

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

*Développement de solutions anti-infectieuses alternatives
en médecine vétérinaire*

Présentée par : **Fatima YAHIAOUI**

Soutenue le 03 Décembre 2017

Les membres du jury

Président du jury :	Pr Hacina AIN-BAAZIZ	Professeur ENSV- Alger
Directrice de thèse :	Pr Meriem- Hind BEN-MAHDI	Professeur ENSV/ ESSAIA
Examineur 1 :	Dr Dahmane MOHAMMEDI	Maitre de conférences A ENSV
Examineur 2 :	Dr Idir BITAM	Maitre de conférences A ESSAIA
Examineur 3 :	Pr Djamel YALA	Professeur Faculté de Médecine- ALGER
Examineur 4 :	Pr Mounira KORICHI-OUAR	Professeur Faculté de Médecine- ALGER

Année universitaire : 2017/2018

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

*Développement de solutions anti-infectieuses alternatives
en médecine vétérinaire*

Présentée par : **Fatima YAHIAOUI**

Soutenue le 03 Décembre 2017

Les membres du jury

Président du jury :	Pr Hacina AIN-BAAZIZ	Professeur ENSV- Alger
Directrice de thèse :	Pr Meriem- Hind BEN-MAHDI	Professeur ENSV/ ESSAIA
Examineur 1 :	Dr Dahmane MOHAMMEDI	Maitre de conférences A ENSV
Examineur 2 :	Dr Idir BITAM	Maitre de conférences A ESSAIA
Examineur 3 :	Pr Djamel YALA	Professeur Faculté de Médecine- ALGER
Examineur 4 :	Pr Mounira KORICHI-OUAR	Professeur Faculté de Médecine- ALGER

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

A Ma directrice de thèse, Madame le Professeur BEN-MAHDI Meriem Hind

Pour m'avoir confié le sujet de cette thèse et a veillé jour après jour à sa réalisation, tout en me faisant bénéficier de son magistral enseignement ; c'est avec émotion que j'évoque la bienveillance, les conseils et les encouragements qu'elle m'a si largement prodigués tout au long de ces années.

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma vive admiration et de mon infinie gratitude.

A Madame le Professeur AIN-BAAZIZ Hacina, Présidente du Jury

Pour nous avoir fait l'honneur de présider cette thèse,

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Au Docteur MOHAMMEDI Dahmane,

Qui a bien voulu s'intéresser à ce travail, et pour l'honneur qu'il nous fait d'avoir accepté de juger et d'examiner ce travail.

Au Docteur BITAM Idir, Au Professeur YALA Djamel et au Professeur KORICHI-OUAR Mounira

Pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de siéger parmi nos juges, nous les prions de trouver ici l'assurance de notre vive reconnaissance.

A Monsieur KADDOUR Rachid

Pour sa précieuse aide à l'élaboration de mes lames histologiques, qu'il trouve ici, l'expression de ma vive gratitude.

A Madame le Docteur BOUZID Nora

Pour avoir consacré de son temps à la lecture des lames histologiques, qu'elle trouve ici l'assurance de ma vive reconnaissance.

*Qu'il me soit permis d'associer dans un même sentiment de gratitude tous les membres de mon équipe, particulièrement mes collègues et amis, **Dr KARDJADJ Moustafa** pour sa précieuse aide, **Dr MOHAMMEDI Sarah** et **Dr ZAOUANI Mohammed** pour leur infaillible soutien.*

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui, au long de mes études vétérinaires, m'ont instruit, conseillé et encouragé.

Je souhaite remercier tous les membres de la bibliothèque de l'ENSV, pour leur aide précieuse, leur gentillesse et leur disponibilité.

Je voudrais également exprimer ma fidèle et cordiale sympathie à tous mes collègues et à tous mes étudiants.

J'exprime ma vive gratitude et reconnaissance infinie à mes parents pour leur présence, leur soutien et leur stimulante fierté.

Que tous les miens trouvent également ici l'expression de mon affection.

Résumé

Les bactéries sont responsables de la survenue de plusieurs pathologies, et représentent de ce fait une menace récurrente pour la santé publique, particulièrement depuis le développement des phénomènes de résistance.

Au vue de cette situation, il devient primordial de trouver des solutions alternatives innovantes. L'exploration des ressources naturelles est une piste prometteuse car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives disponibles. La présente thèse a été une contribution à la mise en évidence de substances anti-infectieuses actives d'origine végétale (préparations phytothérapeutiques ou huiles essentielles) sur la base de connaissances ethno-pharmacologiques.

Elle s'articule autour de deux axes principaux : dans un premier temps nous avons étudié l'action antibactérienne des huiles essentielles sur les germes multi-résistants aux antibiotiques, en particulier sur les souches productrices de bêtalactamases d'origine animale.

Dans un second temps, nous avons étudié l'action antibactérienne, antioxydante d'extraits végétaux issus de deux plantes médicinales algériennes *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus*, par ailleurs, leur usage traditionnel en tant qu'agent vulnérable est reproduit sur un model excisionel murin.

Les résultats obtenus au cours de la première partie a permis de mettre en avant les propriétés antibactériennes des huiles essentielles et de leurs constituants à l'égard de plusieurs bactéries pathogènes. Les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Thymus fontaneseii* se sont avérées être les plus actives et ont présenté des propriétés bactéricides satisfaisantes. Par ailleurs, l'association de l'huile essentielle de menthe avec les antibiotiques conventionnels a présenté des effets additifs ou synergiques prometteurs.

La seconde partie du travail a été consacrée à l'étude des extraits de *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus*, et a permis de démontrer leur effet cicatrisant probablement favorisé par leur activité antibactérienne, mais également par leurs actions anti-inflammatoire et anti-radicalaire.

L'ensemble de ces travaux confirme l'intérêt des substances naturelles dans le cadre de la recherche de composés bioactifs, ainsi que la validité des stratégies ethno-pharmacologiques dans la recherche de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique et préventif dans le domaine vétérinaire.

D'une façon générale, ces travaux permettent de mieux démontrer les propriétés médicinales de certaines espèces et participent également à une meilleure connaissance de la chimio- et de la biodiversité des espèces algériennes, ce qui devrait inciter à une meilleure préservation de notre environnement et notre patrimoine.

Des travaux approfondis sont indispensables et devraient être entrepris afin de déterminer avec précision les cibles cellulaires et moléculaires des huiles essentielles et des molécules bioactives sur les organismes ciblés.

Mots clefs : Antibio-résistance ; BLSE, Cicatrisation ; *Cytisus triflorus* ; Extraits acétoniques végétaux, huiles essentielles, *Marrubium vulgare* ; *Mentha pulegium*, *Thymus fontaneseii*.

Abstract

Bacteria are responsible in the occurrence of several pathologies, and thus represent a recurrent threat to public health, especially since the development of antibiotic resistance phenomena.

In view of this situation, it is essential to find innovative alternative solutions.

The exploration of natural resources is a promising avenue, because, they constitute the largest pool of active substances.

The present thesis has been a contribution to the discovery of active anti-infectious substances of plant origin (phytotherapeutic preparations and essential oils) selected on the basis of ethno-pharmacological knowledge.

It focuses on two main axes: first, we study the antibacterial action of essential oils on antibiotic-resistant organisms, in particular on strains producing betalactamases from animal origin.

Secondly, we study the antibacterial, antioxidant action of plant extracts derived from two Algerian medicinal plants *Marrubium vulgare* and *Cytisus triflorus*. Moreover, their traditional use as a cicatrisant agent is produced on a murine excisional model.

The results obtained during the first part made it possible to highlight the antibacterial properties of essential oils and their constituents especially against several pathogenic bacteria. The essential oils of *Mentha pulegium* and *Thymus fontaneseii* have been the most active and exhibited a satisfactory bactericidal activity. In addition, the association of *Mentha pulegium* essential oil with conventional antibiotics has shown a promising additive or synergistic effects.

The second part of the work consisted on the study of *Marrubium vulgare* and *Cytisus triflorus* extracts, and demonstrated that their healing effect is probably attributed to their antibacterial activity, but also their anti-inflammatory and anti-radical actions.

All these works confirm the interest of natural substances in the search for bioactive compounds, as well as the validity of ethno-pharmacological strategies in the search for new molecules of therapeutic and preventive interest.

In general, these works help to illuminate the medicinal properties of certain species and also contribute to a better knowledge of the chemo and biodiversity of Algerian species, which should encourage better preservation of our environment and heritage.

Extensive work is needed and should be undertaken to accurately determine the cellular and molecular targets of essential oils and bioactive molecules on targeted organisms.

Key words : Acetonic extract ; antibiotic resistance ; *Cytisus triflorus* ; ESBL, essential oils, *Marrubium vulgare* ; *Mentha pulegium*, *Thymus fontaneseii*, wound healing

ملخص

البكتيريا هي المسؤولة عن حدوث العديد من الأمراض، وبالتالي تمثل تهديدا متكررا على الصحة العامة، وخاصة منذ تطور الظواهر المقاومة.

وفي ضوء هذه الحالة، من الضروري إيجاد حلول بديلة مبتكرة. إن استكشاف الموارد الطبيعية وسيلة واعدة، لأنها تمثل أكبر احتياطات من المواد الفعالة المتاحة.

وكانت هذه الأطروحة مساهمة في تحديد المواد الفعالة المضادة للعدوى من أصل نباتي (المستحضرات العشبية والزيوت الأساسية) على أساس المعرفة العرقية الدوائية.

أنها تدور حول محورين أساسيين: أولا قمنا بدراسة الإجراءات المضادة للبكتيريا من الزيوت الأساسية على الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية المتعددة، وخاصة المنتجة بيتا لاکتاماز BLSE ذات المنشأ الحيواني.

ثانيا، قمنا بدراسة مفعول مستحضرات عشبية لنباتين *Marrubium vulgare* و *Cytisus triflorus* ضد الجراثيم و الأكسدة و علاوة على ذلك، يرد الاستخدام التقليدي لها وكيل نافعة لشفاء الجروح مستنسخة على نموذج الفئران. النتائج المتحصل عليها خلال الجزء الأول ساعدت تسليط الضوء على خصائص مضادة للجراثيم من الزيوت الأساسية وناخبهم فيما يتعلق بعدة البكتيريا المسببة للأمراض. أثبتت الزيوت الأساسية من النعناع و الزعتر أن يكون أكثر نشاطا وشهدت خصائص جراثيم مرضية. وبالإضافة إلى ذلك، فإن جمعية الزيوت الأساسية النعناع مع المضادات الحيوية التقليدية أظهرت تأثيرات واعدة أو تآزرية واعدة.

وخصص الجزء الثاني من العمل لدراسة مفعول مستحضرات عشبية لنباتين *Marrubium vulgare* و *Cytisus triflorus* وأظهرت تأثير الشفاء ربما يفضلها نشاطهم مضاد للجراثيم، ولكن أيضا من خلال تصرفاتهم المضادة للالتهابات ومضادة للراديكالية.

كل هذا العمل يؤكد الاهتمام من المواد الطبيعية للبحث من المركبات النشطة بيولوجيا، فضلا عن صلاحية استراتيجيات العرقية الدوائية في البحث عن جزيئات جديدة من الفائدة العلاجية والوقائية في مجال الطب البيطري.

بشكل عام، هذه الدراسات تمنح لإظهار أفضل الضوء الخصائص الطبية لبعض أنواع النباتات ، وكذلك المساهمة في معرفة أفضل لأنواع الجزائرية من حيث التنوع الكيميائي و التنوع البيولوجي، والتي ينبغي أن تؤدي إلى الحفاظ بشكل أفضل على البيئة وتراثنا.

هناك حاجة إلى عمل مكثف، وينبغي القيام به لتحديد بدقة الأهداف الخلوية والجزيئية للزيوت الأساسية والجزيئات النشطة بيولوجيا على الكائنات المستهدفة.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Partie Bibliographique

Introduction générale	01
Chapitre I : La résistance bactérienne et les solutions alternatives	03
I. Rappels sur les antibiotiques	03
I.1 Découverte des antibiotiques	03
I.1.1 Les antibiotiques naturels et synthétiques	03
I.1.2 Les antibiotiques et leurs cibles bactériennes	04
I.2 La résistance aux antibiotiques	05
I.3 Les mécanismes de la résistance bactérienne.....	06
I.3.1 Inactivation de l'antibiotique par production enzymatique.....	07
I.3.2 Diminution de la perméabilité cellulaire	07
I.3.3 Altération des cibles cellulaires d'un antibiotique.....	08
I.3.4 Les systèmes d'efflux	08
I.4 Les approches alternatives anti-infectieuses.....	12
I.4.1 Les peptides antimicrobiens	12
I.4.2 Les bactériophages	12
I.4.3 Les plantes	13
Chapitre II : Les huiles essentielles	15
II. Les huiles essentielles	15
II.1 Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles.....	15
II.2 Procédés d'obtention des huiles essentielles	16
II.2.1 Par entraînement à la vapeur	16
II.2.2. Expression ou pressage à froid	17
II.2.3 Autres procédés	17
II.3 Composition chimique des huiles essentielles.....	18
II.3.1 Les composés terpéniques	18
II.3.2 Les composés aromatiques	20
II.4 les méthodes de séparation, d'identification et de quantification	21
II.4.1 Chromatographie en phase gazeuse	21
II.4.2 Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse	22
II.5 Toxicité des huiles essentielles	24
II.5.1 Toxicité aiguë	24
II.5.2 Toxicité chronique	25
II.5.3 Toxicité dermique	25
II.5.4 Cytotoxicité	25
II.6 Propriétés des huiles essentielles ;.....	26
II.6.1 Les propriétés anti-infectieuses et de défense de l'organisme	27
II.6.2 Les propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes	27
II.7 Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries	28
II.7.1 Effet sur la paroi de la membrane plasmique	29
II.7.2 Effet sur le pH cellulaire	30
II.7.3 Effet sur le quorum sensing	30
II.7.4 autres altérations ;.....	31
Chapitre III : Rappels bibliographiques sur le processus de cicatrisation.	32
III. Rappels bibliographiques sur le processus de cicatrisation.....	32

III.1 Rappels physiologiques sur la peau.....	32
III.2 Rappels histologiques	33
III.2.1 L'épiderme.....	33
a- Kératinocytes	34
b- Mélanocytes	34
c- Cellules de Langerhans	34
d- Cellules de Merkel	34
III.2.2 Le derme	35
III.2.3. L'hypoderme	35
III.2.4 Les annexes cutanées.....	35
III.3 Les acteurs de la cicatrisation cutanée.....	35
III.3.1 Les cellules	35
a- Les plaquettes	35
b- Les neutrophiles	36
c- Les macrophages	36
d- Les lymphocytes	36
e- Les mastocytes	36
f- Les cellules endothéliales	37
g- Les fibroblastes et les myofibroblastes	37
h- Les kératinocytes et les cellules souches épidermique	37
III.3.2 Les facteurs solubles.....	38
III.4 La cicatrisation	40
III.4.1 Phase vasculaire et inflammatoire (détersion).....	40
III.4.2 Phase proliférative (granulation).....	41
III.4.3 Epithélialisation et remodelage	42
III.5 Facteurs influençant la cicatrisation	42
III.5.1 Facteurs favorisant la cicatrisation	43
III.5.2 Facteurs retardant la cicatrisation	43
a- Stress	43
b- Infections	44
c- Médicaments	44
d- Hypoxie et défaut de perfusion.....	44
e- Malnutrition	44
III.6 Rôles des plantes dans la cicatrisation	45
III.7 Métabolites actifs des plantes impliqués dans la cicatrisation	49
III.7.1 Les Alcaloïdes	49
III.7.2 Les tanins	49
III.7.3 Les saponosides	49
III.7.4 Les terpénoïdes	50
III.7.5 Les composés phénoliques	50

Partie expérimentale

I. Etude des activités antibactériennes des huiles essentielles.....	52
I.1 Problématique et objectif.....	52
I.2 Matériels, Appareillages & Réactifs.....	53
I.2.1 Appareillages.....	53
I.2.2 Matériels de laboratoire	54
I.2.3 Milieux et réactifs chimiques.....	54
I.2.4 Les souches bactériennes.....	54
I.2.5 La matière végétale.....	55
I.3 Méthodes.....	56
I.3.1 Extraction et analyses des huiles essentielles.....	56
a- Extraction des huiles essentielles.....	56

b-	Analyse par chromatographie en phase gazeuse/ détecteur ionisation à flamme (GC/FID).....	56
c-	Chromatographie gazeuse / spectrométrie de masse.....	57
I.3.2	Méthodes microbiologiques.....	57
a-	Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque	57
b-	Détermination de la concentration minimale inhibitrice par microdilution	59
c-	Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	60
d-	Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne.....	62
I.3.3	Test de synergie entre l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> et quelques antibiotiques conventionnels.....	62
I.4	Résultats & Discussion	64
I.4.1	Rendement et densité des huiles essentielles.....	64
I.4.2	Analyses chromatographiques	65
a-	<i>Mentha pulegium</i>	65
b-	<i>Thymus fontaneseii</i>	68
I.4.3	Activité antibactérienne	71
a-	Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque.....	71
b-	Détermination de la concentration minimale inhibitrice et concentration minimale bactéricide et time kill assay	77
I.4.4	Test de synergie	82
I.5	Conclusion	85
II.	Etude de l'activité cicatrisante	86
II.1	Problématique et objectif.....	86
II.2	Matériels, Appareillages & Réactifs.....	87
II.2.1	Appareillages et matériel de laboratoire	87
II.2.2	Réactifs chimiques.....	88
II.2.3	Matériel végétal.....	89
II.2.4	Matériel biologique.....	89
II.2.5	Animaux de laboratoire.....	90
II.3	Méthodes	90
II.3.1	Extraction.....	90
II.3.2	Détermination des taux de polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	90
II.3.3	Essais biologiques <i>In vitro</i>	92
a-	Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH... ..	92
b-	Activité antibactérienne.....	92
II.3.4	Essais biologiques <i>In vivo</i>	93
a-	Evaluation de la toxicité cutanée des extraits acétoniques de <i>Marrubium vulgare</i> et de <i>Cytisus triflorus</i> sur rats	93
b-	Evaluation de l'activité cicatrisante des extraits acétoniques de <i>Marrubium vulgare</i> et de <i>Cytisus triflorus</i> sur rats.....	93
1-	Préparation de l'onguent à base d'extrait à tester	93
2-	Evaluation de l'activité cicatrisante sur un modèle excisionnel de cicatrisation murin.....	94
3-	Etude histologique.....	95
II.3.5	Analyse statistique	95
II.4	Résultats et discussion	96
II.4.1	Rendement des extractions	96
II.4.2	Détermination des polyphénols totaux et flavonoïdes.....	96
II.4.3	Activité antioxydante.....	99

II.4.4	Activité antibactérienne.....	101
II.4.5	Toxicité cutanée.....	102
II.4.6	Activité cicatrisante	103
a-	Résultats de l'évaluation de l'activité cicatrisante sur modèle excisionnel de cicatrisation murin.....	103
b-	Résultats de l'évaluation histopathologique	105
II.5	Conclusion	108
	Conclusion générale et perspectives	109
	Références bibliographiques	111
	Annexes	

Liste des figures

Partie Bibliographique

Figure 1 : Chronogramme de la découvertes des antibiotiques naturelles et synthétiques.....	4
Figure 2 : Mode d'action des antibiotiques.....	5
Figure 3 : Les mécanismes de résistance bactérienne.....	6
Figure 4 : Principaux composés impliqués dans l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	19
Figure 5 : Principaux composés aromatiques dérivés du phénylpropane	20
Figure 6 : principe d'identification des constituants volatils d'une HE par CPG/CPG/MS.....	23
Figure 7 : Mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes	28
Figure 8 : Schéma des couches de la peau.....	33
Figure 9 : Recrutement cellulaire et dynamique temporelle après blessure cutanée	38
Figure 10 : Implication des extraits de plantes dans le processus cicatriciel	51

Partie Expérimentale I

Figure 1 : Activité antibactérienne par diffusion sur gélose.....	58
Figure 2 : Activité antibactérienne sur microplaque	60
Figure 3 : Détermination de la CMB sur milieu solide.....	61
Figure 4 : Principe de la microdilution checkerboard méthode.....	63
Figure 5 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	65
Figure 6 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	68
Figure 7 : Dynamique de l'action antibactérienne de <i>Mentha pulegium</i>	80
Figure 8 : Synergie observée entre la gentamycine et <i>Mentha pulegium</i> sur <i>Proteus mirabilis</i>	82

Partie Expérimentale II

Figure 1 : <i>Marrubium vulgare</i> (à gauche), <i>Cytisus triflorus</i> (à droite).....	89
Figure 2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	97
Figure 3 : Courbe d'étalonnage de la quercétine	98
Figure 4 : Structure chimique du radical libre DPPH	99
Figure 5 : Evolution des plaies au cours du processus de cicatrisation	104
Figure 6 : Aspect histologique des cicatrices sur les différents groupes expérimentaux (Grossissement x 40).....	106

Liste des tableaux

Partie bibliographique

Tableau 1 : Mode d'action et mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	10
Tableau 2 : Les composés terpéniques et leurs dérivés.....	18
Tableau 3 : DL 50 des principales huiles essentielles et leurs constituants	24
Tableau 4 : Principales activités des facteurs de croissances au cours de la cicatrisation cutanée.....	39
Tableau 5 : Facteurs impliqués dans la migration et la prolifération des kératinocytes.....	39
Tableau 6 : Facteurs favorisant la cicatrisation.....	43
Tableau 7 : Répertoire des plantes ayant une activité cicatrisante	46

Partie Expérimentale I

Tableau 1 : Lieu et période de récolte des plantes étudiées	55
Tableau 2 : Rendement obtenus et densités des huiles essentielles étudiées.....	64
Tableau 3 : Composition de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> déterminés par GC/FID, GC/MS.....	66
Tableau 4 : Variabilité de la composition de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	67
Tableau 5 : Composition de l'huile essentielle de <i>Thymus fontaneseii</i> déterminés par GC/FID, GC/MS.....	69
Tableau 6 : Variabilité de la composition de l'huile essentielle de <i>Thymus fontaneseii</i>	70
Tableau 7 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) obtenues par la méthode de diffusion sur gélose	72
Tableau 8 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) obtenues par la méthode de diffusion sur gélose.....	73
Tableau 9 : Activité antibactériennes des huiles essentielles sur les différentes bactéries BLSE.....	76
Tableau 10 : CMI et CMB de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	76
Tableau 11 : CMI et CMB de l'huile essentielle de <i>Thymus fontaneseii</i>	77
Tableau 12 : Résultat de la chekerbord méthode entre les antibiotiques et l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	82

Partie Expérimentale II

Tableau 1: Teneur des extraits acétoniques du MV et CT en polyphénols totaux et

en flavonoïdes	98
Tableau 2: Activité antiradicalaire des extraits acétoniques.....	100
Tableau 3: Activité antibactérienne des extraits acétoniques de MV et CT.....	102
Tableau 4: Surfaces moyennes des plaies en cm ² et taux moyens de rétraction des plaies	104
Tableau 5: Résultats de l'étude histopathologique des cicatrices des différents groupes expérimentaux	105

Introduction

Introduction générale

L'histoire du rôle thérapeutique des plantes est aussi longue que l'histoire de l'humanité elle-même. Les fondements mêmes de la pharmacologie moderne sont issues de connaissances ancestrales, depuis l'ère des Sumériens et des Babyloniens qui ont recensé les premières drogues végétales, à l'isolement des premiers principes actifs avec les progrès de la chimie aux XVIII^e et XIX^e siècles (*Houel, 2011*).

Actuellement, environ 25 % des médicaments modernes sont développés à partir de plantes (*Houel, 2011*). Entre 1983 et 1994, près de 40 % des nouvelles drogues autorisées à être mises sur le marché aux Etats-Unis, étaient dérivées de composés naturels (*Simmonds, 2003*) et environ 70 % des nouvelles entités chimiques décrites entre 1981 et 2006 étaient issues d'études portant sur les produits naturels (*Liu et Wang, 2008; Houel, 2011*).

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place dans le but d'obtenir des composés actifs d'origine naturelle, ceux-ci pouvant provenir aussi bien de plantes que de champignons ou de bactéries. Les criblages de collections de plantes ou de micro-organismes sont une méthode classique qui a permis la découverte de la plupart des antibiotiques actuels (*Simmonds, 2003*).

D'autres disciplines comme la chimiotaxonomie, la zoopharmacologie, l'ethnopharmacologie permettent de rationaliser cette recherche. De ce fait, il est actuellement possible de trouver des informations sur les applications thérapeutiques de plus de 85 000 espèces de plantes (*Balunas et Kinghorn, 2005*).

Les bactéries sont responsables de la survenue de plusieurs pathologies, et représentent de ce fait une menace récurrente pour la santé publique, particulièrement depuis le développement des phénomènes de résistance.

L'augmentation des résistances est due à la prescription immodérée et souvent inappropriée des antibiotiques, qui favorisent l'élimination des bactéries sensibles et la sélection des plus résistantes. La prolifération de bactéries résistantes est devenue une préoccupation majeure dans le domaine de la santé. En effet, les conséquences directes d'une infection par des micro-organismes résistants peuvent être graves : durée plus longue de la maladie, hausse de la mortalité, hospitalisation prolongée, protection affaiblie lors d'une intervention chirurgicale ou d'autres actes médicaux ce qui est à l'origine d'une augmentation des coûts, estimés à 1,5 milliard d'euro/ an en Europe (*OMS, 2014*) et un accroissement du taux de mortalité : 25 000 décès/an en Europe, notamment.

Au vue de cette situation critique, il devient primordiale de trouver des solutions alternatives innovante.

Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme l'une des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives

Aussi, la présente thèse a été une contribution à la mise en évidence d'activité anti-infectieuses de substances naturelles d'origine végétale (préparations phytothérapeutiques ou huiles essentielles), les plantes étudiées ont été sélectionnées sur la base de connaissances ethno-pharmacologiques.

La première partie du manuscrit est une revue bibliographique portant sur l'antibiorésistance, et les solutions alternatives possibles. Le processus de cicatrisation sera également présenté.

La deuxième partie expérimentale de ce travail s'articule autour de deux axes principaux : dans un premier temps nous avons étudié l'action antibactérienne des huiles essentielles sur les germes multi-résistants aux antibiotiques, en particulier sur les souches productrices de bêtalactamases d'origine animale, nous avons également exploré l'effet synergique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressées à l'étude de l'effet d'extraits végétaux de la flore algérienne sur la cicatrisation, qui est un processus physiologique qui exige une bonne asepsie de la plaie ainsi qu'une bonne vascularisation, elle est d'autant favorisée par l'usage de substances antibactériennes et antioxydantes. Nous avons de ce fait étudié l'action antibactérienne et antioxydante d'extraits végétaux issus de deux plantes médicinales. Par ailleurs, leur usage traditionnel en tant qu'agent vulnérable est reproduit et confirmé sur un model excisionel murin.

Rappels bibliographiques

*Chapitre I : la résistance bactériennes
et les solutions alternatives*

Chapitre I : La résistance bactérienne et les solutions alternatives

I. Rappels sur les antibiotiques

I.1 Découverte des antibiotiques

En 1928, Alexander Fleming observa que la croissance de *Staphylococcus aureus* était inhibée par une colonie de *Penicillium notatum* produisant un agent actif isolé et nommé peu de temps après « la pénicilline ». Ce mécanisme d'inhibition s'appelle **antibiose**. De ce mot dérive le terme d'**antibiotique**, soit une substance produite par un microorganisme, habituellement une bactérie ou un mycète capable de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (*Tortora et al, 2003*).

Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large.

L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides».

I.1.1 Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (*Newman et al, 2003; Singh et Barrett, 2006*). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes.

Pratiquement la plupart des classes d'antibiotiques ont été découvertes entre 1936 à 1962 (**figure 1**).

Les principales familles d'antibiotiques et leur classification sont représentées en annexe 1.

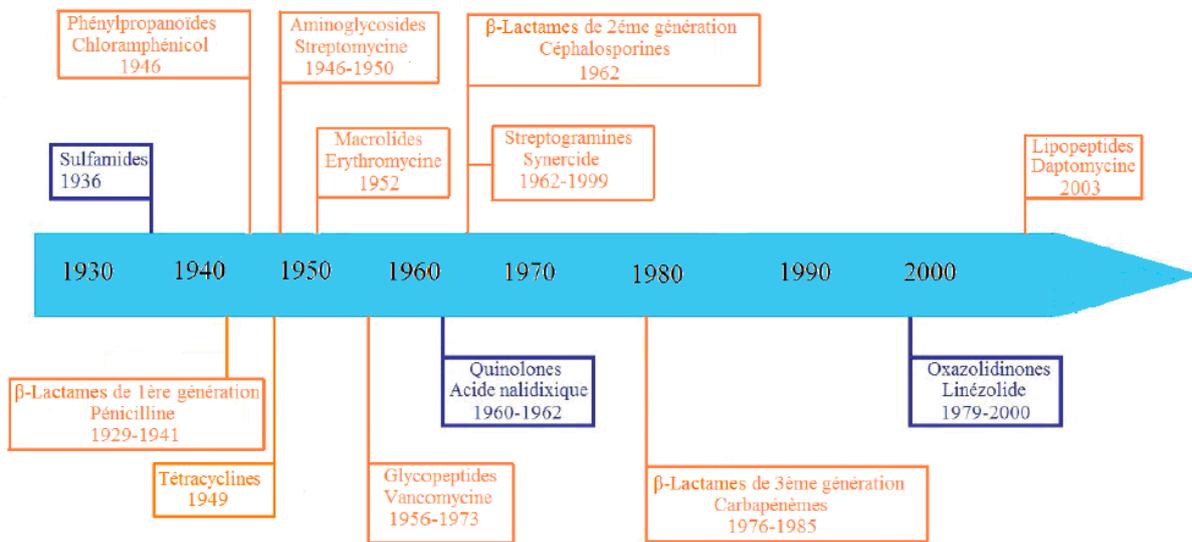


Figure 1 : Chronogramme de la découverte des antibiotiques naturels et synthétiques
(Singh et Barrett, 2006 dans Guinoiseau 2010)

I.1.2 Les antibiotiques et leurs cibles bactériennes

Les antibiotiques ont la particularité d'avoir une cible thérapeutique localisée qui n'est pas un tissu particulier de l'organisme mais une bactérie hébergée accidentellement ou en permanence par cet organisme.

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie.

Ils peuvent ainsi inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens.

La complexité des motifs structuraux et la grande variabilité des groupements fonctionnels, qui entrent dans la constitution des antibiotiques, leur permettent d'établir des interactions spécifiques avec leurs cibles bactériennes. Cette haute spécificité, associée à l'exceptionnelle capacité d'adaptation des bactéries, participe, entre autres facteurs, à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques.

Les principales familles des antibiotiques sont répertoriées dans le tableau 00, le mode d'action de chaque famille d'antibiotique est illustré dans la **figure 2**.

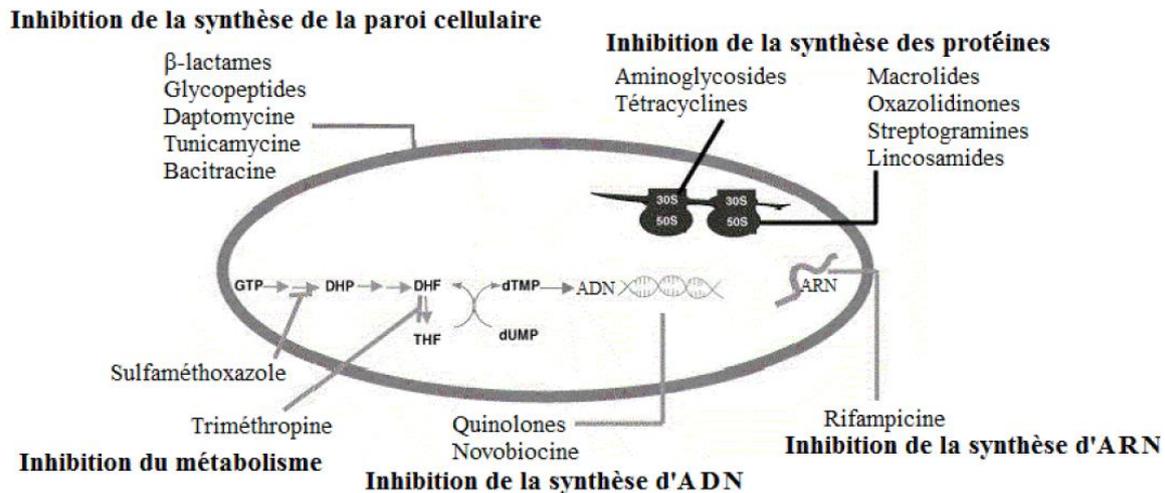


Figure 2 : Mode d'action des antibiotiques (*Singh et Barrett, 2006*)

I.2 La résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne se définit comme la capacité de continuer à croître ou à survivre en présence de l'antibiotique. Les conditions d'activité d'un antibiotique sont de posséder une cible spécifique, de demeurer sous forme active, d'accéder à la cible et d'interagir efficacement avec elle en la désactivant.

Il existe de nombreux mécanismes aboutissant à l'expression de la résistance qui peut être de caractère inné ou acquis : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La résistance naturelle est programmée dans le génome et constante à l'intérieur du taxon; elle constitue un critère d'identification stable d'une espèce.

Les résistances acquises sont quant à elles consécutives à des modifications de l'équipement génétique sur des bactéries initialement sensibles.

L'acquisition de ces résistances est déterminée par des modifications génétiques consécutives à des mutations ponctuelles ou à l'acquisition de gènes de résistance exogènes.

La capacité de multiplication très rapide des bactéries favorise la sélection d'évènements génétiques favorables et la possibilité d'échange d'information même entre espèces lointaines leur conférant un très grand pouvoir d'adaptation aux contraintes du milieu. L'évolution des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et notamment aux β-lactamines illustre parfaitement ce phénomène.

I.3 Les mécanismes de la résistance bactérienne

Le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques se traduit par une diminution d'activité voire une inefficacité totale des molécules habituellement actives. Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies : Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances (**Figure 3**).

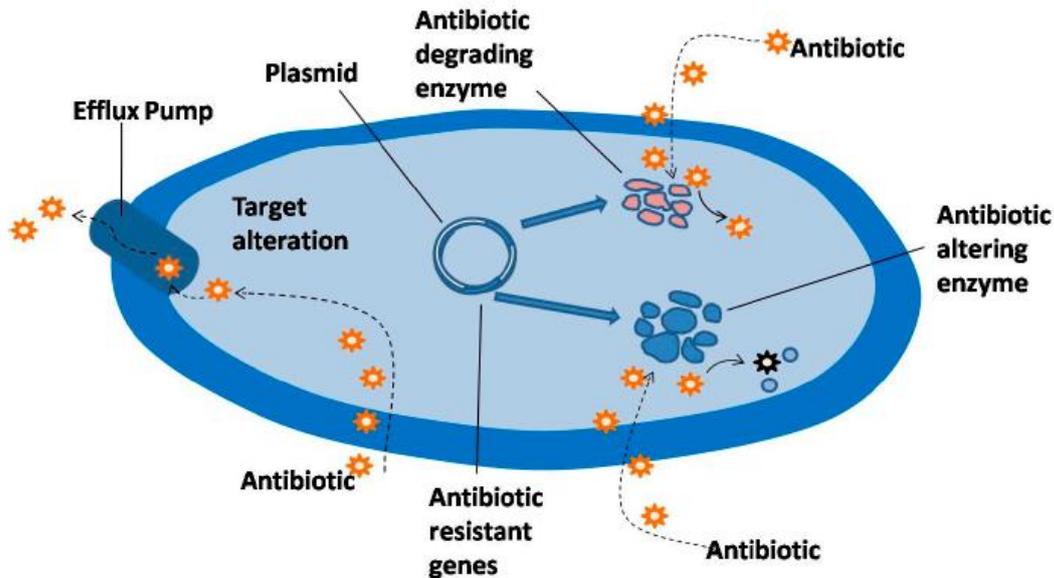


Figure 3 : Les mécanismes de résistance bactérienne (*Chandra et al, 2017*)

Tous permettent à la bactérie de se soustraire à l'action de l'antibiotique présent dans le milieu et peuvent s'observer séparément ou de manière concomitante. Quatre mécanismes principaux sont connus :

- Inactivation de l'antibiotique par production enzymatique ;
- Diminution de la perméabilité cellulaire ;
- Altération des cibles cellulaires de l'antibiotique ;
- Les systèmes d'efflux.

Le **tableau 01** synthétise les modes actions ainsi que les modes de résistance des différents antibiotiques.

I.3.1 Inactivation de l'antibiotique par production enzymatique

Certains microorganismes pathogènes sont devenus résistants aux antibiotiques en modifiant l'antibiotique ou en libérant des enzymes telles que les transférases qui inhibent ou décomposent les structures chimiques de l'antibiotique. Ainsi les β -lactamases hydrolysent la fonction amine du cycle β -lactame des β -lactamines ce qui les rend inactifs (*Wright, 2005*). La destruction des β -lactamines par les β -lactamases est le mécanisme de résistance majeur des bactéries Gram négatif. Afin d'augmenter son taux d'hydrolyse, une cellule peut exprimer le gène de la β -lactamase sous le contrôle d'un promoteur fort, ce qui entraîne une augmentation de la synthèse de l'enzyme (*Spencer et al, 1987*).

Les gènes de résistance sont souvent localisés sur des éléments génétiques mobiles, par exemple des plasmides ou des transposons, et le transfert de ce matériel chez les bactéries n'est pas limité à une espèce en particulier (*Bauernfein et al, 1987*).

Plus de 1000 β -lactamases naturelles ont été identifiées jusqu'à présent (*Bush et Fisher, 2011*).

Chez les bactéries Gram négatives, les aminoglycosides peuvent devenir inefficaces suite à une phosphorylation, une adénylation et/ou une acétylation (*Chandra et al, 2017*).

I.3.2 Diminution de la perméabilité cellulaire

La diminution de la perméabilité est un phénomène observé chez les bactéries Gram négative. La présence d'éléments dédiés à la pénétration de molécules exogènes dans leur paroi est à l'origine de ce type de résistance. La perméabilité membranaire intervient dans le contrôle de la concentration de différentes classes d'antibiotiques comme les β -lactamines ou les quinolones via l'expression des porines ou des transporteurs-pompes.

Les porines sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques. Le dysfonctionnement ou la perte de l'une d'entre elles peut entraîner une augmentation de 4 à 8 fois de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de divers antibiotiques comme les β -lactamines, l'acide nalidixique, le triméthoprime, la fosfomycine, la tétracycline ou encore le chloramphénicol (*Dialo, 2013*).

I.3.3 Altération des cibles cellulaires d'un antibiotique

Les agents antimicrobiens agissent sur un site particulier où ils se lient de façon spécifique pour pouvoir agir; les bactéries deviennent résistantes à certains antibiotiques en raison de la modification ou l'altération de ces sites cibles, qui peut être la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation. Les changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire, par exemple le *Streptococcus spp.* échappe à l'action des macrolides, lincosamides et streptogramin B en les empêchant de se lier à la sous-unité ribosomale 50S et la synthèse des protéines séquentielles par la modification post-transcriptionnelle de la 23S composant ARNr de la sous-unité ribosomale 50S. Ceci est dû à la méthylation du Groupe N6 amine de la fraction adénine dans la sous unité 23S de l'rRNA (*Kataja et al, 1998*).

Certains antibiotiques, comme les β -lactames, le chloramphénicol et les fluoroquinolones, traversent la membrane externe des bactéries Gram négatives et atteignent leurs cibles grâce aux porines (*Nikaido, 2003*). De ce fait, des changements au niveau de ces canaux protéiques limitent l'efficacité de ces antibiotiques. La résistance de certaines souches est ainsi causée par une diminution de l'expression des gènes codant pour les porines (*Chow et Shlaes, 1991*). La taille ou la sélectivité des porines peut également être modifiée et aboutir à une exclusion des antibiotiques (*Nikaido et Rosenberg, 1981*).

I.3.4 Les systèmes d'efflux

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Ces pompes peuvent être des transporteurs « drogue-spécifiques » et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques. Tel est le cas des pompes Tet, qui effluent exclusivement les tétracyclines ou des pompes Mef, qui sont spécifiques des macrolides. Cependant, la plupart de ces transporteurs peut prendre en charge des composés de structures très différentes et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MDR : multi-résistance aux drogues) des bactéries vis-à-vis des antibiotiques. Les gènes, codant pour les pompes « drogue-spécifiques », sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui codent pour les pompes MDR sont, pour la plupart, chromosomiques (*Guinoiseau, 2010*).

Chez les bactéries Gram négatives, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites constitués d'une pompe transmembranaire, d'une protéine péri-plasmique de jonction (MFP : Membrane Fusion Protein) et d'une porine, enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protein).

Ces systèmes complexes à trois composants permettent le rejet des molécules depuis l'espace péri-plasmique ou cytoplasmique vers le milieu extérieur. La protéine d'efflux enchâssée dans la membrane interne est responsable de la prise en charge du substrat et constitue l'élément de pompage actif du système en couplant l'entrée de proton à l'évacuation du toxique. Les autres parties jouent essentiellement le rôle de canaux permettant d'évacuer les substrats vers le milieu extérieur.

Ces complexes protéiques sont plus ou moins spécifiques d'un substrat ou d'un groupe de molécules de structure similaire. Le complexe AcrAB-TolC retrouvé chez *E. coli* est capable de prendre en charge une grande variété d'antibiotiques : β -lactamines, quinolones, tétracyclines entre autres (*Quale et al, 2006*). Dans tous les cas le résultat est une diminution de la concentration de l'antibiotique au contact de sa cible et la perte de l'effet toxique sur le germe.

Tableau 1: Mode d'action et mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Classe	Antibiotiques	Mode d'actions	Mécanisme de résistance
Aminoglycosides	Amikacine, gentamicine, kanamycine, tobramycine, streptomycine	Se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et bloquent en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture.	Activation des systèmes d'efflux Diminution de la perméabilité Altération des ribosomes Modification enzymatiques des aminoglycoside
Bêta-Lactamines	Pénicillines (amoxicilline), ampicilline, oxacilline) céphalosporines (ceftiofur, céftazidime, ceftriaxone), carbapénèmes	Inhibent la synthèse du peptidoglycane par blocage de la transpeptidation	Bêta-lactamases, Altération des protéines liant les pénicillines
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine, acide nalidixique, gemifloxacine, lévofloxacine, sarafloxacine, norfloxacine	Les inhibiteurs de synthèse d'ADN, la cible primaire étant la topoisomérase II et IV	Perte des porines Pompe d'efflux Mutation de l'ADN gyrase/topoisomérase
Glycopeptides et glycolipopeptides	Vancomycine, teicoplanine	Les inhibiteurs de synthèse de la paroi cellulaire en ciblant les unités de peptidoglycane	Modification des précurseurs de peptidoglycanes (faible affinité aux protéines de liaison)
Lipopeptides	Polymyxine B	Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire en ciblant la membrane cellulaire	Mutations spontanées
Lincosamides	Lincomycine, clindamycine	Inhibiteurs de la synthèse des protéines en ciblant les ribosomes 50S	rRNA méthylases, efflux, gènes inactivateur
Macrolides	Erythromycine, azithromycin	Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction.	rRNA méthylases, efflux, gènes inactivateur
Phénicols	Chloramphenicol, florfenicol	Inhibition de la synthèse des protéines par blocage de la sous-unité ribosomale 50S ribosomes	Acétylation par acétyltransférases, phosphotransférases, Mutation des sites cibles Imperméabilité Efflux
Rifamycines	Rifamycine, rifapentine, rifampine	Inhibiteur de synthèse d'ARN en ciblant l'ARN polymérase dépendante de l'ADN	Mutations des gènes codant pour RNA polymérase

Streptogramines	Dalfopristine, pristinamycine, quinupristine	Inhibiteurs de la synthèse des protéines en ciblant les ribosomes 50S	rRNA méthylases, efflux, gènes inactivateur
Tétracyclines	Doxycycline, tetracycline, minocycline	Inhibiteurs de la synthèse des protéines en ciblant les ribosomes 30S	Pompe d'efflux, Protection des protéines ribosomal Inactivation enzymatique
Trimethoprim-sulfaméthoxazole	Co-trimoxazole	Inhibition de la synthèse de l'acide folique	Imperméabilité et/ou pompes d'efflux enzymes cibles naturellement insensibles; changements de régulation dans les enzymes cibles; changements par mutation dans les enzymes cibles; résistance acquise par des enzymes cibles résistant aux médicaments

(Langeveld et al, 2014)

I.4 Les approches alternatives anti-infectieuses

Les antibiotiques sont probablement les médicaments les plus utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Leur utilisation irrationnelle a engendré l'apparition de germes résistants à toute thérapeutique et qui représentent un grand risque autant d'un point de vue médical du fait que les infections occasionnées par ces germes peuvent s'avérer mortelles, que d'un point de vue économique, de par les coûts élevés engendrés.

Face à cette menace, il devient nécessaire de rechercher des thérapies alternatives anti-infectieuses. Plusieurs pistes sont envisageables, avec un regain d'intérêt particulier pour les médecines traditionnelles incluant les remèdes antimicrobiens de l'ère pré-antibiotique.

Ces nouvelles pistes thérapeutiques pourraient contribuer à restreindre le développement des résistances et leur dissémination (*Chavez- Gonzalez et al, 2016*).

Nous présentons ci-après les principales alternatives possibles en médecine vétérinaire :

I.4.1 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens incluent deux classes principales, les peptides de synthèse non ribosomale et ribosomale. La première classe incluent notamment les antibiotiques de la famille des polymyxines, bacitracines... ils sont synthétisés principalement par des bactéries, bien que leur spectre d'action soit assez réduit, ils sont utilisés toutefois dans le traitement de certaines affections.

Les peptides de synthèse ribosomale sont des peptides cationiques d'origine naturelle synthétisés par divers organismes procaryotes et eucaryotes (mammifère, insecte, amphibien, plante) en tant que mécanisme de défense innée.

A titre d'exemple, la peau de grenouille a été utilisée pendant des siècles en Amérique latine comme antimicrobien, elle contient un peptide de 24 acides aminés « bombinin » à la propriété hémolytique. Un autre peptide « melittin », extrait du venin d'abeille présente une bonne activité antimicrobienne mais n'a été pas exploité du part la nature toxique de cette défensine (*Hancock et Chapple, 1999*).

I.4.2 Les bactériophages

Les bactériophages constituent une variété particulière 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, période durant laquelle le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques n'a cessé de s'amplifier (*Guinoiseau, 2010*).

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.

I.4.3 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 bien connues et seule une minorité d'entre elles est explorée chimiquement, 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.

La rareté des maladies chez les plantes sauvages s'explique par l'élaboration d'un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes. Pour se protéger contre les bactéries, les champignons et les virus, les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (*Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons, 2008*). Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives.

Les huiles essentielles sont des molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, elles sont issues du métabolisme secondaire et ne participent donc pas directement à la croissance des plantes, mais leur fournissent une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes. Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices d'huiles essentielles. L'étude des huiles

essentielles pour la recherche de molécules à activité antibiotique semble donc être une voie prometteuse.

Le chapitre suivant consiste en une brève synthèse bibliographique sur les huiles essentielles, leurs propriétés et leur mode d'action.

Chapitre II : les huiles essentielles

Chapitre II : Les huiles essentielles

II. Les huiles essentielles

Une huile essentielle est définie par la pharmacopée européenne comme étant un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage (*Pharmacopée européenne, 2007*).

Les huiles essentielles sont des mélanges liquides très complexes constitués de dizaines, voire de centaines de molécules présentes à des concentrations parfois extrêmement faibles d'un rendement de l'ordre de 0,1 à 1%. Elles sont contenues dans toutes les parties du végétal, dans les poils sécréteurs de feuilles ou des pétales, les cellules du parenchyme, les poches à essences et le bois.

Les huiles essentielles sont en général liquides, elles ont une odeur très forte et sont volatiles, de couleur incolore, jaune ou parfois bleue. Elles sont insolubles dans l'eau, très altérables au contact de l'air et de la lumière (*Charpentier et al, 2007*).

II.1 Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieures, il existe environ 17500 espèces aromatiques. Elles possèdent de nombreuses propriétés et trouvent leurs emplois dans plusieurs secteurs ; elles constituent ainsi le support d'une pratique de soins de plus en plus répandue « l'aromathérapie », elles sont notamment et fréquemment utilisées en tant qu'antiseptique externe, par exemple contre les bactéries endocanalaies ou au niveau de la microflore vaginale ou contre les dermatophytes. Cependant, en raison de leur agressivité potentielle à l'encontre des muqueuses et de la peau, elles sont le plus souvent utilisées diluées dans un véhicule approprié (*Pellecuer et al, 1980 ; Viollon et Chaumont, 1993 ; Chaumont et al 1989 ; Sivropoulou et al, 1996*). Par ailleurs, elles sont employées pour l'aromatisation des médicaments administrés *per os*.

Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, 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 (*Zambonelli et al, 2004*).

Les huiles essentielles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales, végétale-animales et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs.

En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, allopathiques dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles (*Kurt, 1983 ; Croteau, 1987*).

Traditionnellement, les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de nombreux produits finis destinés aux consommateurs. Ainsi, elles sont utilisées dans l'agroalimentaire (gâteaux, biscuits, soupe, sauce, chewing-gum, chocolats, bonbons...) pour aromatiser la nourriture. Elles sont également utilisées dans l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. On les utilise aussi dans la fabrication des adhésifs (colle, scotch ...), de la nourriture pour animaux, et dans la préparation des sprays insecticides. L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage d'huiles essentielles en médecine douce, et leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années (*Bakkali et al, 2008*).

II.2 Procédés d'obtention des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances fragiles, rares, et précieuses. Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisantes.

II.2.1 Par entraînement à la vapeur

L'**hydrodistillation** (HD) est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une huile essentielle (*Meyer-Warnod, 1984*).

Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou broyé) dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau, les deux placés sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange

azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (*Bruneton, 2009*).

Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger.

La durée de l'hydrodistillation, de trois à six heures en fonction de la matière végétale à traiter, peut avoir une influence sur le rendement en huile essentielle et sur sa composition chimique (*Pharmacopée Européenne, 1997*).

La **distillation à vapeur saturée** est un procédé analogue à l'hydrodistillation. Toutefois, le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau ; il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau qui traverse le végétal ; ils sont ensuite séparés par décantation du distillat refroidi.

L'**hydrodiffusion** consiste à faire passer un flux descendant (du haut vers le bas) de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale.

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Par ailleurs, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et par conséquent à la réduction de la consommation de vapeur (*Venturini, 2012*).

II.2.2 Expression ou pressage à froid

Le procédé est utilisé uniquement pour l'obtention des huiles essentielles contenues dans les zestes d'agrumes (*Dugo et Di Giacomo, 2002*). Il s'agit d'un processus physique dans lequel les glandes à huile essentielle de la peau du fruit sont percées, broyées ou concassées mécaniquement afin de libérer l'essence. Cette méthode est économiquement plus rentable que l'hydrodistillation et permet d'éviter d'éventuelles dégradations thermiques.

II.2.3 Autres procédés

Le développement technologique a connu un essor considérable ces dernières années. C'est le cas pour l'hydrodistillation par micro-onde sous vide, au cours de laquelle, la plante fraîche est alors sélectivement chauffée par un rayonnement micro-onde dans une enceinte à pression réduite. L'huile essentielle est entraînée dans une vapeur d'eau propre à la plante traitée. Ce procédé a l'avantage d'être très rapide et consommer peu d'énergie,

l'huile essentielle obtenue est généralement de qualité supérieure à celle produite par l'hydro-distillation traditionnelle (**Bruneton, 2009**).

II.3 Composition chimique des huiles essentielles

La composition des huiles essentielles est très complexe, il existe deux types de composés chimiques :

- Les composés terpéniques ;
- Les composés aromatiques dérivés du phényl-propane.

II.3.1 Les composés terpéniques

Bien qu'une huile essentielle puisse contenir un grand nombre d'éléments biochimiques, les molécules les plus fréquemment rencontrées sont les terpènes les plus volatiles, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas très élevée : il s'agit des monoterpènes, et des sesquiterpènes, les principales molécules sont représentées dans le **tableau 2**.

Les sesquiterpènes présentent des variations structurales de même que pour les monoterpènes, l'allongement de la chaîne farnésyldiphosphate accroît le nombre des cyclisations possibles, d'où la très grande variété des structures connues (plus d'une centaine de squelettes a été décrit).

Tableau 2 : Les composés terpéniques et leurs dérivés

Monoterpènes (C ₁₀)	Acycliques	Monocycliques	Bicycliques
Alcools	Linalol (lavande) Géranol (rose)	Menthol (menthe) A-terpinéol	Bornéol (lavande, romarin)
Aldéhydes	Citral (citron, mélisse) Géranial		
Carbures	Myrcène Ocimènes	Limonène (citron) Terpinène Cymène	A et β pinène (essence de térébenthine) Sabinène (sabine)
Cétones	Tagétone	Menthone (menthe poivrée) Carvone (carvi, menthe douce)	Camphre (camphrier) Thuyone (thuya, absinthe)

		Pulégone (menthe pouliot)	
Ether-oxyde		Eucalytol, (eucalyptus)	
Peroxydes		Ascaridole (chénopode)	
phénols		Thymol (thym) Carvacrol	
Sesquiterpènes (C₁₅)	Acycliques	Monocycliques	Bicycliques
Carbures		B-Bisabolène	B-Caryophyllène
Alcools	Farnésol (tilleul)		Carotol
Cétones	Nootkatone		

(Charpentier et al, 2007, Bruneton, 2009)

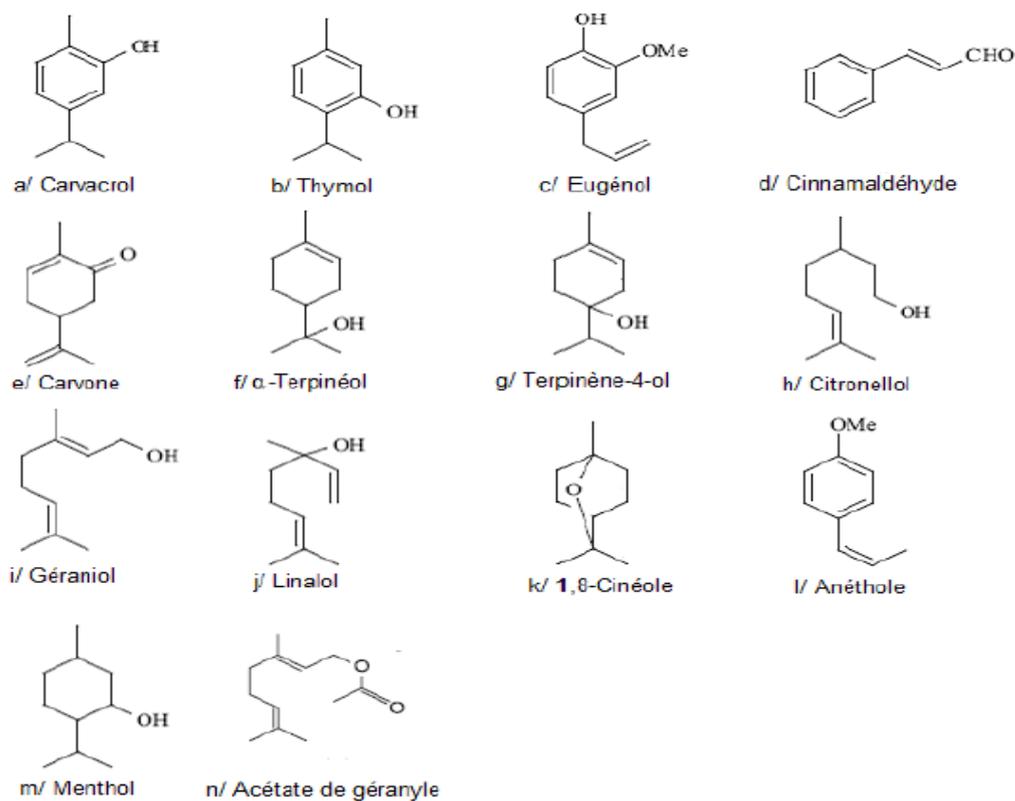


Figure 4: Principaux composés impliqués dans l'activité antibactérienne des huiles essentielles (Kalemba et Kunicka, 2003)

II.3.2 Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les précédents, ils sont retrouvés dans certaines huiles essentielles d'*Apiaceae* (anis, fenouil, persil...) mais aussi celles du clou de girofle, de la muscade, de la cannelle, ils sont aussi rencontrés dans la vanille.

Les principaux dérivés du phénylpropane sont présentés dans la **figure 5** :

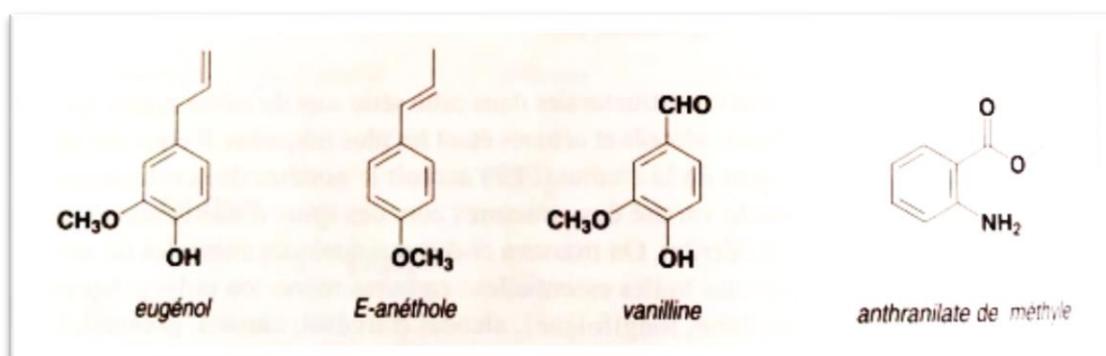


Figure 5 : Principaux composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Bruneton, 2009**).

Il est à noter, qu'au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* possédant six chémotypes différents. Ces différences résident au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit le géraniol, l'exterpinéol, le thuyanol-4, le linalool, le carvacrol ou le thymol (**Thompson et al, 2003**). Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces: *Origanum vulgare* (**Mockute et al, 2001**), *Mentha spicata* (**Edris et al, 2003**) en sont des exemples. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

Cette variabilité est influencée par plusieurs facteurs liés au cycle végétatif de la plante, ou alors le procédé d'obtention de l'huile, en effet, la labilité des constituants explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations et des oxydations (**Bruneton, 2007**).

II.4 Les méthodes de séparation, d'identification et de quantification

L'analyse d'un mélange complexe d'une huile essentielle s'effectue généralement par le couplage d'une technique chromatographique, la chromatographie en phase gazeuse CPG (« Gas Chromatography » GC) pour la fraction légère et la chromatographie liquide à haute performance CLHP (« High Performance Liquid Chromatography » HPLC) pour la fraction lourde, avec une technique d'identification spectrale, consistant en la spectrométrie de masse SM (« Mass Spectrometry » MS) (*Joulain, 1994 ; Marriott et al, 2001*). En routine, l'analyse se fait sur l'huile essentielle globale ou l'extrait brut, cependant, des difficultés d'identification peuvent être rencontrées pour certains constituants, dans ce cas, un fractionnement de l'échantillon devient nécessaire, la spectrométrie à résonance magnétique nucléaire (RMN) est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques ; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules (*Günther, 1994*).

L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de permettre l'identification des connexions entre atomes des diverses entités tout en les situant dans l'espace les uns par rapport aux autres (*Platzer, 2002*).

Nous reprenons ci-après la technique de chromatographie en phase gazeuse/spectrophotométrie de masse, méthode habituellement utilisée pour le fractionnement et l'identification des composants des huiles essentielles.

II.4.1 Chromatographie en phase gazeuse

La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (*Arpino et al, 1995*). Cette technique de séparation permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des composés volatils (*Mastovská et Lehotay, 2003*).

La CPG associée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF) permet une analyse quantitative sur la base de l'aire de chaque pic chromatographique par rapport à l'aire totale

des signaux et une analyse qualitative sur la base des temps de rétention. Ces derniers, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre en fonction des conditions expérimentales et, notamment, du fait du vieillissement des colonnes. Ainsi, pour une colonne donnée, chaque composé est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (*Kováts, 1965*) ou en programmation de température (indices de rétention) (*Van den Dool et Kratz, 1963*). Cependant, une reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques.

Les nombreux cas de coélution tendent à montrer que la comparaison des indices de rétention et même la méthode des surcharges ne suffisent pas à identifier formellement un composé. Le développement de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans l'analyse des composés volatils (*Marriott et al, 2000, 2001*). La CPG bidimensionnelle (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec des composés présents en abondance plus forte. L'échantillon est injecté dans une précolonne, puis les composés coéluant sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés. Par ailleurs, l'utilisation des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) en CPG bidimensionnelle a permis de différencier des monoterpènes énantiomériques dans un mélange complexe (*Mondello et al, 2006*).

II.4.2 Chromatographie en phase gazeuse/ spectrophotométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG/SM) a été mise au point dans les années 1950. L'apparition des colonnes capillaires dans les années 1980 a conduit à un développement rapide des appareils de CPG/SM dans les laboratoires de recherche (*McLafferty et Michnowicz, 1992*). Les constructeurs proposent plusieurs types d'analyseurs de masse; les plus utilisés pour l'analyse des volatils sont le quadripôle et le piège à ions (« ion trap ») (*McLafferty et Tureček, 1993 ; De Hoffmann et Stroobant, 1999*). Les analyseurs quadripolaires linéaires sont, cependant, les plus répandus ; ils sont constitués de quatre barres cylindriques soumises deux à deux à un potentiel composé d'une tension continue U et d'une tension alternative $V\cos$. La modification du rapport U/V au cours du temps permet le passage des ions de masses croissantes (rapport masse/charge m/z) entre les barres selon une trajectoire sinusoïdale. Ce réglage des tensions permet de donner une

trajectoire stable aux ions pour qu'ils traversent le quadripôle ou une trajectoire instable afin qu'ils percutent les barres et soient détruits.

Par la suite, les multiplicateurs d'électrons et les photomultiplicateurs qui sont les détecteurs les plus courants, convertissent le faisceau d'ions et l'amplifient en signaux électriques utilisables par l'ordinateur. Les signaux sont visualisés sous forme de pics d'intensité variable et rangés sur une échelle de rapport masse/charge (m/z). Le mode d'acquisition des données « SCAN » permet de réaliser un balayage sur une gamme de masses prédéterminée conduisant à un chromatogramme reconstitué. Ce processus rend possible l'analyse qualitative de chaque composé. Toutefois, ce mode d'acquisition ne permet pas la quantification des composés analysés ; il est préférable d'utiliser le mode « SIM » (Selected Ion Monitoring) qui offre un gain important en sensibilité et qui est basé sur la sélection d'un nombre réduit d'ions pour chaque constituant.

La **figure 6** synthétise le principe de l'identification d'une HE par GC/MS.

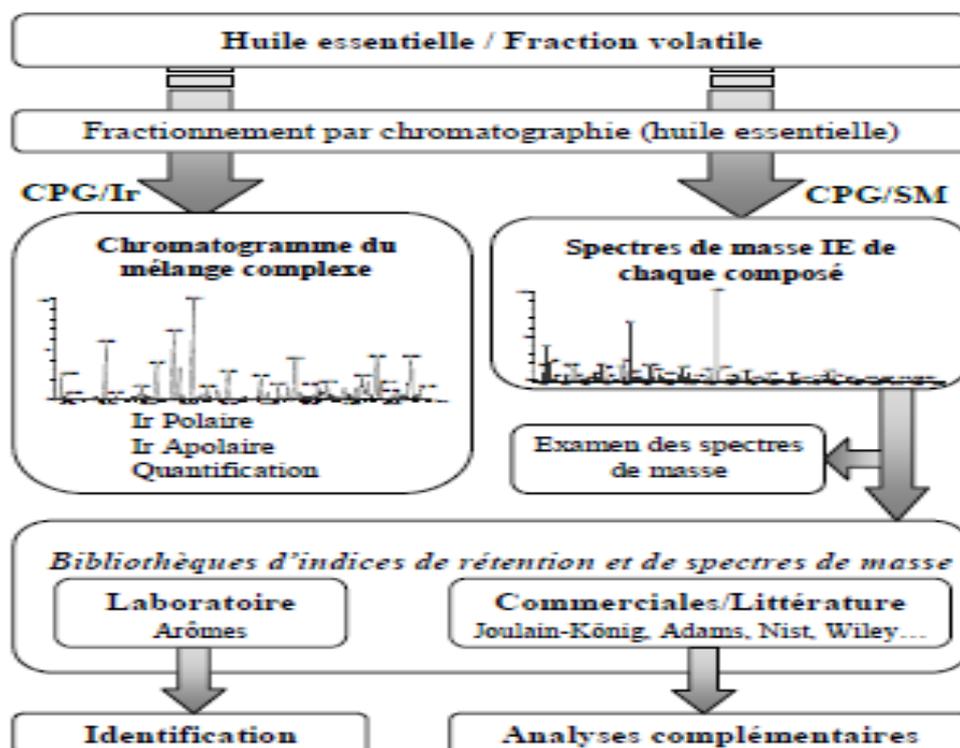


Figure 6 : Principe d'identification des constituants volatils d'une HE par CPG et CPG/SM

(Venturinno, 2012)

II.5 Toxicité des huiles essentielles

Bien que d'origine naturelle, l'utilisation des huiles essentielles n'est pas anodine, en effet, elles peuvent se révéler dangereuses pour la santé, elles peuvent ainsi s'avérer allergisantes, photosensibilisantes, cytotoxiques, irritantes, néphrotoxiques, hépatotoxiques, neurotoxiques...

II.5.1 Toxicité aiguë

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible, le **tableau 3** ci-dessous représente les DL50 des principales huiles essentielles.

Tableau 3 : DL 50 des principales huiles essentielles et de leurs constituants

Huiles essentielles/ Constituants	DL50	Effets toxiques
Anis, eucalyptus, girofle	2-5 g/kg	-
Camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver	> 5g/kg	
Basilic, estragon, hysope,	1-2 g/kg	Neurotoxicité
Origan, sarriette	1,37 g/kg	
Melaleuca, sassafras	1,9 g/kg	
Boldo	0,13 g/kg	Convulsions des 0,07 g/kg
Menthe pouliot (pulégone)	0,47 g/kg	Neuro/ hépato-toxicité
Carvacrol	0,81 g/kg	
Thuyones	0,2 g/kg	Neurotoxicité
Carvone	1,64 g/kg	
Camphre	1,47 g/kg	Convulsions épileptiformes
Eugenol	-	Hépa-toxicité

(Eisenhut, 2007 ; Bruneton, 2009)

II.5.2 Toxicité chronique

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue, du moins en ce qui concerne leur emploi thérapeutique, quel que soit le mode d'administration. Cependant, beaucoup de données expérimentales concernant leur emploi dans le domaine de l'agro-alimentaire en tant qu'arômes (épices, condiments...) sont disponibles, leur innocuité a pu être établie, les doses ingérées quotidiennement à cet effet étant très faibles (*Bruneton, 2009*).

II.5.3 Toxicité dermique

L'usage des huiles essentielles en application locale en cosmétologie ou dans un but thérapeutique (antiseptique), peut générer des irritations (moutarde, thym, origan, sarriette), des allergies voire de la photosensibilisation, c'est le cas de l'huile essentielle de cannelle et les essences d'agrumes (pamplemousse, citron...) qui sont photosensibilisantes, induisant des réactions épidermiques après exposition au soleil (*Couic-Marinié et Lobstein, 2013*).

II.5.4 Cytotoxicité

Les huiles essentielles de par leur composition complexe, semblent n'avoir aucune cible cellulaire spécifique (*Carson et al, 2002*). Leur nature lipophile leur permet de traverser la paroi cellulaire ainsi que la membrane cytoplasmique, ce qui perturbe ainsi la structure des différentes couches de polysaccharides, acides gras et phospholipides cellulaires et les perméabilisent.

Dans les cellules bactériennes, la perméabilisation des membranes est associée à une perte d'ions, un effondrement de la pompe à protons et l'épuisement du pool ATP (*Knobloch et al, 1989; Sikkema et al, 1994; Helander et al, 1998; Ultee et al, 2000, 2002; Di Pasqua et al, 2006; Turina et al, 2006*).

Par ailleurs, les huiles essentielles peuvent coaguler le cytoplasme (*Gustafson et al, 1998*) et endommager les lipides et les protéines (*Ultee et al, 2002; Burt, 2004*), ce qui conduit à la fuite de macromolécules et à la lyse cellulaire (*Juven et al, 1994; Gustafson et al, 1998; Cox et al, 2000; Lambert et al, 2001; Oussalah et al, 2006*).

Dans les cellules eucaryotes, les huiles essentielles provoquent une dépolarisation des membranes mitochondriales en diminuant le potentiel membranaire, affectent les pompes

inoniques et réduisent le pH (*Richter et Schlegel, 1993; Novgorodov et Gudz, 1996; Vercesi et al, 1997*).

Les membranes cellulaires altérées, deviennent anormalement perméables, et entraînent des fuites de radicaux, du cytochrome C, des ions calcium et des protéines, comme dans le cas du stress oxydatif. La perméabilisation des membranes mitochondriales externes et internes conduit à la mort cellulaire par apoptose et nécrose (*Yoon et al, 2000; Armstrong, 2006*). En général, l'activité cytotoxique des huiles essentielles est principalement due à la présence de phénols, d'aldéhydes et des alcools (*Bruni et al, 2003; Sacchetti et al, 2005*).

Certaines huiles essentielles peuvent s'avérer cytotoxiques pour les cellules animales et humaines. En effet, il a été démontré que les huiles essentielles d'origan, de différentes variétés, présentent une forte cytotoxicité sur des cellules humaines cancéreuses (*Sivropoulou et al, 1996, Chaouki et al, 2010*).

II.6 Propriétés des huiles essentielles

De par leur composition complexe, les Huiles Essentielles peuvent avoir de multiples propriétés pharmacologiques à la fois. Elles sont alors antiseptique, diurétique, tonique, antispasmodique, antirhumatismale, antitussive et autre.

En règle générale, chaque huile essentielle est caractérisée par la prédominance de deux à trois composés majoritaires constituant 20 à 70 % de l'huile essentielle. Selon *Bakkali et al (2008)*, ce sont eux qui leur confèrent leurs propriétés thérapeutiques.

Dans la littérature, seuls les constituants principaux de certaines huiles essentielles comme le terpinéol, l'eugénol, le thymol, le carvacrol, le carvone, le geraniol, le linalool, le limonène le safrole, le nerol, le citronellol, , l'eucalyptol, et le cinnamaldéhyde, ont été analysés. Généralement, les principaux composants reflètent assez bien les caractéristiques biophysiques et biologiques des huiles essentielles (*Ipek et al, 2005*). Ainsi, les fonctions synergiques des diverses molécules contenues dans une huile essentielle, par rapport à l'action d'un ou deux composants principaux semblent discutables. Cependant, il est possible que l'activité des composants principaux soit modulée par d'autres molécules mineures (*Franzios et al, 1997; Santana- Rios et al, 2001; Hoet et al, 2006*). En outre, il est probable que plusieurs composants des huiles essentielles jouent un rôle dans la saveur, la densité, la texture, la couleur et surtout la diffusion et la distribution cellulaire (*Cal, 2006*).

II.6.1 Les propriétés anti-infectieuses et de défense de l'organisme

Les molécules aromatiques possédant le coefficient antibactérien le plus élevé sont les phénols, ensuite viennent les aldéhydes et les cétones. Leur effet antibactérien s'avère parfois supérieure aux "antibiotiques" classiques. Les huiles essentielles d'origan, de thym, de sarriette, de cannelle ou de girofle sont dotées de fort pouvoir antiseptique, celles de pin, d'eucalyptus et de lavande le sont moins.

Les huiles essentielles exercent également d'un effet antiviral, en effet le virus de l'herpès est très sensibles aux molécules aromatiques, notamment les huiles essentielles d'*Artemisia arborescens* et de *Melissa officinalis*, *Mentha spicata* et *Cymbopogon citratus* qui présentent des effets notables notamment contre les souches résistante à l'acyclovir (*Edris, 2007*)

Les huiles essentielles sont aussi connues pour leur pouvoir antifongique, les principes actifs mis en jeu s'opposent ainsi au développement des champignons et les détruisent. Les alcools sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques présentent de bonnes propriétés antifongiques. Les huiles essentielles de cannelle, de clous de girofle, d'eucalyptus citronné, de géranium d'Egypte, de niaouli, de ravensare, du romarin à cinéole ou de sarriette sont de bons antifongiques.

Les huiles essentielles sont aussi pourvues d'un pouvoir antiparasitaire. La famille des phénols possède une action puissante contre les parasites, de même que les cétones et les lactones.

II.6.2 Les propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes

L'inflammation est une réponse de protection normale induite par une lésion ou une infection des tissus dont le but est d'éliminer la cellule hôte endommagée.

Dans la réponse inflammatoire, il y a une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales, l'afflux de leucocytes sanguins dans l'interstitium, un burst oxydatif et la libération de cytokines [Interleukines et facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α)]. Dans le même temps, il y a aussi une induction de l'activité de plusieurs enzymes (oxygénases, oxyde nitrique synthétase, peroxydases) ainsi que de celui du métabolisme de l'acide arachidonique. Dans le processus inflammatoire, il existe aussi l'expression cellulaire de molécules d'adhésion, telles que la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM) et la molécule l'adhésion vasculaire (VCAM).

En plus de la capacité de certaines huiles essentielles à éliminer les radicaux libres, une activité anti-inflammatoire leur est connue. Il en est ainsi pour l'huile essentielle de camomille longtemps utilisée comme anti-inflammatoire et aussi pour atténuer les symptômes associés à eczéma, dermatite et autres irritations prononcées. Par ailleurs, il existe d'autres exemples de huiles essentielles (eucalyptus, romarin, lavande, millefiori) ainsi que d'autres plantes (pin, clou de girofle et myrte) qui ont été utilisés dans des formulations mixtes comme anti-inflammatoires.

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles peut être attribuée non seulement à leur effet antioxydant mais aussi à leurs interactions avec des cascades de signalisation impliquant des cytokines et des facteurs de transcription et d'expression de gènes pro-inflammatoires (*Graça Miguel, 2010*).

II.7 Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé. 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 (**Figure 7**).

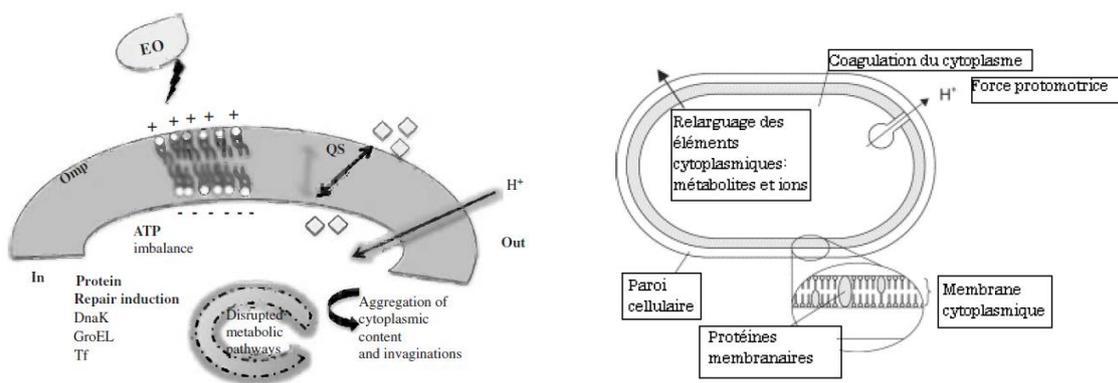


Figure 7 : Mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes
(*Burt 2004, Faleiro et Miguel 2013*)

II.7.1 Effet sur la paroi et la membrane plasmique

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle 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 et de composés intracellulaires (*Carson et al, 2002 ; Ultee et al, 2002*). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature, c'est le cas pour le carvacrol et le thymol qui semblent capables de détruire la membrane externe des bactéries Gram négatives, ils augmenteraient ainsi la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (*Helander et al, 1998*). Par ailleurs, une diminution de l'ATP intracellulaire est observée, ainsi qu'une diminution du potentiel membranaire.

L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles (*Trombetta et al, 2005*). Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. De plus, après avoir traversé la membrane, il peut interagir avec des sites intracellulaires. Le thymol entraîne une diminution de la taille des bactéries, une altération de la paroi bactérienne, une agrégation du cytoplasme et un rapprochement des cellules.

L'analyse ultra-structurale en microscopie électronique à balayage et en microscopie électronique à transmission a montré des changements sévères à modérés de la surface de plusieurs bactéries (*Aeromonas hydrophila*, bactérie Gram positif et négatif) suite à leur exposition à l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* de *Rosmarinus officinalis*.

L'exposition des *E. coli* aux huiles essentielles d'origan et de clous de girofle a été suivie par la formation de trous à la surface cellulaire, tandis que *Bacillus subtilis* a simplement présenté une malformation de sa surface lorsqu'il a été traité par ces mêmes huiles. Cette variabilité des effets des huiles essentielles sur les différentes bactéries peut s'expliquer par des différences structurales de la paroi cellulaire. D'autres études ont rapporté des résultats similaires, par exemple *Hafedh et al, (2010)* ont montré que le traitement avec l'huile essentielle de *Mentha longifolia* conduit à la formation de trous sur la surface d'*E. coli* et de

Salmonella enterica serovar *Typhimurium*. En revanche, *Micrococcus luteus* et *S. aureus* traités dans les mêmes conditions, n'ont présenté qu'une légère modification de leur paroi.

II.7.2 Effet sur le pH cellulaire

L'exposition des cellules bactériennes aux conditions qui compromettent leur survie conduit les cellules à adopter une série de stratégies pour accomplir les processus les plus essentiels, en particulier la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines et l'activité enzymatique; Le maintien du pH intracellulaire (pH_{in}) est crucial pour atteindre cet objectif. Une réduction significative du pH_{in} a été signalée dans les cellules bactériennes exposées aux huiles essentielles. En effet, les huiles essentielles étant lipophiles et hautement perméables aux lipides, peuvent provoquer un afflux de protons. Si le taux de protons dépasse la capacité de tampon cytoplasmique ou accable les systèmes d'efflux de protons, le pH_{in} diminue et les fonctions cellulaires essentielles sont compromises. La perturbation de l'homéostasie du pH par les huiles essentielles est une conséquence de leur action sur les membranes bactériennes, qui deviennent incapables de bloquer l'entrée de protons (*Faleiro et Miguel, 2013*).

A titre d'exemple, 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 permettant la fuite des ions (*Ultee et al, 2002*). En plus de limiter la croissance, le carvacrol est capable d'inhiber la production de toxines chez *B. cereus*. Deux hypothèses ont été évoquées: 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 (*Ultee et Smid, 2001*).

II.7.3 Effet sur le quorum sensing

L'expression des facteurs de virulence bactériens est consommatrice d'énergie car elle est associée à des activités métaboliques élevées. Aussi, la transcription des gènes de virulence est soumise à un système de régulation, désigné sous le terme de « quorum sensing ».

Le quorum sensing (QS) utilise les voies de la communication intercellulaire pour synchroniser l'expression de gènes cibles au sein d'une population bactérienne. Dans ce système, les bactéries peuvent évaluer leur densité de population via la synthèse et la

diffusion de molécules « signal », appelées auto-inducteurs. Ces molécules diffusent librement dans le milieu et peuvent transiter à travers la paroi et la membrane bactérienne. Lorsque leur concentration atteint un certain seuil, les auto-inducteurs se lient à des récepteurs bactériens intra-cytoplasmiques, qui sont des facteurs de transcription. La formation des complexes auto-inducteurs/ récepteurs active la transcription de certains gènes, dont les gènes de virulence.

Ainsi, par cette voie de communication, le QS permet de synchroniser et d'amplifier la virulence à l'ensemble de la population bactérienne et de moduler plusieurs processus cellulaires importants, comme la production du biofilm, la résistance au stress, la motilité et l'essaimage. Il devient donc une cible potentielle pour des applications dans différents domaines dont la médecine.

L'utilisation des plantes et de leurs extraits, notamment les huiles essentielles ont fait l'objet d'étude sur le quorum-sensing. Les méthodes employées pour l'étude des effets inhibiteurs sur QS consistent en l'évaluation de la bioluminescence de *Vibrio harveyi*, qui est médiée par 3-hydroxy-C4-HSL par la mesure de la transcription de HSL d'une part; et le contrôle de la production de violaceine, induite par le N-hexanoyl homoserine lactone dans la bactérie *Chromobacterium violaceum* CV026.

Les huiles essentielles les plus actives contre QS sont les huiles essentielles du clou de girofle, de géranium, lavande, rose, romarin et de poivre. En revanche, les huiles essentielles de camomille, de genévrier et d'orange n'ont pas montré d'activité anti-QS (Faleiro et Milguel, 2013).

II.7.4 Autres altérations

Les huiles essentielles peuvent entraîner également la diminution de l'activité enzymatique de certaines bactéries, comme c'est le cas de l'uréase chez *Klebsiella pneumoniae* sous l'action de *Cuminum cyminum* (Derakhshan et al, 2008). Par ailleurs des changements intra-cytoplasmiques avec la coagulation du cytoplasme, c'est le cas notamment des huiles essentielles d'origan et de cannelle sur *E. coli* and *S. aureus*.

*Chapitre III : Rappels sur le processus
de cicatrisation*

Chapitre III : Rappels bibliographiques sur le processus de cicatrisation

III. Rappels bibliographiques sur le processus de cicatrisation

III.1 Rappels physiologique de la peau

La peau et ses annexes constituent un tissu complexe recouvrant la surface de la plupart des mammifères, il est l'organe le plus lourd et le plus étendu du corps, chez l'Homme, et il représente 16% du poids vif soit environ 5kg (*Keith et Arthur, 2001*).

Son rôle principal est de constituer une barrière entre le milieu externe et interne du corps offrant ainsi une protection contre différentes agressions du milieu extérieur qui peuvent être mécaniques, chimiques, physiques ou encore biologiques, tout en assurant la thermorégulation de l'organisme. On lui connaît aussi un rôle métabolique, consistant en la synthèse de vitamine D, sans oublier qu'elle participe à la perception du monde extérieur par le sens du touché (*Kierszenbaum, 2006*).

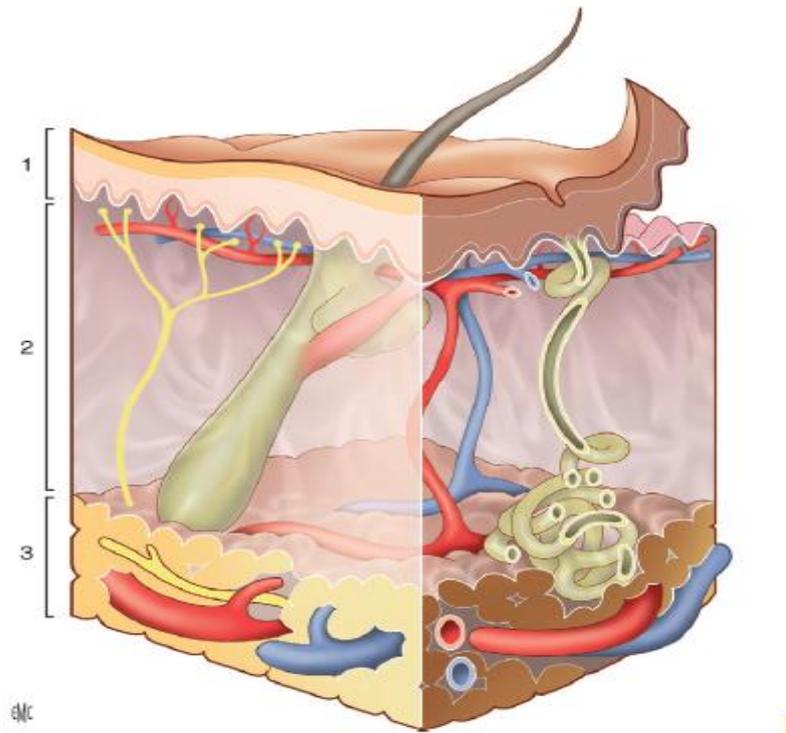
Le pH de la surface cutanée est acide, il se situe généralement entre 4 et 7. Cette acidité limite la multiplication des germes pathogènes tout en préservant le développement de la flore résidente, cependant il peut être modifié par la sueur qui contient certains composés acides comme l'acide lactique, l'acide undécylénique et l'acide urocanique.

La surface cutanée est colonisée en permanence par une flore commensale constituée de levures, de staphylocoques, de *Corynebacterium* et de *Propionibacterium*. Lorsque cette flore est déséquilibrée, des germes opportunistes peuvent s'y développer et provoquer des infections, il s'agit le plus souvent de staphylocoques dorés, de streptocoques et de levures.

Le film hydrolipidique, constitué d'eau provenant principalement des excréctions sudorales et de lipides émanant des sécrétions sébacées et des corps d'Oddland, joue principalement un rôle dans le maintien du pH cutané. Il permet, aussi, de maintenir la souplesse de la peau (*Stevens et Lowe, 1996*).

III.2 Rappels histologiques

La peau est composée principalement de 3 couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.



1- Epiderme 2- Derme 3- Hypoderme

Figure 8 : Schéma des couches de la peau (*Chaput et al, 2012*)

III.2.1 L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau, il s'agit d'un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux, orthokératosique, non vascularisé (*Prost-Squarcioni et al, 2005*).

La face superficielle de l'épiderme est plane, criblée d'une multitude d'orifices correspondant aux ostiums pileux et aux pores sudoraux. Par ailleurs, la surface épidermique est parcourue dans les régions palmo-plantaires de sillons et de crêtes correspondant aux dermatoglyphes.

L'épiderme est constitué de quatre types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (*Prost-Squarcioni, 2001*).

a. Les kératinocytes

Ils représentent 80 % des cellules de l'épiderme, Les kératinocytes assurent 3 rôles principaux:

- La cohésion de l'épiderme et sa protection contre les agressions mécaniques à l'aide de leurs cytosquelettes et de leurs puissantes jonctions ;
- Ils sont une barrière entre le milieu intérieur et extérieur et ceci après leur différenciation final en cornéocytes ;
- Assurent la protection contre les radiations lumineuses, grâce aux mélanosomes de stade IV qu'ils ont phagocytés (*Ishida-Yamamoto et al, 2002*).

b. Les mélanocytes

Ils représentent la seconde population de cellules les plus nombreuses de l'épiderme, elles proviennent des crêtes neurales et ont pour fonction la synthèse des mélanines, eumélanines et phéomélanines qui donnent à la peau sa couleur et offre également une protection contre le soleil (*Prost-Squarcioni, 2001*). Ils sont retrouvés au niveau de la couche basale.

c. Les cellules de Langerhans

Elles dérivent de la moelle osseuse et représentent 3 à 8% de la population cellulaire et sont localisées dans la couche spinieuse.

D'aspect dendritique le corps cellulaire est peu coloré avec des prolongements cytoplasmiques irréguliers qui s'insinuent entre les kératinocytes. Leur principale fonction est de capturer les exo-antigènes par la voie des endosomes, de les apprêter et de les ré exprimer en surface avec les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (*Valladeau, 2003*).

d. Les cellules de Merkel

Ce sont les cellules les moins nombreuses de l'épiderme, leur principale fonction est d'être des mécanorécepteurs et participer à la réception sensitive mais elles ont aussi des fonctions inductives et trophiques sur les terminaisons nerveuses périphériques et les annexes cutanées (*Tachibana, 1995*).

III.2.2 Le derme

D'origine mésoblastique, il est constitué par un tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins qui soutient l'épiderme et le rattache à l'hypoderme. Il contient les follicules pileux et les corpuscules tactiles. Il contient aussi des cellules dendritiques d'origine médullaire et est composé de 2 couches :

- La couche sous épithéliale superficielle, qui est richement vascularisée, les fibres de collagène forment un réseau lâche tandis que les fibres élastiques très fines sont perpendiculaires à la jonction dermo-épidermique.
- Une couche réticulaire profonde, où les fibres de collagènes très denses s'organisent en gros trousseaux horizontaux pénétrant dans le tissu graisseux de l'hypoderme, les fibres élastiques sont quant à elles enchevêtrées en plexus (fibres d'élaunine).

III.2.3 L'hypoderme

Situé en dessous du derme c'est un tissu graisseux, cloisonné par des travées conjonctivo-élastiques qui délimitent des lobules remplis de cellules adipeuses dont le nombre dépend de l'individu et de sa race.

Il contient les corpuscules tactiles de Vater Pacini et les glandes sudoripares ainsi que les racines des follicules pileux il est aussi parcouru par des vaisseaux plus volumineux que ceux du derme, localisés dans les cloisons ou septa.

III.2.4 Les annexes cutanées

Les annexes cutanées sont représentées par l'appareil pilo-sébacé. Il est constitué par les poils, les glandes sébacées et les glandes sudoripares.

III. 3 Les acteurs de la cicatrisation

III.3.1 Les cellules

a- Les plaquettes

Responsable de l'arrêt de l'hémorragie par la libération du contenu de leurs vésicules dans la lésion tout en provoquant le recrutement de nouvelles plaquettes et l'adhésion du collagène par l'intermédiaire de différents facteurs :

- Facteurs de croissance (Platelet Derived Growth Factor : PDGF +++; Transforming Growth Factor α et β :TGF α ; TGF β ; Insulin like Growth Factor 1: IGF1; Epidermal Growth Factor : EGF), activent les monocytes et les fibroblastes et stimulent leurs

activités de synthèse, contribuent à la néovascularisation et la formation de la matrice extracellulaire ;

- Facteurs chimiotactiques qui agissent sur les neutrophiles (activation de la cascade du complément) et stimulent les cellules endothéliales (expression de molécules d'adhésion spécifiques intercellulaires ELAM et ICAM...etc.) ;
- Facteurs de coagulation et les enzymes lysosomiales (hydrolase, élastase, protéase, collagénase...etc.) (*Le Pillouer-Prost et Coulomb, 2009*).

b- Les neutrophiles

Les neutrophiles sont responsables de la détersion et de la lutte antibactérienne non spécifique grâce à leurs propriétés de phagocytose, de sécrétion de radicaux libres oxygénés, de leurs enzymes lysosomiales. Ils sont attirés dans la plaie par chimiotactisme puis par diapédèse, ils sont activés par le GCSF et GM-CSF ; les intégrines, les sélectines et les molécules immunoglobuline-like jouent également un rôle majeur dans leur activation (*Le Pillouer-Prost et Coulomb, 2009*).

c- Les macrophages

Ils apparaissent après les neutrophiles de J3 à J5. Ils présentent l'antigène aux lymphocytes (phase détersivo-inflammatoire) et activent les fibroblastes (entre J3 et J4). Ils secrètent de nombreux facteurs de croissance et sont attirés par les facteurs chimiotactiques (TGF β , PDGF...etc.).

Les macrophages assurent la défense antibactérienne par production de protéases et du monoxyde d'azote (NO) (*Le Pillouer-Prost et Coulomb, 2009*).

d- Les lymphocytes

Ils jouent un rôle important dans l'immunité spécifique de J1 au 4^e mois et sont impliqués dans l'activation des macrophages par les cytokines et la production des lymphokines.

e- Les mastocytes

Ils sont également impliqués dans la formation du néocollagène et augmentent la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. Ils agissent essentiellement par l'intermédiaire de trois agents : l'héparine, l'histamine et le TNF. Ils jouent un rôle dans la différenciation des myofibroblastes (*Artuc et al, 2002; Le Pillouer-Prost et Coulomb, 2009*).

f- Cellules endothéliales

La néoangiogenèse sera stimulée par de nombreux facteurs, les plus importants sont: facteurs de croissance proangiogénique (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF); Fibroblast Growth Factor (FGF), TGF α et β , EGF).

g- Fibroblastes et myofibroblastes

Les fibroblastes sont les principales cellules du derme et les principales cellules responsables de la synthèse des éléments constitutifs de la matrice extracellulaire. D'origine mésenchymateuse, ils jouent un rôle est fondamental en termes de réparation tissulaire et de remodelage dermique. Dans une plaie, ils sont présents dès J2, attirés par les divers chémoattractants: fractions du complément, fibronectine, élastine, PDGF, TGF β , IL4 et IL10 (*Yamamoto et al, 2001*). Ils se lient à la matrice (rôle important des intégrines), y progressent grâce aux enzymes protéolytique et prolifèrent. Vers le 8^e jour, 50% des fibroblastes vont acquérir des propriétés contractiles et se différencier en myofibroblastes qui se multiplient, augmentant ainsi la densité cellulaire dans le tissu de granulation (*Amadeu et al, 2003*). Cette différenciation terminale est sous la dépendance de différents signaux : TGF β , forces mécaniques transmises (*Kessler et al, 2001*), quantité d'acide hyaluronique présent (*Park et Tsuchiya, 2002*) et est en partie responsable du phénomène de contraction des plaies (0.6mm/j). Des signaux ultérieurs vont initier l'apoptose de ces cellules durant la dernière phase de la cicatrisation, dès que l'épidermisation de la plaie est complète.

h- Kératinocytes et cellules souches épidermiques

Activés, ils changent de morphologie pour assurer leur fonction d'épithélialisation à partir des berges des plaies ou des réservoirs de cellules souches épidermiques (*Roh et Lyle, 2006 ; Barrandon et Green, 1987*). Leur migration est régulée par certains composants de la MEC.

Ainsi, la présence de fibronectine induit la migration et la présence de laminine est responsable de l'arrêt de la migration et du passage à la phase de prolifération et de différenciation des kératinocytes. Leur migration est aussi régulée par l'humidité de l'environnement, certains facteurs de croissance (EGF, TGF β) (*Coulomb et Dubertret, 2002*), l'expression de certains intégrines dont le rôle essentiel, dans l'épiderme intact, est d'assurer l'attachement des kératinocytes basaux à la membrane basale. Leur prolifération

est également régulée par des molécules diverses : facteurs de croissance (EGF, TGF β), INF et TNF α , et NO. Après réépithélialisation et fermeture de la plaie, les kératinocytes entrent dans leur dernière phase dite de « maturation » épidermique avec réapparition progressive des différents marqueurs de différenciation : kératines, filaggrine et lectine (*Le Pillouer-Prost et Coulomb, 2009*).

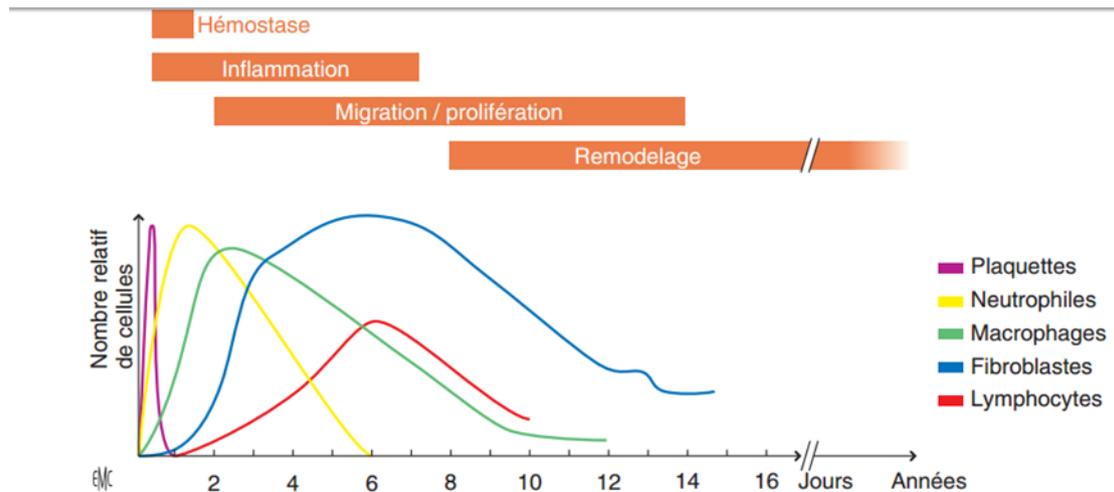


Figure 9 : Recrutement cellulaire et dynamique temporelle après blessure cutanée (*Le Pillouer-Prost et Coulomb, 2009*)

III.3.2 Les facteurs solubles

Ils représentent les facteurs de croissance et les cytokines, ils sont extrêmement nombreux et variés, nous n'en décrivons que les principaux impliqués dans le phénomène qui nous intéresse. Les cytokines sont de petites molécules, glycoprotéiques, impliquées dans la communication intercellulaire. Elles agissent en cascade sur des modes variés paracrines et autocrines.

Les facteurs de croissance sont produits par différentes cellules (essentiellement : les polynucléaires neutrophiles (PNN), les PQ, les macrophages et les fibroblastes).

Ils exercent, sur le site de la cicatrisation, par induction réciproque et en cascade, divers effets biologiques tels que : la chémoattraction, l'activation, l'inhibition, l'angiogenèse, la prolifération, l'induction de l'apoptose, etc. Leurs cellules cibles sont en priorité bien sûr les acteurs cellulaires de la cicatrisation : les PNN, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes. Pour certains, il s'agit de « familles » entières (FGF et EGF par exemple). Les plus impliqués dans la cicatrisation semblent être : PDGF, TGF α , TGF β (1,

2, 3), EGF, FGF, VEGF, KGF-1(FGF7), IGF-1, TNF α , IL1, GM-CSF, NGF, HGF (Cavaillon, 1993 ; Werner et Grose, 2003).

Les tableaux 4 et 5 présentent les principaux facteurs impliqués dans la cicatrisation ainsi que leurs principales fonctions.

Tableau 4 : Principales activités des facteurs de croissances au cours de la cicatrisation cutanée

	Cellules sources	Activité
TGF β	Plaquettes, macrophages, lymphocytes, fibroblastes	Prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales, synthèse de la matrice extracellulaire.
PDGF	Plaquettes, kératinocytes, cellule endothéliales, fibroblastes	Migration et prolifération des fibroblastes, synthèse de collagène, chimiotactique pour les neutrophiles et macrophage.
FGF2	Kératinocytes, fibroblastes, plaquettes	Angiogénèse, epidermisation
VEGF	Kératinocytes, macrophages, plaquettes	Angiogénèse
KGF	Fibroblastes	Migration et prolifération des kératinocytes
EGF	Plaquettes, kératinocytes, macrophages	Migration et prolifération des kératinocytes Prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales

(Senet, 2007)

Tableau 5 : Facteurs impliqués dans la migration et la prolifération des kératinocytes.

	Réépithélialisation (Migration)	Réépithélialisation (Prolifération)
Facteurs de croissance	Macrophage stimulating factor (MSF) Transforming growth factor-beta 1 (TGF-β 1)	Epidemal growth factor (EGF) Transforming growth factor-alpha (TGF-α) Keratinocytes growth factor (KGF) Granulocyte monocytes-colony stimulating factor (GM-CSF)
Intégrines	α3β1, α6β4, αóβ6	Aóβ3/β5, β4, β1
Composants de la matrice extracellulaire	Laminine 5	Laminines et collagènes
Métalloprotéases	MPP1,2,9,10	MPP3

(Le Pillouer-Prost et Coumomb, 2009)

III.4 La cicatrisation

La cicatrisation des plaies est l'interaction d'une cascade complexe d'actions cellulaires et biochimiques menant à la restauration de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des tissus lésés.

Les étapes de la cicatrisation d'une plaie correspondent à une succession d'événements à l'échelle microscopique initiés, orientés et soutenus par de nombreux médiateurs biochimiques tels que les cytokines et les facteurs de croissance. La succession et l'imbrication de ces événements est complexe (*Witte et Barbul, 1997 ; Broughton et al, 2006*).

Chacune de ces phases est caractérisée par des activités cellulaires spécifiques qui font progresser le processus de réparation selon une dynamique spatiotemporelle interactive encore mal élucidée.

Le déroulement naturel de la cicatrisation se décompose classiquement en 3 grandes phases : la phase de déterision, la phase de granulation et la phase de remodelage.

III.4.1 Phase vasculaire et inflammatoire (détersion)

Cette phase dure approximativement 48 heures. Après la formation d'une brèche vasculaire l'organisme va rapidement tenter de minimiser les pertes sanguines par la formation d'un thrombus faisant intervenir plusieurs mécanismes physiopathologiques, une vasoconstriction locale, suivie de l'adhésion des plaquettes au collagène vasculaire via le facteur von Willebrand (vWF) et la glycoprotéine Ib (située à la surface des plaquettes). Ce phénomène, associé à l'entrée en jeu de la thrombine, provoque l'activation des plaquettes qui libèrent alors le contenu de leurs granules et permet ainsi leur agrégation et la formation du clou plaquettaire (*Levy-Toledano et Dupuy, 1995 ; Guilin et Bezeaud, 1995 ; Alessi et al, 1995 ; George et al, 1995*).

Les facteurs de croissance et les cytokines libérés par les plaquettes activées ainsi que des facteurs du complément et des produits de dégradation de la fibrine sont responsables du recrutement et de l'activation de cellules impliquées dans les phénomènes inflammatoires, à savoir : des polynucléaires neutrophiles et des macrophages (*Lawrence, 1990*).

Les cellules endothéliales expriment à leur surface des sélectines P et E qui se lient aux intégrines exprimées à la surface des neutrophiles (*Freemont, 1998*). Ces derniers peuvent

alors se rendre sur le lieu de l'inflammation par diapédèse et y libérer des enzymes protéolytiques (collagénases et élastases) (*Volkert et al, 1992*) et des cytokines pro-inflammatoires (ayant un rôle dans le recrutement et la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes) (*Hubner et al, 1996*).

Les monocytes arrivent juste après les neutrophiles et se différencient en macrophages lorsqu'ils se trouvent dans le milieu tissulaire et se lient ensuite aux protéines de la matrice extracellulaire. Les macrophages sont responsables du nettoyage de la plaie par leur action phagocytaire, de la prolifération des fibroblastes, de la formation du tissu de granulation et de la production de collagène par la libération de cytokines : *Tumor necrosis factor α* (TNF- α), TGF- β , *Insulin growth factor 1* (IGF-1) et PDGF (*Lawrence, 1990*).

III.4.2 Phase proliférative (granulation)

Toute cicatrisation doit passer par un processus de réorganisation tissulaire orchestré par trois phénomènes importants : la prolifération des fibroblastes, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et la ré-épithélialisation.

Les cytokines produites par les macrophages et les plaquettes activées attirent les fibroblastes vers le site de l'inflammation où leur prolifération pourra avoir lieu, toujours sous la dépendance de ces cytokines mais aussi des fibroblastes déjà présents sur les lieux.

Ces fibroblastes synthétisent les composants de la matrice extracellulaire (collagène I et III, protéoglycanes et fibronectine). Ils participent aussi au remodelage de la matrice grâce aux métalloprotéinases (collagénase, gélatinase et stromélysine) et favorisent la migration des cellules endothéliales.

La différenciation de certains fibroblastes en myofibroblastes sous la dépendance des cytokines, des facteurs de croissance et des molécules de la matrice néoformée, facilite le rapprochement des berges de la plaie grâce à leurs propriétés contractiles (*Sappino et al, 1990*).

Cette fibroplasie aboutit à la formation d'un tissu de granulation.

Par ailleurs, le processus de néo-angiogenèse, sous la dépendance du bFGF (synthétisé par les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales), du TGF- β et de certains

composants de la matrice extracellulaire aboutit à la formation d'un réseau vasculaire non différencié (*Clark, 1993*).

III.4.3 Epithélialisation et remodelage

L'épithélialisation est l'avant dernière phase de la cicatrisation, durant ce processus, les kératinocytes se trouvant sur les berges de la plaie se multiplient puis migrent sur le tissu de granulation afin de le recouvrir. Ce phénomène de migration est possible grâce à l'action des récepteurs transmembranaires α - β hétérodimériques qui assurent la dissociation des hémidesmosomes. Des travaux ont aussi montré que les fibroblastes joueraient un rôle important dans la différenciation des kératinocytes : le *keratinocyte growth factor-1* (KGF-1) synthétisé par les fibroblastes, est un facteur activateur des kératinocytes (*Coulomb et al, 1989 ; Le Panse et al, 1996 ; Smola et al, 1993*)

Ces phénomènes de migration et de multiplication des kératinocytes sont possibles grâce à des substrats fournis par les métalloprotéases et certains composants de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène, la fibrine ou le plasminogène (*Geer et Andreadi , 2003*).

A la fin du processus de ré-épithélialisation, la fonction de barrière s'achève par les processus de remodelage, où les cellules remodelent la matrice extracellulaire par la mise en jeu de mécanismes complexes d'interactions cellulaire et moléculaire permettant la différenciation de l'épiderme et la réduction de la cellularité par la stimulation de l'apoptose des myofibroblastes et des endothéliocytes (*Desmoulière et al, 1995*). La proportion de fibroblastes présents dans le tissu de granulation diminue tandis qu'une structure collagénique prend progressivement le dessus (*Lawrence, 1998*).

III.4 Facteurs influençant la cicatrisation

La cicatrisation peut être influencée par plusieurs facteurs. Certains peuvent favoriser la cicatrisation, d'autres peuvent au contraire la retarder. En effet, un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques peuvent compromettre le déroulement de ces phases et entraîner un retard de cicatrisation ou la formation de tissus de mauvaise qualité (*Le Pillouer-Prost et Coumomb, 2009*).

III.5.1 Facteurs favorisant la cicatrisation

Le processus de cicatrisation peut être favorisé par des facteurs physiques, chimiques, ou encore biologiques (nutriments). Ces différents facteurs sont rapportés dans le **tableau 6** :

Tableau 6 : Facteurs favorisant la cicatrisation

Type de facteurs	Facteurs	Effet /Action
Physique	Thermique	Milieu chaud
	Pression partiel d'O ₂	Relativement pauvre
	Pression partiel de CO ₂	Relativement riche
	Hygrométrie	Milieu humide
	Pression total	Dépression
Chimique	pH	[5 ; 5,5]
Biologique	Acides aminés	
	Oligoéléments	Zn, Fe ...etc.
	Vitamines	A, C, E

(Le Pillouer-Prost & Coulomb, 2009)

III.5.2 Facteurs retardant la cicatrisation

Les retards à la cicatrisation sont fréquents chez les sujets exposés à certains facteurs de risques.

a- Stress

Un taux de cortisol élevé en présence d'une plaie en cours de cicatrisation, engendre l'apparition d'escarres (*Braden, 1990*). Par ailleurs, l'activation du système sympathique et la stimulation des phénomènes de vasoconstriction compromettrait la cicatrisation par hypoperfusion.

b- Les infections

La présence en grand nombre de germes potentiellement pathogènes ou directement pathogènes augmente les risques d'infection et provoque des retards de cicatrisation (*Rudensky et al, 1992*).

c- Les médicaments

Certains traitements peuvent provoquer des retards de cicatrisation par leurs effets anti-mitotiques : chimiothérapies ; ou anti-inflammatoires : corticoïdes à forte dose par voie systémique (*Howes et al, 1950*), anti-inflammatoires non stéroïdiens à forte dose (*Prosper et al, 1988*). Les radiothérapies aussi causent des retards de cicatrisations par altération du tissu irradié (hypoperfusion, fibrose et atrophie de la peau) (*Mustoe et Porras-Reyes, 1993*).

d- L'hypoxie et défaut de perfusion

L'hypoxie inhibe la phagocytose et augmente le nombre de germes dans la plaie; L'oxygène est nécessaire à la synthèse d'un collagène de bonne qualité; lors d'une hypoxie, le dépôt de collagène se ralentit et peut s'arrêter si l'hypoxie persiste tandis que sa destruction se poursuit de façon continue ce qui pourrait provoquer la réouverture de la plaie (*Stotts et Wipketevis, 1997*).

L'anémie n'entraîne pas de retard de cicatrisation tant que la volémie est préservée; ce n'est pas le cas de la nicotine (tabagisme) qui par vasoconstriction provoque l'adhésion des plaquettes et ainsi accroît le risque d'ischémie; le monoxyde de carbone se lie à l'hémoglobine ne laissant pas place à l'oxygène (*Heughan et al, 1972*).

e- La malnutrition

Les carences protéino-énergétiques altèrent toutes les étapes de la cicatrisation (risque d'infection, angiogenèse, remodelage...etc.); en cas de carences en hydrate de carbone, les protéines sont déviées de la synthèse du collagène vers la production de glucose indispensable à la phagocytose. Une carence lipidique n'altère la cicatrisation que si elle entraîne un déficit en vitamine liposolubles ou en acides gras essentiels.

La carence de la vitamine A altère la production des macrophages, retarde l'épithélialisation, diminue la production de collagène et sa maturation; il en est de même pour son excès qui altère la cicatrisation (*Pollack, 1984*).

La vitamine C à forte dose, a un effet positif sur la cicatrisation. La carence en vitamine K provoque des saignements et des hématomes (*Stotts et Wipketevis, 1997*).

Les oligoéléments tels que le zinc, le cuivre et le manganèse entrent dans la synthèse du collagène.

La malnutrition protéino-énergétique altère également la phagocytose, augmentant ainsi le risque d'infection (*Pollack, 1984, Albina, 1994*).

III.6 Rôle des plantes dans la cicatrisation

Le règne végétal, de par sa biodiversité, offre un immense potentiel thérapeutique particulièrement pour la prise en charge des plaies. En effet, diverses plantes sont utilisées en médecine traditionnelle et folklorique dans de nombreux pays pour le traitement des blessures et des brûlures induisant une guérison et une régénération des tissus par des mécanismes multiples. La richesse des plantes en métabolites actifs a incité les scientifiques à les explorer davantage dans le but de déterminer leurs composants et leurs potentielles propriétés en l'occurrence cicatrisante (*Nayak et Pereira, 2006*).

La valeur médicale des plantes réside dans leurs constituants phytochimiques actifs, appartenant à diverses familles chimiques comme les alcaloïdes, les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tanins, les terpénoïdes, les saponines et les composés phénoliques (*Edeoga et al, 2005*).

Différentes plantes, se sont vues attribuées diverses propriétés : antibactérienne, anti-inflammatoire, et cicatrisante. Le **tableau 7** résume les plantes médicinales dont les propriétés cicatrisantes ont été prouvées (*Logeeswari et Sripathi, 2012 ; Das et al ,2017*), malgré la multitude des rapports pharmacologiques, une majorité reste à explorer et les mécanismes d'action moléculaires devraient également être établis.

Tableau 7 : Répertoire des plantes ayant une activité cicatrisante

N°	Nom latin de plante	Partie de la plante étudiée	N°	Nom latin de plante	Partie de la plante étudiée
1	<i>Achillea biebersteinii</i> Afan	Parties aériennes	60	<i>Ocimum suave</i> Wild	Feuilles
2	<i>Achillea kellalensis</i> Bioss & Hauskn	Fleurs	61	<i>Rosmarinus officinalis</i> Linn	Huiles essentielles
3	<i>Achillea millefolium</i> Linn	Feuilles	62	<i>Salvia cryptantha</i> Montbr. and Aucher	Plante
4	<i>Ageratum conyzoides</i>	Feuilles	63	<i>Salvia cyanescens</i> Boiss	Plante
		Racines			
5	<i>Aspilia africana</i> C.D. Adams	Feuilles	64	<i>Salvia hypoleuca</i> Benth	Feuille et fruits
6	<i>Bidens pilosa</i> Linn	Feuille	65	<i>Salvia splendens</i> Sellow J.A.Schultes	Feuilles
7	<i>Blumea lacera</i> (Burn.f)DC	Plante entière	66	<i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl	Fleurs
8	<i>Calendula officinalis</i> Linn	Fleurs	67	<i>Teucrium polium</i> Linn	Fleur et miel
9	<i>Centaurea iberica</i> Trev ex Spreng	Partie aérienne	68	<i>Acalypha fruticosa</i> Forssk	Parties aériennes
10	<i>Centaurea sadleriana</i> Janka	Partie aérienne	69	<i>Acalypha indica</i> Linn	Plante
11	<i>Centratherum anthelminticum</i> (L.) Kuntz	Graines	70	<i>Acalypha langinia</i>	Plante
12	<i>Chromolaena odorata</i> Linn	Feuilles	71	<i>Baliospermum montanum</i> (Wild) Muell	Raciness
13	<i>Echinacea pallida</i> (Nutt)	Racines	72	<i>Bridelia ferruginea</i> Benth	Ecorce
14	<i>Elephantopus scaber</i> Linn	Partie aérienne	73	<i>Croton bonplandianum</i> Baill	Feuilles
15	<i>Flaveria trinervia</i> (Speng) C.Mohr	Feuilles	74	<i>Emblica officinalis</i> Gaerth	Fruits
16	<i>Gynura procumbens</i> (Lour.) Merr	Feuilles	75	<i>Euphorbia heterophylla</i> Linn	Feuilles
17	<i>Matricaria chamomilla</i>	Plante	76	<i>Euphorbia hirta</i> Linn	Plantes entières
18	<i>Siegesbeckia pubescens</i> Mak.	Plante	77	<i>Hevea brasiliensis</i> Mull.Arg	Latex

19	<i>Sphaeranthus indicus</i> Linn	Sommités fleuries	78	<i>Jatropha curcas</i> Linn	Ecorce
		Parties aériennes			Feuille
20	<i>Stevia rebaudiana</i> Bert	Feuilles	79	<i>Pedilanthus tithymaloides</i> Linn	feuilles
21	<i>Tagetes erecta</i> Linn	Feuilles	80	<i>Plectranthus tenuiflorus</i> (Vetke)	feuilles
22	<i>Tridax procumbens</i> Linn.	Feuilles	81	<i>Tragia involucrata</i> Linn	Racine
23	<i>Vernonia amygdalina</i> Delile	Feuilles	82	<i>Abutilon indicum</i> Linn	Fleurs
24	<i>Vernonia arborea</i> Hk	Feuilles	83	<i>Gossypium arboreum</i> Linn	Fleurs
25	<i>Vernonia arborea</i> Buch. Ham	Ecorce	84	<i>Gossypium herbaceum</i> Linn	Fleurs
26	<i>Vernonia scopioides</i> Schreb	Plante/ feuilles	85	<i>Hipiscus-rosa sinensis</i> Linn	Fleurs
27	<i>Wedelia trilobata</i> Linn	Feuilles	86	<i>Malva sylvestris</i> Linn	Fleurs
28	<i>Butea monosperma</i> Lam	Ecore de la tige	87	<i>Carallia brachiata</i> Merrill.	Ecorces
		Fleurs			
29	<i>Cassia fistula</i> Linn	Feuilles	88	<i>Pterospermum acerifolium</i> Wild	Fleurs
30	<i>Cassia tora</i> (L.) Roxb	Feuilles	89	<i>Sida acuta</i> Burm.f	Plante
31	<i>Centrosema pubescens</i> Benth	Feilles	90	<i>Sida spinosa</i> Linn	Feuilles
32	<i>Clitoria ternatea</i> Linn	Grains et racine	91	<i>Thespesia populnea</i> Linn	Fruits
33	<i>Colutea cilicica</i> Bioss and Balansa	Fruits et feuilles	92	Aloe vera	0.5% jus d'aloë vera
34	<i>Crotalaria verrucosa</i> Linn	Plante	93	<i>Andrographis paniculata</i>	Feuilles (extrait aqueux)
35	<i>Delonix regia</i> (Boj. Ex Hook.) Raf	Fleurs	94	<i>Annona squamosa</i> L.	Feuilles
36	<i>Desmodium gangeticum</i> L.(DC)	Parties aériennes	95	<i>Ageratina pichinchensis</i>	Plante entière
37	<i>Desmodium gyrans</i> (Linn.F)	Feuilles	96	<i>Arnebia densiflora</i>	Racine
38	<i>Glycyrrhiza glabra</i> Linn	Raciness	97	<i>Astragalus species</i>	Racine
39	<i>Indigofera asphalathoides</i> Vahl. exDC	Poudre	98	<i>Bridelia ferruginea</i>	Feuilles
40	<i>Mimosa pudica</i> Linn	Feuilles	99	<i>Calendula officinalis</i>	Fleurs

		Racines			
41	<i>Prosopis cineraria</i> (L.) Druce	Ecorce	100	<i>Centaurea iberica</i>	Partie aérienne
42	<i>Pseudarthria viscida</i> Linn	Plante entière	101	<i>Centella asiatica</i> L.	Plante
43	<i>Pterocarpus marsupium</i> Roxburgh	Bois	102	<i>Euphorbia caducifolia</i>	Latex
44	<i>Pterocarpus santalinus</i> Linn.f	Bois	103	<i>Haberlea rhodopensis</i>	Plante
45	<i>Pueraria tuberosa</i> (Roxb Ex. Wild) DC	Tubercule	104	<i>Hippophae rhamnoides</i> L	Graine
46	<i>Senna alata</i> Linn	Feuilles	105	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Partie aerienne et fleurs
47	<i>Sesbania grandiflora</i> Linn	Fleurs	106	<i>Morus alba</i> L	Racine
48	<i>Tamarindus indica</i> Linn	Graines	107	<i>Myrica rubra</i>	Plante entière
49	Tephrosia purpurea Linn	Partie aérienne	108	<i>Polygonum aviculare</i> L	Feuille
		Racines		<i>Psidium guajava</i>	Feuille
50	<i>Trigonella foenum graecum</i> Linn	Feuilles	109	<i>Rafflesia hasseltii</i>	Fleurs
		Graines et mile		<i>Sambucus ebulus</i> L	Feuille
51	<i>Coleus amboinicus</i> Lour.	Feuilles	110	<i>Wedelia trilobata</i> L	Feuille
52	<i>Coleus aromaticus</i> Benth	Feuilles	111		
53	<i>Hyptis suaveolens</i> Linn	Feuilles	112		
54	<i>Leonotis nepetaefolia</i> R.Br	Feuilles			
55	<i>Leucas hirta</i> B.Heyne ex Roth	Feuilles			
56	<i>Ocimum basilicum</i> Linn	Feuilles			
57	<i>Ocimum gratissimum</i> Linn	Feuilles			
58	<i>Ocimum kilimandscharicum</i> Guerke	Feuilles			
59	<i>Ocimum sanctum</i> Linn	Feuilles			

(Logeeswari et al, 2012 ; Das et al ,2017)

III.7 Métabolites actifs des plantes impliqués dans la cicatrisation

III.7.1 Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit au début du XIX^e siècle par Meisner (**Bruneton, 1999**), ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale. Leur composition chimique varie d'un alcaloïde à un autre, le seul point commun entre tous est la présence d'un azote (**Charpentier et al, 2007**).

Ils sont constitués à partir des acides aminés suivants : le tryptophane, la phénylalanine et l'ornithine. Plusieurs types d'alcaloïdes sont distingués en fonction du noyau qui les compose, qui leur confèrent des effets pharmacologiques divers, et des toxicités variées (**Richter, 1993; Pelletier, 1983**). A titre d'exemple, les alcaloïdes à noyau pyrolizidiniques sont dotés notamment de pouvoir cicatrisant (**Grosmond, 2012**).

III.7.2 Les tanins

Ce sont des composés phénoliques ayant la propriété de coaguler les albumines des muqueuses ou des tissus en créant une barrière isolante et protectrice. Ils rendent la peau imputrescible. Ils sont présents dans un grand nombre de familles comme les *rosaceae*, les *myrtaceae*, les *fabaceae*... ils peuvent se localiser dans la racine, le rhizome, les feuilles, le bois ou encore l'écorce (**Charpentier et al, 2007**). Ils sont solubles dans l'alcool et l'acétone, et sont doués de plusieurs activités: antibactérienne, antifongique, antivirale, anti-inflammatoire, anti-hypertensive, antimutagène, immunostimulante, anti-tumorale, anti-diarrhéique, inductrice de l'apoptose, anti-oxydante, catalytique, astringente (**Iserin, 2001**). Ils sont également vasoconstricteurs sur les petits vaisseaux et cicatrisants, expliquant ainsi leur emploi pour traiter hémorroïdes et les blessures superficielles.

III.7.3 Les saponosides

Ce sont des hétérosides constitués d'oses banals et/ou d'acide uroniques et d'une génine ou aglycone (appelée saponine), d'origine stéroïdique ou triterpénique. Ils possèdent un pouvoir aphrogène (pouvoir moussant plus ou moins important), hémolytique et des propriétés tensio-actives (diminution de tension superficielle). Ils peuvent s'avérer toxiques notamment chez les animaux à sang froid comme les poissons (**Charpentier et al, 2007**).

Ils sont pourvus d'un fort pouvoir antifongique à l'encontre de divers pathogènes tels que *Candida* et les dermatophytes dont l'action est la conséquence de l'interaction du saponoside avec les stérols membranaires des micro-organismes.

Bien que leur pouvoir antibactérien ne soit pas bien établi, un pouvoir antiviral leur est parfois attribué comme c'est le cas des saponosides de l'*Anagalis arvensis* (**Bruneton, 2009**).

III.7.4 Les terpénoïdes

Appelés aussi terpènes, ils forment une classe de substance naturelle organique résultant de l'association de maillon isopréniques (C₅H₈). Le menthol, le cédrène, le bêta-carotène, le camphre sont des exemples de terpène. Ce sont des médiateurs chimiques pour les plantes : ils jouent un rôle dans leur communication avec d'autres espèces, comme les insectes qu'ils attirent, repoussent ou paralysent. Ils exhalent aussi une variété de goûts et d'odeurs.

Les terpènes sont surtout reconnus pour leurs actions drainantes lymphatiques, stimulantes, anti-infectieuses, antiseptiques et antitussives (**Mayer, 2012**).

III.7.5 Les composés phénoliques

Comme la majorité des métabolites secondaires, les polyphénols et essentiellement les flavonoïdes sont synthétisés pour accomplir certaines fonctions lors du développement de la plante. En terme de fonction protectrice, ils défendent la plante contre les pathogènes tels que les moisissures, les champignons et les bactéries. Ils assurent sa protection contre le rayonnement ultraviolet. Certains d'entre eux sont des répulsifs qui inhibent la croissance d'autres espèces. Les polyphénols jouent un rôle structural comme la lignine constituant la rigidité du bois (**Buchanan et al, 2000 ; Druyne, 1999**). Ils participent à la coloration des fleurs et des fruits à fin d'attirer les insectes pollinisateurs (**Buchanan et al, 2000**).

Les polyphénols peuvent être répartis en deux classes majeures : les flavonoïdes et les non flavonoïdes :

La classe des non flavonoïdes contient plusieurs composés chimiques, parmi lesquels: les acides phénoliques, les stilbènes hydroxylés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthonnes.

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques. A présent plus de 6000 composés ont été identifiés soit environ 50% des polyphénols.

Ces composés ont une structure de base formé de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique (**Lobstein, 2010**).

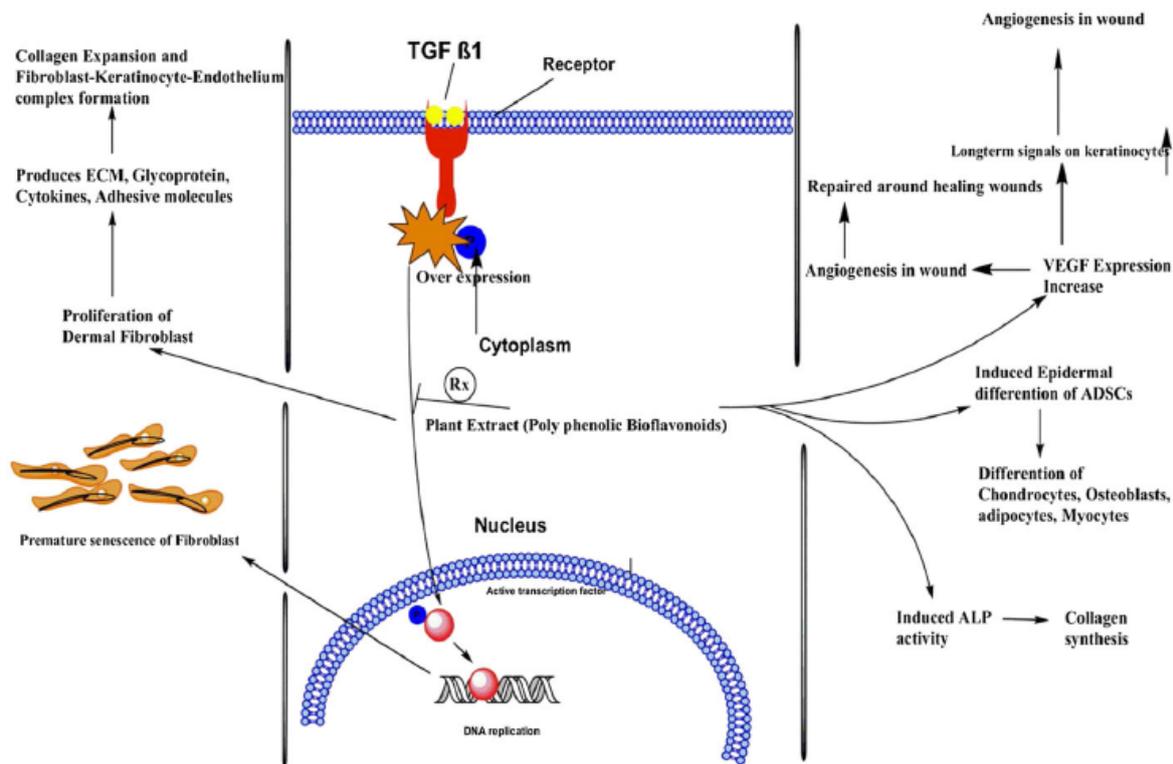


Figure 10 : Implication des extraits de plantes dans le processus cicatriciel (Das et al, 2017).

Figure 10 : Les extraits de plantes riches en polyphénols induisent la guérison des plaies : Le TGF-β1 exprimé en excès provoque une sénescence prématurée des fibroblastes humains. En présence des extraits de plantes, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est activé, ce qui provoque des signaux prolongés sur les kératinocytes pour augmenter l'angiogenèse dans le site blessé. Par ailleurs, le VEGF active l'expression de la glycoprotéine de la matrice extracellulaire pour se réparer autour de la plaie. La prolifération induite du fibroblaste dermique, produit par conséquent ECM, glycoprotéines, cytokines et molécules adhésives pour l'expansion du collagène et la formation du complexe fibroblaste-kératinocytes-endothélium, L'activité de la phosphatase alcaline (ALP) augmentent la synthèse du collagène (Das et al, 2017).

Partie expérimentale

Partie expérimentale I :
Etude des activités antibactériennes des
huiles essentielles

I. Etude des activités antibactériennes des huiles essentielles

I.1 Problématique & Objectifs

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus importants dans les arsenaux thérapeutiques des médecins et des vétérinaires. Ils ont ouvert la voie de la médecine moderne et ont considérablement réduit le nombre de décès dus aux maladies infectieuses depuis leur introduction il y a plus de 70 ans. Ils ont permis d'avoir des animaux en bonne santé, en particulier les animaux d'élevage et ainsi produire l'alimentation protéinique nécessaire pour nourrir l'humanité.

Par ailleurs, l'utilisation immodérée et souvent inappropriée des antibiotiques chez les animaux d'élevage, (que cela soit à visée thérapeutique, prophylactique, ou facteur de croissance afin de stimuler les performances zootechniques) a contribué largement à la sélection de bactéries résistantes, à l'origine d'un fléau médical « l'antibio-résistance ».

L'antibio-résistance constitue sans doute l'un des défis médicaux majeurs de notre siècle, les infections causées par les micro-organismes résistants aux antibiotiques sont responsables annuellement du décès de 25 000 patients et d'un surcoût des soins de santé et de perte de productivité d'1,5 milliard d'euros. En conséquence, les antibiotiques doivent être perçus comme un véritable bien commun qu'il importe de préserver car ils sont indispensables à la santé humaine et animale (*OMS, 2016*).

Dans cette perspective, des efforts sont consentis mondialement en adoptant un certain nombre d'approches basées principalement sur la sensibilisation du public, l'amélioration des infrastructures sanitaires, imposant des réglementations strictes en matière de prescription d'antibiotiques, l'abolition de l'usage non-thérapeutique des antibiotiques notamment dans le secteur de l'agriculture et l'alimentation animale.

Aussi, au vu du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antimicrobiens de demain devront viser de nouvelles cibles d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses, le développement de vaccins bactériens, l'utilisation des bactériophages, les probiotiques constituent des exemples... mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme l'une des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives.

Par conséquent, notre travail a eu pour objectif la valorisation de la flore végétale algérienne, en caractérisant d'une part, l'action antibactérienne de molécules issues des substances naturelles en l'occurrence les huiles essentielles, notamment sur les germes multi-résistants aux antibiotiques, en particulier sur des souches productrices de β -lactamases d'origine animale et en étudiant d'autre part un potentiel effet synergique de l'association d'antibiotiques classiques à l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

L'ensemble de l'étude a été réalisé au niveau du Laboratoire de Recherche « Santé & Productions Animales », situé à l'ENSV d'Alger.

Les résultats obtenus ont donné lieu à une publication intitulée : « Antibacterial activity of *Mentha pulegium* essential oil against avian isolated ESBL producing bacteria and its synergistic potential with Antibiotics », publiée par International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (Juin 2017).

I.2 Matériels, Appareillages & Réactifs

I.2.1 Appareillage

- Broyeur Kinematica© AG model Microtron 550
- Chauffe ballon Wise Therm Healing mantle ©
- Balance de précision Kern © (d=0,001g)
- Distillateur GFL©-2008.
- Spectromètre de masse Hewett Packard Agilent modèle 7890/5975 C
- Spectromètre avec détecteur d'ionisation flamme Hewett Packard Agilent modèle 6890
- Autoclave Sanoclav©
- Chambre UV (Ultra Violet Products, UK).
- Spectrophotomètre Shimadzu modèle UV-1800
- Vortex (Technokartell TK3S)
- Bain marie (Julabo Sw 22)
- Incubateur /étuve (Memmert)
- Compteur de colonie Bioblock scientific 50971.

I.2.2 Matériels de laboratoire

- Verrerie
- Clevenger
- Pipettes automatiques permettant la distribution de volumes de 10 à 1000µl.
- Pipettes automatiques permettant la distribution de volume de 2 à 10 ml.
- Embouts pour micropipettes.
- Tubes à essais gradués coniques de 50 ml.
- Tubes à essais à usage unique.
- Portoirs pour tube.
- Bêchers.
- Eau distillée
- Eau physiologique
- Gants en latex
- Pipettes graduées
- Disque de papier wattman (Biorad)
- Boîte de Pétri
- Microplaque de 96 puits (Nunc).

I.2.3 Milieux et réactifs chimiques

- Bouillon Muller Hinton (Conda, Madrid, Espagne)
- Gélose Muller Hinton (IPA)
- Gélose nutritive (IPA)
- Tween 80 (sigma-Aldrich- France))
- Disques d'antibiotiques vierges (Biorad)
- Antibiotique lyophilisé
- 3- 4.5-dimethylthiazol-2-yl-2.5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (sigma Aldrich-Saint Louis- USA)

I.2.4 Les souches bactériennes

Les souches bactériennes de référence de la collection American Type Culture Collection ATCC ont été utilisées : *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Par ailleurs, des souches bactériennes (différents genres et espèces) de provenance animale, fournies par l'Institut de Médecine Vétérinaire d'Alger ont également été étudiées. Des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi, isolées dans le cadre d'un projet de recherche, ont également été incluses dans l'étude.

Leur culture a été réalisée sur gélose nutritive : Muller Hinton agar ou Muller Hinton bouillon à 37° C.

I.2.5 La matière végétale

Huit plantes aromatiques ont été sélectionnées suite à une étude ethnobotanique réalisée préalablement, visant à identifier les plantes qui auraient potentiellement une action antimicrobienne et/ou antiseptique en se basant sur leur usage en pharmacopée traditionnelle.

Le tableau ci-dessous (*Tableau 1*) présente les lieux et périodes de récolte des plantes étudiées.

Tableau 1 : Lieu et période de récolte des plantes étudiées

Nom vernaculaire	Nom en Arabe	Nom en berbère	Nom latin	Période de récolte	Lieu de récolte
Menthe pouliot	فليو (fliou)	Felgou	<i>Mentha pulegium</i>	Juin 2014	Wilaya de Bejaïa
Sauge officinale	النبي سواك	Swak Ennebi M'rimiya Agurim	<i>Salvia officinalis</i>	Septembre 2014	Wilaya d'Alger
Lavande sauvage	الخزامة	Amezzir	<i>Lavandula stoechas</i>	Juin 2014	Wilaya de Bejaïa
Laurier noble	الرنند	Rend	<i>Laurus nobilis</i>	Juin 2014	Wilaya d'Alger
Thym	الزعرتر	Tazaartart	<i>Thymus fontaneseii</i>	Juin 2014	Wilaya de Bejaia
Citronnelle	-	-	<i>Cymbopogon citratus</i>	Juin 2014	Wilaya d'Alger
Genévrier de Phénicie	العراعر	Arer , ayfez	<i>Juniperus phoenicea</i>	Septembre 2015	Wilaya de Ain-Temouchent
Armoise blanche	الشيح	Chih	<i>Artemisia herba alba</i>	Mai 2016	Wilaya de Djelfa

Les parties aériennes des plantes étudiées ont été séchées à l'ombre pendant 15 jours, elles ont été conservées ensuite à l'abri de l'humidité et dans l'obscurité jusqu'à leur distillation.

Des fiches ethnobotaniques ont été établies pour chaque plante étudiée (cf. annexe).

Les plantes ont été identifiées par le Département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger. Un spécimen de chaque plante a été conservé au niveau de l'herbier du Laboratoire de Recherche de Santé et Productions Animales.

I.3 Méthodes

I.3.1 Extraction et analyses des huiles essentielles

a- Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites par hydro-distillation. Pour ce faire, les parties aériennes séchées de chaque plante ont été coupées et grossièrement broyées, pesées et mises dans un ballon à fond rond. Ce dernier a été rempli au 2/3 (environ 1,5 l) d'eau distillée.

Le ballon a été rattaché à un appareil de distillation de type Clevenger, et placé dans un chauffe ballon. La distillation a duré entre 2 et 3 heures en fonction de la plante traitée.

A la fin de l'opération, les huiles essentielles ont été récupérées, et stockées dans des flacons ambrés à l'abri de la lumière à 4°C.

b- Analyse par chromatographie en phase gazeuse / détecteur ionisation à flamme (GC/FID)

Seules les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Thymus fontanesei* ont été analysées pour ce travail.

Les huiles essentielles ont été analysées sur un chromatographe gazeux avec détecteur d'ionisation de flamme argonomique (GC-FID) modèle 6890 (Hewlett Packard), équipé d'une colonne apolaire (DB5 MS: 20 m de longueur 0,18 mm de diamètre intérieur 0,18 µm d'épaisseur de film), programmé à partir de 50 ° C (3,2 min) à 300 ° C à 10 ° C / min.

La température de l'injecteur était de 280 ° C. L'huile essentielle a été diluée dans de l'acétone à 4% (v / v) et 2 µL ont été injectés en mode fractionné (1/120).

L'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur (1,1 ml / min).

c- Chromatographie gazeuse / spectrophotométrie de masse

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée au Spectromètre de masse, GC/MS, permet la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires, elle donne des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon analysé.

La spectrométrie de masse a été effectuée sur un chromatographe couplé à un spectromètre de masse Agilent (GC / MS) modèle 7890/5975 C (Hewlett Packard), programmé dans les mêmes conditions que pour la GC-FID (comme décrit ci-dessus). L'huile essentielle a été diluée dans de l'acétone à 4% (v / v) et 2 µl ont été injectés en mode divisé (1/150).

L'hydrogène a été utilisé comme gaz porteur (1,1 ml/ min).

Les données spectrales de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans la gamme de masse 33-550.

Les pourcentages ont été calculés à partir des surfaces de pics donnés par le GC / FID sans l'utilisation de facteur de correction.

Les composants de l'huile ont été identifiés par une recherche combinée des temps de rétention (bibliothèque de laboratoire) et des spectres de masse (documents de bibliothèque NIST et Adams).

I.3.2 Méthodes microbiologiques

a- Evaluation l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque

Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle donne lieu à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique utilisée est une variante de la méthode de **Bauer et al, (1966)**. Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé de l'huile essentielle, sur un tapis bactérien en phase de croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, est ainsi déterminé.

Pour ce faire, les bactéries utilisées à cet effet, ont d'abord été cultivées sur gélose nutritive à 37 °C pendant 18 à 24 h. Quelques colonies de chaque souche bactérienne ont été transférées

dans de l'eau physiologique et les suspensions bactériennes obtenues ont été ajustées à 1×10^7 CFU / ml correspondant au 1/10, v / v 0,5 de Mc Farland standard (*Lima-Filho et De Aguiar Cordeiro, 2014*).

Les géloses Muller Hinton ont été ensuiteensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile à la façon d'un antibiogramme.

Par la suite, des disques stériles de 6 mm Ø et imprégnés de 15 µl huile essentielle ont été placés à la surface des boîtes de Pétri. Le contrôle négatif a été préparé en utilisant une solution d'eau et de tween 80 à une concentration de 0,01%. Des antibiotiques de référence ont été utilisés comme témoin positif pour chaque souche testée (gentamicine/ imipènème).

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Tous les essais ont été réalisés en triplicate.

L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant le rayon des zones d'inhibition.

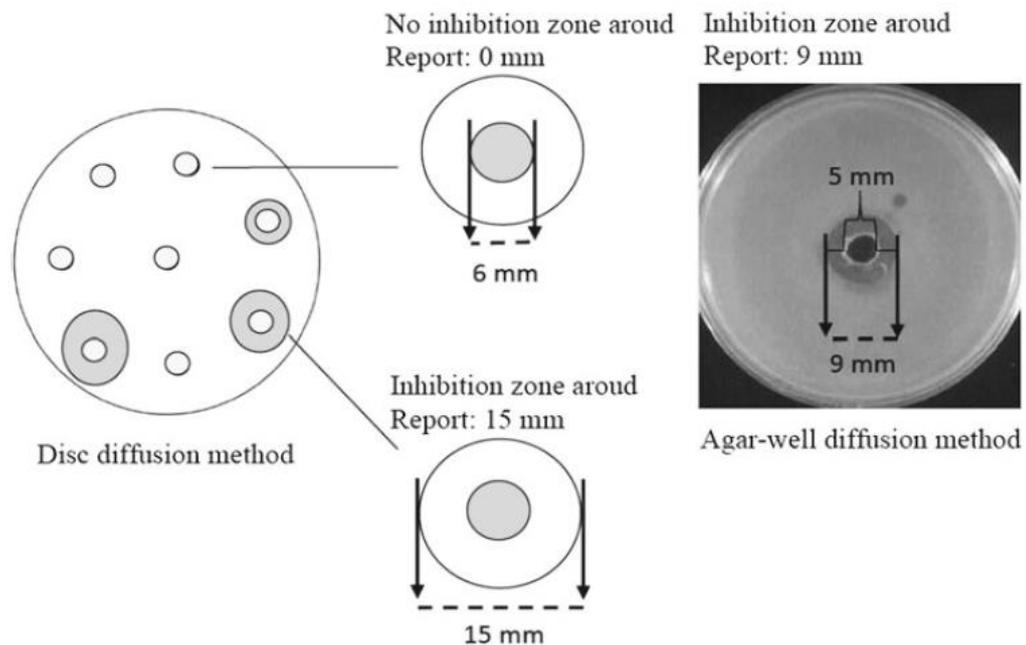


Figure 1 : Activité antibactérienne par diffusion sur gélose (*Lima-Filho et De Aguiar Cordeiro, 2014*).

b- Détermination de la concentration minimale inhibitrice par microdilution

La technique consiste à ensemercer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Seules les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Thymus fontanesei* ont fait l'objet des tests de CMI, CMB et du time kill assay (cf. ci-dessous).

Seules les souches ayant présenté une bonne sensibilité à ces huiles ont été sélectionnées pour les tests précités.

Les CMI ont été déterminées sur une microplaque à 96 puits selon la méthode de microdilution décrite par Eloff avec quelques variations (*Eloff, 1998*). Les huiles essentielles de menthe et de thym ont été dissoutes dans du bouillon Muller Hinton additionné de tween 80 à la concentration de 0,01%. Des dilutions au demi ont ensuite été effectuées de façon à générer une gamme de concentration variant de 18,56 mg / ml à 0,036 mg / ml. 100 µl d'une culture en croissance active des souches bactériennes testées ont été ajoutés à chacune des dilutions, la microplaque a été scellée et incubée 18 h à 37 °C.

Après incubation, on ajoute à chacun des puits 40 µl de 0,2 mg / ml de solution de MTT [3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium, Sigma Chemicals].

La microplaque a été examinée après une incubation supplémentaire de 30-120 min. La croissance bactérienne a été indiquée par la couleur pourpre du MTT réduite en formazan.

La concentration la plus faible à laquelle une diminution de la couleur pourpre a été observée par rapport à la dilution suivante a été prise comme valeur de CMI.

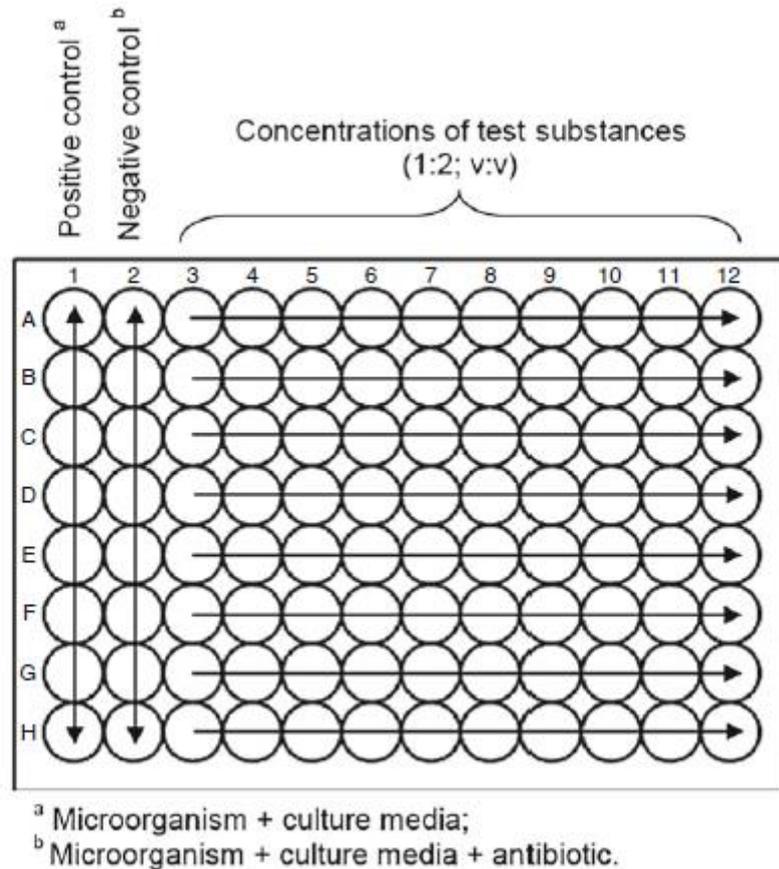


Figure 2 : Activité antibactérienne sur microplaque (*Lima-Filho et De Aguiar Cordeiro, 2014*).

c- Détermination de la concentration minimale bactéricide

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). La CMB définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

La même gamme de concentration, réalisée par la technique de microdilution est utilisée pour déterminer la CMB de l'huile essentielle à tester (*figure 3*).

10µl sont prélevés de chaque puits visiblement dépourvus de bactéries (pas de coloration pourpre) puis déposés « en strie » sur gélose Muller Hinton. Les boîtesensemencées sont incubées 24 heures à 37°C.

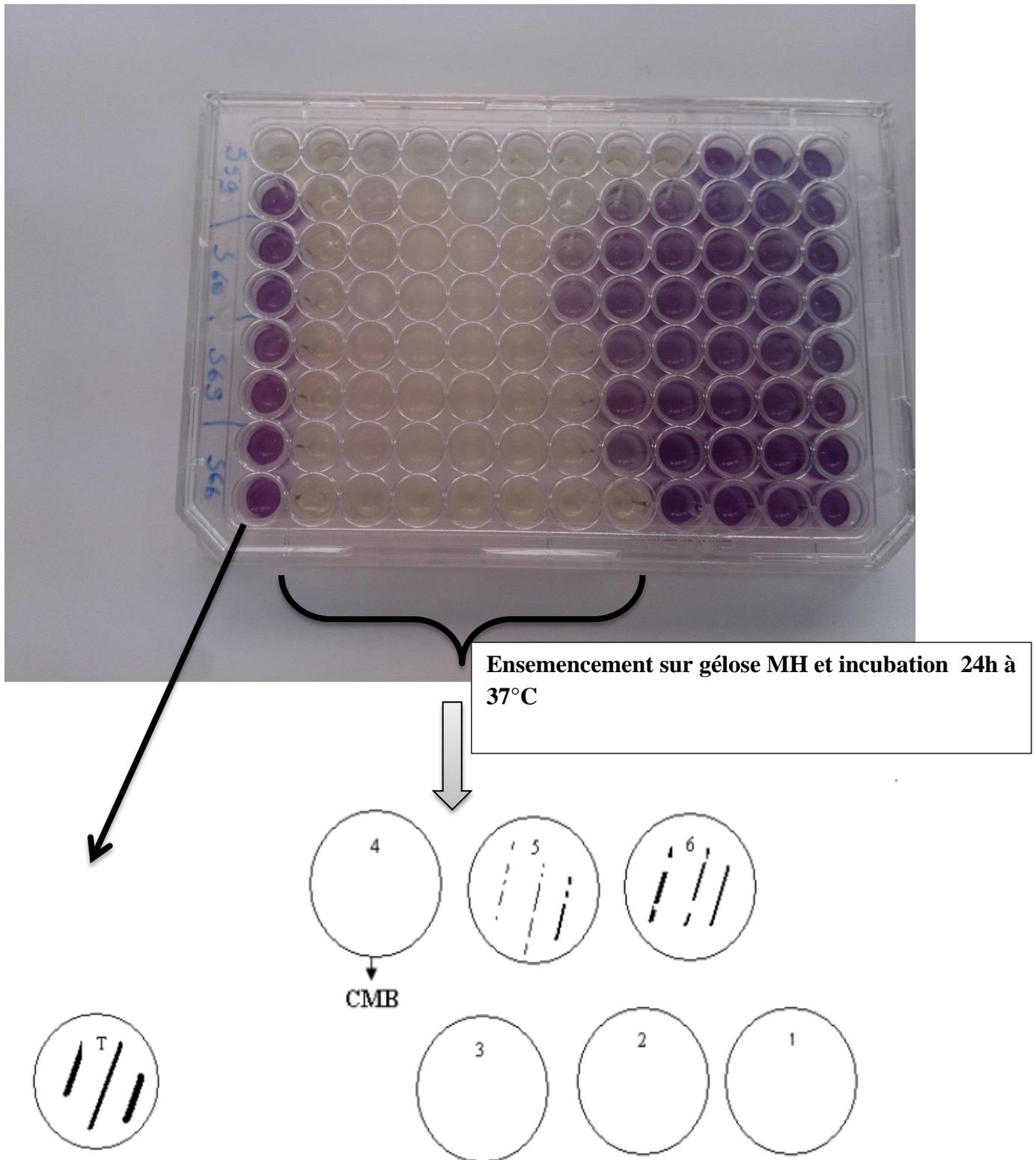


Figure 3 : Détermination de la CMB sur milieu solide (photo personnelle)

d- Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne (Time-kill assay)

Cette méthode permet de caractériser l'activité antibactérienne d'une huile essentielle au cours du temps. Elle évalue la décroissance des bactéries, qui sont soumises à une concentration donnée en huile essentielle, sur plusieurs un laps de temps défini (*Viljoen et al, 2003*).

Trois à cinq colonies bactériennes,ensemencées la veille au soir sur une gélose nutritive, sont prélevées à l'aide d'une boucle d'inoculation et déposées dans 2 ml de NaCl à 0,9 %.

La suspension obtenue est standardisée de manière à ce que sa concentration soit comprise entre 10^6 et 5.10^6 UFC/ml. Pour cela, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (Shimadzu UV-1800) à 620 nm, ajustée au standard 0,5 de Mac Farland puis diluée au 1/20.

Un millilitre de cet inoculum est déposé dans 9 ml de MHB-Tween 80 (0,01%, v/v) en absence (témoin de croissance) ou en présence d'une concentration en huile essentielle correspondant à la CMI en milieu liquide. Les suspensions ainsi obtenues contiennent environ 5.10^5 UFC/ml et sont maintenues sous agitation à 37°C. 100 µl de suspension sont prélevés à différents temps (0, 10, 30, 60, 90min) afin de procéder à un dénombrement sur gélose MHA après une incubation à 37°C pendant 24 heures. La quantification du nombre de colonies bactériennes est limitée à la valeur seuil de 10^2 UFC/ml. Chaque expérience est réalisée trois fois.

I.3.3 Test de synergie entre l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et quelques antibiotiques conventionnels

L'effet synergique entre l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et neufs antibiotiques conventionnels (amoxicilline, pénicilline, céfotaxime, céfazoline, tétracycline, imipénème, enrofloxacin, marbofloxacin et gentamicine) a été évalué par la méthode Checkerboard décrite par *Pillai et al, 2005*. Les bactéries étudiées dans cette section incluent deux souches de références *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, et des isolats cliniques multi-résistants de *E. coli*, *Salmonella pullorum*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*.

Les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle et des antibiotiques des souches étudiées à cet effet, ont été déterminées sur microplaques par la technique de microdilution, telle que décrite précédemment.

Les dilutions testées étaient basées sur la CMI des deux agents antimicrobiens qui sont mélangés de sorte que les puits de la plaque puissent contenir diverses combinaisons de concentration des deux composés.

Pour ce faire, des dilutions en demi variant de la CMI à la CMI/ 128 ont été effectuées pour chaque agent antimicrobien (**Figure 4**).

100 µl de la première gamme de dilution (huile essentielle) ont été ajoutées dans une orientation verticale et 100 µl de la seconde gamme de dilution (antibiotique) ont été ajoutées dans une orientation horizontale. Enfin, 100 µl de suspension bactérienne fraîche ($\approx 10^6$ CFU / ml) ont été ajoutés à chaque puits et cultivés à 37 °C pendant 24 h.

50µl de solution de MTT ont été ajoutés à chaque puits pour détecter la CMI en association.

Les CMI obtenues en association des deux agents antimicrobiens ont été utilisées pour calculer l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FIC) selon la formule suivante:

$$\text{L'indice FIC} = \frac{\text{CMI HE en combinaison}}{\text{CMI HE seule}} + \frac{\text{CMI ATB en combinaison}}{\text{CMI ATB seul}}$$

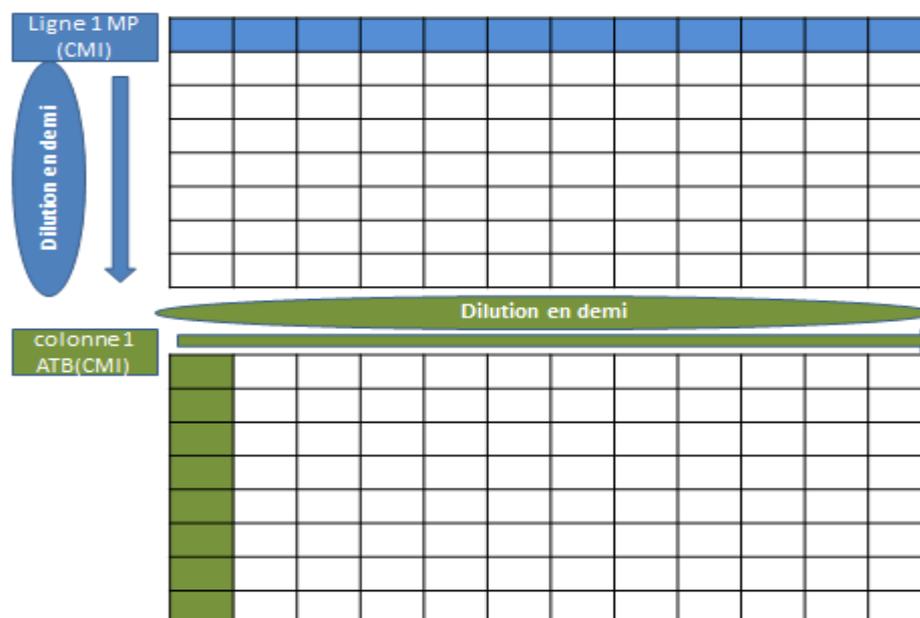


Figure 4 : Principe de la microdilution checkerboard méthode

I.4 Résultats & discussion

I.4.1 Rendement & densité des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la matière végétale sèche utilisée (*Afnor 1986*), il est exprimé en % et calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{Poids de l'HE}}{\text{poids de la matière sèche}}$$

La densité de chaque huile essentielle étudiée a été calculée selon la méthodologie de *Fonseca et Librandi (2008)*.

Un tube Eppendorf a été pesé vide (P1) puis repesé après avoir ajouté 1 ml d'huile essentielle (P2). La densité D était calculée en utilisant la formule suivante :

$$D = \frac{P2-P1}{V} \text{ mg/ml}$$

Les résultats obtenus pour les huiles essentielles étudiées sont présentés dans le **Tableau 2**

Tableau 2: Rendements obtenus et densités des huiles essentielles étudiées

Plante	Rendement	Densité
<i>Mentha pulegium</i>	1,74 %	928 mg/ml
<i>Salvia officinalis</i>	0,6 %	916 mg/ml
<i>Lavendula stoechas</i>	0,90 %	905 mg /ml
<i>Laurus nobilis</i>	0,70 %	870 mg/ml
<i>Thymus fontaneseii</i>	0,68 %	864 mg/ml
<i>Cymbopogon citratus</i>	1,69 %	817 mg/ml
<i>Juniperus phoenicea</i>	2,30 %	952 mg/ml
<i>Artemesia herba alba</i>	1,1 %	880 mg/ml

I.4.2 Analyses chromatographiques

Compte tenu des résultats du screening de l'activité antibactérienne des huiles essentielles testées et qui se sont avérés plus concluants avec les espèces de *Mentha pulegium* et de *Thymus fontaneseii* (résultats présentés plus bas), seules ces deux dernières ont fait l'objet d'analyses chromatographiques.

a- *Mentha pulegium*

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a révélé l'existence de 26 composés différents représentant 97,71% de sa composition totale (**Tableau 3**). Comme le montre le chromatogramme ci-dessus (**Figure 5**), La pulégone représente le constituant majoritaire de l'huile essentielle étudiée avec un taux de 88,78 %.

Les résultats détaillés sont présentés dans le tableau 3

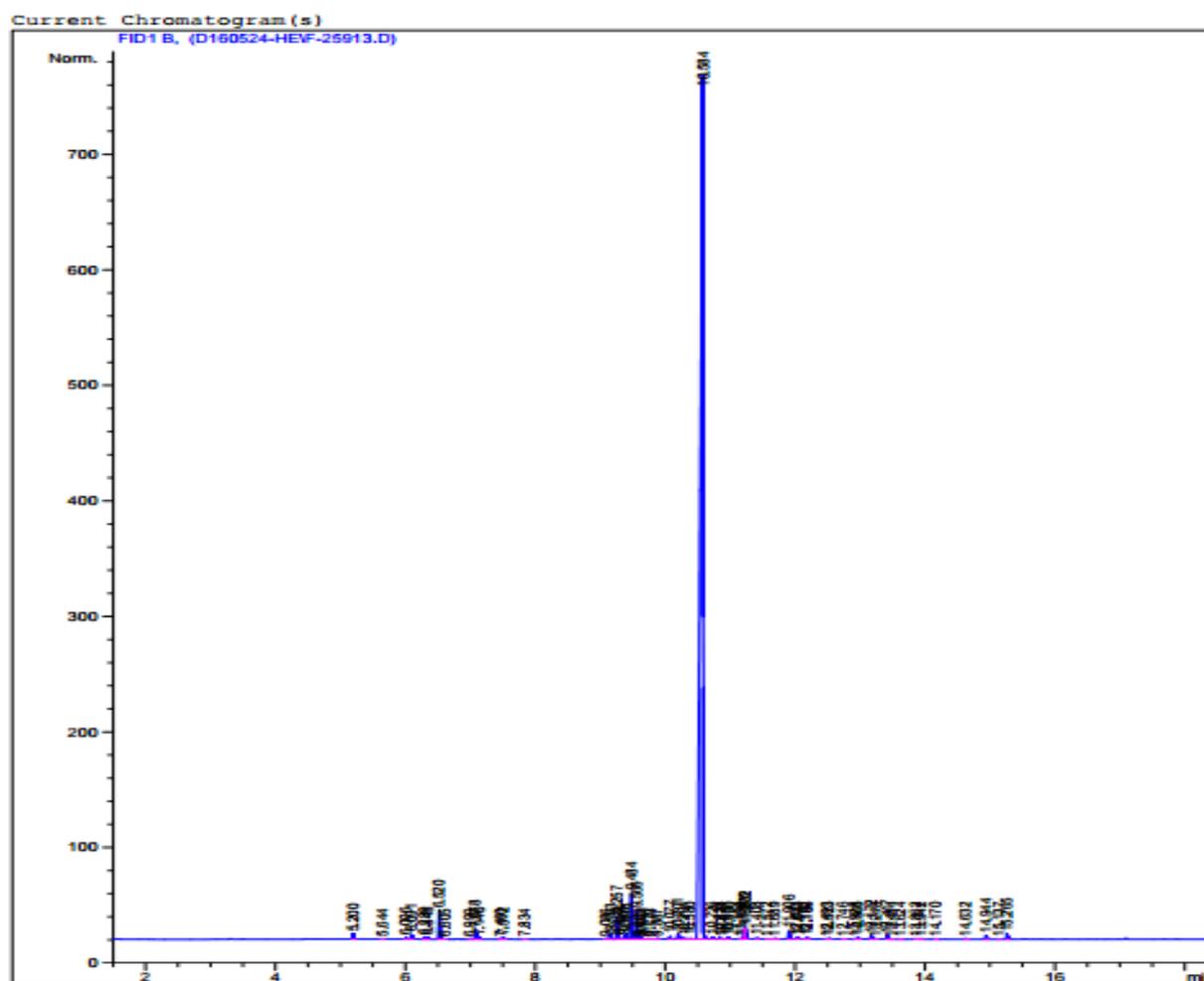


Tableau 3 : Composition de l'huile essentielle *Mentha pulegium* déterminée par la CG/FID, GC/MS

	Temps de rétention	Composé	GC/FID %
1	5.20	Alpha-Pinene	0.235
2	5.64	Camphene	0.016
3	6.01	Sabinene	0.054
4	6.09	Beta-pinene	0.196
5	6.34	Myrcene	0.073
6	5.52	3-Octanol	1.207
7	7.00	Para-cymene	0.026
8	7.08	Limonene	0.372
9	7.14	Eucalyptol	0.068
10	7.83	Trans-Iso-Limonene	0.020
11	9.16	Menth-3-ene8-ol-para	0.236
12	9.26	Menthone	0.919
13	9.36	Menthofuran	0.044
14	9.40	Iso-menthone	0.211
15	9.48	Neo-menthol	2.083
16	9.57	Trans-dihydrocarvone	1.364
17	10.58	Pulegone	88.78
18	11.23	8-hydroxy-4(5)-para menthen3 one	0.453
19	11.91	Piperitenone	0.329
20	12.02	Inknown MW	0.087
21	12.96	Beta-caryophyllene	0.104
22	13.42	Alpha-humulene	0.180
23	13.62	Germacrene-D	0.020
24	13.94	Mintfuranone	0.029
25	14.94	Oxyde de caryophyllene	0.187
26	15.26	Humulene 1,5epoxyde	0.224
		Total : 97,77%	

Selon la littérature, la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. se caractérise par la présence majoritaire de cétones possédant un squelette menthanique.

En effet, les compositions décrites sont dominées soit par la pulégone, soit par la pipériténone ou la pipéritone soit par l'isomenthone ou néoisomenthol (*Tableau 4*), ce qui a permis l'établissement de trois chémotype de menthe pouliot (*Stoyanova et al, 2005*).

En Algérie, les composés de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* ont été identifiés par *Beghidja et al (2007)*, qui ont montré une variabilité dans sa composition en fonction de la

région de récolte; En effet, il semblerait que les huiles algériennes peuvent être classées suivant deux chemotypes: le premier est le type pulegone avec une variation de son taux de 52-87% et le deuxième chimio-type qui est plus pauvre en pulegone et relativement riche en monoterpène non oxygénée.

Des études réalisées en Bulgarie, en Tunisie, au Maroc, en Inde, en Serbie et en Iran ont signalé un chemotype pulegone mais avec des proportions en pulégone très variables et généralement bien inférieures par rapport à l'huile essentielle étudiée présentement (*Stoyanova et al, 2005; Mkaddem et al, 2007; Cherrat et al, 2014; Agnihotri et al, 2005; Nikolic et al, 2014; Morteza-Semnani et al, 2011; Khosravi Zanjani et al, 2015*).

Dans notre cas, le taux élevé de pulegone pourrait être attribué à la zone de récolte située à 1092 m d'altitude.

Tableau 4: Variabilité de la composition de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

Origine	Chémotype établi	Références
Grèce	Pipériténone (0- 97,2%), Pulégone (0.1- 90.7%), Menthone (0.2–53.4%), Isomenthone (0.1- 45.1%), Piperitenone (< 0.1- 39.8%) et isopiperitenone (0- 23.5%).	<i>Kokkini et al, 2002</i>
Inde	Pulégone (65.9 - 83.1%);	<i>Agnihotri et al, 2005</i>
Iran	Piperitone (38.0%); Piperitenone (33.0%)	<i>Mahboubi et Haghi 2008</i>
Algérie	Pulégone (4.4 - 87.3%); Piperitenone (0.1- 26.7%); Isomenthone (trace à 22.6%); beta-pinène (0.4- 20.9%)	<i>Beghidja et al, 2007</i>
Maroc	P u l é g o n e (3 3 . 6 5 %) , α - t e r p i n e n y l a c e t a t e (2 4 . 2 9 %) ,	<i>Cherrat et al, 2014</i>
Iran	Pulégone (54.6 %), menthone (15.1 %).	<i>Morteza-Semnani et al</i>
Tunisie	Pulegone (41.8%), isomenthone (11.3%) et carvone (6.2%)	<i>Mkaddem et al, 2007</i>
Bugarie	(42.9- 45.4%), piperitenone (21.7- 23.1%) et isomenthone (11.3- 12.8%).	<i>Stoyanova et al, 2005</i>
Serbie	Pulegone 68.7%	<i>Nikolic et al, 2014</i>
Portugal	Menthone 35.9%, pulegone 23.2 % et neo-menthol,et 9.2%	<i>Texeira et al, 2012</i>

b- *Thymus fontaneseii*

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontaneseii* a révélé la présence de 51 composés différents (**Figure 6, Tableau 5**). Le thymol 26,34 % et l'ocimène 18,79 % représentent les composés majoritaires de cette huile essentielle suivie, en des proportions variables, par le γ -terpinène 9,46 %, le 4-terpinéol 8,94 %, le para-cymène 8,19 %, le β -myrcène 8,19 % le linalol 4,64 % et le carvacrol 4,20 %.

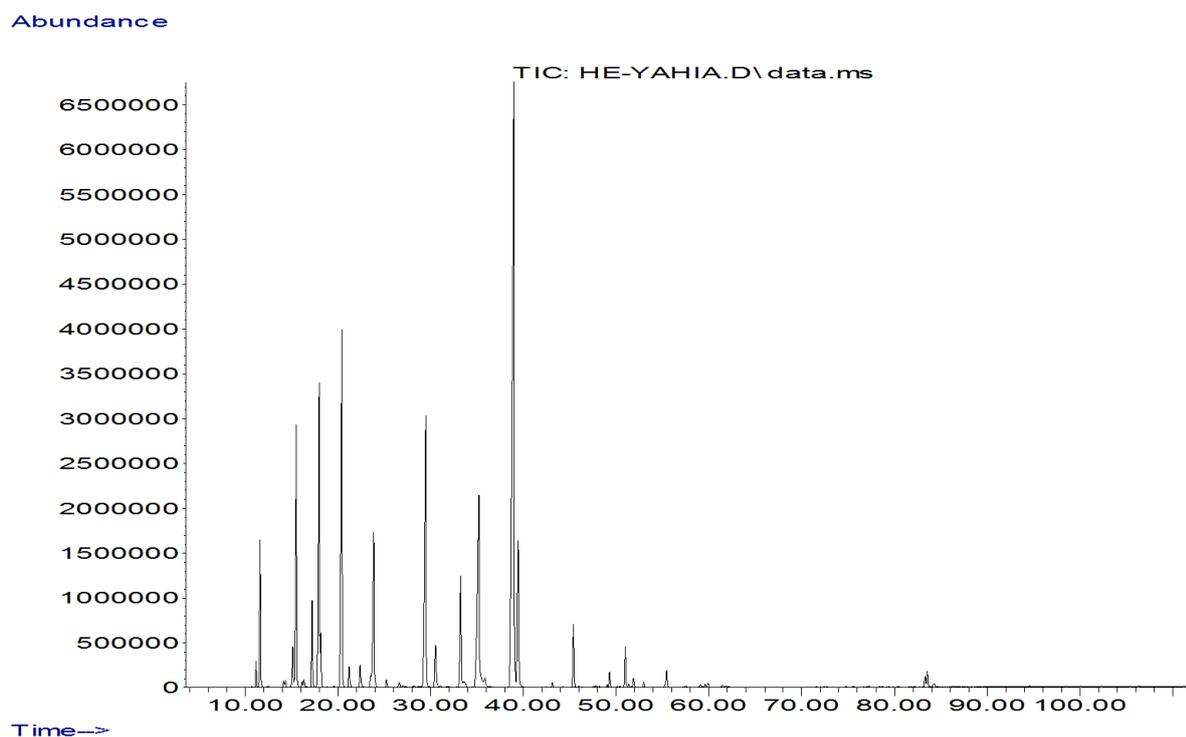


Figure 6 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus fontaneseii*

Tableau 5 : Composition de l'huile essentielle de *Thymus fontaneseii*

	Temps de rétention	Composé	% aire
1	7,4	trans-Hex-2-enal	0.0028
2	8,9	Heptanone 2	0.0063
3	10,82	Tricyclene	0.0009
4	11,15	alpha-thujene	0.5547
5	11,58	α -Pinene	3.0388
6	12,49	Camphene	0.0465
7	12,86	thuja-2,4(10)-diene	0.0094
8	14,14	Sabinene	0.1398
9	14,32	β -Pinene	0.1763

10	15,49	β -Myrcene	6.1983
11	16,3	α -Phellandrene	0.2085
12	16,62	Carene <delta-3->	0.0163
13	17,19	α -Terpinene	2.0338
14	17,95	para- cymenene	8.1975
15	18,11	Limonene	1.0964
16	18,78	Ocimene <(Z)-beta->	18.7914
17	19,55	Ocimene <(E)-beta->	0.0258
18	20,4	γ -Terpinene	9.4690
19	21,18	cis-sabinene hydrate	0.6129
20	22,36	Terpinolene	0.6508
21	22,7	para- cymenene	0.0171
22	23,84	Linalool	4.6551
23	25,2	Terpin-1-ol	0.2206
24	26,59	Terpineol <cis-beta->	0.2164
25	27	trans-Verbenol	0.0305
26	27,9	Isomenthone	0.0025
27	28,18	trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	0.0112
28	29,45	4-terpineol	8.9462
29	30,5	α -Terpineol	1.4359
30	33,21	Methyl thymyl ether	2.8518
31	35,18	Geraniol	8.4727
32	38,95	Thymol	26.3430
33	39,41	Carvacrol	4.2080
34	42,48	Copaene <alpha->	0.0241
35	43	β -Bourbonene	0.1585
36	45,38	(E)-Caryophyllene	1.6110
37	45,94	β -Copaene	0.0499
38	47,53	Humulene <alpha->	0.0255
39	47,71	Farnesene <(E)-beta->	0.0341
40	47,9	Aromadendrene <allo->	0.0443
41	49	γ -Muurolene	0.0719
42	49,27	Germacrene D	0.4241
43	50,48	α -Muurolene	0.0109
44	50,97	β -bisabolene	0.9404
45	51,89	δ -Cadinene	0.2669
46	52,97	Bisabolene <(E)-gamma->	0.0772
47	55,43	Caryophyllene oxide	0.5052
48	57,44	1-epi-cubenol	0.0196
49	59,1	α -Cadinol	0.1047
50	59,9	tau.-Muurolol	0.1390
51	61,67	α -Bisabolene oxide	0.0012

Plusieurs espèces de thym existent à travers le monde fournissant des huiles essentielles très variables de par leur composition et donc des chémotype différents, ainsi l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* possède six chémotypes différents. Ces différences concernent la nature du monoterpène majoritaire la composant et pouvant être soit le géraniol, l'exterpinéol, le thuyanol-4, le linalool, le carvacrol ou le thymol.

Peu d'études ont concerné *Thymus fontaneseii*, néanmoins, trois études algériennes révèlent l'existence de deux chémotypes avec le carvacrol ou le thymol comme composés majoritaires possibles (**Tableau 06**).

Les résultats obtenus sur la composition de l'huile essentielle de *Thymus fontaneseii* étudiée dans le cadre de ce travail se rapprochent des résultats obtenus par **Dob et al, (2006)**.

Tableau 6 : Variabilité de la composition de l'huile essentielle de *Thymus fontaneseii*

Origine	Composition de l'HE	Références
Sétif (Algérie)	Thymol 67,8 %, γ -terpinène 15,9 %, p-cymène 13 %, carvacrol 1,7 %.	Ghannadi et al, 2004
Djelfa (Algérie)	Thymol 29,3 %, γ -terpinène 21,7 %, p-cymène 15,9 %, linalol 4,8 %.	Dob et al, 2006
Médea (Algérie)	Carvacrol 63,7 %, thymol 0,16 %, γ -terpinène 6,06 %, p-cymène 6,27 %, linalol 6,43 %.	Mouhi et al, 2017

La variabilité dans la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Thymus fontaneseii* rapportée par les différentes études est probablement influencée par différents facteurs liés notamment au stade végétatif de la plante, les conditions climatiques, la région géographique (altitude), la composition du sol et les conditions de traitement et d'extraction de l'huile (**Xu et al, 2003; Müller-Riebau et al, 1997, Bruneton, 2007**), ainsi, au cours de l'hydro-distillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations et des oxydations de l'huile essentielle obtenue ce qui modifierait ses propriétés (**Bruneton, 2007**).

Il est à noter que cette variabilité dans la composition confère à chaque huile essentielle des effets biologiques différents et des toxicités variables.

I.4.3 Activité antibactérienne

a- Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Mentha pulegium*, *Thymus fontaneseii*, *Laurus nobilis*, *Cymbopogon citratus*, *Juniperus phoenicea*, *Salvia officinalis*, *Lavendula stoechas*, *Artemisia herba alba* a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats du criblage sont présentés dans **les tableaux 7 et 8**. Les résultats représentent la moyenne des trois essais effectués sur chaque bactérie \pm écart type.

La gentamicine, et l'imipenème ont été utilisés comme antibiotique de contrôle.

Le tween 80 (0,01 %) a été utilisé pour améliorer la solubilisation des huiles essentielles dans les milieux de culture. Le mélange eau physiologique/tween (0,01%, v/v) sert de contrôle négatif interne. Avec un diamètre d'inhibition égal à celui du disque stérile non imprégné (6 mm), l'absence d'effet du tween 80 sur les bactéries étudiées à la concentration utilisée est donc vérifiée.

Tableau 7 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) obtenues par la méthode de diffusion sur gélose

Souche bactérienne	Antibiotique Contrôle IMP	Antibiotique contrôle GTC	Contrôle négatif Tween0,01%/ eau	Huile essentielle de MP	LS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	-	30 ± 1.1	∞	35 ± 0.7	14 ± 0.7
<i>E. coli</i> ATTC25922	-	25 ± 0.5	∞	17 ± 1.41	12 ± 0.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC 27853	-	-	∞	7 ± 0	7 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	24 ± 0.4	∞	16 ± 0.7	12 ± 0.7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	19 ± 0.7	∞	14 ± 0	11 ± 0.5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	∞	12 ± 0.7	10 ± 0.5
<i>Salmonella dublin</i> ,	-	18 ± 0.3	∞	13 ± 0	-
<i>Salmonella enteridis</i> ,	-	19 ± 0.3	∞	13 ± 0	-
<i>Salmonella thyphi</i> ,	-	19 ± 0.4	∞	10 ± 0	-
<i>Salmonella infantis</i> ,	-	19 ± 0.3	∞	12 ± 0.7	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	25 ± 0.7	∞	10 ± 0	-
<i>Proteus mirabilis</i> (1)	-	-	∞	14 ± 0.7	10 ± 0.5
<i>Shigella</i> sp	-	23 ± 0.4	∞	12 ± 1	-
<i>Yersinia</i> sp,	-	25 ± 0.6	∞	11 ± 0.8	-
<i>Providencia</i> sp,	-	23 ± 0.4	∞	12 ± 0.7	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	24 ± 0.3	∞	14 ± 1	10 ± 0.5
<i>Salmonella pulorum</i> BLSE	≥30	24 ± 0.3	∞	13 ± 0.12	-
<i>E. coli</i> BLSE (1)	≥30	-	∞	15.33 ± 0.7	10 ± 0.12
<i>E. coli</i> BLSE (2)	≥30	-	∞	12.66 ± 0.7	10.33 ± 1
<i>E. coli</i> BLSE (3)	≥30	-	∞	14 ± 0.2	9.33 ± 0.7
<i>E. coli</i> BLSE (4)	≥30	-	∞	13.66 ± 0.2	9 ± 0.2
<i>E. coli</i> BLSE (5)	≥30	-	∞	10 ± 0.24	10 ± 0.76
<i>E. coli</i> BLSE (6)	≥30	-	∞	14.66 ± 0.57	10 ± 1
<i>E. coli</i> BLSE (7)	≥30	-	∞	14.33 ± 1.12	9 ± 0.5
<i>E. coli</i> BLSE (8)	≥30	-	∞	11.33 ± 0.8	11.33 ± 0.8
<i>E. coli</i> BLSE (9)	≥30	-	∞	13 ± 1	9.33 ± 1
<i>E. coli</i> BLSE (10)	≥30	-	∞	12.66 ± 0.76	9.33 ± 0.76
<i>E. coli</i> BLSE (11)	≥30	-	∞	12.66 ± 0.76	9.33 ± 0.76
<i>E. coli</i> BLSE (12)	≥30	-	∞	14 ± 1	10.33 ± 0.76
<i>E. coli</i> BLSE (13)	≥30	-	∞	16.66 ± 0.23	9.66 ± 0.3
<i>Proteus mirabilis</i> BLSE(2)	≥30	-	∞	26.66 ± 0.76	11.33 ± 0.76
<i>Proteus mirabilis</i> BLSE(3)	≥30	-	∞	16.66 ± 0.23	10.66 ± 0.1
<i>Enterobacter cloacae</i> BLSE	≥30	-	∞	12 ± 0.46	10 ± 0.46
<i>Enterobacter cloacae</i> BLSE	≥30	-	∞	13.16 ± 0,57	10 ± 0.7

IMP : imipénème ; GTC : gentamicine ; MP : *Mentha pulegium* ; LS : *Lavendula stoechas*

Tableau8: Diamètre des zones d'inhibition (mm) obtenues par la méthode de diffusion sur gélose

Souches bactériennes	HE TF	HE CC	HE SO	HE LN	HE JP	HE AHA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	33 ± 0.7	35 ± 0.7	13 ± 0.7	17 ± 0.7	20 ± 0.7	16 ± 0.7
<i>E. coli</i> ATTC25922	17 ± 1.41	20 ± 1.41	13 ± 1.41	17 ± 1.41	17 ± 1.41	11 ± 1.41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC 27853	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i>	29 ± 0.7	30 ± 0.7	12 ± 0.7	16 ± 0.7	16 ± 0.7	14 ± 0.7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20 ± 0	20 ± 0	11 ± 0	14 ± 0	14 ± 0	11 ± 0
<i>Klebsiella pneumonia</i>	16 ± 0.7	25 ± 0.7	12 ± 0.7	16 ± 0.7	12 ± 0.7	-
<i>Salmonella dublin,</i>	14 ± 0	12 ± 0	9 ± 0	13 ± 0	13 ± 0	-
<i>Salmonella enteritidis,</i>	13 ± 0	10 ± 0	9 ± 0	13 ± 0	13 ± 0	-
<i>Salmonella thyphi,</i>	13 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	-
<i>Salmonella infantis,</i>	13 ± 0.7	13 ± 0.7	10 ± 0.7	12 ± 0.7	12 ± 0.7	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	14 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	14 ± 0	10 ± 0	-
<i>Proteus mirabilis</i> (1)	20 ± 0.7	20 ± 0.7	13 ± 0.7	14 ± 0.7	10 ± 0.7	-
<i>Shigella</i> sp	12 ± 1	12 ± 1	9 ± 1	13 ± 1	12 ± 1	-
<i>Yersinia</i> sp,	12 ± 0.8	11 ± 0.8	10 ± 0.8	ND	11 ± 0.8	-
<i>Providencia</i> sp,	12 ± 0.7	13 ± 0.7	12 ± 0.7	14 ± 0.7	12 ± 0.7	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	17 ± 1	20 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	10 ± 1	-
<i>Salmonella pulorum</i> BLSE	13 ± 0.12	13 ± 0.12	13 ± 0.12	13 ± 0.12	13 ± 0.12	10 ± 0.12
<i>E. coli</i> BLSE (1)	15.33 ± 0.7	12 ± 0.7	13.33 ± 0.7	14 ± 0.7	11.33 ± 0.7	10 ± 0.7
<i>E. coli</i> BLSE (2)	14.33 ± 0.7	12.66 ± 0.7	13.66 ± 0.7	12.66 ± 0.7	12 ± 0.7	11.66 ± 0.7
<i>E. coli</i> BLSE (3)	16 ± 0.2	12 ± 0.2	10 ± 0.2	13 ± 0.2	11 ± 0.2	10 ± 0.2
<i>E. coli</i> BSEL (4)	16 ± 0.2	12 ± 0.2	10 ± 0.2	17 ± 0.2	10 ± 0.2	9 ± 0.2
<i>E. coli</i> BLSE (5)	11 ± 0.24	13 ± 0.24	12 ± 0.24	13 ± 0.24	10 ± 0.24	10 ± 0.24
<i>E. coli</i> BLSE (6)	17.66 ± 0.57	10 ± 0.57	8.66 ± 0.57	14 ± 0.57	10 ± 0.57	10 ± 0.57
<i>E. coli</i> BSEL (7)	14.33 ± 1.12	12 ± 1.22	9.33 ± 1.12	13 ± 1.12	10 ± 1.12	10 ± 1.12
<i>E. coli</i> BLSE (8)	11.33 ± 0.8	12 ± 0.8	10 ± 0.8	13 ± 0.8	11 ± 0.8	10 ± 0.8
<i>E. coli</i> BLSE (9)	16 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	13 ± 1	10 ± 1	12 ± 1
<i>E. coli</i> BLSE (10)	17.66 ± 0.76	10 ± 0.76	10 ± 0.76	10 ± 0.76	10 ± 0.76	9 ± 0.76
<i>E. coli</i> BLSE (11)	13 ± 0.76	10 ± 0.76	10.66 ± 0.76	12.66 ± 0.76	10 ± 0.76	10 ± 0.76
<i>E. coli</i> BLSE (12)	17 ± 1	10 ± 1	8 ± 1	14 ± 1	10 ± 1	10 ± 1
<i>E. coli</i> BLSE (13)	16.66 ± 0.23	12.66 ± 0.23	8.66 ± 0.23	16.66 ± 0.23	10 ± 0.23	9 ± 0.23
<i>Proteus mirabilis</i> BLSE(2)	23.66 ± 0.76	23 ± 0.76	17 ± 0.76	21.66 ± 0.76	15 ± 0.76	9 ± 0.76
<i>Proteus mirabilis</i> BLSE(3)	19.66 ± 0.23	14.66 ± 0.23	12 ± 0.23	15.66 ± 0.23	10 ± 0.23	9 ± 0.23
<i>Enterobacter cloacae</i> BLSE	17 ± 0.46	12 ± 0.46	10.66 ± 0.46	15 ± 0.46	9 ± 0.46	9 ± 0.46
<i>Enterobacter cloacae</i> BLSE	18 ± 0.57	17.16 ± 0.57	11 ± 0.57	14 ± 0.57	9 ± 0.57	10 ± 0.57

HE : Huile essentielle ; TF : *Thymus fontaneseii* ; CC : *Cymbopogon citratus* ; SO : *Salvia officinalis* ; JP : *Juniperus phoenicea* ; AHA: *Artemisia herba alba*

La méthode de diffusion sur disque a été utilisée comme test de dépistage qualitatif pour la détermination des activités antimicrobiennes des huiles essentielles, l'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant le rayon des zones d'inhibition (mm).

Les diamètres d'inhibition, générés par les huiles essentielles, sont très nettement inférieurs à ceux produits par les antibiotiques du contrôle positif (gentamicine/ imipenème) et très variables d'une huile à une autre. L'activité antibactérienne des huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes de molécules, est généralement inférieure à celle exercée par les molécules antibiotiques, isolées des microorganismes. Aussi, elles sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 15 mm (**Rossi et al, 2007**).

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a fait l'objet de multiples recherches à travers le monde et leur efficacité à l'encontre de plusieurs espèces bactériennes a été prouvée.

Avec des diamètres d'inhibition inférieurs variant entre 7 et 13 mm, les huiles essentielles de *Salvia officinalis*, *Lavendula stoechas*, *Artemesia herba alba* et *Juniperus phoenicea* se sont avérées être les moins actives.

Ces résultats diffèrent de certaines études antérieures qui ont attribué des effets antibactériens notables aux huiles essentielles de *Lavendula stoechas* (**Cherrat et al, 2013**), et de *Salvia officinalis* (**Bozin et al, 2007**). **Mazari et al, 2010** ont rapporté pour leur part, des effets antibactériens modérés pour l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*.

Par ailleurs, les huiles essentielles extraites de *Mentha pulegium*, *Thymus fontaneseii*, *Cymbopogon citratus* et *Laurus nobilis* ont présenté une activité moyenne à bonne avec des diamètres moyens variant de 12 à 35 mm en fonction des espèces bactériennes étudiées (Tableau 7/8).

Plusieurs études ont rapporté l'activité de ces huiles à l'encontre d'un grand panel de bactéries, notamment *Laurus nobilis* qui a présenté des effets notables sur des bactéries Gram positive et négative (**Bouzouita et al, 2003, Marzouki et al, 2007, Ramos et al, 2011, Ouibrahim et al, 2013**). L'efficacité de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* est variable : **Hammer et al (1999)**, décrivent ainsi une bonne activité alors que **De silva et al, (2017)** la considèrent comme moyenne.

D'une façon générale, l'action des huiles essentielles étudiées s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives d'importance médicale. Toutefois, les bactéries Gram positifs semblent être les plus sensibles à l'action des huiles essentielles. En effet, toutes les huiles essentielles testées au cours de cette étude se sont avérées efficaces contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètres variant entre 13 et 35 mm. Ceci pourrait être attribué à la structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives les rendant plus sensibles à l'action des huiles essentielles (**Burt, 2004**). Par ailleurs, la présence d'un lipopolysaccharide hydrophobe dans la membrane des bactéries Gram négatives les protège des différents agents externes (**Nikaido et Vaara, 1985**).

La variabilité des résultats décrits par la littérature pourrait être due à la différence de la composition des huiles essentielles étudiées mais aussi à la nature génétique des souches bactériennes testées.

Aucune des huiles testées n'a présenté d'effet sur *Pseudomonas aeruginosa*, cette bactérie est connue pour être la moins sensible aux huiles essentielles (**Dorman et Deans, 2000; Burt et al, 2004**), du fait de la structure de sa membrane externe, particulièrement imperméable aux huiles essentielles mais aussi à l'action des mécanismes d'efflux, qui amélioreraient la protection de la bactérie contre les agents antibactériens (**Longbottom et al, 2004**).

Avec des diamètres respectifs variant de 12 et 26 mm, en particulier sur des bactéries multi-résistantes et productrices de β -lactamases d'origine animale, les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Thymus fontaneseii*, ont démontré la plus haute activité anti-bactérienne. Les différences signalées dans la sensibilité des souches d'une même espèce bactérienne à l'encontre d'une même huile essentielle peuvent être attribuées encore une fois aux différences dans la composition de la paroi cellulaire et / ou le contenu génétique de leurs plasmides (**Karaman et al, 2003**).

Plusieurs études ont rapporté l'action de différentes huiles essentielles sur des bactéries multi-résistantes notamment sur les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), entérocoques résistant à la vancomycine (**Faleiro et Miguel, 2013**),

Des études ont également prouvé les effets antibactériens de certaines huiles essentielles sur les bactéries productrices de β -lactamases, ainsi une activité intéressante des huiles de cannelle, d'origan, de thé vert a été notifié sur des souches d'*E.coli* et de *Klebsiella pneumonia* (**Dhara et Tripathi, 2013; Rai, 2013; Si et al, 2008; Sejal et Manita, 2015**).

Le **Tableau 9** répertorie les huiles essentielles actives sur les souches BLSE.

Tableau 9: Activité antibactériennes des huiles essentielles sur les bactéries BLSE

Huiles essentielles	Bactéries sensibles	Références
<i>Faeniculum vulgare</i> (fenouil) <i>Mentha pipereta</i> (M poivrée) <i>Mentha spicata</i> (M verte) <i>Ocimum basilicum</i> (Basilic) <i>Origanum vulgare</i> (Origan) <i>Satureja cuneifolia</i> (sariette)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Orhan et al, 2011</i>
<i>Lantana camara</i> (lantancier)	<i>E. coli</i>	<i>Sousa et al, 2010</i>
<i>Origanum vulgare</i>	<i>E. coli</i>	<i>Si et al, 2008</i>
Cinnamaldehyde, eugenol	<i>E. coli, Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Dhara et Tripathi, 2013</i>
<i>Ferula gummosa</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Afshar et al 2016</i>
<i>chillea wilhelmsii</i> , <i>Echinophora platyloba.</i> , <i>Lallemantia royleana</i> , <i>Nepeta persica</i> , <i>Pulicaria vulgaris Gaertn.</i> , <i>Salvia nemorosa</i> , and <i>Satureja intermedia</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sharif rad et al, 2016</i>

a- Détermination de la concentration minimale inhibitrice et concentration minimale bactéricide par microdilution et time kill assay

Les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Thymus fontaneseii* ayant présenté une bonne activité antibactérienne en comparaison aux autres huiles étudiées, leurs activités vis-à-vis de bactéries résistantes ont été explorées.

Des tests de détermination de la CMI et de la CMB ont été réalisés afin de préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide des huiles essentielles sélectionnées.

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile est considérée comme bactéricide.

Les tableaux ci-dessous représentent les résultats obtenus pour les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Thymus fontaneseii*.

Les rapports CMB/CMI des huiles de *Mentha pulegium* varient entre 1, et 2 et sont égaux à 2 pour l'huile essentielle de *Thymus fontaneseii*, elles exerceraient donc une action bactéricide contre les bactéries étudiées.

Tableau 10 : CMI et CMB de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.29 ± 0.16	0.58 ± 0.16	2.07
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.58 ± 0.16	1.16 ± 0.33	2
<i>E. coli</i> ATCC25922	1.16 ± 0.33	2.32 ± 0.66	2
<i>Proteus mirabilis</i> BLSE 3	2.32 ± 0.66	4.64 ± 1.33	2
<i>Proteus mirabilis</i> BLSE 2	2.32 ± 0.66	2.32 ± 0.66	1
<i>E. coli</i> BLSE 3	1.16 ± 0.33	2.32 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 6	1.16 ± 0.66	2.32 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 7	1.16 ± 0.66	2.32 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 1	0.58 ± 0.16	1,16 ± 0.33	2
<i>E. coli</i> BLSE 12	1.16 ± 0.66	2.32 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 13	0.58 ± 0.16	1.16 ± 0.33	2
<i>Salmonella dublin</i>	2.32 ± 0.66	2.32 ± 0.66	1
<i>Salmonella enteridis</i>	0.58 ± 0.16	1.16 ± 0.33	2
<i>Salmonella pullorum</i> BLSE	2.32 ± 0.66	2.32 ± 0.66	1
<i>Enterobacter cloacae</i> BLSE	2.32 ± 0.66	2.32 ± 0.66	1

Tableau 11 : CMI et CMB de l'huile essentielle *de thymus fontaneseii*

	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.27 ± 0.16	0.54 ± 0.16	2.07
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.27 ± 0.16	0,54 ± 0.33	2
<i>E. coli</i> ATCC25922	1.08 ± 0.33	2.16 ± 0.66	2
<i>Proteus mirabilis</i> BLSE 3	0,27 ± 0.66	0,54 ± 1.33	2
<i>Proteus mirabilis</i> BLSE 2	0,27 ± 0.66	0.54 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 3	1.08 ± 0.33	2.16 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 6	1.08 ± 0.66	2.16 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 7	1.08 ± 0.66	2,16 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 1	0.54 ± 0.16	1,08 ± 0.33	2
<i>E. coli</i> BLSE 12	1.08 ± 0.66	2.16 ± 0.66	2
<i>E. coli</i> BLSE 13	0.54 ± 0.16	1.08 ± 0.33	2
<i>Salmonella dublin</i>	2.16 ± 0.66	4,32. ± 0.66	2
<i>Salmonella enteridis</i>	2,16 ± 0.16	4,32.16 ± 0.33	2
<i>Salmonella pullorum</i> BLSE	2.16 ± 0.66	4,32.32 ± 0.66	2
<i>Enterobacter cloacae</i> BLSE	0,54 ± 0.66	1,08+ 0.66	2

Les valeurs de CMI obtenues dans notre étude pour l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sont inférieures à celles rapportées par **Teixeira et al (2012)**: CMI de 3,2 et 3,8 mg / ml pour *E. coli* et *S. typhimurium*.

Cependant, il reste difficile de comparer ces résultats avec les nôtres, en raison de la différence dans la composition des huiles essentielles étudiées et qui appartiennent à des chemotypes différents mais aussi à la différence des souches bactériennes testées. **Abdelli et al (2016)** ont étudié les activités antibactériennes de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* avec un chemotype pulegone et ont rapporté des résultats assez similaires avec des CMI variant de 1,25 et 2,5 µl/ml sur un panel de bactéries incluant *S. aureus*, *E. coli* et plusieurs espèces de *Salmonella*. Par ailleurs, **Mahboubi et Haghi (2008)** utilisant un chemotype piperitone/ piperitenone ont noté une activité significative contre les bactéries Gram-positives avec des zones d'inhibition allant de 8 à 21 mm avec des CMI allant de 0,25 µL à 4µl ; aucune activité n'a cependant été rapporté contre *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* contrairement à **Teixeira et al (2012)** et **Marzouk et al (2008)** qui ont rapporté une inhibition satisfaisante de *E. coli*. **Cherrat et al (2013)** ayant étudié un chemotype pulégone, α -terpinenyl acetate, ont rapporté des CMI de 2 µl/ml sur *E.coli* et *Staphylococcus aureus*.

Concernant les valeurs CMI rapportées pour l'huile essentielle de *Thymus fontaneseii*, les valeurs obtenues variaient entre 0,27 et 1,08 mg /ml, et sont proches de celles obtenues par

Bekhechi et al, 2007 et **Dob et al, 2006**, bien que les chémotypes étudiées soient différents, il n'en demeure pas moins que les deux composés majoritaires, en l'occurrence le carvacrol et le thymol, appartiennent à la grande famille des phénols qui sont connus pour avoir les meilleures propriétés antibactériennes.

Avec des concentrations minimales bactéricides proches des concentrations minimales inhibitrices, les huiles essentielles *Mentha pulegium* et de *Thymus fontaneseii* inhibent la croissance des bactéries étudiées par une action de type bactéricide (**Hammer et al, 1996**).

Nos résultats sur les effets bactéricides des huiles essentielles de menthe pouliot et de thym rejoignent les études précédemment réalisées (**Mahboubi et al, 2008 ; Abdelli et al, 2016 ; Fadli et al, 2013**).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (**Dormans et Deans, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003**), Ils peuvent toutefois interagir avec d'autres molécules actives comme cela a été décrit pour le p-cymène, qui, en facilitant la pénétration intracellulaire du carvacrol, potentialise les effets de ce composé sur *B. cereus* (**Ultee et al, 2002**). Des synergies du même ordre pourraient être impliquées dans l'action des huiles étudiées, dans la mesure où une molécule même en faible proportion pourrait être à l'origine d'un effet bactéricide (**Guinoiseau, 2011**).

Les composés chimiques ayant une grande action antibactérienne sont les phénols (thymol, carvacrol), les alcools (α -terpinène et linalol), les cétones (pulgéone) et plus rarement les terpènes (**Cheurfa et al, 2013**). La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, étudiée, est dominée par la présence de pulgéone, par le thymol et l'ocimène et plusieurs autres monoterpènes pour l'huile essentielle *Thymus fontaneseii*.

Des espèces de genre *Thymus* qui contiennent des phénols ont un spectre d'action antibactérienne très large (**Amarti et al 2008, Amarti et al, 2011**).

Dorman et Deans, (2000) et **Satrani et al, (2001)** ont testé un grand nombre de constituants purs d'huiles essentielles contre 25 genres différents de bactéries et ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne, suivi du carvacrol et de l' α -terpinéol. Ces mêmes auteurs ont expliqué la différence de l'efficacité

antimicrobienne observée entre le thymol et le carvacrol par la position du groupement hydroxyle sur la structure phénolique des deux molécules (*Cheurfa, 2013*).

Le carvacrol et le thymol semblent agir sur la membrane externe des bactéries Gram négatives, ils détruiraient cette dernière et augmenteraient ainsi la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (*Helander et al, 1998*).

L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles (*Trombetta et al, 2005*), lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. De plus, après avoir traversé la membrane, il peut interagir avec des sites intracellulaires. Le thymol entraîne une diminution de la taille des bactéries, moyen probablement employé pour survivre, ainsi qu'une altération de la paroi bactérienne, une agrégation du cytoplasme ainsi qu'un rapprochement des cellules.

Le test du time kill assay a été réalisé uniquement pour l'huile essentielle de *Mentha pulegium* (le faible rendement de l'huile essentielle de thym ne permettait pas de réaliser cet essai) L'objectif du time kill assay était de caractériser l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* au cours du temps. Elle évalue la décroissance des bactéries, qui sont soumises à une concentration donnée en huile essentielle.

Les effets, générés par l'huile de *Mentha pulegium* sur les bactéries testées, ont été déterminés par mesure de la décroissance bactérienne au cours d'une période de 120 minutes. Les courbes de mort cellulaire, obtenues pour des concentrations en huile essentielle égales à la CMB, et la courbe de croissance de la population témoin sont présentées dans la **figure 7**.

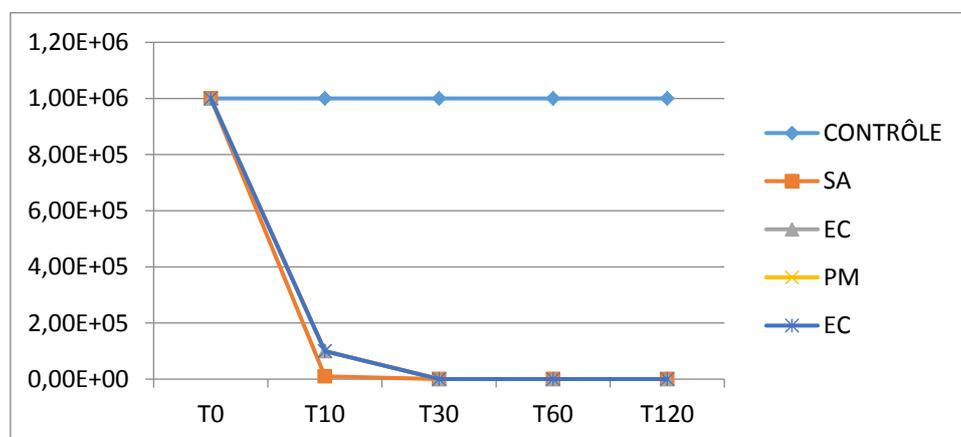


Figure 7 : Dynamique de l'action antibactérienne de *Mentha pulegium*

L'action des huiles essentielles de *Mentha pulegium*, utilisées à la CMB, est immédiate. Cette action est toutefois plus rapide sur *Staphylococcus aureus*, en effet, durant les dix premières minutes, la concentration bactérienne diminue de 4 log₁₀ et le seuil de détection est atteint au bout de 10 minutes, il est cependant atteint au bout de 30 min pour les autres bactéries étudiées.

L'action bactéricide de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* pourrait être attribuée à la quantité élevée de pulegone (88,78%). **Duru et al (2004)**, ont précédemment démontré une forte activité antimicrobienne de pulegone contre un ensemble de bactéries, y compris *S. typhimurim* et *E. coli*. **Oumzil et al (2002)** ont comparé l'action antibactérienne de différents monoterpènes (limonène, menthone, carvone et pulegone) connus pour leurs propriétés antimicrobiennes élevées et ont conclu que la pulegone présente l'activité biocide la plus puissante. Cependant, le mécanisme d'action de la pulegone est encore peu connu, **Cox et al (2000)** ont suggéré que les monoterpènes perturberaient la barrière de perméabilité des membranes cellulaires et inhiberaient la respiration.

D'une façon générale, la membrane plasmique des cellules bactériennes représente le premier site d'action des huiles essentielles. Ceci est directement lié à l'hydrophobicité des molécules qui entrent dans la composition des huiles essentielles. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Il s'ensuit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires (**Sikkema et al, 1994; Cox et al, 2000 ; Ultee et al, 2002 ; Carson et al, 2006 ; Guinoiseau, 2011**). En plus des altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intra-cytoplasmiques (**Cristani et al, 2007**).

En raison de la composition complexe d'huiles essentielles, de multiples cibles cellulaires non spécifiques pourraient être impliquées (**Carson et al, 2002 ; Burt, 2004**). Dans les bactéries, la perméabilisation de la membrane est associée à la perte d'ions et à la réduction du potentiel membranaire conduisant à l'effondrement de la pompe à protons et à l'épuisement des réserves d'ATP. En outre, les huiles essentielles peuvent coaguler le cytoplasme, endommager les lipides et les protéines générant ainsi des dommages à la paroi cellulaire et à la membrane qui conduisent à la fuite de macromolécules et à la lyse bactérienne (**Bakkali et al, 2008**).

I.4.4 Test de synergie

Les résultats de l'essai de synergie de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* avec les différents antibiotiques sont présentés dans le **tableau 12**.

Les résultats du checkerboard test sont interprétés en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FIC). Les valeurs de l'indice FIC ont été interprétées comme suit: effet synergique ($FICI \leq 0,5$), effet additif ($0,5 \leq FICI \leq 1$), effet indifférent ou antagoniste ($1 \leq FICI \leq 2$) (EUCAST, 2000 ; White et al, 1996).

Tableau 12 : Résultat de la checkerboard methode entre les antibiotiques et l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. pullorum</i>	<i>E. cloacae</i>
MP+ Amoxicilline	0.56± 0.1 ^d	0.5± 0.1 ^c	0.5± 0.1 ^c	0.31± 0.1 ^c	1.5± 0.5 ^e	1.25± 0.5 ^e
MP+ Pénicilline	-	-	-	0.06± 0.01 ^c	1.5± 0.5 ^e	0.75± 0.15 ^d
MP+ Céfotaxime	0.5± 0.1 ^c	0.093± 0.01 ^c	0.13± 0.1 ^c	0.5± 0.1 ^c	0.25± 0.1 ^c	0.093± 0.1 ^c
MP+ Céfazoline	0.18± 0.06 ^c	0.07± 0.1 ^c	0.07± 0.1 ^c	0.25± 0.1 ^c	0.5± 0.1 ^c	0.325± 0.1 ^c
MP+ Tétracycline	0.18± 0.06 ^c	0.5± 0.1 ^c	0.37± 0.1 ^c	0.25± 0.1 ^c	1± 0.5 ^d	0.75± 0.15 ^d
MP+ Imipénème	0.18± 0.06 ^c	0.5± 0.1 ^c	0.187± 0.06 ^c	0.06± 0.1 ^c	0.625± 0.15 ^d	1± 0.5 ^d
MP+ enrofloxacin	2± 0.5 ^e	2± 0.5 ^e	2± 0.5 ^e	2± 0.5 ^e	1.5± 0.5 ^e	1± 0.5 ^d
MP+ marbofloxacin	2± 0.5 ^e	2± 0.5 ^e	2± 0.5 ^e	2± 0.5 ^e	1.5± 0.5 ^e	0.325± 0.1 ^c
MP+ gentamicine	0.375± 0.1 ^c	0.18± 0.06 ^c	0.18± 0.06 ^c	0.18± 0.06 ^c	0.18± 0.06 ^c	0.18± 0.06 ^c



Figure 8 : Synergie observée entre la gentamicine et *Mentha pulegium* sur *Proteus mirabilis*

Sur les 51 associations testées entre l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et neuf antibiotiques conventionnels (enrofloxacin, gentamicine, amoxicilline, pénicilline,

céfazoline, céfotaxime, tétracycline, marbofloxacin, imipénème): 31 (60,78%) ont montré une synergie totale, 7 (13,72%) un effet additif, et 13 (25,49%) n'ont présenté aucun effet.

Les meilleures activités synergiques ont été obtenues par la combinaison de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et de la céfazoline, du céfotaxime et de la gentamicine dans laquelle l'indice FIC variait de 0,07 à 0,5. Cet effet synergique a été observé pour toutes les souches étudiées. La combinaison de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* avec l'amoxicilline, la tétracycline et l'imipénème a montré une synergie totale contre toutes les souches testées, à l'exception de *Salmonella* et *Enterobacter* (FICI \geq 0,75).

Les bactéries productrices de bêta-lactamase possèdent des enzymes à médiation plasmidique qui permettent d'hydrolyser et d'inactiver une grande variété de β -lactamines (**Shah Pratibha et Williamson, 2015**). Leur forte émergence au cours des dernières décennies, tant chez les animaux que chez les humains, menace la santé publique par de nombreuses infections graves et incurables en raison de leur forte résistance aux antibiotiques conventionnels.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* exerce un effet bactéricide, particulièrement contre les bactéries productrices de β -lactamases, par ailleurs, différentes associations avec les antibiotiques, notamment avec certaines β -lactamines, se sont avérées synergiques. Ceci constitue une piste alternative prometteuse dans la lutte contre l'antibiorésistance.

Certains rapports montrent une synergie entre les huiles essentielles et β -lactamines, qui agissent tous les deux sur la membrane cellulaire. Par exemple, le thymol agirait en synergie avec la pénicilline sur *E. coli* (**Gallucci et al, 2006**). **Palaniappan et Holley (2010)**, ont rapporté également des synergies entre le thymol, le carvacrol avec la pénicilline contre *E. coli* et *S. typhimurium*.

Certaines études antérieures ont rapporté des effets synergiques entre différentes huiles essentielles et les antibiotiques, ainsi, **Fadli et al (2012)**, ont rapporté l'effet synergique de l'huile essentielle de thym et plusieurs antibiotiques notamment le céfixime sur des souches *E. coli* et *Salmonella sp* BLSE.

Par ailleurs, **Si et al, (2008)**, ont rapporté des effets additifs entre l'huile essentielle d'organ et l'amoxicilline, le ceftiofur et le ceftriaxone sur des souches d'*E. coli* BLSE.

Certaines études ont rapporté l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur les β -lactamases, en l'occurrence l'épigallocatechingallate, la baïcaline et la myrcétine sur des SARM et des BLSE (**Hu et al., 2001 ; Zhao et al.,2001 ; Liu et al.,2000 ; Lin et al., 2005**).

Toutefois, aucune synergie n'a été noté concernant la combinaison de l'huile essentielle de menthe avec les antibiotiques de la famille des quinolones en l'occurrence la marbofloxacine et l'enrofloxacin à l'exception d'*Enterobacter* pour la marbofloxacine. Des effets synergiques entre l'huile essentielle de *Thym marrocanus* et la ciprofloxacine ont été notés sur *E coli*, *salmonella*, *enterobacter* et *klebsiella* (**Fadli et al, 2012**) l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et la sarafloxacine et la levofloxacine sur *E. coli* (**Si et al, 2008**) et l'huile essentielle de *P. chloranthus*, *T. ramosissimum* and *P. lentiscus* et l'ofloxacine sur *E. coli* (**Lahmar, 2017**).

De nombreux mécanismes peuvent engendrer les synergies entre les huiles essentielles et les antibiotiques, ils incluent l'inhibition séquentielle des voies biochimiques communes, l'inhibition des enzymes protectrices, des effets pharmacocinétique et physico-chimique pouvant améliorer la diffusion et biodisponibilité d'autres antimicrobiens. (**Hemaiswarya et al, 2008; Yap et al, 2014; Sokolova et al, 2005; Fadli et al, 2012**). En outre, des études récentes ont démontré que certains composés de plantes peuvent inhiber efficacement les pompes d'efflux impliqués dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques (**Smith et al, 2007**), ce qui pourrait conduire à la restauration de la sensibilité aux antibiotiques et à réduire leur dose minimale efficace et donc leurs effets secondaires et résidus dans les produits animaux.

1.5 Conclusion

Cette étude a permis de montrer que les huiles essentielles présentent de réels potentiels anti-infectieux en microbiologie, particulièrement l'huile essentielle de *Mentha pulegium* Algérienne très riche en pulegone, qui a présenté des propriétés bactéricides satisfaisantes et a démontré une synergie de son action lorsqu'elle était associée à certains antibiotiques contre des bactéries multi-résistantes.

L'utilisation de ces associations permettrait de réduire les doses minimales efficaces des médicaments ce qui réduirait leurs effets toxiques possibles et le coût du traitement.

L'utilisation des huiles essentielles en médecine vétérinaire constituerait une bonne alternative anti-infectieuse de par les effets antibactériens qu'elles possèdent. Par ailleurs, leurs actions dans l'amélioration des performances zootechniques ont été rapportées notamment pour l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (**Ben-Mahdi et al, 2010**) et de *Mentha pulegium* (**Goodarzi et Nanekarani, 2014**), ce qui présente une réelle piste alternative en élevage qui permettrait de réduire nettement l'usage des antibiotiques dans un but non-thérapeutique.

Les domaines d'application des huiles essentielles sont très divers, du fait du potentiel divers qu'offrent les huiles essentielles, ainsi leur potentiel antioxydant pourrait être mis à profit en industrie alimentaire et pharmaceutique.

Des travaux complémentaires sont nécessaires et devraient être entrepris pour déterminer avec précision les cibles cellulaires et moléculaires des huiles essentielles seules ou en association avec d'autres molécules antibactériennes.

Partie expérimentale II : Etude de l'activité cicatrisante

II. Etude de l'activité cicatrisante

II.1 Problématique & Objectif

La seconde partie de notre travail expérimental a été consacrée à l'étude de l'effet cicatrisant de certaines essences végétales de la flore algérienne traditionnellement utilisées dans le traitement des plaies. La cicatrisation est un processus physiologique qui exige une bonne aseptie de la plaie ainsi qu'une bonne vascularisation, elle est d'autant favorisée par l'usage de substances antibactériennes et antioxydantes.

Une enquête préliminaire effectuée dans le but de dresser un inventaire des plantes médicinales utilisées en pharmacopée traditionnelle a permis de sélectionner : *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus*.

Marrubium vulgare, communément appelé marrube blanc, مريوة en arabe, (marruyet en berbère) appartient à la famille des *Lamiaceae*, est originaire d'Afrique du Nord, d'Asie centrale et occidentale et du sud de l'Europe. Il pousse de façon sauvage dans les sols sableux et les prés secs entre mai et septembre. Cette plante est utilisée dans la médecine folklorique pour le traitement de différentes maladies incluant les troubles inflammatoires, gastro-entériques et respiratoires (*Balmé, 1982; Newall et al, 1996*). Le *Marrubium vulgare* posséderait également des effets vasorelaxant (*El-Bardai et al., 2003*), hypoglycémiant, antihypertenseur (*El-Bardai et al, 2004*), analgésique (*DeSouza et al, 1998*) et anti-inflammatoire (*Sahpaz et al, 2002*).

En outre, il est traditionnellement utilisé pour ses effets antispasmodique et antibactériens (*Sahpaz et al, 2002; Schinella et al, 2002; Masoodi et al, 2008*).

Le genre *Cytisus* appartient à la famille des *Fabaceae* qui compte environ 60 espèces. Il est répandu dans la région méditerranéenne. Huit espèces se développent dans le nord de l'Algérie (*Quezel, 1963*). Plusieurs espèces du genre sont utilisées dans la médecine folklorique pour leurs propriétés diurétiques, anti-inflammatoires, anti-hypertensives et antidiabétiques (*Giao et al, 2007 ; Rauter et al, 2009*).

Cytisus triflorus, localement connu sous le nom "Ilougui" est l'espèce la plus répandue parmi les huit espèces communément connues dans tout le nord de l'Algérie.

Cytisus triflorus est connu dans le nord de l'Algérie pour ses propriétés médicinales. Ses propriétés anti-inflammatoires ont été mises en évidence par une seule étude (*Aït-Kaci*

Aourahoum et al, 2015). Il est également utilisé pour traiter les douleurs abdominales, la cicatrisation des plaies (notamment durant la guerre de la révolution) et comme hémostatique, antifongique et hypotenseur, De plus, ses feuilles sont utilisées comme «henné» pour traiter et teindre les cheveux à cause de leur richesse en tanins.

Par conséquent, cette étude a eu pour objectif l'évaluation des propriétés potentiellement cicatrisantes de ces plantes afin de confirmer leur utilisation traditionnelle. Leur toxicité cutanée, leur composition phytochimique, leurs propriétés antioxydantes et antibactériennes ont également été évaluées.

Les résultats obtenus ont donné lieu à un manuscrit intitulé « Antibacterial, antioxidant and wound healing activities of *Marrubium vulgare* and *Cytisus triflorus* extracts native to Algeria », accepté pour publication dans la revue « Phytothérapie ».

II.2 Matériels Appareillages & Réactifs

II.2.1 Appareillages et matériel de laboratoire

- Broyeur mécanique
- Balance de précision
- Autoclave
- Etuve
- Spectrophotomètre Shimadzu modèle UV-1800
- Vortex
- Agitateur
- Incubateur /étuve
- Lecteur Biotek modèle ELx800
- Verrerie
- Tube de centrifugation 50 ml.
- Pipettes automatiques permettant la distribution de volumes de 10 à 1000µl.
- Pipettes automatiques permettant la distribution de volume de 2 à 10 ml.
- Embouts pour micropipettes.
- Tubes à essais à usage unique.
- Portoirs pour tube.
- Bêchers.
- Eau distillée.

- Eau physiologique.
- Gants en latex.
- Pipettes graduées.
- Microplaque de 96 puits.
- Trousse à dissection
- Cage métabolique pour animaux de laboratoire en plastique transparent (430 x 270 x 150 mm), et couvercle en acier inoxydable.
- Biberon pour animaux de laboratoire.

II.2.2 Réactifs chimiques

- Bouillon Muller Hinton (conda, Madrid, Espagne)
- Tween 80 (sigma-Aldrich)
- Antibiotique control (gentamicine, céfazoline)
- 3- 4.5-dimethylthiazol-2-yl-2.5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (sigma Aldrich, Saint Louis- USA)
- 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) (Sigma Aldrich, Saint Louis-USA)).
- Réactif de Folin-Ciocalteu's (VWR, prolabo- France).
- AlCl_3 (Biochem).
- Na_2CO_3 (Sigma aldrich, France).
- Méthanol (Sigma aldrich, France)
- Acétone (Sigma aldrich, France)
- Quercétine (Sigma aldrich, Saint-Louis, USA).
- Acide gallique (Biochem).
- Zoletil ® 50 (Virbac).
- Glycol stearate (Eden labo, Algérie).
- Propylene glycol (Eden labo, Algérie).
- Paraffine liquide (Eden labo, Algérie).
- Hématoxyline/ éosine.

II.2.3 Matériel végétal

Les parties aériennes de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* (**figure 1**) ont été collectées respectivement à Ain Bessam dans la wilaya Bouira (36° 17' 48" nord, 3° 40' 12", Est, à 675m d'altitude) et Bejaia (36° 45' 00" nord, 5° 04' 00" est, à 1092 m d'altitude) au mois de juin 2014.

Les parties aériennes des plantes récoltées ont été séchées à l'ombre pendant 15 jours, elles ont été conservées à l'abri de l'humidité jusqu'à leur extraction.

Les fiches ethnobotaniques établies pour chaque plante étudiée, sont jointes en annexe.

Les plantes ont été identifiées au niveau du Département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, un spécimen de chaque plante a été conservé au niveau du l'herbier du Laboratoire de Recherche Santé et Productions Animales où a été réalisée l'étude expérimentale.



Figure 1 : *Marrubium vulgare* (à gauche), *Cytisus triflorus* (à droite)

II.2.4 Matériel biologique

La sensibilité de différentes espèces bactériennes de l'American type Culture Collection (*E. coli* 8739, *Staphylococcus aureus* 6538, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 et *Bacillus subtilis* 6633) a été testée aux extraits étudiés.

II.2.5 Animaux de laboratoire

L'étude a porté sur des rats albinos de souche Wistar de sexe mâle d'un poids moyen variant de 180 à 200 g fournis par de l'Institut Pasteur d'Algérie. Les rats ont été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant une semaine avant l'expérimentation. Ils ont été abreuvés et nourris *ad libitum* avec des granulés spécial rongeurs.

L'expérimentation a été approuvée par le conseil de laboratoire de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, elle a été réalisée conformément aux règles et guidelines relatives à l'éthique sur l'expérimentation animale et la biodiversité.

II.3 Méthodes

II.3.1 Extraction

Les parties aériennes séchées ont été réduites en poudre à l'aide d'un broyeur mécanique. L'extraction a été effectuée selon la méthode modifiée d'Eloff (*Eloff, 2000*), en utilisant l'acétone comme solvant. Pour se faire, 1.5 g de poudre végétale est mise en contact avec 15 ml d'acétone (1 :10 w/v) dans des tubes coniques, pendant 5 à 10 min sous agitation, les tubes sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 3000 tr/min.

La phase liquide est décantée et la procédure est répétée deux fois sur le même matériel végétal. Les extraits sont obtenus après évaporation de l'acétone à température ambiante. Ils sont conservés à 4°C à l'obscurité jusqu'à utilisation.

II.3.2 Détermination des taux de polyphénols totaux et des flavonoïdes

La teneur totale en polyphénols des extraits acétoniques de *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus* a été déterminée par spectrophotométrie par la méthode de Folin-Ciocalteu, en se référant à une courbe d'étalonnage de l'acide gallique, utilisé comme standard (*Dorman et al, 2003*).

Une solution aqueuse de 1 mg/ml d'acide gallique est préparée. Des dilutions en demi sont ensuite effectuées afin de générer une gamme de concentration de 1 mg/ml à 0,0075 mg/ml.

Par ailleurs, 100 µl de suspensions aqueuses concentrées à 10 mg/ml d'extraits de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* obtenues ont été ajoutés respectivement à 6 ml d'eau distillée puis mélangé à 500 µl de réactif phénolique de Folin-Ciocalteu ; 1,5 ml d'une solution aqueuse à 20% de Na₂CO₃ ont été ajoutés aux mélanges. Ces derniers sont ensuite agités au vortex et complétés avec de l'eau à 10 ml. Pour le témoin négatif, seul le réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté.

Après incubation dans l'obscurité, à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance des échantillons a été mesurée en spectrophotométrie à 765 nm (Shimadzu UV-1800).

Le résultat est l'expression de la moyenne de trois essais indépendants, les polyphénols totaux (PPT) ont été estimés comme équivalents d'acide gallique (EAG) et exprimés en mg EAG / g d'extrait en poids de matière sèche (ms) ± écart-type (et).

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée sur microplaque, en spectrophotométrie en utilisant la méthode décrite par **Brahmi et al. (2015)** avec quelques modifications, elle est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium de couleur jaune dont la densité est mesurable en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 430nm.

La quercétine, utilisée comme standard, a été diluée dans de l'éthanol, une gamme de concentration allant 12,5 à 0,18 µg/ml a ainsi été générée en effectuant des dilutions en demi.

Par ailleurs, les extraits de *Marrubiumvulgare* et de *Cytisus triflorus* ont été dissous dans de l'éthanol à la concentration de 10 mg/ml. 100 µl de chaque solution (quercétine, *Marrubiumvulgare* et *Cytisus triflorus*) ont été ajoutés à 100 µl d'une solution à 2% d'AlCl₃-éthanol. Après un temps d'incubation de 15 min à température ambiante dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 430 nm par rapport à un blanc préparé sans extrait dans un lecteur de plaque (Biotek ELx 800).

La teneur en flavonoïdes est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine.

Le résultat est l'expression de la moyenne de trois essais indépendants, les flavonoïdes ont été estimés comme équivalents de quercétine (EQ) et exprimés en mg EQ/g de matière sèche (ms) ± écart-type (et).

II.3.3 Essais biologiques In vitro

a- Evaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode DPPH

Le pouvoir antioxydant des extraits de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* a été évalué par la méthode de 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyle DPPH décrit par **Brand-Williams et al, (1995)**.

50 µl d'une gamme de concentration allant de 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,3125 mg/ml, 0,15625 mg/ml) des extraits respectifs ont été ajoutés à 1250 µl de solution de méthanol DPPH (0,0004%).

Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu modèle UV-1800).

La quercétine a été utilisée comme molécule de référence, une gamme de concentration variant de 0,4mg/ml à 0,00625 mg/ml a été préparée à cet effet.

b- Evaluation de l'activité antibactérienne

Différentes souches bactériennes provenant des souches standards de l'American Type Culture Collection (ATCC) *E. coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC ATCC 6538 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ont été testées.

L'activité antibactérienne a consisté en la détermination des CMI des extraits par la méthode modifiée de micro-dilution sur microplaques, telle que décrite par **Eloff (1998)**. 20 mg des extraits acétoniques de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* ont été dissouts dans de l'eau physiologique /tween 80. Des dilutions en demi ont été effectuées dans une microplaque de 96 puits générant une gamme de concentration variant de 10 mg/ml à 0,019 mg/ml.

Les bactéries ont été cultivées sur de la gélose nutritive, et incubées à 37° pendant 24 heures. Des suspensions bactériennes d'une densité de 0,5 mac Ferland, puis diluées au 1/10 dans du bouillon Muller Hinton (1×10^6 UFC/ml) ont été préparées. 100 µl de chaque suspension microbienne sont ajoutées dans chaque puits de la microplaque. Cette dernière a été scellée et incubée 18 h à 37 ° C.

Après incubation, 40 µl de 0,2 mg/ml de solution de MTT [3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium, Sigma Chemicals] sont ajoutés. La microplaque a été examinée après une incubation supplémentaire de 30 à 120 minutes. La croissance bactérienne était indiquée par la couleur pourpre du MTT réduit en formazan. La concentration la plus faible à laquelle une diminution de la couleur pourpre a été observée par rapport à la dilution suivante a été retenue comme valeur minimum d'inhibition de la croissance bactérienne.

La gentamicine et la céfazoline ont été utilisées comme contrôles positifs pour chaque souche testée, le mélange eau physiologique/ tween 80 (0,01%) a été utilisée comme témoin négatif.

Toutes les déterminations ont été effectuées trois fois.

II.3.4 Essais biologiques In vivo

a- *Evaluation de la toxicité cutanée des extraits acétoniques de Marrubium vulgare et Cytisus Triflorus sur rats*

Les tests de toxicité aiguë cutanée des extraits acétoniques de *Marrubium vulgare* et *Cytisus Triflorus* ont été effectués en appliquant les onguents contenant les extraits à tester à la dose de 2000 mg/kg sur 12 rats de souche Wistar, répartis en 2 groupes expérimentaux. La région dorsale des rats a été rasée et l'onguent a été appliqué sur toute la région dorsale.

Les animaux ont été maintenus individuellement dans des cages séparées et mis en observation pour relever tout signe de toxicité cutanée (rougeur, irritation, œdème...) pendant 15 jours conformément à la directive N° 402 de l'OCDE.

b- *Evaluation de l'activité cicatrisante des extraits acétoniques de Marrubium vulgare et Cytisus Triflorus*

1- *Préparation de l'onguent à base d'extrait à tester*

Les onguents d'essai ont été préparés à une concentration de 5% d'extrait, en utilisant une base d'onguents (véhicule) consistant en une mixture de stéarate de glycol: propylène glycol: paraffine liquide aux proportions respectives de 3/ 6/ 1. La préparation a été faite tel que décrit par *Güvenc et al, (2012)*.

Les onguents ont été conservés à + 4°C dans des contenants opaques, pendant toute la période expérimentale.

2- Evaluation de l'activité cicatrisante sur un modèle excisionnel de cicatrisation murin

Le modèle excisionnel de cicatrisation a été utilisé pour l'évaluation des propriétés de cicatrisation de *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus*.

Ce modèle est utilisé afin d'évaluer la contraction et la fermeture de la plaie au cours du temps. Quatre groupes (I, II, III, IV) de six rats chacun ont été constitués aléatoirement, les animaux ont d'abord été anesthésiés par voie générale (Zoletil® 20mg/kg en IP), puis rasés sur la région dorsale inter-scapulaire. Une plaie circulaire d'un diamètre d'environ 1 cm a ensuite été créée à l'aide d'un emporte-pièce et d'une lame chirurgicale.

Les quatre groupes ont été traités quotidiennement avec 0,5 g de pommade/rat, par voie topique pendant 15 jours. Le groupe I a été traité avec le médicament de référence Madécassol® (Bayer), le groupe II a reçu le véhicule et les groupes III et IV ont été traités avec les onguents contenant chacun 5% d'extrait de *Marrubium vulgare*, et de *Cytisus triflorus*.

Les plaies ont été laissées à l'air libre et les animaux ont été déposés individuellement dans des cages séparées.

Le taux de contraction des plaies a été contrôlé par mesure planimétrique de la surface de la plaie tous les trois jours pendant 15 jours. Les changements progressifs dans la plaie ont ainsi été évalués en traçant les limites de celle-ci sur un papier transparent, les superficies ont ensuite été calculées en utilisant le logiciel AutoCAD© et la contraction de la plaie a été exprimée en pourcentage de réduction de la taille originale de la plaie selon la formule suivante (Sadaf et al, 2006; Li et al, 2008):

$$\text{Contraction de la plaie (\%)}_N = \frac{(\text{superficie } J_0 - \text{superficie } J_n)}{\text{superficie } J_0} \times 100$$

3- Etude histopathologique

Les échantillons de peau cicatrisée de chaque groupe ont été recueillis à la fin de l'expérimentation. Les échantillons ont été fixés dans du formol tamponné à 10%, traités et bloqués dans de la paraffine. Des sections de 5 μm ont été réalisées et les lames ont été colorées à l'hématoxyline et l'éosine (HE).

Les tissus ont été examinés sous microscope optique, la qualité de la cicatrisation superficielle et conjonctive a été appréciée, les populations cellulaires ont été identifiées et la phase du processus de cicatrisation a été déterminée : phase inflammatoire, phase proliférative ou phase de remodelage.

II.3.5 Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à un intervalle de confiance de 95% de signification statistique en utilisant le logiciel SPSS 20.0.

Le test de Mann Whitney a été utilisé à un intervalle de confiance de 95% pour comparer les taux moyens des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes, ainsi que pour évaluer la significativité des résultats de l'activité antioxydante et de l'activité antibactérienne des extraits étudiés.

L'analyse du test du Chi-2 (χ^2) a été effectuée pour comparer les pourcentages (%) de la contraction de la plaie.

L'ANOVA à un facteur a été utilisé pour déterminer la significativité de la variance des différences de valeurs du diamètre de la plaie entre les différents groupes.

II.4 Résultats & Discussion

II.4.1 Rendement des extractions

12 g de poudre de matière végétale sèche de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* ont permis l'obtention de **1,029 g** et **1,25 g** d'extrait soit un rendement de **8,57%** et **10,78 %** respectivement.

Le résultat obtenu pour le *Marrubium vulgare* est différent des rapports précédemment publiés sur la même plante : 11,44% (*Djahra et al, 2013*) ; 3,60% (*Amessis-Ouchemoukh et al, 2014*) et 22,5% (*Khodja et al, 2014*).

Aucune donnée sur le rendement de l'extraction concernant l'espèce *Cytisus triflorus* n'a été documentée.

Ces différences de rendement pourraient être influencées par les différentes méthodes d'extraction utilisées ainsi que par les solvants différents pour chaque étude. Les solvants polaires tels que le méthanol et l'éthanol sont les plus fréquemment utilisés. En ce qui concerne notre étude, le choix de l'acétone a été motivé par le fait qu'il ne possède pas/ ou peu d'effets toxiques sur les organismes bactériens et de sa toxicité modérée sur les animaux par rapport aux autres solvants. Par ailleurs, de par sa polarité intermédiaire, il permet d'extraire une large gamme de métabolites secondaires actifs et les extraits obtenus se rapprochent ainsi par leur composition des préparations utilisées en médecine traditionnelle utilisant l'eau comme solvant (*Eloff, 1998*).

II.4.2 Détermination des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les polyphénols totaux ont été estimés en équivalents d'acide gallique (EAG) et exprimés en mg EAG par gramme (g) de matière sèche.

Les valeurs de densité obtenues en spectrophotométries relatives à la gamme étalon de l'acide gallique ont permis de tracer une courbe de calibration (**Figure 2**) et de définir la formule suivante :

$$y = 1,1264x - 0,0009$$

(y correspond à l'absorbance, et x à la concentration de l'acide gallique)

$$R^2 = 0,9995.$$

Les polyphénols totaux (PPT) dans les extraits ont été estimés, en se référant à cette courbe, comme équivalents d'acide gallique (EAG) et exprimés en mg EAG / g de matière sèche \pm écart-type.

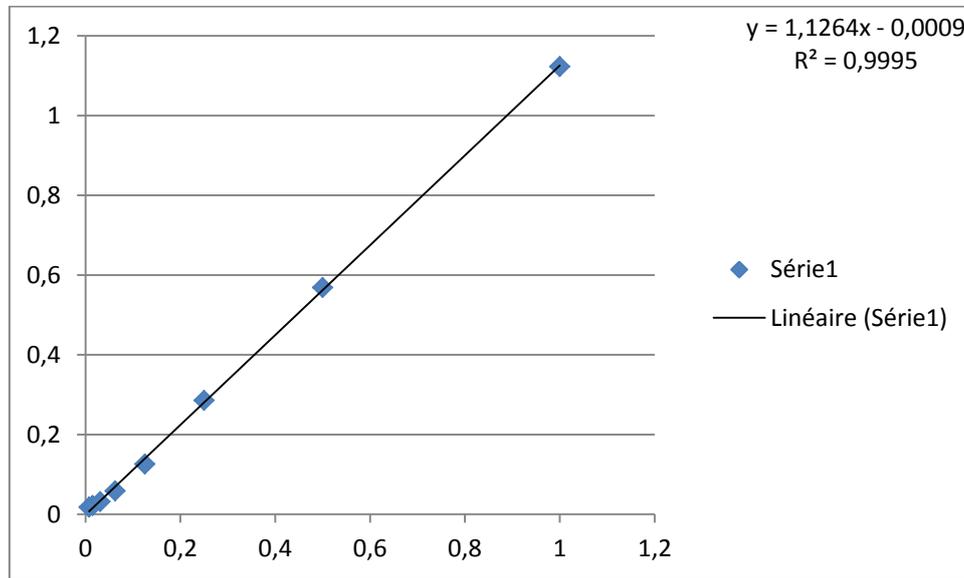


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

De même, la teneur en flavonoïdes totaux (FT) a été calculée en équivalents de quercétine (EQ) et exprimée en mg EQ par gramme (g) de matière sèche \pm écart-type.

Les valeurs de densité obtenues en spectrophotométries relatives à la gamme étalon de quercétine ont permis de tracer une courbe de calibration (**Figure 3**) et de définir la formule suivante :

$$y = 1,1264x - 0,0009$$

$$R^2 = 0,9995$$

x représente la concentration de quercétine ($\mu\text{g} / \text{mL}$) et y correspond à l'absorbance.

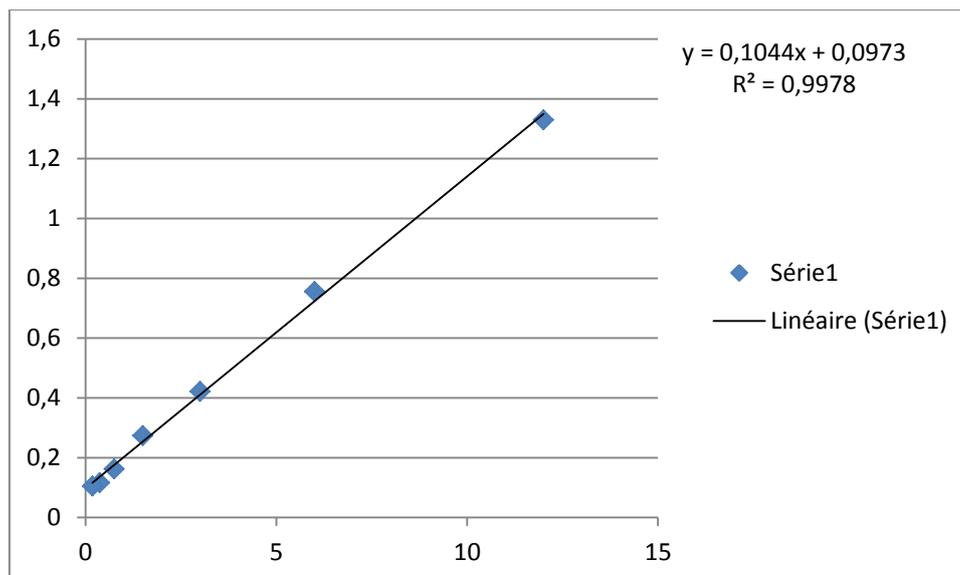


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de la quercetine

Les résultats globaux des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes sont présentés dans le **tableau 1**.

Tableau 1: Teneur des extraits acétoniques du MV et CT en polyphénols totaux et en flavonoides

Extrait acetonique	Rendement de l'extraction %	PPT*(mg EAG)/g	FT* (mgEQ/g)
<i>Marrubium vulgare</i>	8,57%	7,22 ± 0,87 mg EAG/g	0,85 ± 0,05 mg EQ/g
<i>Cytisus triflorus</i>	10,78%	8,48 ± 0,86 mg EAG/g	0,531 ± 0.06mg EQ/g

L'analyse phytochimique préliminaire des extraits *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus* a montré des teneurs élevées en polyphénols et moindre en flavonoïdes ($p < 0,001$).

La teneur en flavonoïdes de l'extrait de *Marrubium vulgare* est significativement plus importante que celle de l'extrait de *Cytisus triflorus* ($p < 0,05$).

Plusieurs études ont rapporté la présence de flavonoïdes et de composés phénoliques dans différents extraits de *Marrubium vulagre* obtenus par différents solvants. Leur quantité peut toutefois varier sous l'influence de plusieurs paramètres notamment le génotype de la plante, ses conditions de développement et de croissance, son stade de maturité et les conditions de

son stockage (**Zang et hamauru, 2003**). Par ailleurs, le procédé d'extraction et les solvants utilisés peuvent jouer un rôle dans la teneur de l'extrait en métabolites secondaires.

En ce qui concerne *Cytisus triflorus*, peu d'études ont été menées sur cette espèce de plante. **Ait-Kaci Aourahoum et al (2015)** ont signalé une grande quantité de polyphénols totaux et de flavonoïdes sur un extrait hydro-éthanolique dont les taux estimés en mg EAG/ gramme d'extrait et mg EQ/ gramme d'extrait sont de $204 \pm 4,24$ et de $52,13 \pm 1,69$ respectivement.

II.4.3 Activité antioxydante

L'activité antiradicalaire des extraits acétoniques de *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus* a été évaluée par la méthode DPPH.

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Blois, 1958 ; Brand-Williams et al, 1995**). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Figure 4**). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur pourpre bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration pourpre, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

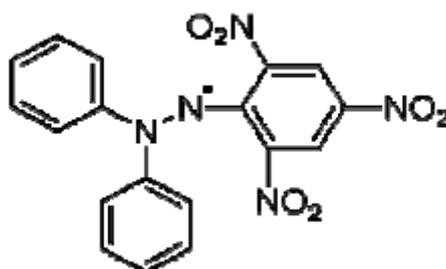


Figure 4 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle)

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

- La libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certains acides et dérivés phénoliques) ;

- La libération d'un électron (cinétique lente des dérivés glycosylés et des anthocyanes) (*Popovici et al, 2009*).

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH de couleur jaune:

La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, et donc d'arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Le test DPPH est une excellente méthode *in vitro* pour étudier l'activité antiradicalaire d'un antioxydant (*Molyneux, 2004 ; Popovici et al, 2009*).

Les résultats de l'effet des extraits étudiés sur le piégeage des radicaux libres sont exprimés en IC 50 et sont présentés dans le **Tableau 2**

Tableau 2 : Activité antiradicalaire des extraits acétoniques

Extrait/ étalon	Piégeage DPPH IC ₅₀ (mg/ml)
Quercetin	0,06 ± 0,02 mg/ml
<i>Marrubium vulgare</i>	0,481± 0,1 mg/ml
<i>Cytisus triflorus</i>	0,792 ± 0,1 mg/ml

Les extraits acétoniques du *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* présentent une activité anti-radicalaire satisfaisante, toutefois une meilleure action a été notée pour l'extrait de *Marrubium vulgare*, cette observation peut être expliquée par sa teneur en flavonoïde plus importante que celle de l'extrait de *Cytisus triflorus*.

La quercétine, substance pure utilisée comme étalon, a présenté la plus faible IC 50 égale à 0,06 mg/ml, valeur nettement inférieure à celle des extraits étudiés ($p < 0,05$). L'effet antiradicalaire des extraits testés par rapport à la quercétine se compare comme suit: quercétine > MV > CT (**Tableau 2**).

Des études récentes ont démontré que l'activité antioxydante et antibactérienne d'une plante était directement associée à sa teneur en composés phénoliques (*Conforti et al, 2008 ; Giao et al, 2007*).

Dans notre étude, la teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits étudiés justifie leur action anti-oxydante, ils constitueraient donc de bon agents de protection cellulaire contre le stress oxydatif et limiteraient ainsi l'apparition des maladies dégénératives causées par les radicaux libres (*Hernandez-Hernandez et al, 2017 ; Ben-Mahdi et al, 2016*). Les effets cytoprotectifs ont été mis en évidence notamment sur les fibroblastes, kératinocytes et cellules endothéliales de la peau (*Hernandez-Hernandez et al, 2017*).

Nos résultats rejoignent les travaux antérieurs ayant mis en évidence l'action anti-oxydante de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* par la méthode de DPPH (*Ghedadba et al, 2014, Khaled-Khodja et al, 2014, Amessis-Ouchemoukha et al, 2014, Ait-Kaci-Aourahoum et al, 2014, Ait-Kaci-Aourahoum et al, 2015*).

II.4.4 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits étudiés a été évaluée par la méthode de microdilution et les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tous les extraits testés ont présenté une CMI inférieurs à 1mg/ml ce qui traduit une bonne action antibactérienne contre toutes les souches testées, excepté pour *Pseudomonas aeruginosa*. Ils sont toutefois plus actifs sur bactéries Gram positifs (*S. aureus, B. subtilis*) pour lesquelles, les CMI observées étaient les plus basses variant de 0,12- 0,52 mg/ml ($p < 0,05$) (**Tableau 3**).

D'une façon générale, l'action de l'extrait de *Marrubium vulgare* était meilleure que celle de l'extrait de *Cytisus triflorus* contre les souches étudiées excepté pour *Pseudomonas aeruginosa* ($P < 0,05$).

L'activité antibactérienne des extraits a été comparée à la gentamicine comme antibiotique de référence qui a inhibé complètement la croissance bactérienne et l'eau physiologique/ tween 80 (0,01%) en tant que témoin négatif qui n'a eu aucun effet sur la croissance bactérienne.

Tableau 3 : Activité antibactérienne des extraits acétoniques de *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus*

Souches bactériennes	Extrait de <i>Marrubium vulgare</i>	Extrait de <i>Cytisus triflorus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,12 ± 0,05 mg/ml	0,26 ± 0,09 mg/ml
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0,52 ± 0,18 mg/ml	0,42 ± 0,18 mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1,67 ± 0,72 mg/ml	1,67 ± 0,72 mg/ml
<i>Escherichia coli</i> (ATCC8739)	0,52 ± 0,18 mg/ml	1,04 ± 0,36 mg/ml

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que les bactéries Gram positives étaient plus sensibles aux extraits étudiés que les Gram négatifs ($p < 0,05$). Ceci est dû aux caractéristiques structurelles et à la composition de la paroi de ce groupe bactérien. Les peptidoglycanes sont à l'intérieur d'une matrice d'acides teichoïques, teichuroniques et lipoteichoïques, qui fournissent une charge négative pour assimiler les cations divalents. Cette caractéristique rend les bactéries Gram positives plus sensibles aux composés polaires de l'extrait acétonique (*Cimanga et al, 2002*).

L'activité antibactérienne du *Marrubium vulgare* a été démontrée antérieurement notamment sur les souches d'*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (*Djahra et al, 2013*). Par ailleurs, *Khaled-Khodja et al, (2014)* ont rapporté une bonne activité sur gélose de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* sur les souches de *S. aureus* et *E. coli* avec des diamètres d'inhibition 18,5 mm et 15,5mm respectivement. La CMI rapporté pour *E.coli* était de 0,9 mg/ml.

Aucun rapport sur l'activité antibactérienne de *Cytisus triflorus* n'a été rapporté antérieurement.

II.4.5 Toxicité cutanée

Aucun signe clinique de toxicité cutanée, y compris d'irritation, de sensibilité, de rougeur et/ou d'inflammation n'a été signalé pendant les 14 jours de l'observation. Ce qui permet d'estimer que la toxicité aiguë cutanée est supérieure à 2000 mg / kg. Les deux plantes sont par conséquent considérées dénuées de tout effet toxique cutané.

II.4.6 Activité cicatrisante

a- Résultats de l'évaluation de l'activité cicatrisante sur un modèle excisionnel de cicatrisation murin

La cicatrisation des plaies est un phénomène biologique qui est automatiquement initié par l'organisme dès qu'il y a un dommage physique d'un tissu ; c'est le résultat de l'interaction d'une cascade complexe d'actions cellulaires et biochimiques menant à la restauration de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des tissus lésés (*Witte et Barbul ,1997 ; Broughton et al, 2006*).

Dans les conditions naturelles, le processus de contraction est la principale voie de cicatrisation. C'est un phénomène naturel qui facilite grandement le traitement des plaies cutanées étendues, elle se poursuit jusqu'à ne laisser qu'une cicatrice réduite. En effet, la contraction de la plaie est due aux myofibroblastes du tissu de granulation qui possèdent des caractères des muscles lisses.

L'évaluation de l'effet cicatrisant des extraits de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* a été effectuée selon un modèle excisionnel dont l'objectif est d'étudier la contraction de la plaie par une analyse planimétrique permettant une évaluation quantitative directe par le calcul de la superficie de la plaie et de son évolution dans le temps.

Les valeurs de contraction des plaies des différents groupes testés : groupe véhicule, groupe Madecassol® et les groupes expérimentaux traités respectivement par les pommades à base d'extrait de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* sont présentées dans le **Tableau 4**.

Les pourcentages des taux de rétraction des plaies sont également présentés.

Les résultats obtenus indiquent un bon potentiel de guérison des groupes traités par les onguents à bases d'extraits à la concentration de 5%, en effet, la contraction des plaies des groupes expérimentaux sont semblables au groupe traité par le médicament de référence (Madecassol®) (test χ^2 $p = 0,0742$, ANOVA test $p=0.0795$). Par ailleurs, le taux de contraction des plaies du groupe véhicule est significativement inférieur à celui des groupes expérimentaux et de référence (χ^2 test $p = 0,025$; ANOVA $p= 0.031$).

L'analyse planimétrique des plaies a mis en évidence le potentiel cicatrisant de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* notamment au 14^{ème} jour (Figure 5), ce potentiel a encore été confirmé par les résultats de l'étude histologique présentée ci-dessous.

Il s'agit de la première étude portant sur l'évaluation de l'activité cicatrisante de *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus*.

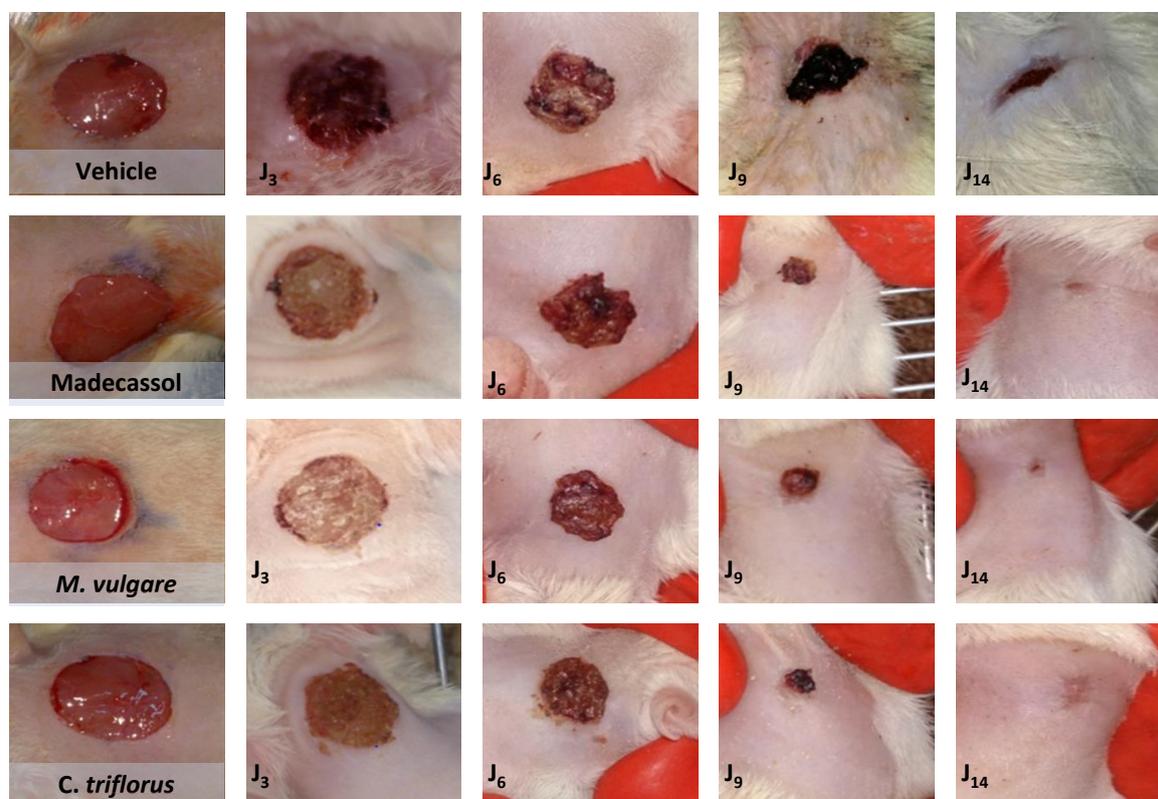


Figure 5 : Evolution des plaies au cours du processus de cicatrisation

Tableau 4 : Surfaces moyennes des plaies en cm² et taux moyens de rétraction des plaies

Jours après création de la plaie	<i>Surfaces moyennes des plaies cm² ± sd (% rétraction des plaies)</i>			
	Groupe I Madécassol ®	Groupe II Pommade véhicule	Groupe III Pommade <i>M. vulgare</i>	Groupe IV Pommade <i>C. triflorus</i>
0	1,45 ± 0,12 (0%)	1,46 ± 0,21 (0%)	1,45 ± 0,13 (0%)	1,46 ± 0,2 (0%)
3	1,18 ± 0,11 (18%)	1,28 ± 0,23 (12,32%)	1,06 ± 0,2 (26%)	1,08 ± 0,2 (26,02%)
6	0,72 ± 0,24 (50%)	0,89 ± 0,18 (39,04%)	0,65 ± 0,13 (55,17%)	0,60 ± 0,18 (58,90%)
9	0,36 ± 0,12 (75%)	0,49 ± 0,06 (66,43%)	0,36 ± 0,12 (75,17%)	0,32 ± 0,12 (78,08%)
14	0,05 ± 0,01 (96,55%)	0,38 ± 0,02 (73,97%)	0,09 ± 0,02 (93,79%)	0,08 ± 0,05 (94,52%)
Le % de contraction de la plaie du groupe II est significativement inférieure aux autres groupes (χ^2 test $p=0.025$)				
Le % de contraction de la plaie des groupes I, III and IV est statistiquement similaire (χ^2 test $p=0.0742$)				
Le diamètre de la plaie du groupe II est significativement supérieur compare aux autres groupes (ANOVA test $p=0.031$)				
Le diamètre des plaies des groupes I, III and IV est statistiquement similaire (ANOVA test $p=0.0795$)				

b- Résultats de l'évaluation histopathologique

Les résultats de l'étude histopathologique des tissus cicatriciels prélevés au 14^{ème} jour sont résumés dans le **Tableau 5**, les coupes histologiques correspondant à chaque lot sont présentés dans la **Figure 6**, la phase du processus de cicatrisation pour chaque lot a été déterminée en fonction du niveau d'épithélialisation de l'épiderme, la fibrose du tissu conjonctif, sa population cellulaire et sa vascularisation.

Comme cité précédemment, une similarité dans le processus cicatriciel a été mise en évidence entre les lots expérimentaux et le lot de référence, ainsi, une réépithélialisation complète de l'épithélium a été rapportée, de plus, une infiltration inflammatoire discrète comprenant des polynucléaires et monocytes ainsi qu'une prolifération modérée des fibroblastes ont été observés dans le tissu conjonctif.

En ce qui concerne le lot véhicule, une épithélialisation incomplète a été notée, de plus, une forte prolifération des fibroblastes a été observée, elle était accompagnée d'une forte présence d'éléments inflammatoires, en l'occurrence des polynucléaires neutrophiles.

Par ailleurs, une vascularisation de type capillaire a été notée. Toutes ces observations déterminent la phase inflammatoire du processus cicatriciel.

Tableau 5 : Résultats de l'étude histopathologique des cicatrices des différents groupes expérimentaux

	Lot Madécassol®	Lot véhicule	Lot <i>Marrubium vulagre</i>	Lot <i>Cytisus triflorus</i>
Epiderme	Régulier	+/- Reconstitué	Régulier	Régulier
Tissu conjonctif	Fibrose modérée paucicellulaire Discret infiltrat inflammatoire +	Fibrose cellulaire riche en éléments inflammatoire polymorphe ++	Fibrose cellulaire avec discret infiltrat inflammatoire	Fibrose cellulaire avec discret infiltrat inflammatoire
Vascularisation	Vaisseaux sanguins de type capillaire +	Vaisseau sanguin de type capillaire +++	Vaisseaux congestifs de type capillaire +	Vaisseaux congestifs de type capillaire +
Evolution de la cicatrisation	Cicatrisation ad intégrale / Phase de remodelage	Cicatrisation non achevée Phase inflammatoire/ proiférative	Cicatrisation ad intégrale	Cicatrisation ad intégrale

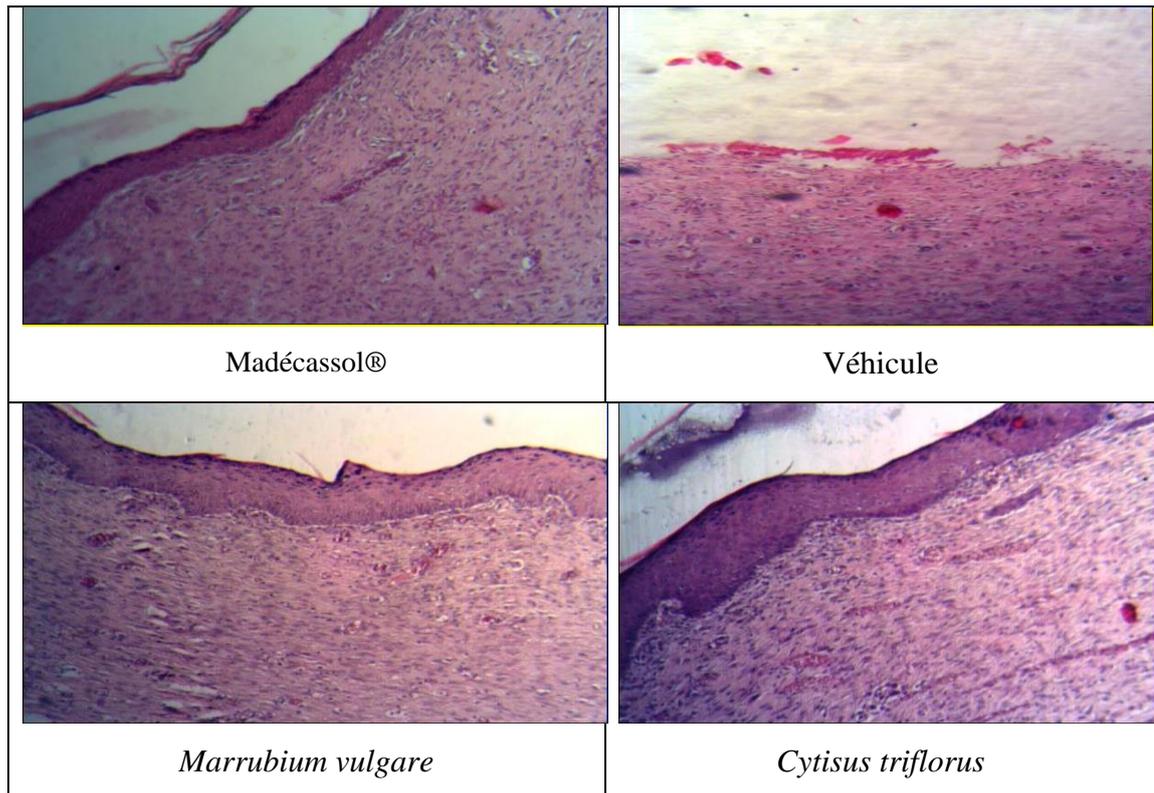


Figure 6 : Aspect histologique des cicatrices sur les différents groupes expérimentaux
(Grossissement x 40)

L'analyse phytochimique des extraits acétoniques de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* a mis en évidence des teneurs élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes, métabolites fortement impliqués dans l'effet antioxydant des deux plantes ainsi que dans l'activité antibactérienne particulièrement sur *Staphylococcus aureus*.

Ces observations sont cohérentes avec l'usage ethnobotanique de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* pour la cicatrisation et les maladies de peau qui sont principalement causées par des bactéries Gram positives.

En outre, les flavonoïdes sont dotés de divers effets thérapeutiques, et sont notamment connus pour leur effet anti-inflammatoire.

L'inflammation est l'un des processus majeurs de la cicatrisation des plaies, ainsi une inflammation excessive ou incontrôlée pourrait altérer ou retarder le processus cicatriciel.

Marrubium vulgare et *Cytisus triflorus* ont été étudiées précédemment pour leur effet anti-inflammatoire (Sahpaz et al, 2002 ; Ait-Kaci Aourahoum et al, 2015) qui pourrait partiellement expliquer le bon potentiel cicatrisant de ces deux plantes. De plus, la contraction

de la plaie et son épithélialisation sont favorisées par l'effet antimicrobien et astringent de ces plantes.

Le processus de guérison débute immédiatement après la blessure et se déroule en quatre étapes. La première étape est la coagulation, qui contrôle la perte de sang excessive par les vaisseaux endommagés. Elle est suivie par la phase inflammatoire, puis la ré-épithélialisation, qui comprend la prolifération, la migration et la différenciation des cellules épithéliales squameuses de l'épiderme. La phase finale du processus de guérison consiste en un dépôt de collagène et un remodelage qui se produisent dans le derme (*Chettibi et Ferguson, 1999 ; Senet, 2007*).

Les extraits de plantes riches en polyphénols induisent la guérison des plaies en intervenant à différents niveaux, ils activent le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), ce qui provoque des signaux prolongés sur les kératinocytes pour augmenter l'angiogenèse dans le site blessé. Par ailleurs, le VEGF active l'expression de la glycoprotéine de la matrice extracellulaire pour réparer autour de la plaie. La prolifération induite du fibroblaste dermique, produit par conséquent ECM, glycoprotéines, cytokines et molécules adhésives pour l'expansion du collagène et la formation du complexe fibroblaste-kératinocytes-endothélium, L'activité de la phosphatase alcaline (PAL) augmentent la synthèse du collagène (*Das et al, 2017*).

Les résultats expérimentaux de l'activité cicatrisante de *Marrubium vulgare* et de *Cytisus triflorus* ont montré que l'application topique de l'onguent préparé à base d'extraits acétoniques présentait une efficacité significativement similaire à celle du médicament de référence.

La fermeture des plaies est le résultat de la contraction des bords de la plaie vers le centre; ce mouvement centripète serait dû à l'action des myofibroblastes (*Chitra et al, 2009*). Par ailleurs, l'épithélialisation des plaies pourrait être due à une prolifération facilitée des cellules épithéliales et / ou à une augmentation de la viabilité des cellules épithéliales favorisée par l'action des polyphénols et des flavonoïdes (*Sanwal et al, 2011*).

II.5 Conclusion

Les résultats de la présente étude indiquent que les extraits acétoniques de *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus* exercent une action positive sur la cicatrisation des plaies et favoriseraient ce processus, non seulement par leur activité antibactérienne évitant ainsi les surinfections, mais également par leurs actions anti-inflammatoire et anti-radicalaire.

Ces résultats confortent leur utilisation traditionnelle, toutefois, d'autres investigations sont nécessaires pour identifier les composés bioactifs responsables des effets pharmacologiques observés.

Conclusion générale

Conclusion générale et Perspectives

L'objectif du présent travail a été la valorisation et la recherche de nouvelles substances alternatives anti-infectieuses d'origine végétale. Il a abordé de deux volets principaux ; le premier consacré à l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles notamment sur des bactéries multi-résistantes, le second, avait pour but d'évaluer les activités antibactérienne, antioxydante et cicatrisante d'extraits de plantes sur la base de connaissances ethno-pharmacologiques locales.

Les résultats obtenus au cours de la première partie a permis de mettre en avant les propriétés antibactériennes des huiles essentielles et de leurs constituants à l'égard de plusieurs bactéries pathogènes. Les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Thymus fontaneseii* se sont avérées être les plus actives et ont présenté des propriétés bactéricides satisfaisantes. Par ailleurs, l'association de l'huile essentielle de menthe avec les antibiotiques conventionnels a présenté des effets additifs ou synergiques prometteurs.

L'utilisation des huiles essentielles en médecine vétérinaire constitue une bonne alternative anti-infectieuse de par les effets antibactériens qu'elles possèdent, par ailleurs, leur potentiels dans l'amélioration des performances zootechniques ont été rapporté notamment pour l'huile essentielle de thym (*Ben-Mahdi et al, 2010*) et de menthe pouliot (*Goodarzi Nanekarani, 2014*), ce qui présente une réelle piste alternative en élevage qui permettrait de réduire nettement l'utilisation des antibiotiques dans un but non-thérapeutique, par ailleurs, l'exploitation des diverses propriétés des huiles essentielles (antioxydante, immunostimulante, anti-infectieuse...) est une mesure sanitaire intéressante pouvant s'avérer efficace dans la prévention des infections.

Cette stratégie devrait être considérée avec intérêt dans la mesure où elle rejoint une des principales recommandations de L'OMS dans la lutte contre l'antibiorésistance.

La seconde partie du travail a porté sur l'étude des extraits de plante de *Marrubium vulgare* et *Cytisus triflorus*, et a permis de démontrer leur effet cicatrisant probablement favorisé par leur activité antibactérienne, mais également par leurs actions anti-inflammatoire et anti-radicalaire.

La voie de la valorisation pencherait vers le développement d'un médicament phyto-thérapeutique vétérinaire topique, le remède ne présentant pas de toxicité cutanée avérée.

De nombreuses études restent cependant indispensables avant de pouvoir, dans un cas comme dans l'autre, aboutir à des recommandations d'usage dans le domaine vétérinaire.

L'ensemble de ces travaux confirme l'intérêt des substances naturelles dans le cadre de la recherche de composés bioactifs, ainsi que la validité des stratégies ethno-pharmacologiques dans la recherche de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique.

L'étude des utilisations traditionnelles des plantes reste pertinente, surtout dans le contexte où l'usage des plantes médicinales reste vivace. D'une façon générale, ces travaux permettent de mieux démontrer les propriétés médicinales de certaines espèces et participent également à une meilleure connaissance de la chimio- et de la biodiversité des espèces algériennes, ce qui devrait inciter à une meilleure préservation de notre environnement et notre patrimoine floristique.

Des travaux approfondis sont nécessaires et devraient être entrepris pour déterminer avec précision les cibles cellulaires et moléculaires des huiles essentielles et des molécules bioactives sur les organismes ciblés.

Les références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdelli M, Moghrania H, Aboun A et Maachi R, 2016: Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products* (2016) 94, 197–205.

AFNOR, 1986: Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles, Association Française de Normalisation, Paris, 1986.

Afshar FF, Saffarian P, Hosseini HM, Sattarian F, Amin M, Fooladi AA, 2016: Antimicrobial effects of *Ferula gummosa* Boiss gum against extended-spectrum β -lactamase producing *Acinetobacter* clinical isolates. *Iran J Microbiol.* 2016 Aug;8(4):263-273

Agnihotri VK, Agarwal SG, Dhar PL, Thappa Baleshwar RK, Kapahi BK, Saxena RK et Qazi GN, 2005: Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Fragrance Journal* 2005; 20: 607–10.

Ait-Kaci Aourahoum K, Fazouane F and Benayache S, 2015: Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. Extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent. *Pharma Lett.* 2015; 7 (5):104-10.

Ait-kaci Aourahoun K, Fazouane F, Benayad T, Bettache Z, Denni N, 2014: The synthetic antioxidant Butylated Hydroxytoluene, a naturally occurring constituent of the broom *Cytisus triflorus* L'Hérit. *J Nat Prod.* 2014; 7:58-64.

Chebli. S, Ait-Kaci Karima, Fazouane Fathia, 2011: Etude comparative des méthodes d'extraction des alcaloïdes de la plante médicinale *Cytisus triflorus* l'hérit; 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2; Ourgla; ALGERIE.

Albina JE, 1994: Nutrition and wound healing. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1994; 18:367-376.

Alessi MC, Ailaud MF, Juhan-Vague I, 1995: Physiologie de la fibrinolyse. In: Sampol J, Arnoux D, Boutière B, editors. *Manuel d'hémostase.* Paris: Elsevier; 1995. p. 57–74.

Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AM, 2003: Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds* 2003; 2:60-8.

Amarti F, El Ajjouri M, Ghanmi M, et al, 2011: Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie* 9: 149–57.

Amarti F, Satrani B, Aafi A, 2008: Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie* 6: 342–7.

Amessis-Ouchemoukha N, Abu-Reidah I M, Quirantes-Piné R, Quirantes-Piné R, Madani K, Segura-Carretero A, 2014: Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total

phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Ind Crops Prod.* 2014; 61:120-129.

Armstrong J.S, 2006 : Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays* 28, 253–260.

Arpino P, Prévôt A, Serpinet J, Tranchant J, Vergnol A, et Witier P, 1995: Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4ème éd. Paris: Masson, 1995, 700 pages.

Artuc M, Steckelings UM, Henz BM, 2002: Mast-cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *J Invest Dermatol* 2002; 118:391-5.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et Idaomar M, 2008: Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46-2: 446-75.

Balmé E, 1982: Plantas medicinais. Hemus Ltda, Brazil, pp. 241–243.

Balunas MJ et Kinghorn AD, 2005 : Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78, 431-441.

Barrandon Y et Green H, 1987: Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 1987; 50:1131-7.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC and Turck M 1966: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45-4: 493-6.

Bauernfeind A et Horl G, 1987: Novel R-factor borne beta-lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. *Infection* 15:257-9.

Beghidja N, Bouslimani N, Benayache F, Benayache S et Chalchat JC, 2007: Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the East of Algeria. *Chem Nat Compd* 2007; 43: 481–3.

Bekhechi C, Atik Bekkara F, Abdelouahid DE, Tomi F, Casanova J, 2007: Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss et Reut from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 19:6, 594-596.

Ben-Mahdi MH, Dang PMC, Gougerot-Pocidallo MA, O'Dowd Y, El-Benna J, Pasquier C, 2016: Xanthine Oxidase-Derived ROS Display a Biphasic Effect on Endothelial Cells Adhesion and FAK Phosphorylation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Ben-Mahdi M-H, Djellout B, Bouzagh-Belazouz T, Yahiaoui F et Ben-Mahdi N-R 2010: Intérêt de l'huile essentielle de thym dans l'amélioration des performances zootechniques et sanitaires du poulet de chair. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 22, Article #112.

Blois MS, 1958: Antioxidant determination by the use of stable free radicals. *Nature* 26, 1199–1200.

Bouzouita N, Kachouri F, Hamdi M, et Chaabouni, M.M, 2003: Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 380–383.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I et Jovin E, 2007: Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae*) Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7879–7885.

Braden BJ, 1990: The relationship between emotional stress and pressure sore formation among elderly recently relocated to a nursing home. In Funk SG, Tournquist EM, Champagne MT eds. *Key aspects of recovery: improving nutrition, rest and mobility.* New York : Springer-Verlag, 1990:188-196.

Brahmi F, Hauchard D, Guendouze N, Madani K, Kiendrebeogo M, Kamagaju L, Stévigny C, Chibane M, Duez P, 2015: Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M.pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Ind Crops Prod.* 2015; 74:722-30.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, 1995: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol.* 1995; 28:25-30.

Broughton G, Janis JE, Attinger CE, 2006: Wound healing an overview. *Plast Reconst Surg* 2006; 117 (suppl 7): 1S- 32S.

Bruneton J, 2009: Pharmacognosie; Phytochimie; Plantes médicinales; 4eme édition, Lavoisier éditions TEC et DOC, Paris France.

Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M, 2003 : Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 85, 415–421.

Buchanan, B, Gruissem W, et Jones R, 2000 : American Society of Plant Physiologists, chapitre, 1250-1318 p.

Burt S, 2004 : Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.

Bush K et Fisher J.F, 2011 : Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamase from Gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 2011, 65, 455–478.

Cal K, 2006: Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Med.* 2006 Mar; 72 (4): 311-6.

Carson CF, Mee BJ and Riley TV 2002: Mechanism of action of *Melaleuca ternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy: *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1914–20.

Carson CF, Hammer KA, Riley TV, 2006: Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clin. Microbiol. Rev. 19: 50-62

Cavaillon JM, 1993: Les cytokines, Paris-Masson; 1993.

Chandra H, Bishnoi P, Yadav A, Patni B, Prakash Mishra A et Nautiyal AR, 2017 : Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review. Plants 2017, 6, 16.

Chaouki W, Leger DY, Eljastimi J, Beneytout JL, Hmamouchi M, 2010: Antiproliferative effect of extracts from Aristolochia baetica and Origanum compactum on human breast cancer cell line MCF-7. Pharm Biol. 2010; 48(3):269- 74.

Chaput B, Coutarde-Saidi M, De bonnacaze G, Eburdery H, Crouzer C et Chavoïn JP et al, 2012: Anomalies de la cicatrisation EMC. Techniques chirurgicales- Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique 2012; 7 (2): 1-12 (article 45-011).

Charpentier B, Hamon-Lorléac'h F, Harlay A, Huard A, Ridoux L et Chansellé S, 2007 : Guide du préparateur en pharmacie. 2^{ème} édition, Elsevier-Masson. Paris- France.

Chávez-González ML, Rodríguez-Herrera R et Aguilar CN, 2016: Essential oils: a natural alternative to combat antibiotics resistance. In, A2 - Kon, Kateryna. M. Rai, Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches Academic Press: 227-237.

Cherrat L, Espina L, Bakkali M, Pagán R et Laglaouiet A, 2014: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of Mentha pulegium, Lavandula stoechas and Satureja calamintha scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined process. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2014; 22: 221-9.

Chettibi S, Ferguson M.W.J, 1999: Wound repair: an overview. In: Gallin J.I, Snyderman R, editors. Inflammation: basic principles and clinical correlates. 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA: 1999. pp. 864–881.

Chourfa M, Allem R, Sebahia M, Belhiche S, 2013: Effet de l'huile essentielle de Thymus vulgaris sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites. Phytothérapie (2013) 11:154-160.

Chitra V, Prasad PD, Pavan KK, Alla NR, 2009 : Wound healing activity of alcoholic extract of Buchanania lanzan in albino rats. Int J Chem Tech Res. 2009;1(4):1026-31.

Chow JW et Shlaes DM, 1991: Imipenem resistance associated with the loss of a 40kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. J. Antimicrob. Chemother. 28: 499-504

Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ, 2002: Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J. Ethnopharmacol. 2002; 79:213-20.

Clark RA, 1993: Biology of dermal wound repair. Dermatol Clin 1993; 11 : 647-666.

Conforti F, Sosa S, Marrelli M, et Menichini F, Statti G A, Uzunov D, Tubaro A, Menichini F, Della Loggia R, 2008: In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants: *J of Ethnopharmacol.* 2008; 116:144-151.

Couic-Marinier F, et Lobstein A, 2013: Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actual pharm* 2013; 52 (525): 26-30

Coulomb B, Dubertret L, 2002: Skin cell culture and wound healing. *Wound Repair Regen* 2002; 10:109-12.

Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L, 1989: Influence of human dermal fibroblasts of epidermalization. *J Invest Dermatol* 1989; 92:122-5.

Cox S.D, Mann C.M, Markham J.L, Bell H.C, Gustafson J.E, Warmington J.R, Wyllie S.G, 2000 : The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88, 170–175.

Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D, 2007: Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6300-6308.

Croteau R, 1987: Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev,* 1987, 87 (5), pp 929–954.

Das U, Behera SS, Pramanik K, 2017 : Ethno-Herbal-Medico in Wound Repair: An Incisive Review. *Phytother Res.* 2017 Apr;31(4):579-590.

De Hoffmann E, Stroobant V, 1999: *Spectrométrie de Masse.* 3ème éd. Paris : Dunod, 1999, 424 pages.

Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M, 2008: Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Ag* 2008; 32:432e6.

Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G, 1995: Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between Granulation Tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146:56-66.

DeSouza MM, DeJesus R.A.P, Cechinel-Filho V, Schlemper V, 1998: Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine* 5, 3–7.

Dhara L et Tripathi A, 2013: Antimicrobial activity of eugenol and cinnamaldehyde against extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae by in vitro and molecular docking analysis. *European Journal of Integrative Medicine* 2013; 5-6: 527-36

Di Pasqua R, Hoskins N, Betts G, Mauriello G, 2006 : Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54.

DIALLO Alpha Amadou, 2013 : Escherichia coli pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Thèse de doctorat : microbiologie : Université de Toulouse III.

Djahra AB, Bordjiba O et Benkherara S, 2013: Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) *Phytothérapie* (2013) 11(6): 348–352.

Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, et Chelghoum C, 2006: Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii*. *Pharmaceutical Biology* 2006, Vol. 44, No. 8, pp. 607–612.

Dorman HJD et Deans SG, 2000: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 2000; 88: 308–16.

Dorman HJD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R, 2003: Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4563–4569.

Druyne T, 1999: Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol*, 445-59 p.

Dugo G et Di Giacomo A, 2002: The genus *Citrus*. Londres, CRC press; Taylor & Francis Publishing, 2002, 642 pages.

De Silva BCJ, Won-Gi Jung S H, Wimalasena SHMP, Pathirana HNK Set Gang-Joon Heo, 2017: Antimicrobial property of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against pathogenic bacteria isolated from pet turtles. *Lab Anim Res.* 2017 Jun; 33 (2):84-91.

Duru ME, Öztürk M, Ugur A et Ceylan Ö, 2004: The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J Ethnopharmacol* 2004; 94: 43–8.

Edeoga HO, Okwu DE et Mbaebie BO, 2005: “Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 7, pp. 685–688, 2005.

Edris A.E, Shalaby A, Fadel H, 2003: Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L) growing in Siwa Oasis, Egypt. *Eur. Food Technol.* 218, 74-78

Edris AE, 2007: Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytother. Res.* 21, 308–323 (2007).

Eisenhut M, 2007: The toxicity of essential oils. *Int J Infect Dis* 2007; 11(4): 365-6.

El-Bardai S, Lyoussi B, Wibo M, et Morel N, 2004: Comparative Study of the anti hypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 26: 65–74.

El-Bardai S, Morel N, Wibo M, Fabre N, Llabres G, Lyoussi B, Leclercq J-Q, 2003: The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Med* 69: 5–7.

Eloff JN, 1998: A sensitive and quick method to determine the minimum inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998; 60:1–8.

Eloff JN, 2000: A proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care in South Africa. *S Afr J Sci.* 2000; 96:116-18

EUCAST, 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST) 2000; CMI, Vol. 6: 503–08.

Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pagès JM and Hassani L, 2012: Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 2012; 19-5: 464-71.

Faleiro M.L. et Miguel M.G, 2013: Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria. *Essential oil book.* Academic Press Elsevier. London,UK/Waltham San-Diego USA.

Fonseca P et Librand APL, 2008: Evaluation of physicochemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Braz. J. Pharm. Sci.*, 4, 271–277 (2008).

Franzios G, Mirotsoou M, Hatziapostolou E, Kral J, Scouras Z.G, Mavragani-Tsipidou P, 1997: Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2690–2694.

Freemont AJ. Demystified 1998: adhesion molecules. *Mol Pathol* 1998; 51: 175-184.

Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygadlo J et Demo M, 2006: Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Molec Med Chem* 10:30–2.

Geer DJ, Andreadis ST, 2003: A novel role of fibrin in epidermal healing: plasminogen-mediated migration and selective detachment of differentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; 121:1210-6.

George F, Boutière B, Sampol J, 1995: Endothélium et hémostasie. In: Sampol J, Arnoux D, Boutière B, editors. *Manuel d'hémostasie.* Paris: Elsevier; 1995. p.75-92.

Ghannadi A, Sajjadi SE, Kaboucheb A, et Kaboucheb Z, 2004: *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. ♂ A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen.*

- Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y, 2015:** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*. 2014; 12:15.
- Giao MS, González-Sanjósé ML, Rivero-Pérez MD, Pereira CI, Pintado ME, Malcata FX, 2007:** *J. Sci. Food.Agric.* 2007, 87, 2638–2647.
- Gibbons S, 2008 :** Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* 74: 594-602.
- Goodarzi M et Nanekarani S, 2014:** Effects of Feeding *Mentha pulegium* L. as an Alternative to Antibiotics on Performance of Broilers. *APCBEE Procedia* 8 (2014) 53 – 58.
- Graça Miguel M, 2010 :** Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* 2010, 15(12), 9252-9287.
- Grosmond Gilles 2012:** Santé animale et solutions alternatives : adition France agricole. Paris France.
- Guilin MC et Bezeaud A 1995:** Physiologie de la coagulation plasmatique. In: Sampol J, Arnoux D, Boutière B, editors. *Manuel d'hémostase*. Paris: Elsevier; 1995. p. 37–56.
- Guinoiseau E, 2010 :** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat : Biochimie- Biologie Moléculaire ; Université de Corse, UMR CNRS 6134 SPE ; France, 2010.
- Günther H, 1994:** La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications dela spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie, Ed Masson, Paris, 1994.
- Gustafson J.E, Liew Y.C, Chew S, Markham J.L, Bell H.C, Wyllie S.G., Warmington J.R, 1998 :** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 194–198.
- Güvenc A , Küpeli Akkol E, Hürkul MM Süntarb I, Keles H, 2012:** Wound healing and anti-inflammatory activities of the *Michauxia L'Hérit* (Campanulaceae) species native to Turkey. *J Ethnopharmacol.* 2012; 139:401-08.
- Hafedh H, Fethi BA, Mejdí S, Emira N, Amina B, 2010:** Effect of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *Afr J Microbiol* 2010; 4:1122e7.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV, 1996:** Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Am. J. Infect. Control.* 24: 186-189
- Hammer KA, Carson CF et Riley TV, 1999:** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 1999, 86, 985–990.

Hancock REW et Chapple DS, 1999 : Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1317e23.

Hansen, J.M., Go, Y.M., Jones, D.P., 2006. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 215–234.

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM et von Wright A, 1998: Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3590-3595.

Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, et Doble M, 2008: Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008; 45: 639–52.

Hernandez-Hernandez AB, Alarcon-Aguilar FJ, Almanza-Perez JC, Nieto-Yañez O, Olivares-Sanchez JM, Duran-Diaz A, Rodriguez-Monroy MA, et Canales-Martinez MM, 2017: Antimicrobial and anti-inflammatory activities, wound-healing effectiveness and chemical characterization of the latex of *Jatropha neopauciflora* Pax. *J Ethnopharmacol.* 2017; 204:1-7.

Heughan C, Ninikoski J, Hunt TK, 1972: Effect of excessive infusion of saline solution on tissue oxygen transport. *Surg Gynecol Obstet* 1972;135: 257-260.

Hoet S, Ste´vigny C, He´rent M.F, Quetin-Leclercq J, 2006: Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.* 72, 480–482.

Houël E, 2011, Etude de substances bioactives issues de la flore amazonienne Analyse de préparations phytothérapeutiques à base de *Quassia amara* L. (*Simaroubaceae*) et de *Psidium acutangulum* DC. (*Myrtaceae*) utilisées en Guyane française, pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolomique d'huiles essentielles à activité antifongique. Thèse de doctorat : Chimie thérapeutique. Université des Antilles-Guyane, 2011.

Howes EL, Plotz CM, Blunt JW et al, 1950: Retardation of wound healing by cortisone. *Surgery* 1950; 28:177-181.

Hu Z.-Q, Zhao W-H, Hara Y, Shimamura T, 2001: Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 361–364.

Hubner G, Brauchie M, Smola H Madlener M, Fassler R, Werner S, 1996: Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 1996; 8 : 548-556.

Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu B.A, Kurkcuoglu M, et Husnu Can Baser K, 2005: Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem.* 93, 551–556.

Iserin P, 2001: Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2ème édition, Paris, France.

Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H, 2002: Lessons from disorders of epidermal differentiation - associated keratins. *Histol Histopathol* 2002 ; 17 : 331-8

Jones JDG et Dangl JL, 2006 : The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329

Joulain D, 1994: Method for analysing essential oil. *Modern analysis methodologies : use and abuse, Perfumer & Flavorist*, 1994, 19, 5-17.

Juven B.J, Kanner J, Schved F, et Weisslowicz H, 1994 : Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626–631.

Kalemba D et Kunicka A, 2003 : Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829.

Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sngul M, et Adiguzel A, 2003: Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 2003; 85: 231–5.

Kataja J, SeppalaH, Skurnik M, Sarkkinen H, et Huovinen P 1998: Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G *Streptococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 1493–1494.

Keith Lean Moore, Arthur F. Dalley, 2001: *Anatomie médicale, De Boeck Supérieur*, ,2001 .p. 12

Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, et al, 2001: Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a “synthetic” phenotype. *J Biol Chem* 2001; 276:36575-85.

Khaled-Khodja N, Boulekbache-Makhlouf L, Madani K, 2014: Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Lamiaceae*. *Ind crops Prod.* 2014; 61:41-48.

Khosravi Zanjani MA, Mohammadi N, Zojaji M et Bakhoda H, 2015: Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L and its Antimicrobial Activity on *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Zygosaccharomyces rouxii* *Journal of Food Biosciences and Technology* 2015; 2: 31-40.

Kierszenbaum Abraham L 2006: *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique.* Edition De Boeck. Imprimé en Espagne.

Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, et Weis N, 1989 : Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essen. Oil Res.* 1, 119–128.

Kokkini S, Hanlidou E, Karousou R et Lanaras T, 2004: "Clinal Variation of *Mentha pulegium* Essential Oils Along the Climatic Gradient of Greece." *Journal of Essential Oil Research* 16(6): 588-593.

Kováts E, 1965: Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*, ed. Par Giddings J.C. et Keller R.A. New-York : M. Decker Inc, 1965, p. 229-247.

Kurt Torrsell, 1983: *Natural Products Chemistry*. John Willy & Sons Limited. 1983, 401 p.

Lahmar A, Bedoui A, Mokdad-Bzeouich I, Dhaouifi Z, Kalboussi Z, Cheraif I, Ghedira K, Chekir-Ghedira L, 2017: Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microb Pathog.* 2017 May; 106:50- 59.

Lambert R.J.W, Skandamis P.N, Coote P, Nychas G.J.E, 2001 : A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453–462.

Langeveld WT, Veldhuizen EJA and Burt SA, 2014: Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology* 2014; 40-1: 76-94.

Lawrence WT, 1990: Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1990; 25: 321-340.

Lawrence WT, 1998: Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1998; 25:321-340.

Le panse R, Bouchard B, Lebreton C, Coulomb B, 1993: Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within collagen matrix. *Exp Dermatol* 1996; 5:108-14.

Le Pillouer-Prost A, Coulomb B, 2009: *Physiologie de la cicatrisation cutanée*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) *Cosmetologie et dermatologie esthetique*, 50-040-A-10,2009.

Levy-Toledano S et Dupuy E 1995: Physiologie de l'hémostase primaire. In: Sampol J, Arnoux D, Boutière B, editors. *Manuel d'hémostase*. Paris: Elsevier; 1995. p. 19–36.

Li H, Fu X, Zhang L, Huang Q, Wu Z, Sun T, 2008: Research of PDGF-BB gel on the wound healing of diabetic rats and its pharmacodynamics. *J Surg Res* 2008;145 (1):41-8.

Lima-Filho J.V, et de Aguiar Cordeiro R, 2014: In Vitro and In Vivo Antibacterial and Antifungal Screening of Natural Plant Products: Prospective Standardization of Basic Methods. In: Albuquerque U., Cruz da Cunha L., de Lucena R., Alves R. (eds) *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, New York, NY

Lin R-D, Chin Y.P, Lee M.H, 2005: Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum b-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytother. Res.* 19, 612–617.

Liu I.X, Durham D.G, Richards R.M, 2000: Baicalin synergy with b-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other b-lactam-resistant strain of *S. aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 361–366.

Liu Y et Wang M-W, 2008 : Botanical drugs: Challenges and opportunities, Contribution to Linnaeus memorial symposium 2007. *Life Sci.* 82, 445-449.

Lobstein A, 2010: Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, 3-25 p.
Logeeswari K et Shubashini K Sripathi, 2012 : Wound Healing Medicinal Plants: A Review. International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research Vol. 3, No.3, 199-218

Longbottom CJ, Carson CF, Hammer KA, Mee BJ et Riley TV, 2004: Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca ternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 386–92.

Mahboubi M et Hagi G, 2008: Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. J. Ethnopharmacol 2008; 119-2: 325-7.

Marriott P, Shellie R et Cornwell C, 2001: Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, Journal of Chromatography A, 2001, 936, 1-22.

Marriott P, Shellie R, Fergus J, Ong R, et Morrison P, 2000: High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology, Flavour and Fragrance Journal, 2000, 15, 225-239.

Marzouk B, Fredj MBH, Chraief I, Mastouri M, Boukef Kand Marzouk Z, 2008: Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. J Food Agric Environ 2008; 6: 78–82.

Marzouki H, Khaldi A, Chamli R, Bouzid S, Piras A, Falconieri D, et Marongiu B, 2007: Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. Natural Product Research, 23, 230–237.

Masoodi MH, Ahmed B, Zargar IM, Khan SA, Khan S, Singh P, 2008: Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. Afr J Biotechnol. 2008; 7:86-87.

Mastovská K, et Lehotay S.J, 2003: Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2003, 1000, 153-180.

Mazari K, Bendimerad N, Bekhechi C et Fernandez X, 2010: Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(10), pp. 959-964.

Mayer F, 2012: Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles étude de cas en maison de retraite. Thèse de docteur d'état en pharmacie; université de lorraine faculté de pharmacie.

McLafferty F.W et Tureček F, 1993: Interpretation of mass spectra, 4ème édition. Sausalito, Californie : éd. University Science Books, 1993, 371 pages.

McLafferty F.W, et Michnowicz J.A, 1992: State-of-the-art GC/MS, Chemtech, 1992, 22, 182-189.

Meyer-Warnod B, 1984: Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, Perfumer & Flavorist, 1984, 9, 93-103.

- Mkaddem M, Boussaid M et Fadhel NB, 2007:** Variability of Volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research* 2007; 19: 211–4.
- Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A, 2001:** The essential oil of *Origanum vulgare* L. *ssp. vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry* 57, 65-69.
- Molyneux P, 2004:** The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 2004, 26 (2), 211-219.
- Mondello L, Casilli A, Tranchida P., Furukawa M, Komori K, Miseki K, Dugo P, et Dugo G, 2006:** Fast enantiomeric analysis of a complex essential oil with an innovative multidimensional gas chromatographic system, *Journal of Chromatography A*, 2006, 1105, 11-16.
- Morteza-Semnani K, Saeedi M et Akbarzadeh M 2011:** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2011; 14-2: 208-13.
- Mouhi L, Moghrani H, Nasrallah N, Amrane A et Rachida Maachi, 2017:** Anti-inflammatory activity of essential oil of an endemic *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. With chemotype carvacrol, and its healing capacity on gastric lesions. *J Food Biochem.* 2017; 00:e12359.
- Müller-Riebau FJ, Berger BM, Yegen O, et Cakir C, 1997:** Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 4821–5.
- Mustoe TA et Porras-Reyes BH, 1993:** Modulation of wound healing response in chronic irradiated tissues. *Clin Plast Surg* 1993; 20:465-472.
- Nayak B S et Pinto Pereira LM, 2006 :** “*Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 6, article 41, 2006
- Newall CA, Anderson LA et Philipson JD, 1996:** *Herbal Medicines. A Guide for Health Care Professional.* The Pharmaceutical Press, London, United Kingdom; 1996.
- Newman DJ, Cragg GM et Snader KM, 2003:** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037.
- Nikaido H et Vaara M, 1985:** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Review* 1985; 49: 1–32.
- Nikaido H, 2003:** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 593-656
- Nikaido H, Rosenberg EY, 1981:** Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Physiol.* 77: 121-135

Nikolic M, Jovanovic KK, Markovic T, Markovic D, Gligorijevic N, Radulovic S, and Sokovic M, 2014: Chemical composition antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products* 2014; 61: 225-32.

Novgorodov S.A, et Gudz TI, 1996 : Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 139–146.

Orhan IE, Ozcelik B, Kan Y, et Kartal M, 2011: Inhibitory effects of various essential oils and individual components against extended-spectrum beta-lactamase produced by *Klebsiella pneumoniae* and their chemical compositions. *J Food Sci* 2011; 76:538e46.

Ouibrahim A, Tlili-Ait-kaki Y, Bennadja S, Amrouni S, Djahoudi A G et Djebar M. R, 2013: Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *African Journal of Microbiology Research.*

Oumzil H, Ghouami S, Rhajaoui M, Iidirissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M et Benjouad A, 2002: Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res* 2002; 16: 727–31.

Oussalah M, Caillet S, Lacroix M, 2006 : Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69, 1046–1055.

Palaniappan K et Holley RA, 2010: Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol* 140:164–8.

Park JU et Tsuchiya T, 2002: Increase in gap junctional intercellular communication by high molecular weight hyaluronic acid associated with fibroblast growth factor production normal human dermal fibroblasts. *Tissue Eng* 2002; 8:419-27.

Pellecuer M, Jacob B, De Simeon G, Dusart M, Attisso M, Barthez L, Gourgas B, Pascal B, et Tomei 1980: *Plant. Méd. Phytothér.* 1980, 14, 83.

Pelletier SW, 1983: Alkaloids. Chemical and biological perspectives; Edition John

Pharmacopée Européenne, 6ème édition, Conseil de l'Europe 2007: VOL 1, 2008:1433.

Pharmacopée Européenne, 3ème édition, Conseil de l'europe, Sainte Ruffine, édition Maisonneuve S.A, 1997, 1918 pages.

Pillai SK, Moellering RC and Eliopoulos GM, 2005: Antimicrobial combinations, in antibiotics in laboratory medicine, ed.V. Lorian, Philadelphia, USA; 2005.

Platzer N, 2002: Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, 2002.

Pollack SV, 1984: Systemic drug and nutritional aspects on wound healing. *Clin Dermatol* 1984; 2:68-80.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B, 2009: Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 2009, 4, 25-39.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA, 1995: Microbiologie. De Boeck ed. p 1014

Prosper SA, Frenske NA, Burnett SM, 1988: Compromised wound repair caused by perioperative use of ibuprofen. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18:1173.

Prost-Squarcioni C, Heller M, Fraitag S, 2005: Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes. *Ann Dermatol Venerol* 2005; 132 : 8S5-48

Prost-Squarcioni C. 2001: Actualités sur les mélanocytes de la peau et la mélanogenèse chez l'homme. *Morphologie* 2001; 85 : 5-9.

Quale J, Bratu S, Gupta J, et Landman D, 2006: Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1633-41.

Quezel, S. Santa, 1963: Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions Désertiques CNRS, Paris, 1963. p484.

Rai Mahendra Kumar, 2013: Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Component. K V Kon. San Diego, USA; 2013.

Ramos C, Teixeira B, Batista I, Matos O, Serrano C, Neng NR, Nogueira J.M.F d, Nunes M.L. et Marques A, 2012: Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 26:6, 518-529

Rauter AP, Martins A, Lopes R, Ferreira J, Serralheiro LM, Araujo ME, Borges C, Justino J, Silva FV, Goulart M, Ouates JT, Rodrigues JA, Edwards E, Noronha JP, Pinto R, Mota-Filipe H, 2009: *J. Ethnopharmacol.*, 2009, 122, 384–393.

Richter C, et Schlegel J, 1993 : Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. *Toxicol. Lett.* 67, 119–127.

Roh C et Lyle S, 2006: Cutaneous stem cells and wound healing. *Pediatr Res* 2006 Apr; 59 (4 Pt 2):100R-3R.

Rossi PG, Berti L, Panighi J, Maury J, Muselli A, de Rocca Serra D, Gonny M et Bolla JM, 2007: Antibacterial action of essential oils from Corsica. *J. Essent. Oil Res.* 19: 176-182

Rudensky B, Lipshits M, Isaacsohn M, Sonnenblick M, 1992: Infected pressure sores: comparison of methods for bacterial identification. *South Med J* 1992; 85:901-903.

Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R, 2005 : Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chem.* 91, 621–632.

Sadaf F, Saleem R, Ahmed M, Ahmad SI et Navaid-ul Z,2006: Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in guinea pigs. *J Ethnopharmacol* 107: 161–63.

Sahpaz S, Garbacki N, Tits M, Bailleul F, 2002: Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol.*79, 89–92.

Santana-Rios G, Orner G.A, Amantana A, Provost C, Wu S.Y, Dashwood R.H, 2001: Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutat. Res.* 495, 61–74.

Sanwal R et Chaudhary AK, 2011 : Wound healing and antimicrobial potential of *Carissa spinarum* Linn In albino mice. *J Ethnopharmacol.* 2011;135(3):792-6.

Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G 1990: Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990; 95:700-4.

Satrani B, Farah A, Fechtal M, et al, 2001: Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calaminta* et *Satureja alpina* du Maroc. *Ann Fals Exp Chim* 94(956): 241–50.

Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, de Buschiazzo PM, Ri os JL, 2002: Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci.* 2002; 70 (9):1023-33.

Sejal R et Manita W, 2015: Antibacterial activity of green tea extract in combination with cefortaxime on diarrhea causing ESBL producing *E.coli*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2015; 7-6: 258-62.

Senet P, 2007: Physiologie de la cicatrisation cutanée. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Dermatologie, 98-040-A-10-2007.

Shah Pratibha J et Williamson Manita T, 2015: Antibacterial activity of honey against ESBL producing *klebsiella pneumoniae* from burn wound infections. *International journal of current pharmaceutical research* 2015; 7-2: 32-6.

Si H, Hu J, Liu Z et Zeng ZL, 2008: Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2008; 53-2: 190-4.

Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B, 1994 : Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 8022-8028.

Silhi N. Diabetes and wound healing. *J Wound Care* 1998;7:47-51.

Simmonds M-S-J, 2003 : Novel drugs from botanical sources. *Drug Discovery Today* 8, 721-722.

Singh SB et Barrett JF, 2006: Empirical antibacterial drug discovery: foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71: 1006-1015.

- Sivropoulou E, Papanikolaou C, Nikolaou S, Kokkini T, Lanaras et M Arsenakis, 1996:** Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 1202.
- Smith ECJ, Kaatz GW, Seo SM, Wareham N et Williamson EM, Gibbons S, 2007:** The phenolic diterpenetotarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 54: 4480–3.
- Smola H, Thiekotter G, Fusenig NE, 1993:** Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell reaction. *J Cell Bio* 1993; 122:417-29.
- Sokolova SM, Buzuk GN, Lovkova MY et Tyutekin YV, 2005:** Membranotropic compounds and alkaloid accumulation in plants. *Dokl Biochem Biophys* 2005; 402: 220–2.
- Sousa EO, Silva NF, Rodrigues FFG, Campos AR, Lima SG et da Costa JGM, 2010:** Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* Linn. *Pharmacogn Mag* 2010; 6: 79e82.
- Spencer RC, Wheat PF, Winstanley TG, Cox DM, et Plested S J, 1987 :** Novel betalactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to betalactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 20:919-21
- Stevens A et Lowe J.S, 1996:** *Histologie humaine*; De beock Université 1996.
- Stotts NA, Wipketevis D, 1997:** Co-factors in impaired wound healing. In : Krasner D, Kane D. *Chronic wound care*. New York: Health Management Publications, 1997; 64-72.
- Stoyanova A, Georgiev E, Kula J, et Majda T, 2005:** Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* l. from Bulgaria. *Journal of Essential Oil Research* 2005; 17 -5: 475-6.
- Tachibana T, 1995:** The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 379-96.
- Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, Neng NR., Nogueira JMF, Saraiva JA et Nunes ML, 2012:** European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products* 2012; 36-1: 81-7.
- Thompson J.D, Chalchat J.C, Michet A, Linhart Y.B, et Ehlers B, 2003:** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol.* 29, 859-880.
- Tortora G-J, Funke B-R et Case C-L, 2003 :** *Introduction à la microbiologie*, Edition du renouveau pédagogique, Quebec, CANADA.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G, 2005 :** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jun;49(6):2474-8.

Turina A.V, Nolan M.V, Zygadlo J.A, et Perillo M.A, 2006 : Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 122, 101–113.

Ultee A et Smid EJ, 2001: Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 373-378.

Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R 2002 : The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568.

Ultee A, Kets E., Alberda M, Hoekstra F.A, et Smid E.J, 2000 : Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 174, 233–238.

Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C, Saeland S, 2003: Langerin/CD207 sheds light on formation of Birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol Res* 2003; 28: 93-107.

Van den Dool H, Kratz P.D, 1963: A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography*, 1963, 11, 463-471.

Venturini N, 2012: Contribution chimique à la définition de la qualité: Exemples des spiritueux de myrte (*myrtus communis l.*) et de cedrat (*Citrus medica l.*) De Corse: these de doctorat université de corse, 2012.

Vercesi A.E, Kowaltowski A.J, Grijalba M.T, Meinicke A.R, et Castilho R.F, 1997 : The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep.* 17, 43–52.

Viljoen A, VanVuuren S, Ernst E, Klepser M, Demirci B, Baser H et Van Wyk B, 2003: *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae) the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88: 137–43.

Viollon J.P, et Chaumont D, 1993: *Plant Méd Phytothér* 1993, 26, 17.

Volkert D, Krusc W, Oster P, Schlierf G, 1992: Malnutrition in geriatric patient: diagnostic and prognostic significance of nutritional parameters. *Ann Nutr Metabol* 1992; 36: 97-112.

Werner S et Grose R, 2003: Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835-70.

White R.L, Burgess DS, Manduru M, et Bosso JA, 1996: Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob agents chemother* 1996; 40: 1914–8.

Witte MB et Barbul A, 1997: General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*, 1997; 509-28.

Wright G.D, 2005 : Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57, 1451–1470.

Xu P, Jia W, Bi L, Liu X, et Zhao Y, 2003: Studies on components and quality of essential oil from *Mentha piperita* L produced in Xinjiang, China. *Chemistry and Industry of Forest Products* 2003; 23: 43–5.

Yamamoto T, Eckes B, Krieg T, 2001: Effect of IL-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by TGF-beta and monocyte chemoattractant protein-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281:200-5

Yap PSX, Yiap BC, Ping HC et Lim SH, 2014: Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal* 2014; 8: 6-14.

Yoon H.S, Moon S.C, Kim N.D, Park B.S, Jeong M.H, Yoo, Y.H, 2000 : Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 151–156.

Zambonelli A.Z, D'Aurelio A, Severi E, Benvenuti L, Maggi A, Bianchi J 2004: Chemical Composition and Fungicidal Activity of Commercial Essential Oils of *Thymus vulgaris* L." *Journal of Essential Oil Research* 16(1): 69-74

Zang D et Hamauru Y, 2003: Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of grebe. Red and yellow bell peppers. *Food Agric Environ.* 2003; 2:22-7.

Zhao W-H, Hu Z-Q, Okuba S, Hara Y, Shimamura T, 2001: Mechanism of synergy between epigallocatechingallate and b-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1737–1742.

Les annexes

Annexe 1

Principaux antibiotiques et leur mode et spectre d'action

	Familles	Sous-famille		DCI	Spectre d'action
ACTION SUR LA PAROI BACTERIENNE	LES BETALACTAMINES	Les pénicillines	Pénicillines du groupe G/ V	Benzathine benzylpenicilline Benzathine pénicilline Benzathine phenoxymethylpenicilline Pénicillines G = benzylpénicilline sodique Pénicilline V	Cocci Gram + et -, bacilles Gram +
			Pénicillines du groupe M	Cloxacilline Oxacilline	Cocci Gram + et -, bacilles Gram + Ces produits ne sont pas inactivés par la pénicillinase staphylococcique
			Pénicillines du groupe A	Amoxicilline Amoxicilline + Acide clavulanique Ampicilline Ampicilline + Sulbactam	Gram positif et certains Gram négatif
			carboxypénicilline	Ticarcilline Ticarcilline + Acide clavulanique	
			Uréidopénicillines	Pipéracilline Pipéracilline + Tazobactam	Elargi à certains bacilles à Gram négatif ; inactivées par les pénicillinases, y compris celle du

Annexe 1

Principaux antibiotiques et leur mode et spectre d'action

					staphylocoque. actives sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et sur certaines souches productrices de céphalosporinases (en particulier <i>Proteus</i>)
			Aminidopénicillines	<i>Pivmécillinam</i>	Limité aux bacilles à Gram négatif (Entérobactéries)
			Témocilline	<i>Témocilline</i>	
		Carbapénèmes		Ertapénem Imipénem + Cilastatine Méropénem	Spectre large.
		Monobactame		Aztréonam	Bacilles à Gram négatif
		Les céphalosporines	Céphalosporines de 1 ^{ère} génération (C1G)	Céfaclor Céfadroxil Céfalexine Céfalotine Céfazoline Céfradine	Bacilles à Gram négatif
			Céphalosporines de 2 ^{ème} génération (C2G)	Céfamandole Céfoxitine Céfuroxime sodique Céfuroxime axétil	
			Céphalosporines de 3 ^{ème} génération	Céfixime Cefpodoxime proxétil	

Annexe 1

Principaux antibiotiques et leur mode et spectre d'action

			(C3G)	Céfodiam hexétil Céfépime Céfotaxime Cefpirome Ceftazidime Ceftriaxone	
ACTION SUR LA MEMBRANE	POLYMYXINES			Colistine	Actifs sur les bacilles à Gram négatif
	GRAMICIDINES et TYROCIDINE			Bacitracine Tyrothricine	Bactéries à Gram positif
ACTION SUR LE RIBOSOME (INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES)	LES AMINOSIDES			Streptomycine Kanamycine Tobramycine Amikacine Nétramycine	Cocci et bacilles à Gram positif (sauf les streptocoques) ; cocci et bacilles à Gram négatif, mycobactéries. Toutes les bactéries anaérobies sont résistantes.
	GROUPE DES "M L S"	MACROLIDES		Spiramycine Erythromycine Josamycine Roxithromycine Clarithromycine Azithromycine	Cocci Gram + et -, bacilles Gram +.
		LINCOSAMIDES		Lincomycine	

Annexe 1

Principaux antibiotiques et leur mode et spectre d'action

		Clindamycine		
		SYNERGISTINES	Virginiamycine Pristinamycine	Antistaphylococciques
	PHÉNICOLÉS		Chloramphénicol Tifomycine	Spectre large y compris rickettsies et chlamydiales
	TÉTRACYCLINES		Tétracycline Doxycycline Monocycline	Spectre large mais résistances fréquentes. Actives sur les germes à développement intracellulaire y compris rickettsies, chlamydiales et mycoplasmes.
	ACIDE FUSIDIQUE		Acide fusidique	Antistaphylococcique
	OXAZOLIDINONES		Linézolide	Gram +
BLOCAGE DE L'ARN-POLYMERASE	RIFAMYCINES	Rifamycine	Spectre large : mycobactéries (M. tuberculosis, M. leprae), cocci Gram + et -, Bactéries à Gram +, divers bacilles à Gram négatif (dont Brucella).	
ACTION SUR L'ADN	QUINOLONES	Acide nalidixique Acide oxolinique Acide pipémidique	Gram négatif	
	FLUOROQUINOLONES	Fluméquine	Spectre élargi au	

Annexe 1

Principaux antibiotiques et leur mode et spectre d'action

			Péfloxacin Norfloxacin Ofloxacin Ciprofloxacin Enoxacin Sparfloxacin Levofloxacin Moxifloxacin	Pseudomonas et aux bactéries à Gram positif, notamment les staphylocoques.
	PRODUITS NITRÉS	OXYQUINOLÉINES	Nitroxoline Tilboquinol	
		NITROFURANES	Nitrofurantoïne Nifuroxazide	
		NITRO-IMIDAZOLÉS	Métronidazole Ornidazole	
ACTION SUR LA SYNTHÈSE DE L'ACIDE FOLIQUE	SULFAMIDES		Sulfadiazine	
	TRIMÉTHOPRIME		Sulfaméthisol	

(D'après Decoster, 2017)

Mentha pulegium

I. Description et taxonomie

Mentha pulegium L, appelée localement « Fliou », est également appelée pouliot, pouliot royal, herbe aux puces, chasse puce, herbe de Saint Laurent ou frétillet. Elle pousse dans les lieux humides des plaines et des montagnes.



Ses tiges sont quadrangulaires couchées à ascendantes, légèrement duvetées à glabres, vert clair, à rejets aériens. Les Feuilles opposées ovales à arrondies, petites, (10 à 30 x 3,5 à 10 mm), courtement pétiolées, bord à très légères encoches. Feuilles florales petites. Fleurs violettes, rarement blanches, petites, en glomérule. Calice velu à 5 dents non égales, presque bilabié. Corolle à lobes presque égaux, légèrement bossue d'un côté les fruits akènes en 4 parties, lisses. Semences ovales de 0,5 mm, brun luisant (*Quezel et Santa, 1963*).

Règne	plantae
Sous regne	Viridiaeplantae
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Equisetopsida
Sous classe	Magnoliidae
ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha pulegium</i> L
Nom commun	Menthe pouliot (Fliou)

D'après QUEZEL et SANTA (1963) ;

II. Propriétés et usage traditionnel

Mentha pulegium est l'une des espèces médicinales avec de bonnes propriétés antimicrobiennes, elle est originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie mineure et proche-orientale. En Algérie, les feuilles sont largement utilisées à la fois comme infusion de thé et comme aromatisant dans les salades ou la nourriture cuite.

En outre, elle est utilisée dans la médecine populaire de plusieurs façons, notamment en tant que

tonique digestif, ainsi elle stimule les sucs digestifs, soulage les flatulences et les coliques. C'est aussi un bon remède contre les maux de tête et les infections respiratoires (rhume, sinusite, bronchite, tuberculose) et un puissant stimulant pour le muscle utérin. Elle est également utilisée en cataplasme pour soulager les rhumatismes, y compris la goutte. Par ailleurs, les feuilles de la menthe pouliot, à la fois fraîches et séchées, sont particulièrement indiquées pour repousser les insectes (*Mossaddak B, 1995*).

Salvia officinalis

I. Description et taxonomie

Semi-arbrisseau à tige rameuse, richement recouverte de feuilles persistantes. Celles-ci sont opposées, ovales, ridées, d'un vert glauque. Les fleurs violettes, rouge-violet, voire blanches sont groupées en épis terminaux. C'est une espèce originaire des régions méditerranéennes où son usage est connu depuis l'antiquité.



Règne	<i>plantae</i>
Sous regne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Astériidae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiacées</i>
Genre	<i>Salvia</i>
Espèce	<i>Salvia officinalis L</i>
Nom commun	<i>La sauge</i>

II. Composition chimique de la plante

La Saugue officinale est riche en huiles essentielles que l'on extrait par distillation, le rendement pouvant aller jusqu'à 2,5%. la thuyone, du bornéol, du cinéol et du camphre représentent les composés majoritaires de l'huile essentielle de sauge. Les diterpènes, salvine et picrosaline, des sucres amers et des tanins sont également retrouvés.

III. Utilisation traditionnelle :

La sauge est employée contre les affections gastriques et intestinales, où elle réduit les processus inflammatoires, elle est efficace contre la diarrhée, les ballonnements et la transpiration nocturne excessive. Elle est également efficace en cas d'inflammation des voies respiratoires supérieures, contre la toux, et réduits les sécrétions lactées. En usage externe, elle est employée en gargarisme pour diverses pathologies buccales (stomatite, parodontose, angines, odontalgie...) comme désinfectant lors de maladie de la peau (**Volak et stodola, 1983**).

Lavandula stoechas

I. Description et taxonomie

Lavandula stoechas se présente sous la forme d'un arbrisseau ou d'un buisson très aromatique et très ramifié pouvant atteindre un mètre de haut avec une forte odeur semblable à celle du pin.



Les feuilles opposées de 2-4 cm de long sont sessiles, tomenteuses, oblongues, lancéolées, linéaires, étroites et recourbées sur les bords et sont souvent grises. Les inflorescences de coupe carrée sont sessiles, compactes et surmontées d'une couronne de bractées florales violettes, élargies, stériles, obovale ou spatulées de 1 à 2 cm de longueur.

Les bractées fertiles sont largement ovales à obovale ou trilobées, brièvement acuminées, membraneuses, veinées et plus courtes que le calice. Le Calice est sessile, à treize nervures avec des lobes moyens modifiés en un appendice. La Corolle est de couleur violet foncée ou mauve. La floraison, plus précoce que chez les autres lavandes, se déroule d'avril à mai puis en automne (Heywood, 1996).

Règne	Végétale
Sous regne	<i>viridiaeplantae</i>
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Equisetopsida
Sous classe	Magnoliidae
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiacées</i>
Genre	<i>Lavendula</i>
Espèce	<i>Lavandula stoechas</i> (L.)
Nom vernaculaire	<i>Lavande sauvage, el khezzama</i>

D'après (Quezel et Santa, 1963)

Elle est répandue dans tout le bassin méditerranéen (Europe méridionale, l'Afrique du Nord et le Moyen Orient) avec une petite disjonction sur la frontière Lybie-Egypte. Actuellement, elle a été introduite et est cultivée en Bretagne, Nouvelle Zélande et en Australie.

II. Etude phytochimique

Toutes les espèces et les hybrides du genre *Lavandula* sont des plantes très aromatiques qui produisent des mélanges complexes d'HE produites et stockées dans des glandes sur la surface des fleurs et des feuilles.

Les études sur la composition chimique des HE des espèces du genre *Lavandula* montrent qu'elles sont plus riches en monoterpènes, en sesquiterpènes et que ces deux groupes de molécules constituent la majeure partie des huiles essentielles.

L'huile essentielle de *lavandula stoechas* renferme comme composés phytochimiques : 1,8-cinéol, fenchone, α -pinène , β -pinène , β -santalène , bornéol , camphre , caryophyllène , géraniol et le limonène .

En ce qui concerne les flavonoïdes on trouve : apigénine 7-glucoside, lutéoline 7-glucoside et lutéoline 7-glucuronide.

III. Propriétés pharmacologiques

L. stoechas est une espèce végétale bien connue et utilisée à travers toute la région méditerranéenne pour ses vertus médicinales principalement attribués à sa teneur en HE. Elle était utilisée par les médecins musulmans qui la considéraient comme céphalique (tonique), résolvente, désobstruante, et carminative. Ils la prescrivent pour lutter contre des infections pulmonaires et pour l'expulsion des humeurs bilieuses et flegmatiques.

La plante est également utilisée dans la médecine populaire comme antispasmodique dans les douleurs des coliques, expectorant, stimulant, les cétones et époxydes terpéniques de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* aident à l'expulsion du mucus de la trachée ou des bronches, ce qui permet de libérer les voies respiratoires.

Utilisée sous forme de fumigation elle soigne "le mal des sinus". Cette lavande a aussi des effets cicatrisants grâce à la fenchone et le camphre, les infections urinaires, les maladies cardiaques et l'eczéma. Finalement, elle possède également des vertus analgésiques, sédatives, antiseptiques et antimicrobiennes (**Debuigne et Couplan, 2009**).

Laurus nobilis

I. Description et taxonomie

Le laurier est un arbuste aromatique mesurant de 2 à 6 m et jusqu'à 15 m de haut, à tige droite et grise dans sa partie basse, verte en haut. Les feuilles de forme lancéolées, alternes, coriaces, à bord ondulé, longues de 16 cm sur 8 cm de large, persistantes vert foncé sur leur face supérieure et plus clair à la face inférieure. Elles dégagent une odeur aromatique quand on les froisse. Les fleurs, blanchâtres, groupées par 4 à 5 en petites ombelles, apparaissent en mars-avril. C'est une plante dioïque (fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés). Le fruit est une petite baie ovoïde de 2 cm de longueur sur 1 cm de largeur, noir violacé et nue (*Iserin, 2001 ; Demir et al, 2004*).



Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Viridaplantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Equisetopsida</i>
Sous classe	<i>Magnoliidae</i>
Ordre	<i>Laurales</i>
Famille	<i>Lauracées</i>
Genre	<i>Laurus</i>
Espèce	<i>Laurus nobilis L.</i>
Nom vernaculaire	<i>Rend</i>

Le laurier est la seule espèce représentant la famille lauracées dans la région méditerranéenne d'où elle est originaire. Actuellement, la plante est largement cultivée comme plante ornementale et pour la production commerciale dans beaucoup de pays tels que l'Algérie, la Turquie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux (*Demir et al, 2004*)

En Algérie, Dans les forêts et ravins humides. Commun dans le tell algérois et constantinois (*Beloued, 2001*).

II. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

De nombreuses études ont prouvé la richesse des feuilles de laurier en substances actives. Par hydrodistillation les feuilles fournissent environ (1-3%) d'huile essentielle (**Bruneton 1999, Demir et al, 2004**) dont les constituants majoritaires inclut : cinéol, α et β pinène, sabinène, linalol, eugénol, terpinéol, plus d'autres esters et terpenoïdes, mais dont les proportions varient selon l'origine géographique (**Iserin 2001 ; Demir et al, 2004**).

Plusieurs flavonoïdes et dérivés ont été déterminés dans les extraits de laurier comme des flavonoïdes O-glycosides ou C-glycoside, de la catéchine, et du cinnamtannin (Dall'Acqua et al, 2009). En plus, d'autres composés ont été isolés comme des lactones sesquiterpenoïdes, des alcaloïdes isoquinolines, et de la vitamine E.

III. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

Connu pour de nombreuses propriétés : Antiseptique, stomachique, carminative, antispasmodique, expectorante, diurétique, sudorifique, antirhumatismal, mucolytique, régulatrice du système nerveux, tonifiante, anti-inflammatoire, anticoagulante, antalgique puissante (**Fesneau, De Larochequet, 2005 ; Franchomme et al, 1990**), Le laurier est principalement utilisé pour soigner les troubles de l'appareil digestif supérieur et les douleurs arthritiques. En outre, il stimule l'appétit et la sécrétion des sucs gastriques. Utilisées comme condiment, les feuilles facilitent la digestion et l'assimilation des aliments (**Iserin, 2001**).

Il est aussi utilisé pour ses propriétés antiseptiques, le laurier serait aussi un bon expectorant en cas de bronchite et sa poudre ferait tomber la fièvre.

Thymus fontanesii

I. Description et taxonomie

Plantes sous-ligneuses, érigées ou prostrées, odorantes. Inflorescences en faux verticilles. Feuilles \pm contractées. Calice tubuleux à 2 lèvres, la supérieure à 3 dents, l'inférieure à 2, ciliées dentées. Corolle \pm exserte à 2 lèvres, à 2 et 3 lobes. Etamines 4 saillantes \pm divergentes. Carpelles lisses.



Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Maliophytae
Classe	Magnoliopsida
Super ordre	<i>asternae</i>
Ordre	<i>Lamiaceae</i>
Famille	Lamiales/labiateae
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus fontanesii</i>
Nom commun	<i>Le thym</i>

Selon *Quezel et Santa (1963)*

Le thym est un arbuste odorant qui pousse spontanément dans le vieux continent, dans la région Macaronisienne (les Canaries, les Açores et le Madère), dans le Nord de l'Afrique (le Maroc, la Tunisie, l'Algérie et la Libye), dans la péninsule de Sinâï (l'Egypte), dans la péninsule Ibérique (l'Espagne) ainsi qu'en Sibérie et en Europe Nordique. Cependant, la plupart des espèces se concentrent dans le pourtour du bassin Méditerranéen.

II. Propriétés pharmacologiques

Le thym est une plante qui a une longue tradition *Thymus fontanesii* est utilisé comme antiseptique, antispasmodique et antitussive, possède des propriétés carminative, stomachique, expectorante, anthelminthique, diurétique et 'est conseillée contre le rhume, la bronchite et les troubles gastro-intestinaux (**Ghannadi et al, 2004**).

Cymbopogon Citratus

I. Description et taxonomie

Cymbopogon citratus est une herbe aromatique vivace sans ramification à odeur de citron poussant en touffes denses. Ces feuilles peuvent atteindre 90 cm de longueur et 1,25 cm de largeur. Elles sont isolées, vert-claires, fortement parfumées, longues, effilées et réunies en gaine sur une certaine portion de leurs longueurs. Aussi, le bord des feuilles est hyalins formé de nombreuses petites dents dirigées vers le sommet de la plante. La partie souterraine du *C. citratus* est constituée par un bulbe en rhizome. Bien que cette plante fleurisse rarement, elle possède une hampe florale pouvant atteindre 60 cm de longueur à nombreuses ramifications terminées par des épis agglomérés de couleur verdâtre. *C. citratus* se reproduit par rhizomes (Iwu MM., 2014).



Division	<i>Tracheophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Poales</i>
Famille	<i>Poaceae</i>
Genre	<i>Cymbopogon</i>
Espèce	<i>Cymbopogon citratus</i>

II. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

Les analyses chimiques des huiles essentielles de *C. citratus* ont révélé la présence de monoterpènes oxygénés (78,2 - 86,4%), sesquiterpènes oxygénés (1,4-1,6%), hydrocarbures monoterpènes (7,9-10,6%) et hydrocarbures sesquiterpènes (3,8-8%) (Tyagi et al, 2010 ; Koba et al, 2009). L' α -citral (29,4-60,3%) et β -citral (21,39-39,7%) sont les molécules prépondérantes de l'HE (Tyagi et al, 2010;Cavalcanti et al, 2004). Aussi, des études préliminaires sur des extraits organiques (méthanol et éthanol) et aqueuses (décoction et infusion) des feuilles ont-elles montré la présence de tanins (tanins catéchique et phlobotanin), d'acides phénoliques (dérivés de l'acide caféique et p-coumarique) et des glycosides flavonoïdes (apigénine et dérivés du lutéoline). Les saponosides sont à l'état de trace (Figueirinha, 2008)

III. Propriétés pharmacologiques

C. citratus est couramment utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement des troubles nerveux et gastro-intestinaux, et comme antispasmodique, analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique, diurétique et sédatif. Elle est largement appliquée dans la médecine traditionnelle en infusion ou décoction pour traiter les troubles nerveux.

De nombreux essais précliniques et thérapeutiques ont montré que l'HE de *C. citratus* possède des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, insecticides, antioxydantes, hypoglycémiques, hypolipémiants, antidiabétiques, hypotensives, cardioprotecteurs, antalgiques et anti-tumorales (**Bayala, 2014**)

Juniperus phoenicea

I. Description botanique et taxonomie

Juniperus phoenicea (Genévrier de Phénicie, «Arâar»). C'est un arbre branchu pouvant atteindre 8 mètres de hauteur, possédant un tronc court qui peut atteindre 2 mètres de circonférence, l'écorce à de couleur brun rougeâtre, bourgeons nus, ramules cylindriques ; feuilles toutes ou presque toutes en forme d'écailles très petites, étroitement imbriquées sur 4-6 rangs, ovales rhomboïdales, non articulées, décurrentes, glanduleuses, bombées et sillonnées sur le dos.

Cette espèce est monoïque, la floraison a lieu pendant l'hiver et la fructification à la fin de l'été de l'année suivante.

A maturité, les fruits sont bruns-rouges et luisants. Elle devient de plus en plus rare sous l'effet de son exploitation abusive (son bois est très recherché comme combustible et fournit du charbon très apprécié).



Juniperus phoenicea est une espèce qui se produit au Sud de l'Europe, Ouest d'Asie et le Nord Africain en Algérie (Cet arbre constitue au côté du cèdre, la principale couverture végétale dans les montagnes des Aurès), au Maroc et Tunisie, également dans l'Est de Portugal jusqu'en Turquie et l'Égypte, dans les îles Canaries, et dans les montagnes de l'Ouest de l'Arabie Saoudite, mais il est plus fréquent dans la partie Ouest des régions méditerranéennes.

II. Taxonomie

Règne	Plante
Embranchement	Spermatophyta (gymnospermae)
Classe	Coniferopsida
Ordre	Coniferales
Famille	Cupressaceae
Genre	Juniperus
Espèce	Phoenicea

III. Utilisation traditionnelle

Cette espèce est très utilisée en médecine traditionnelle: les feuilles sont utilisées sous forme de décoction pour soigner le diabète, diarrhée et rhumatisme alors que les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès.

IV. Composition chimique

La majorité des composants chimiques isolés des feuilles et des cônes (fruits) de *Juniperus phoenicea* sont des huiles volatiles. Des études phytochimiques antérieures de cette espèce ont montré que cette plante accumule des terpenoïdes, en particulier des monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes (*Djenadi, 2011*).

Artemisia herba alba

I. Description & taxonomie

Artemisia herba alba est un arbuste nain vivace (Kavishankar et al, 2011) de 30 - 60 cm de long (El Rhaffari, 2008) , se caractérise par une odeur de thymol, avec de jeunes branches tomenteuses, les feuilles sont poilues, courtes, sessiles, verdâtre argentées et pennatilobées, les fleurs sont hermaphrodites jaunâtres emballées dans des petites capitules (comprenant chacun de 3 à 8 fleures) sessiles et les bractées externes de l'involucre sont orbiculaires et pubescentes, les fruits sont des akènes (Ghrabi et Al-Rowaily, 2005).



Artemisia est le nom de genre des armoises, il provient de celui de la déesse grecque de la chasse *Artémis*; *herba-alba* signifie herbe blanche.

embranchement	<i>Angiospermeae</i>
Sous embranchement	<i>Dicotylédones</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Sous famille	<i>Asterioideae</i>
Tribu	<i>Anthemideae</i>
Sous tribu	<i>Artemisia</i>
Genre	<i>Artemisia</i>
Espèce	<i>Artemisia herba-alba</i>
Nom commun	<i>Armoise/ Chih en arabe</i>

L'*Artemisia Herba-Alba* est largement répandue depuis les îles Canaries et le sud-Est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan) et à travers l'Afrique du Nord, l'Arabie et le Proche-Orient. En Afrique du nord, cette espèce couvre d'immenses territoires évalués à plus de dix millions d'hectares, l'*Artemisia herba-alba* est absente des zones littorales nord. Cependant, l'espèce se raréfie dans l'extrême sud (Nabli, 1989).

II. Composition chimique de la plante

Elle est riche en composés phénoliques, connus pour être d'excellent antioxydants et anti-infectieux, elle contient également des flavonoïdes, tanins, des anthocyanes, des acides phénoliques et d'autres substances.

Historiquement, l'armoise a été un genre productif dans la recherche de nouveaux composés biologiquement actifs. Les investigations phytochimiques ont montré que ce genre est riche en sesquiterpène, monoterpène, flavonoïdes, et coumarines.

Les principaux monoterpènes identifiés sont: Le thuyone, le 1,8-cinéol et le thymol. Le thuyone est certainement l'un des constituants terpéniques les plus bioactifs de l'armoise, c'est un composé chiral présent à l'état naturel sous deux formes stéréoisomériques: l'alpha thuyone et le bétathuyone. Les principaux flavonoïdes isolés à partir de l'armoise herbe blanche sont: l'hispiduline, la cirsimaritrine. Des flavonesglycosidiques comme la 3- rutinoside, quercitine et l'isovitexine sont aussi mis en évidence (*Aouadhi, 2010*).

III. Usage traditionnel

L'Artemisia herba alba est très utilisée en médecine traditionnelle notamment lors de diarrhée et de douleurs abdominales. Elle est fréquemment citée pour son usage en tant qu'hypoglycémiant. Des études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique, antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, anti-malarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique.

A forte dose, l'armoise est abortive, neurotoxique et hémorragique. La thuyone constitue la substance toxique et bioactive dans l'armoise et la forme la plus toxique est l'alpha-thuyone. Elle a des effets convulsivantes (*Aouadhi, 2010*).

Cytisus triflorus

I. Description et taxonomie

Le genre *Cytisus* appartient à la tribu des *Genisteae* de la famille *Fabaceae* et comprend environ 60 espèces, confinées aux régions de climat doux de l'Europe du sud et centrale, d'Afrique du Nord et de l'Ouest et de l'Asie. Il est répandu dans la région méditerranéenne et huit espèces poussent au nord de l'Algérie (*Quezel et Santa, 1963*).



C'est un arbrisseau dressé, sans épines, pouvant atteindre un à deux mètres de hauteur. Les poils sont présents sur les rameaux, les fruits (gousses) et les feuilles (surtout la face inférieure). Les feuilles sont composées de trois folioles, allongées, ovales, la centrale étant plus grande que les latérales. Les fleurs sont de couleur jaune, rayées de brun rouge, disposées un à trois sur une tige florale comportant des poils longs. Le Cytise est une plante toxique (Guide illustré de la flore Algérienne 2012), qui fait partie du groupe biologique des phanerophytes (*Belouahem, 2012*).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>viridiaeplantae</i>
Sous embranchement	<i>Maliophytae</i>
Classe	Equisetopsida
Sous classe	<i>Magnoliidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Genre	<i>Cytisus</i>
Espèce	<i>Cytisus troflorus</i>
Nom commun	<i>Le cytise</i>

II. Composition chimique

La sous-famille des Papilionacées est caractérisée par la présence d'isoflavones, de rétinoïdes, d'anthocyanines et de flavonols glycosylés (Mokhtari, 2012).

L'analyse phytochimique préliminaire de *Cytisus triflorus* a montré la présence de terpènes, de tanins, de flavonoïdes, d'acides phénoliques, d'alcaloïdes et de coumarines (*Ait-Kaci,*

2014 ; 2015). La plante est tout particulièrement riche en alcaloïdes *quinolozidiniques* (Chebli et al, 2011).

III. Utilisation traditionnelle

Cytisus triflorus est connu dans le nord de l'Algérie pour ses propriétés médicinales. La plante est utilisée pour traiter les douleurs abdominales, la cicatrisation des plaies, comme hémostatique, antifongique et hypotenseur. En outre, les feuilles sont utilisées comme "henné" pour traiter et teindre les cheveux (Aït-Kaci Aourahoun et al, 2015).

Marrubium vulgare

I. Description et taxonomie

Marrubium vulgare est une plante herbacée vivace de la famille des *Lamiaceae* originaire d'Afrique du nord, d'Europe et d'Asie ; la plante se trouve surtout en région méditerranéenne et a été introduite en Amérique (**Bonnier G, 1990**).



On la trouve surtout sur les bords des chemins, dans des prés secs, des lieux incultes, des décombres et des terrains vagues. Assez commun à assez rare dans les régions siliceuses et Assez rare à rare sur les sols calcaire (**De Souza M. M et al, 1998**).

C'est une plante herbacée, vivace à odeur de thym au froissement, couverte d'un duvet blanc, à tiges dressées, portant souvent de nombreuses pousses courtes et stériles. Sa hauteur varie de 40 à 60 cm.

Les feuilles sont ovales arrondies, souvent un peu cordées à la base, gaufrées et crénelées, feutrées à la face intérieure. Les fleurs sont petites et blanches (12-15 mm de long), organisées en corolle à 2 lèvres, l'inférieure trilobée, la supérieure à 2 lobes et en calice à 10 dents courtes, crochues, et placées en verticilles denses à l'aisselle des feuilles supérieures. (**Schlempher et al, 1996**).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Viridaplantae</i>
Division	<i>Magnoliophytes</i>
Classe	<i>Magnolipsides</i>
Sous classe	<i>Asteridees</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<u><i>Lamiaceae</i></u>
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>Marrubium Vulgare</i>
Nom commun	Marrube blanc

II. Composition chimique

Marrubium vulgare est une plante riche en principes actifs. La Marrubiine et Marrubénol, composés majoritaires du *Marrubium vulgare*, sont des lactones diterpéniques. Le *Marrubium vulgare* est caractérisé par sa richesse en flavonoïdes notamment les hétérosides flavoniques, lactate de flavones glycosylées et flavonoliques du quercétol, de la lutéoline et de l'apigénine, lactoylflavones, dérivés de l'acide ursolique (**Bruneton, 2009**).

Les tanins sont également des polyphénols mais de structure plus complexe que celle des flavonoïdes, ayant la capacité de précipiter les protéines. Ils sont présents essentiellement dans les écorces.

Une huile essentielle est un produit odorant, volatile, non gras, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie par distillation ou par expression à froid. Composé pour le *Marrubium vulgare* de monoterpènes (<0,1%) : α -pinène, camphène, limonène, sabinène, para-cymène, para-fenchène... (Laurain-Mattar, 2014).

III. Propriété et usage traditionnel

Un grand nombre des propriétés traditionnellement attribué à *Marrubium vulgare*, ont été confirmées par une intensive recherche moderne couplée à différents essais cliniques, tels que les effets : Antipyrétique, Anti-athérogène, Antioxydant, Anti-inflammatoire, Cholérétique, Hypoglycémiant, Analgésique, Anti hypertensive, Antispasmodiques (**Khaled khodja et al, 2014**).

Liste des références des annexes

Ait-Kaci Aourahoum K, Fazouane F and Benayache S, 2015: Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. Extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent. *Pharma Lett.* 2015; 7 (5):104-10.

Ait-kaci Aourahoun K, Fazouane F, Benayad T, Bettache Z, Denni N, 2014: The synthetic antioxidant Butylated Hydroxytoluene, a naturally occurring constituent of the broom *Cytisus triflorus* L'Hérit. *J Nat Prod.* 2014; 7:58-64.

Aouadhi S, 2010 : Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle. Étude de 57 plantes recommandées par les herboristes 2010.

Bayala B, 2014 : Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. *Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II*, 2014.

Belouahem-Abed Djamila., 2012; THESE de doctorat d'Etat Option: Ecologie et Environnement étude écologique des peuplements forestiers des zones humides dans les régions de SKIKDA, ANNABA et EL TARF (Nord-Est algérien); Badji MOKHTAR ANNABA faculté de biologie.

Bonnier G, 1990 : La grande Flore française Ed.Bllin ; Complète. Tome : 09. 25-26.

Bruneton J, 2009: Pharmacognosie; Phytochimie; Plantes médicinales; 4eme édition, Lavoisier éditions TEC et DOC, Paris France.

Cavalcanti ESB, Maia De Morais S, Lima M, et al, 2004: Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:

Debuigne et Couplan, 2009: Petit larousse des plantes médicinales. Editions Larousse, 2009.

DeSouza MM, DeJesus R.A.P, Cechinel-Filho V, Schlemper V, 1998: Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine* 5, 3–7.

Djenadi F, 2011 : Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du genévrier (*Juniperus phoenicea*): essai des huiles essentielles et composés phénoliques. Université A Mira de Béjaia Algérie - Master en biologie option biochimie appliquée 2011

EL Rhaffari L, 2008 : Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes, l'organisation non gouvernementale italienne (MOVIMONDO), p 11.

Fesneau M., De Larochequet P., 2005 : Les huiles essentielles de A-Z. La nature au service de la vie, les essences végétales naturelles.

Figureirinha A, Paranhos A, Perez-Alonso JJ, et al, 2008: Cymbopogon citratus leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. Food Chem 110: 718–28

Franchomme P., Pénoél D. et al, 1990 : "Matière médicale aromatique fondamentale". L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges. 4- (317-446).

Ghannadi A, Sajjadi SE, Kaboucheb A, et Kaboucheb Z, 2004: Thymus fontanesii Boiss. & Reut. ♂ A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen

Ghrabi Z et Al-Rowaily S.L.R, 2005: A guide to medicinal plants in north Africa. Artemisia herba alba Asso. (IUCN), Spain: Malaga, pp. 43-44.

Heywood, V.H, 1996: Flowering Plants of the World. 3th edition, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-145, 149-152.

Iserin P, 2001: Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2ème édition, Paris, France.

Iwu MM, 2014: Handbook of African medicinal plant. 2e édit CRC Press Inc, Boca Raton Floride p 202

Kavishankar GB, Lakshmidivi N, Murthy SM, Prakash HS et Niranjana SR, 2011: Diabetes and medicinal plants. International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences 2 (3) : 65-80.

Khaled-Khodja N, Boulekbache-Makhlouf L, Madani K, 2014: Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. Ind crops Prod. 2014; 61:41-48.

Koba K, Sanda K, Guyon C, et al, 2009: In vitro cytotoxic activity of Cymbopogon citratus L. and Cymbopogon nardus L. essential oils from Togo. Bangladesh J Pharmacol 4: 29–34

Mossaddak B, 1995 : Investigation du polymorphisme chimique via la caractérisation chimiotaxinomique des menthes cultivées au Maroc, Thèse de DES ès-sciences physiques, spécialité chimie organique, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat.

Nabli M A, 1989 : Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes, tome I. Ed. MAB 1989 (Faculté des sciences de Tunis) ; 186-188 p.

Quezel, S. Santa, 1963: Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions Désertiques CNRS, Paris, 1963.

Schlemper V., Ribias A., Nicolau M., Cechinel V. 1996 : Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of marrubium vuklgare on isolated tissues ; phytomedecine 7. 103-107p.

Tyagi AK, Malik A, 2010: Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against Candida albicans: microscopic observations and chemical characterization of Cymbopogon citratus. BMC Complement Altern Med 10(65): 01-11 27.

Végétation de la France, Suisse et Belgique.

Volak et stodola, 1983: Plantes médicinales, éditions Grund 1983.

valorisation

Publications et communications

Publication

- Antibacterial activity of *Mentha pulegium* essential oil against avian isolated esbl producing bacteria and its synergistic potential with antibiotics
International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Vol 9, Issue 6, 2017
- Antibacterial, antioxidant and wound healing activities of *Marrubium vulgare* and *Cytisus triflorus* extracts native to Algeria », accepté pour publication dans la revue « Phytothérapie ».

Communications

- Evaluation of Wound Healing and Antioxydant Activities of *Marrubium vulgare* Native to Algeria
29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCNP-29) and the 9th International Conference on Biodiversity (ICOB-9) September 24-27, 2016 İzmir-Turkey
- Contribution à l'étude des effets cicatrisants d'*Inula viscosa* et de *Marrubium vulgare*
2eme Journées de Biologie des Systèmes Microbiens Alger, Novembre 2016.
- Synergistic potential of *Mentha pulegium* essential oil with antibiotics against avian multidrug resistant bacteria
PSE International Symposium "New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare" September 17-19, 2017, Francavilla al Mare, Chieti, Italy
- Wound healing properties of *Cytisus triflorus*
PSE International Symposium "New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare" September 17-19, 2017, Francavilla al Mare, Chieti, Italy

Original Article

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *MENTHA PULEGIUM* ESSENTIAL OIL AGAINST AVIAN ISOLATED ESBL PRODUCING BACTERIA AND ITS SYNERGISTIC POTENTIAL WITH ANTIBIOTICS

FATIMA YAHIAOUI¹, QADA BENAMEUR², MERIEM HIND BEN-MAHDI^{1,3}

¹Laboratoire de Recherche, Santé and Productions Animales, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire-Algiers, Algeria, ²Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie, University of Mostaganem, Algeria, ³Ecole Préparatoire en Sciences de la Nature et de la Vie EPSNV-Algier, Algeria

Email: yahiaoui.fatima@gmail.com

Received: 14 Jan 2017 Revised and Accepted: 20 Apr 2017

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of Algerian *Mentha pulegium* essential oil against extended-spectrum β -lactamases (ESBL) producing bacteria isolated from avian livestock. The synergistic interactions between conventional antibiotics and *Mentha pulegium* essential oil were assessed.

Methods: Essential oil composition was determined by gas chromatograph-flame ionization detector (GC/FID), gas chromatograph-mass spectrometer (GC/MS) analysis.

Antibacterial activity of *Mentha pulegium* essential oil against ESBL producing bacteria was investigated by disc diffusion assay. Minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oil and its synergistic interaction with conventional antibiotics were determined by micro-broth dilution method and checkerboard test, respectively.

Results: The results indicate that *Mentha pulegium* essential oil with a high amount of pulegone (88.78%) had high inhibitory activity against the tested strains and particularly displays a satisfactory action against the studied ESBL producing bacteria from animal origin, with a diameter ranging from 13 to 26 mm. Out of 51 combinations tested between essential oil and antibiotics 60.78 % showed total synergy, 13.72 % had presented a partial synergy. The best antibacterial activities were obtained with the combination of *Mentha pulegium* essential oil and cefazolin, cefotaxime and gentamycin.

Conclusion: This study allowed concluding that *Mentha pulegium* essential oil showed not only satisfactory antibacterial properties, but also acts synergistically combined with conventional antibiotics, which make it a promising alternative to antimicrobial drugs; beside that, it might reduce the minimum effective dose of the drugs which minimizes their possible side effects.

Keywords: *Mentha pulegium*, Essential oil, Pulegone, ESBL bacteria, Antibacterial, Synergy, Antibiotics

© 2017 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i6.17092>

INTRODUCTION

The extended-spectrum β -lactamases (ESBL) producing bacteria are plasmid mediated enzymes that are able to hydrolyze and inactivate a wide variety of beta-lactams including third generation cephalosporins, penicillins, and aztreonam [1]. Production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) is one of the major causes of antibiotic resistance in these bacteria [2]. Their emergence in animal livestock is of a major medical and economic importance, indeed, antimicrobial resistance threatens public health and confronts humans at a therapeutic risk impasse, especially for zoonotic bacterial infections, and moreover, it causes several therapeutic failures in livestock which can lead to great economic losses.

The battle against bacterial infections involving antibiotic-resistant microorganisms has thus become a critical concern in the veterinary field and so, the development of alternative strategies becomes mandatory. The exploration of natural resources appears to be more promising, essential oil extracted from medicinal herbs and food plants have been highlighted as natural substances having a rich source of compounds with effective antimicrobial and antibiotic properties.

Mentha pulegium is one of medicinal *Mentha* species with good antimicrobial properties, it is commonly known as pennyroyal. It is native from Europe, North Africa and in minor and near East Asia [3]. In Algeria, where it is an endemic plant, leaves are widely used both as a tea brewing and as flavoring in salads or cooked food. Moreover, it is used in folk medicine in several ways, actually, it is known to be a good digestive tonic, it stimulates digestive juices,

relieves flatulence and colic. It is also a good remedy for headaches and for respiratory infections (cold, sinusitis, bronchitis, tuberculosis) and a powerful stimulant to the uterine muscle encouraging menstruation [4]. It can be used externally to relieve rheumatic conditions including gout [5]. Besides that, pennyroyal leaves, both fresh and dried, are especially noted for repelling insects [6].

Previous studies have reported satisfactory antibacterial activities of *Mentha pulegium* essential oil; actually, it shows a better activity on Gram positive bacteria [7]. Moreover, Teixeira *et al.* (2007) highlighted a good growth inhibition of Gram negative bacteria including *E. coli* [8]. To date, few studies have been conducted on its possible inhibitory effect on multidrug resistant bacteria especially ESBL producing one. Accordingly to this, the purpose of this study was to determine the antibacterial activity of *Mentha pulegium* essential oil against different multidrug resistant bacteria particularly on ESBL producing strains, isolated from chicken livestock, and to assess the antimicrobial possible synergistic effect of the association between classical antibiotics and *Mentha pulegium* essential oil.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and chemicals

Muller Hinton agar and Muller Hinton broth were purchased from Conda, Spain, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and tween 80 were purchased from Sigma-Aldrich Chemical USA.

Plant material

Flowering aerial parts of *Mentha pulegium* were collected from Adekar area (N 36.7172164, E 4.6690730, Bejaia-ALGERIA) in summer 2013. The voucher specimen was identified by the Department of Botany of Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA, El Harrach), and deposited at the Herbarium of Santé et productions animales Laboratory research (ENSV, Algiers) under number 027/13. The samples were dried in the shade away from light at room temperature for 7 to 10 d.

Essential oil extraction procedure, GC/FID and GC/MS analyses

After drying, the samples were ground and hydrodistilled for 3 h using a clevenger-type apparatus. The essential oils were stored in sterile amber bottle at 4 °C until analyses. The *Mentha pulegium* essential oil analysis was performed at *Lexva analytique* laboratory (Saint-Beauzire, France) under the operating conditions described below:

The essential oil of *Mentha pulegium* was analysed on an agilent gas chromatograph-flame ionization detector (GC-FID) model 6890, equipped with an apolar column (DB5 MS: 20 m length 0,18 mm internal diameter 0,18 µm film thickness), programmed from 50 °C (3,2 min) to 300 °C at 10 °C/min. Injector temperature were 280 °C. The essential oil was diluted in acetone in 4% (v/v), and 2 µl was injected in split mode (1/120). Hydrogen was used as a carrier gas (1.1 ml/min) [9].

Mass spectrometry was performed on an agilent gas chromatograph-mass spectrometer (GC/MS) model 7890/5975 C, programmed with the same conditions as for GC-FID (as described above). The essential oil was diluted in acetone in 4% (v/v), and 2 µl was injected in split mode (1/150). Hydrogen was used as a carrier gas (1.1 ml/min). Mass spectral data were acquired in the scan mode in the mass range 33-550.

The percentage was calculated from the peaks area given by the GC/FID without the use of correction factor. The components of the oil were identified by a combined search of retention times (lab library) and mass spectra (Library NIST 225000 records).

Antibacterial activities and synergy test

Bacterial strains

Different bacterial strains from the American type culture collection (ATCC) standard strains (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), obtained from Institute Pasteur of Algiers, were tested.

Besides that, thirty one multi-resistant veterinary clinical isolates of different bacterial strains were studied (table 1) including 18 ESBL producing bacteria; their resistance profiles have been previously established according to clinical and laboratory standards institute (CLSI) [10].

Disc diffusion assay

The disk diffusion method was employed as a qualitative screening test for the determination of antimicrobial activities of *Mentha pulegium* essential oil, according to the method described by Kirby and Bauer [11].

The bacterial cultures were first grown on nutrient agar plates at 37 °C for 18 to 24 h. Some colonies of each bacterial tested strain were transferred into physiological water and the obtained bacterial suspensions were adjusted to 1×10⁷CFU/ml (1/10, v/v; pattern 0.5 of McFarland standard). Then, it was spread into Muller Hinton agar, using a sterile cotton swab.

Subsequently, sterile disks of 6 mm diameter were placed in the surface of Petri dishes and impregnated with essential oil. Negative control was prepared using water and tween 80 at a concentration of 0.01%. Reference antibiotics were used as a positive control for each tested strain. The Petri dishes were incubated at 37 °C for 24 h. All determinations were performed in triplicate. Antibacterial activity was evaluated by measuring the radius of the inhibition zones.

Minimal inhibitory concentration (MIC), Minimal bactericidal concentration (MBC)

The sensitive bacteria to *Mentha pulegium* essential oil were selected for the micro dilution assay in order to determine the minimal

inhibitory and bactericidal concentrations. Moreover, the time kill assay was performed to establish the dynamic of action of *Mentha pulegium* essential oil against these same bacteria.

The MIC and MBC assays were performed using a serial microplate dilution method as described by Eloff with some variations [12]. Briefly, serial twofold dilutions of *Mentha pulegium* essential oil in Mueller-Hinton broth-tween 80 0.01 % was prepared in 96-well microplate, over the range 18.56 mg/ml to 0.036 mg/ml. 100 µl of an actively growing culture of the tested organism were added to each of the dilutions, the microplate was sealed and incubated 18 h at 37 °C.

After incubation, 40 µl of 0.2 mg/ml of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Chemicals] solution, was added to each of the wells. Microplate was examined after additional incubation of 30-120 min. Bacterial growth was indicated by the purple color of the MTT reduced to formazan. The lowest concentration at which a decrease in the purple color was observed compared to the next dilution was taken as the MIC value.

The samples showing no bacterial growth were streaked on MHA agar plates, which were incubated for 24 h at 37 °C and finally examined for 99.9% killing. The minimal bactericidal concentration was thus deduced.

Time-kill assay

Time-kill assay was performed according to the method described by Viljoen *et al.* [13]. Activities of essential oils against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, ESBL producing bacteria including *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella pullorum* and *Enterobacter cloacae* strains were evaluated by measuring the reduction in the number of CFU/ml over 2 h.

An initial inoculum of 5 x 10⁶CFU/ml was prepared and 1 ml was added to 9 ml of MHB containing both the essential oils and tween 80 (tests) or tween 80 only (control).

Essential oils were used at a final concentration equal to their MIC and their MBC. Tween 80 was added to both tests and control at a final concentration of 0.01% (v/v). The test tubes were incubated with agitation at 37 °C and samples (100 µl), taken in duplicate at 0, 10, 30, 60, 90 and 120 min, were serially 10-fold diluted, plated onto MHA and the total viable counts were determined after overnight incubation at 37 °C.

Synergistic interaction between *Mentha pulegium* essential oil and antibiotic

Broth micro dilution checkerboard method was used to determine the potential synergistic interactions between *Mentha pulegium* essential oil and antibiotics on 96 well-plate [14, 15]. Nine conventional antibiotics have been used (table 4).

In this experiment, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 and 4 ESBL producing bacteria including *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella pullorum*, and *Enterobacter cloacae* were studied. The tested dilutions were based on the MIC of the two antimicrobial agents which are mixed together so that the wells of the plate could contain various concentration combinations of the two compounds.

Eight serial two-fold dilutions (from MIC to MIC/128) of each antimicrobial agent were prepared.

100 µl aliquots of the first antimicrobial agent dilution were added in a vertical orientation, and 100 µl aliquots of the second antimicrobial agent dilution were added in a horizontal orientation. 100 µl of fresh bacterial suspension (≈10⁶CFU/ml) were added to each well and cultured at 37 °C for 24 h.

The results of the checkerboard assay were used for calculation of the fractional inhibitory concentration (FIC) index for two antimicrobials in combination according to the following formula:

$$\text{FIC Index} = \frac{\text{MIC}_{\text{essential oil combination}}}{\text{MIC}_{\text{essential oil alone}} + \frac{\text{MIC}_{\text{antibiotic in combination}}}{\text{MIC}_{\text{antibiotic alone}}}}$$

RESULTS

Chemical composition

Chemical analysis of *Mentha pulegium* essential oil revealed 26 different compounds accounting for 97.71% of the essential oil composition (table 1). The major constituent of the studied *Mentha pulegium* essential oil is represented by pulegone (88.78%).

Antibacterial activities and synergy test

Disc diffusion assay

The disk diffusion method was employed as a qualitative screening test for the determination of antimicrobial activities of *Mentha pulegium essential oil*, antibacterial activity was evaluated by measuring the radius of the inhibition zones (mm) (table 2).

Table 1: *Mentha pulegium* essential oil composition

Compounds	GC/FID%	Compounds	GC/FID %
Alpha-Pinene	0.235	Neo-menthol	2.083
Camphene	0.016	Trans-dihydrocarvone	1.364
Sabinene	0.054	Pulegone	88.78
Beta-pinene	0.196	8-hydroxy-4(5)-para menthen3 one	0.453
Myrcene	0.073	Piperitenone	0.329
3-Octanol	1.207	Inknown MW	0.087
Para-cymene	0.026	Beta-caryophyllene	0.104
Limonene	0.372	Alpha-humulene	0.180
Eucalyptol	0.068	Germacrene-D	0.020
Trans-Iso-Limonene	0.020	Mintfuranone	0.029
Menth-3-ene8-ol-para	0.236	Oxyde de caryophyllene	0.187
Menthone	0.919	Humulene 1,5epoxyde	0.224
Menthofuran	0.044		
Iso-menthone	0.211		
		Total identified	97.71

Table 2: Diameter of inhibition zones (mm) obtained by the agar diffusion method

Bacterial strain	Antibiotic control IMP	Antibiotic control GTC	Negative control tween	<i>Mentha pulegium</i> essential oil
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	-	30±1.1	≤6	35±0.7
<i>E. coli</i> ATTC25922	-	25±0.5	≤6	17±1.41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC 27853	-	-	≤6	7±0
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	24±0.4	≤6	16±0.7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	19±0.7	≤6	14±0
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	ND	≤6	12±0.7
<i>Salmonella dublin</i> ,	-	18±0.3	≤6	13±0
<i>Salmonella enteridis</i> ,	-	19±0.3	≤6	13±0
<i>Salmonella thyphi</i> ,	-	19±0.4	≤6	10±0
<i>Salmonella infantis</i> ,	-	19±0.3	≤6	12±0.7
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	25±0.7	≤6	10±0
<i>Proteus mirabilis</i> (1)	-	ND	≤6	14±0.7
<i>Shigella</i> sp	-	23±0.4	≤6	12±1
<i>Yersinia</i> sp,	-	25±0.6	≤6	11±0.8
<i>Providencia</i> sp,	-	23±0.4	≤6	12±0.7
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	-	24±0.3	≤6	14±1
<i>Salmonella pulorum</i> ESBL	≥30	-	≤6	13±0.12
<i>E. coli</i> ESBL (1)	≥30	-	≤6	15.33±0.7
<i>E. coli</i> ESBL (2)	≥30	-	≤6	12.66±0.7
<i>E. coli</i> ESBL (3)	≥30	-	≤6	14±0.2
<i>E. coli</i> ESBL (4)	≥30	-	≤6	13.66±0.2
<i>E. coli</i> ESBL (5)	≥30	-	≤6	10±0.24
<i>E. coli</i> ESBL (6)	≥30	-	≤6	14.66±0.57
<i>E. coli</i> ESBL (7)	≥30	-	≤6	14.33±1.12
<i>E. coli</i> ESBL (8)	≥30	-	≤6	11.33±0.8
<i>E. coli</i> ESBL (9)	≥30	-	≤6	13±1
<i>E. coli</i> ESBL (10)	≥30	-	≤6	12.66±0.76
<i>E. coli</i> ESBL (11)	≥30	-	≤6	12.66±0.76
<i>E. coli</i> ESBL (12)	≥30	-	≤6	14±1
<i>E. coli</i> ESBL (13)	≥30	-	≤6	16.66±0.23
<i>Proteus mirabilis</i> ESBL (2)	≥30	-	≤6	26.66±0.76
<i>Proteus mirabilis</i> ESBL (3)	≥30	-	≤6	16.66±0.23
<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL (2)	≥30	-	≤6	12±0.46
<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL (3)	≥30	-	≤6	13.16±0.57

Values are given as mean±standard deviation (n=3), IMP= imipenem/GTC= gentamicin ND= not determined

The obtained results revealed that *Mentha pulegium essential oil* had wide antibacterial spectrum, it inhibited the growth of all tested bacteria with ranging magnitudes (10-35 mm), except for

Pseudomonas aeruginosa which shown a very low sensibility (table 2). No inhibition zone was observed for the negative control (0.01% tween 80).

In which concerns the other tested bacteria, our study has shown for the first time that *Mentha pulegium* essential oil displays a satisfactory action against the studied ESBL producing bacteria (12/18) from animal origin, with a diameter ranging from 13 to 26 mm.

Minimal inhibitory concentration (MIC), Minimal bactericidal concentration (MBC)

The sensitive bacteria to *Mentha pulegium* essential oil were selected to the micro dilution assay in order to determine the minimal inhibitory and bactericidal concentrations. Moreover, the time kill assay was performed to establish the dynamic of action of *Mentha pulegium* essential oil against these same bacteria.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) were ranging from 0.14 mg/ml to 2.32 mg/ml (table 3).

MIC values are close to MBC values, so that the MBC/MIC ratios of the different strains are lower than 4 (table 3).

Time kill assay

Preliminary treatment of bacteria with *Mentha pulegium* essential oil used at a concentration equivalent to their MIC has shown a rapid decrease in the bacterial growth rate, the bactericidal end point was obtained after one hour at last, whereas, a total inhibition of growth was noted after 10 min when a concentration equivalent to the MBC were used, these observations are valuable for all tested bacteria including ESBL producing ones.

Synergistic interaction between *Mentha pulegium* essential oil and antibiotic

The results of the checkerboard assay are interpreted by calculating the fractional inhibitory concentration (FIC) index. FIC Index values were interpreted as following: Synergy (FICI \leq 0.5), additive effect (0.5 \leq FICI \leq 1), indifferent or antagonistic effect (1 \leq FICI \geq 2), [16, 17].

The results of synergistic effect between *Mentha pulegium* essential oil and antibiotics are given in table 4.

Table 3: Minimal inhibitory concentrations MIC (mg/ml), minimal bactericidal concentrations MBC (mg/ml) and MBC/MIC ratios of *Mentha pulegium* essential oil

	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.29±0.16	0.58±0.16	2.07
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.58±0.16	1.16±0.33	2
<i>E. coli</i> ATCC25922	1.16±0.33	2.32±0.66	2
<i>Proteus mirabilis</i> (ESBL) 3	2.32±0.66	4.64±1.33	2
<i>Proteus mirabilis</i> (ESBL) 2	2.32±0.66	2.32±0.66	1
<i>E. coli</i> (ESBL) 3	1.16±0.33	2.32±0.66	2
<i>E. coli</i> (ESBL) 6	1.16±0.66	2.32±0.66	2
<i>E. coli</i> (ESBL) 7	1.16±0.66	2.32±0.66	2
<i>E. coli</i> (ESBL) 1	0.58±0.16	1.16±0.33	2
<i>E. coli</i> (ESBL) 12	1.16±0.66	2.32±0.66	2
<i>E. coli</i> (ESBL) 13	0.58±0.16	1.16±0.33	2
<i>Salmonella dublin</i>	2.32±0.66	2.32±0.66	1
<i>Salmonella enteridis</i>	0.58±0.16	1.16±0.33	2
<i>Salmonella pullorum</i> (ESBL)	2.32±0.66	2.32±0.66	1
<i>Enterobacter cloacae</i> (ESBL) 3	2.32±0.66	2.32±0.66	1

Values are given as mean±standard deviation, (n=3)

Table 4: Synergistic interaction between *Mentha pulegium* essential oil and antibiotics against selected bacteria, FIC^a Index of different combinations of antibiotics and MP^b essential oil

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> (ESBL1)	<i>P. mirabilis</i> (ESBL2)	<i>S. pullorum</i> (ESBL)	<i>E. cloacae</i> (ESBL3)
MP+amoxicillin	0.56±0.1 ^d	0.5±0.1 ^c	0.5±0.1 ^c	0.31±0.1 ^c	1.5±0.5 ^e	1.25±0.5 ^e
MP+penicillin	ND	ND	ND	0.06±0.01 ^c	1.5±0.5 ^e	0.75±0.15 ^d
MP+cefotaxime	0.5±0.1 ^c	0.093±0.01 ^c	0.13±0.06 ^c	0.5±0.1 ^c	0.25±0.1 ^c	0.093±0.01 ^c
MP+cefazolin	0.18±0.06 ^c	0.07±0.01 ^c	0.07±0.01 ^c	0.25±0.1 ^c	0.5±0.1 ^c	0.325±0.1 ^c
MP+tetracycline	0.18±0.06 ^c	0.5±0.1 ^c	0.37±0.1 ^c	0.25±0.1 ^c	1±0.5 ^d	0.75±0.15 ^d
MP+imipenem	0.18±0.06 ^c	0.5±0.1 ^c	0.187±0.06 ^c	0.06±0.01 ^c	0.625±0.15 ^d	1±0.5 ^d
MP+enrofloxacin	2±0.5 ^e	2±0.5 ^e	2±0.5 ^e	2±0.5 ^e	1.5±0.5 ^e	1±0.5 ^d
MP+marbofloxacin	2±0.5 ^e	2±0.5 ^e	2±0.5 ^e	2±0.5 ^e	1.5±0.5 ^e	0.325±0.1 ^c
MP+gentamycin	0.375±0.1 ^c	0.18±0.06 ^c	0.18±0.06 ^c	0.18±0.06 ^c	0.18±0.06 ^c	0.18±0.06 ^c

ND: not determined, Values are given as mean±standard deviation. (n=3), ^aFractional inhibitory Concentration Index, ^b*Mentha pulegium*, ^ctotal synergy, ^dadditive effect, ^eindifferent or antagonistic

DISCUSSION

Chemical analyses of the studied essential oil showed that it belongs to the pulegone type, it contained mainly oxygenated monoterpenes represented by pulegone with a rate of 88.78%, no study has reported before such high pulegone rate.

Worldwide, several studies on *Mentha pulegium* essential oil composition establish three chemotypes: pulegone type, piperitenone/piperitone type and isomenthone/neoisomenthol type [18].

Previously in Algeria, the compounds of *Mentha pulegium* essential oil have been identified by Beghidja et al., who showed a difference on its constituents depending on the region of cultivation; actually, it appears that Algerian oils can be classified following two

chemotypes: the first is the pulegone type with 52–87% yield of pulegone and some variations of the other constituents and the second chemotype which is poorer in pulegone and relatively rich in the non-oxygenated terpenic fraction [19].

Studies conducted in Bulgaria, Tunisia, Morocco, India, Serbia and Iran, have reported pulegone chemotype but in lower proportions of pulegone compared to the presently studied essential oil [18, 20-25]. The high amount of pulegone can be attributed to the harvest area which is located in high altitude.

It is known that variability in the chemical composition of *Mentha pulegium* essential oil through different studies is probably due to the high chemical variability of extracted oils from *Mentha spp.*

induced by various factors, such as the age of the plant, variety of species, geographic region, soil composition and processing conditions [26, 27]. Moreover, this variability confers to each essential oil different biological effects.

The antibacterial investigation on *Mentha pulegium* essential oil showed that it exhibits a potent antibacterial activity against a wide panel of bacteria including multi-resistant ones except for *Pseudomonas aeruginosa* which is known to be the least sensitive bacteria to essential oils [28, 29]. According to Longbottom *et al.*, its resistance appears to be due to its external membrane structure, particularly impermeable to essential oil molecules and the action of efflux mechanisms, which enhance the protection of the bacteria against the essential oil action [30].

Staphylococcus aureus was the most sensitive to essential oil, it was followed by *Staphylococcus epidermidis* and some other *Enterobacteria* (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* strains: *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. pullorum*). Concerning the other *Enterobacteria* (*Salmonella gallinarum*, *Salmonella thyphi*, *Salmonella infantis*, *Providencia sp*, *Klebsiella sp*, *Shigella sp*, *Yersinia sp*) we noted a moderate response. Gram positive species are more sensitive to natural products than Gram-negative bacteria, because of the hydrophobic lipopolysaccharide in the outer Gram negative membrane's which provides protection against different agents [31].

Concerning EBSL strains represented by *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. pullorum*, *E. cloacae*, our study shows for the first time that *Mentha pulegium* essential oil displays a satisfactory action against the studied ESBL producing bacteria (12/18) from animal origin, with a diameter ranging from 13 to 26 mm.

The reported differences in susceptibility may be due to the differences in the cell wall composition and/or genetic content of their plasmids [32].

Some studies have proved the antibacterial effects of essential oil on human ESBL producing bacteria, actually, it has been described an interesting activity of natural compounds including clove, cinnamon, oregano, green tea against *E. coli* and *Klebsiella pneumonia* ESBL producing bacteria [33-36].

It was reported through this study that *Mentha pulegium* essential oil displays a bactericidal activity [36].

The MIC values obtained in our study are lower than those reported by Teixeira *et al.* [8], who noted respectively a MIC of 3.2 and 3.8 mg/ml for *E. coli* and *S. typhimurium*.

However, it seems difficult to compare these results with ours, because of the difference in essential oil composition of the chemotypes studied and the different strains tested (ESBL producing bacteria from animal origin). Thereby, Mahboubi et Haggi [7] using piperitone chemotype have noted a significant activity against Gram-positive bacteria with inhibition zones ranging from 8-21 mm and no activity against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Furthermore, they noted the lowest MIC with values of 0.25-4 µl/ml. On the opposite, Teixeira *et al.* and Marzouk *et al.* reported a satisfactory inhibition of *E. coli* [8, 37].

The objective of time kill assay was to characterize the antibacterial kinetic activity of essential oil. The obtained results highlighted a rapid decrease in the bacterial growth rate, indeed the bactericidal end point was obtained after one hour at last, whereas, a total inhibition of growth was noted after 10 min when a concentration equivalent to the MBC were used, these observations mean that *Mentha pulegium* essential oil displays an immediate bactericidal action.

The bactericidal action of *Mentha pulegium* essential oil might be attributed to the high amount of pulegone (88.78%), Duru *et al.*, have previously demonstrated a strong antimicrobial activity of pulegone against a set of bacteria, including *S. typhimurim* and *E. coli* [38].

Moreover, because of the complex composition of essential oils, multiple nonspecific cellular targets might be implicated [39]. In bacteria, the permeabilization of the membrane is associated with loss of ions and reduction of membrane potential, collapse of the proton pump and depletion of the ATP pool. Furthermore, essential

oils can coagulate the cytoplasm and damage lipids and proteins generating thus damage to the cell wall and membrane which lead to the leakage of macromolecules and to bacteria lysis [40].

Out of 51 combinations tested between *Mentha pulegium* essential oil and nine antibiotics (enrofloxacin, gentamicin, amoxicillin, penicillin, cefazolin, cefotaxime, tetracycline, marbofloxacin, imipenem): 31 (60.78 %) showed total synergy, 7 (13.72 %) had partial synergistic interaction and 13 (25.49 %) had no effect. The best antibacterial activities were obtained with the combination of *Mentha pulegium* essential oil and cefazolin, cefotaxime and gentamicin in which FIC index ranged from 0.07 to 0.5 and the total synergy effect obtained with this combination was observed for all studied strains. The combination of *Mentha pulegium* essential oil with amoxicillin, tetracycline and imipenem showed total synergy against all the tested strains, excepting *Salmonella* and *Enterobacter* (FICI \geq 0.75).

The ESBL producing bacteria are plasmid mediated enzymes that are able to hydrolyze and inactivate a wide variety of betalactams including third generation cephalosporins, penicillins, and aztreonam [41]. Their large emergence since last decades both in animals and humans threatens public health by many serious incurable infections because of their high resistance to conventional antibiotics.

Accordingly to this, the objective of our study was to explore the potential synergistic effect of *Mentha pulegium* essential oil with conventional antibiotics.

The obtained results showed that *Mentha pulegium* essential oil displays a bactericidal effect especially against ESBL producing bacteria and reported potential synergistic effects with conventional antibiotics like amoxicillin, cefazolin, cefotaxime, gentamycin.

We demonstrated for the first time synergy between *Mentha pulegium* essential oil and antibiotics tested on avian multi-resistant clinical isolates.

The synergistic effect of *Mentha pulegium* essential oil combined with amoxicillin, cefazolin and cefotaxime is promising, it can lead to recover these antibiotics efficiency against ESBL producing bacteria.

This synergy might be attributed to the action of the major compounds of the studied essential oil which is mainly represented by pulegone. Oumzil *et al.* have compared the antibacterial action of different monoterpenes (limonene, menthone, carvone and pulegone) known for their high antimicrobial properties and concluded that pulegone displays the most potent biocide activity [42]. However the mechanism of action of pulegone is still poorly known, Cox *et al.* suggested that monoterpenes disrupt the permeability barrier of cell membranes and inhibit respiration [43].

Many mechanisms pathways of essential oil/antibiotics synergism include sequential inhibition of common biochemical pathways, inhibition of protective enzymes, combination of membrane active agents, and use of membranotropic agents, these mechanisms leads to enhance the diffusion of other antimicrobials [44-47]. In addition, recent studies have demonstrated that some plant compounds can effectively inhibit the efflux pumps involved in antibiotic resistance mechanisms [48], which could lead to the restoration of sensitivity to antibiotics and reduce their minimum effective dose and thus their side effects and residues in animal products.

CONCLUSION

This study allowed concluding that the rich pulegone Algerian *Mentha pulegium* essential oil showed satisfactory bactericidal properties, and demonstrated that its association with classical antibiotics presents a real potential of synergistic interactions especially against threatening ESBL producing bacteria.

The use of these combinations is an efficient practice to reduce the minimum effective dose of the drugs reducing thus their possible toxic effects and the treatment cost.

Pulegone rich *Mentha pulegium* essential oil may have a huge potential as food preservative and pharmaceutical additive.

However, further work is necessary to explore the molecular action of pulegone and to understand the cellular mechanisms of their combinations with various antibacterial drugs.

AUTHORS CONTRIBUTION

All the authors have contributed in various degrees to conception and design, and/or acquisition of data, and/or analysis and interpretation of data, and/or writing present article.

CONFLICTS OF INTERESTS

All the author(s): YAHIAOUI Fatima, BENAMEUR Qada and BEN-MAHDI Meriem Hind declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- Lavanya S, Kumar S, Maria Joseph N, Sivaraman U. Prevalence of extended spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* and their antibiogram pattern from various clinical samples. *Asian J Pharm Clin Res* 2015;8:220-3.
- Thapa R, Lamichhane P, Banjara MR, Prasad Acharya G. Prevalence of extended spectrum beta lactamase producing uropathogens in pregnant women. *Asian J Pharm Clin Res* 2015;8:207-10.
- Chalchat JC, Gorunovic MS, Maksimovic ZA, Petrovic SD. Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L from Yugoslavia. *J Essent Oil Res* 2000;12:598-600.
- Newall CA, Anderson LA, Philipson JD. Herbal medicines. A guide for health care professional. The Pharmaceutical Press: London, United Kingdom; 1996.
- Franke R, Schilcher H. Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles. CRC Press; 2005.
- Kowalchik C, William HH. Rodale's illustrated encyclopedia of herbs. Emmaus, Pennsylvania, USA; 1998.
- Mahboubi M, Haggi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol* 2008;119-2:325-7.
- Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, et al. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind Crops Prod* 2012;36:81-7.
- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Edition. Carol Stream, Ill, USA; 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:493-6.
- Eloff JN. A sensitive and quick method to determine the minimum inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998;60:1-8.
- Viljoen A, VanVuuren S, Ernst E, Klepser M, Demirci B, Baser H, et al. *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae) the antimicrobial activity and essential oil composition of a cape-dutch remedy. *J Ethnopharmacol* 2003;88:137-43.
- Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol* 2014;40:76-94.
- Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations, in antibiotics in laboratory medicine. ed V Lorian, Philadelphia, USA; 2005.
- EUCAST: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (EUCAST). *CMI* 2000;6:503-8.
- White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1914-8.
- Stoyanova A, Georgiev E, Kula J, Majda T. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. *J Essent Oil Res* 2005;17:475-6.
- Beghidja N, Bouslimani N, Benayache F, Benayache S, Chalchat JC. Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the East of Algeria. *Chem Nat Compd* 2007;43:481-3.
- Mkaddem M, Boussaid M, Fadhel NB. Variability of volatiles in tunisian *Mentha pulegium* L. (*Lamiaceae*). *J Essent Oil Res* 2007;19:211-4.
- Cherrat L, Espinal L, Bakkali M, Pagán Rand. Laglaoui a: chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined process. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2014;22:221-9.
- Agnihotri VK, Agarwal SG, Dhar PL, Thappa Baleshwar RK, Kapahi BK, Saxena RK, et al. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Fragrance J* 2005;20:607-10.
- Nikolic M, Jovanovic KK, Markovic T, Markovic D, Gligorijevic N, Radulovic S, et al. Chemical composition antimicrobial, and cytotoxic properties of five *Lamiaceae* essential oils. *Ind Crops Prod* 2014;61:225-32.
- Morteza-Semnani K, Saeedi M, Akbarzadeh M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* L. *J Essent Oil-Bear Plants* 2011;14:208-13.
- Khosravi Zanjani MA, Mohammadi N, Zojaji M, Bakhoda H. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L and its antimicrobial activity on *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Food Biosci Technol* 2015;2:31-40.
- Xu P, Jia W, Bi L, Liu X, Zhao Y. Studies on components and quality of essential oil from *Mentha piperita* L produced in Xinjiang, China. *Chem Ind For Prod* 2003;23:43-5.
- Müller Riebau FJ, Berger BM, Yegen O, Cakir C. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J Agric Food Chem* 1997;45:4821-5.
- Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000;88:308-16.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94:223-53.
- Longbottom CJ, Carson CF, Hammer KA, Mee BJ, Riley TV. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:386-92.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985;49:1-32.
- Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sngul M, Adiguzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 2003;85:231-5.
- Dhara L, Tripathi A. Antimicrobial activity of eugenol and cinnamaldehyde against extended spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* by *in vitro* and molecular docking analysis. *Eur J Integr Med* 2013;5:527-36.
- Rai Mahendra Kumar. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their component. K V Kon. San Diego, USA; 2013.
- Si H, Hu J, Liu Z, Zeng ZL. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:190-4.
- Sejal R, Manita W. Antibacterial activity of green tea extract in combination with cefortaxime on diarrhea causing ESBP producing *E. coli*. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7-6:258-62.
- Marzouk B, Fredj MBH, Chraief I, Mastouri M, Boukef K, Marzouk Z. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *J Food Agric Environ* 2008;6:78-82.
- Duru ME, Ozturk M, Ugur A, Ceylan O. The constituents of essential oil and *in vitro* antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J Ethnopharmacol* 2004;94:43-8.
- Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1914-20.

40. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46:446-75.
41. Shah Pratibha J, Williamson Manita T. Antibacterial activity of honey against ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* from burn wound infections. *Int J Curr Pharm Res* 2015;7:32-6.
42. Oumzil H, Ghouami S, Rhajaoui M, Ildrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, et al. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res* 2002;16:727-31.
43. Cox SD, Mann CM, Markham JL. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 2000;88:170-5.
44. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008;45:639-52.
45. Yap PSX, Yiap BC, Ping HC, Lim SH. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open Microbiol J* 2014;8:6-14.
46. Sokolova SM, Buzuk GN, Lovkova MY, Tyutekin YV. Membranotropic compounds and alkaloid accumulation in plants. *Dokl Biochem Biophys* 2005;402:220-2.
47. Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pagès JM, et al. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection—bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 2012;19:464-71.
48. Smith ECJ, Kaatz GW, Seo SM, Wareham N, Williamson EM, Gibbons S. The phenolic diterpenetotarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;54:4480-3.

How to cite this article

- Fatima Yahiaoui, Qada Benameur, Meriem Hind Ben-Mahdi. Antibacterial activity of *Mentha pulegium* essential oil against avian isolated ESBL producing bacteria and its synergistic potential with antibiotics. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9(6):35-41.