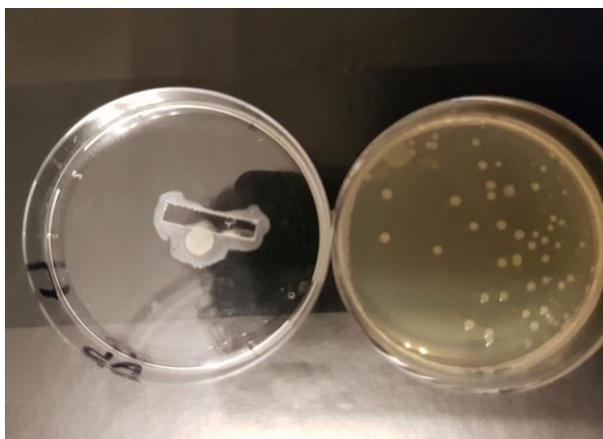


*E.coli* BMR

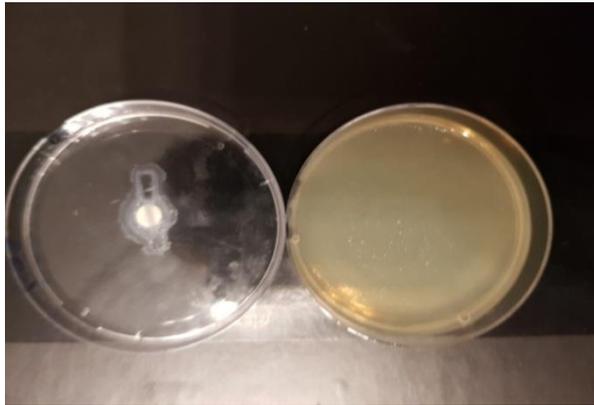
*K.pneumoniae*



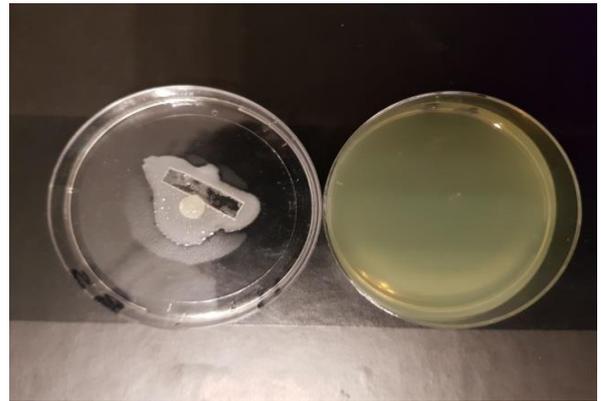
*S.aureus* *P.aeruginosa*



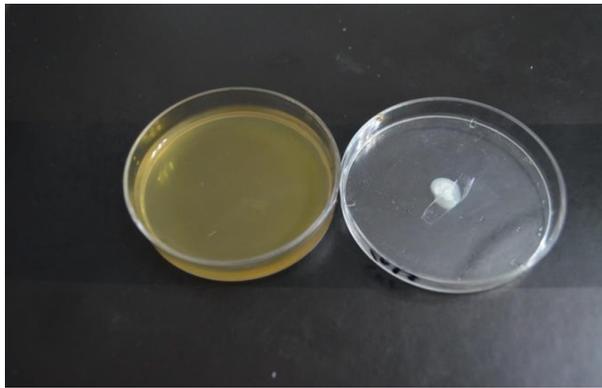
*A.baumannii* *S.marcescens*



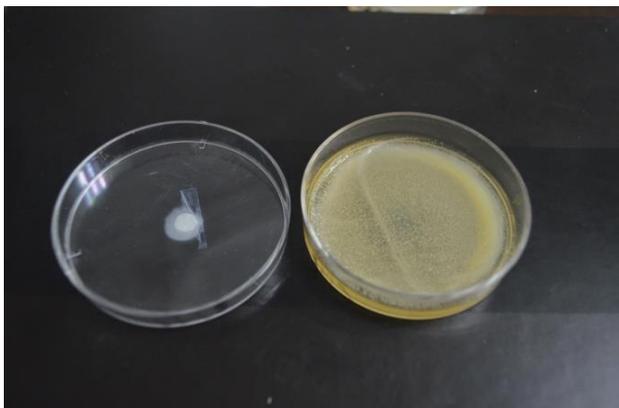
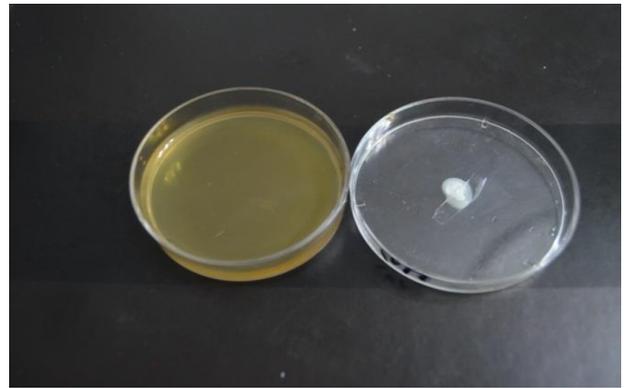
*E.coli* ATCC 25922



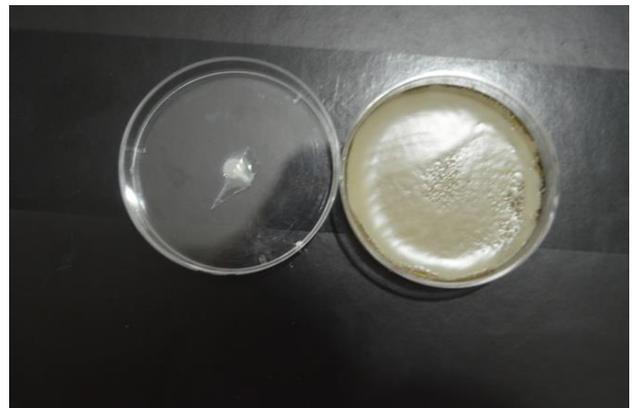
*K.pneumoniae*



*C.albicans* *C.albicans* ATCC 10231



Témoin positif *C.albicans*



Témoin négatif *C.albicans*