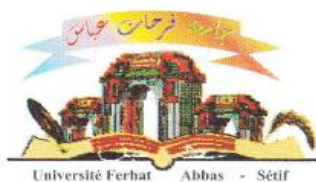


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas - Sétif  
Faculté des Sciences  
de la Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس - سطيف  
كلية علوم الطبيعة والحياة

N°...../SNV/2021

**Département de biochimie**

## **MEMOIRE**

Présenté par : **AGGOUN LOUBNA**

Pour obtenir le diplôme de **Magister**

Option : Biochimie Appliquée

## **THEME**

# **Activité antibactérienne et inhibitrice de $\beta$ -lactamases des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa* L.**

Soutenu publiquement le 28/06/2012

## **Devant le jury**

<b>Président :</b>	Benboubattra Mustapha	Professeur	Université de Sétif
<b>Rapporteur :</b>	Belattar Noureddine	Professeur	Université de Sétif
<b>Examineur :</b>	Sahli Farida	Maître de conférences	Université de Sétif
<b>Examineur :</b>	Zerroug Mohamed Mihoub	Maître de conférences	Université de Sétif

**Année universitaire 2011-2012**

## *Dédicaces*

*A mes parents que Dieu protège:*

*en témoignage de ma profonde affection qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien; je suis très reconnaissante. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.*

*A mes frères Samir, Mourad, Ridha, Zinou et surtout à mon petit frère Zaki, à mes sœurs (Naima et Chahrazed), à mes nièces et surtout à la famille Hachmi.*

*A tous mes Amis (es).*

*A tous les miens.*

## **REMERCIEMENTS**

*A Monsieur le Professeur N. Belattar*

*Qui a accepté d'être rapporteurs de cette thèse et qu'il trouve ici le témoignage de notre respectueuse gratitude pour son aide, sa patience et pour son œil critique qui m'a été très précieux pour structurer et améliorer la qualité de ce travail.*

*A Madame le Professeur F. Sahli, à Monsieur M. Benboubattra et à Monsieur M-M. Zerroug qui nous ont fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse et qu'ils soient remerciés pour le temps consacré à lire et à juger ce modeste travail.*

*Aux Dr. H. Bouriche, Dr. N. Boussoualim, Dr. N. Radjhi,*

*Dr. G. Tabette et à Dr. N. Benzidane*

*qui m'ont accueillie comme enseignants. Ainsi, vos conseils, vos encouragements m'ont permis de surmonter les difficultés rencontrées aux cours de la réalisation de ce travail.*

*Sincères remerciements.*

*Enfin, je remercie infiniment mes collègues et mes amis pour leur contribution de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Résumé :

les huiles essentielles de deux huiles fixes commerciales des graines de *Nigella sativa* (*Abou el Kacem* et *Miracle*) sont obtenues par hydro distillation dont l'analyse qualitative par chromatographie sur couches minces (CCM) a permis d'identifier le thymoquinone, le thymol et/ou le carvacrol comme l'un des principaux constituants chimiques. L'activité antibactérienne de ces essences mais également de la thymoquinone, le thymol et le carvacrol (composés synthétiques pure) a été évaluée par trois méthodes différentes (la diffusion en milieu gélosé, la microdillution et par micro-atmosphère) contre douze souches cliniques isolées à partir de diverses prélèvements (pus, urine, etc.) provenant des patients hospitalisés au niveau du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Sétif et caractérisées phénotypiquement par diverses mécanismes de résistances aux  $\beta$ -lactamines. En parallèle, les souches d'*E. coli* ATCC25922, de *P. aeruginosa* ATCC 25927 et de *S. aureus* ATCC 25923 ont été utilisées dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus à partir de ces travaux ont montré que les principaux constituants se sont révélés les plus actives avec des effets bactéricides vis-à-vis de l'ensemble des souches testées à l'égard des bactéries à Gram<sup>+</sup> et celle à Gram<sup>-</sup>, résistantes ou sensibles aux antibiotiques sauf vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* comparativement aux huiles essentielles extraites. Ces activités varient en fonction de la technique utilisée, de la souche testées et de la concentration appliquée.

Enfin, la susceptibilité d'inhibition d'une  $\beta$ -lactamases -type pénicillinase- du *Bacillus cereus* par les huiles essentielles extraites et les principaux constituants est vérifié. L'étude de la cinétique d'inhibition réalisée pour ces agents montre qu'ils sont inactifs sur cet enzyme.

Les résultats trouvés, positifs ou négatifs, sont intéressants pour une étude complémentaire plus approfondie et plus détaillée.

**Mots clés :** Résistance,  $\beta$ -lactamases, les huiles essentielles, *Nigella sativa*, chromatographie sur couches minces, activité antibactérienne, micro atmosphère.

## Abstract

Essential oils obtained from two types of fixed commercial oils of *Nigella sativa* (*Abou el Kacem* and *Miracle*) were obtained by water-distillation. Chemical analysis of essential oils extracts performed by Thin Layer Chromatography (TLC) showed the presence of compounds with known antimicrobial activity, including thymoquinone, carvacrol and/or thymol. Thus, a study of the evaluation of antibacterial activity of essential oils and the major compounds (thymoquinone, carvacrol and thymol) were screened against 12 different isolates of clinical bacteria which was identified as resistant to  $\beta$ -lactams and 3 other are reference bacteria (*E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC 25927 and *S. aureus* ATCC 25923). A visible antibacterial activity is made in vitro with three techniques, the agar diffusion test or aromagram, the micro-atmosphere method which is used to prove the antibacterial effect of the volatiles phase of these essential oils and by microdilution method.

The results gotten from these works showed that the major's compounds which tested separately exhibited a broad inhibition spectrum, presenting strong activity and also shows good potential to kill these isolates, exceptionally against the isolates of *P. aeruginosa*. However, the essential oils showed antibacterial properties with inability to exercise an antibacterial power on most tested bacteria, moderate to strong inhibition, with a more restricted action against studied. The activity depends on the concentration, microbial species and the method used.

Finally, the susceptibility of inhibition of  $\beta$ -lactamase type penicillinase from *Bacillus cereus* by essential oils extracts and their major's compounds was assessed. The kinetic method is realised with these agents showed their inability to exercise any inhibitors effect against these enzyme.

The positive or negative results found, are interesting for complementary studies, more deepened and more detailed.

**Key words:** Resistance,  $\beta$ -lactamases, essential oils, *Nigella sativa*, Thin Layer Chromatography, antibacterial activity, micro atmosphere.

## المخلص

أظهرت الدراسة التحليلية بطريقة الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لنوعين من الزيوت الأساسية المستخلصة بطريقة التقطير المائي من نوعين من الزيوت الثابتة التجارية للحبة السوداء (زيت أبو القاسم و زيت المعجزة) أنها تحتوي على تيموكينون، تيمول و الكرفكول كمكونات أساسية . كما قدرت النشاطية التثبيطية لهذه الزيوت الأساسية و كذا لكل من تيموكينون، تيمول و الكرفكول (مركبات نقية) ضد 12 نوع من البكتيريا السرييرية المقاومة للمضادات الحيوية من النوع  $\beta$ -smatlac. بالموازاة مع ذلك، *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 25927, قد استعملت كشواهد في نفس الظروف التجريبية.

النتائج المتحصل عليها أثبتت أن كل من تيموكينون تيمول و كرفكول تأثير ضد بكتيري عال و قاتل في جميع الحالات ماعدا ضد العزلات من النوع *P. aeruginosa* مقارنة مع الزيوت الأساسية المستخلصة. تختلف هذه النشاطية تبعاً للتقنية المستعملة، العزلة البكتيرية و درجة التخفيف.

في النهاية حاولنا أن نكشف عن قدرة كل من الزيوت الأساسية المستخلصة و البعض من مكوناتها الأساسية (تيموكينون، تيمول و الكرفكول) على تثبيط مميهة الحلقة  $\beta$ -amaselect نوع أ ل *Penicillinase* للعزلة *Bacillus cereus*. بينت الدراسة الحركية المحققة في جميع الحالات أن كل هذه المواد هي غير فعالة و ليس لها القدرة على تثبيط الإنزيم.

هذه النتائج المحصل عليها سواء كانت ايجابية أو سلبية مهمة من اجل دراسات تكميلية أكثر تعمقا و أكثر تفصيلا.

**الكلمات المفاتيح:** المقاومة، مميهة الحلقة  $\beta$ -elactam، الزيوت الأساسية، الحبة السوداء, كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، النشاطية المضادة للبكتيريا.

## Liste des abbréviations

<b>BLSE</b>	$\beta$ -lactamase à Spectre Elargi
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CcrA</b>	$\beta$ -lactamase, « cefotaxin and carbapenem resistant »
<b>C1G</b>	Céphalosporines de 1 <sup>ère</sup> génération
<b>C3G</b>	Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération
<b>C4G</b>	Céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération
<b>CMB</b>	Concentration Minimale Bactéricide
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CMY</b>	$\beta$ -lactamase, « active on cephamycins »
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gaz
<b>CPG/SM</b>	Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>CTX-M</b>	$\beta$ -lactamase, « active on cefotaxime, first isolated at Munich »
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétra acétique
<b>FEC</b>	$\beta$ -lactamase, « fecal Escherichia coli »
<b>HE<sub>1</sub></b>	Huile essentielle d' <i>Abou el Kacem</i>
<b>HE<sub>2</sub></b>	Huile essentielle de <i>Miracle</i>
<b>Kda</b>	kilo dalton
<b>KPC</b>	$\beta$ -lactamase, « Klebsiella pneumoniae carbapenemase »
<b>L1</b>	$\beta$ -lactamase, « Labile enzyme from Stenotrophomonas maltophilia »
<b>MIR</b>	$\beta$ -lactamase, « discovered at Miriam Hospital »
<b>NAD</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>OXA</b>	$\beta$ -lactamase, « active on oxacillin »
<b>PC1</b>	$\beta$ -lactamase, « from Staphylococcus aureus strain PC1 »
<b>PCR</b>	Polymérase Chaîne Reaction
<b>pI</b>	Point isoélectrique
<b>PLP</b>	Protéines-Liant Pénicillines
<b>PSE</b>	$\beta$ -lactamase, « Pseudomonas- specific enzyme »
<b>PER</b>	Pseudomonas Extended Resistance
<b>QMI</b>	Quantité minimale inhibitrice
<b>QMB</b>	Quantité minimale bactéricide
<b>SHV</b>	Sulfhydryl reagent variable
<b>SME</b>	$\beta$ -lactamase, « Serratia marcescens enzyme »
<b>TEM</b>	Nommé d'après le patient (Temoneira) qui a fournit le premier échantillon.
<b>TRI</b>	TEM résistante aux inhibiteurs
<b>TZP</b>	Tazobactam/piperacilline
<b>VEB</b>	Vietnam Extended Spectrum $\beta$ -lactamase

# Sommaire

## Introduction

<b>I. Infections bactériennes</b> .....	<b>1</b>
I.1. L'antibiothérapie.....	3
I.1.1. Principaux familles d'antibiotiques utilisés en clinique.....	3
<i>I.1.1.1. les <math>\beta</math>-lactamines</i> .....	4
I.1.1.2. Les antibiotiques non $\beta$ -lactamines.....	4
I.1.2. Modes d'action des antibiotiques.....	4
I.3.2.1. Modes d'action des $\beta$ -lactamines.....	4
<u>I.3.2.2. Modes d'action des antibiotiques non <math>\beta</math>-lactamines</u> .....	6
I.2. L'antibiorésistance.....	7
I.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	7
I.2.1.1. Résistance enzymatique.....	7
I.2.1.2. Résistance non enzymatique.....	19
I.2.1. Résistance aux antibiotiques non $\beta$ -lactamines.....	20
<b>II. Aromathérapie</b> .....	<b>23</b>
II.1. Les huiles essentielles.....	23
II.1.1. Composition chimique des huiles essentielles.....	23
II.1.2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles.....	24
II.1.3. Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	25
II.1.4. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	27
II.2. La nigelle cultivée " <i>Nigella sativa</i> L." .....	28
II.2.1. Aspect botanique de <i>N. sativa</i> L.....	28



II.2.2. Aspects phytochimiques.....	29
II.2.3. Usages et propriétés pharmacologiques.....	30

### **Matériels et méthodes**

I. Matériels.....	33
I.1. Matériel végétal.....	33
1.2. Souches bactériennes.....	33
I.3. Produits chimiques.....	34
II. Méthodes.....	35
II.1. Extraction des huiles essentielle .....	35
II.2. Identification ou analyse qualitative des huiles essentielles.....	36
II.3. Caractérisation microbiologique des souches étudiées.....	37
II.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	40
II.5. Effet des huiles essentielles sur l'activité de la pénicillinase.....	41

### **Résultats et discussions**

I. Extraction des huiles essentielles de la nigelle.....	42
II. Identification ou analyse qualitative des huiles essentielles.....	43
III. Caractérisation microbiologique des souches étudiées.....	45
IV. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	49
V. Effet des huiles essentielles sur l'activité de la pénicillinase.....	63
Conclusion générale.....	65
Perspective.....	67
Références bibliographiques.....	69
Annexes.....	86

# Liste des illustrations

<b>Figure 1.</b>	Structure fine d'une cellule bactérienne .....	<b>1</b>
<b>Figure 2.</b>	Sites et mécanismes d'actions de principales familles d'antibiotiques.....	<b>3</b>
<b>Figure 3.</b>	Structures chimique de principales classes de $\beta$ -lactamines.....	<b>4</b>
<b>Figure 4.</b>	Biosynthèse du peptidoglycane (a) et le mécanisme catalytique des PLP (b).....	<b>5</b>
<b>Figure 5.</b>	Structure tridimensionnelle d'un $\beta$ -lactamase à sérine de la classe A d'Ambler (TEM-1) isolé à partir d' <i>E.coli</i> et le mécanisme catalytique général des $\beta$ -lactamases à sérine.....	<b>9</b>
<b>Figure 6.</b>	Structure tridimensionnelle d'un métallo-béta-lactamases (IMP-1) isolé à partir de <i>P. aeruginosa</i> .....	<b>10</b>
<b>Figure 7.</b>	Structure chimique des trois combinaisons $\beta$ -lactamines/inhibiteurs de $\beta$ -lactamases.....	<b>15</b>
<b>Figure 8.</b>	Mécanisme d'inactivation des $\beta$ -lactamases à serine par le clavulanate.....	<b>15</b>
<b>Figure 9.</b>	Souche de <i>K. pneumoniae</i> productrice de $\beta$ -lactamase à spectre élargi.....	<b>16</b>
<b>Figure 10.</b>	Mesure de la CMI par la méthode d'E-test.....	<b>17</b>
<b>Figure 11.</b>	Détection phénotypique de la céphalosporinases de type AmpC chez <i>Citrobacter freundii</i> (a), de la production de carbapénémase de la classe <b>B</b> et <b>A</b> d'Ambler chez <i>K. pneumoniae</i> par le test de synergie IMP/EDTA (b) et Modified Hodge Test (c) respectivement.....	<b>18</b>
<b>Figure 12.</b>	Aspect morphologique et classification de <i>Nigella sativa</i> L .....	<b>29</b>
<b>Figure 13.</b>	Montage du dispositif simple employé pour l'extraction des huiles essentielles.....	<b>36</b>
<b>Figure 14.</b>	Méthodologie de réalisation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.....	<b>38</b>
<b>Figure 15.</b>	Chromatogrammes de l'analyse des huiles essentielles sous observation UV à 256nm (A), par révélation à l'aide de vapeurs d'iode (B) et par une solution d'anisaldéhyde (C).....	<b>43</b>
<b>Figure 18.</b>	Structures chimique de l'acide clavulanique, de la nitrocéfine et des principaux constituants de l'huile essentielle de la nigelle.....	<b>63</b>

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b>	Principales bactéries infectieuses.....	<b>2</b>
<b>Tableau 2.</b>	Mécanismes d'action des antibiotiques non $\beta$ -lactamines.....	<b>6</b>
<b>Tableau 3.</b>	Éléments structuraux des sites actifs des $\beta$ -lactamases à sérine.....	<b>8</b>
<b>Tableau 4.</b>	Classifications moléculaire et phénotypique des $\beta$ -lactamases d'après Ambler et Bush-Jacoby-Meideros.....	<b>11</b>
<b>Tableau 5.</b>	Principaux mécanismes de résistances aux antibiotiques non $\beta$ -lactamines.....	<b>21</b>
<b>Tableau 6.</b>	Les informations générales concernant les huiles commerciales de la nigelle utilisées.....	<b>33</b>
<b>Tableau 7.</b>	Souches cliniques étudiés.....	<b>34</b>
<b>Tableau 8.</b>	Rapports frontaux et couleurs des spots constituant les huiles essentielles extraites et des étalons.....	<b>44</b>
<b>Tableau 9.</b>	Antibiogrammes des souches à Gram <sup>+</sup> .....	<b>45</b>
<b>Tableau 10.</b>	Antibiogrammes des souches à Gram <sup>-</sup> (Familles d'entérobactériaceae).....	<b>46</b>
<b>Tableau 11.</b>	Antibiogrammes des souches à Gram <sup>-</sup> (Familles de pseudomonaceae).....	<b>48</b>
<b>Tableau 12.</b>	Activité antibactérienne des huiles essentielles extraites et des principaux constituants, exprimée par le diamètre d'inhibition (en mm), vis-à-vis des bactéries à Gram <sup>+</sup> .....	<b>50</b>
<b>Tableau 13.</b>	Activité antibactérienne des huiles essentielles et des principaux constituants, exprimée par le diamètre d'inhibition (en mm), vis-à-vis des bactéries à Gram <sup>-</sup> .....	<b>52</b>
<b>Tableau 14.</b>	Activité antibactérienne des huiles essentielles extraites en micro atmosphère vis-à-vis des bactéries à Gram <sup>+</sup> .....	<b>56</b>
<b>Tableau 15.</b>	Activité antibactériennes des huiles essentielles de la nigelle en micro atmosphère vis-à-vis des bactéries à Gram <sup>-</sup> .....	<b>57</b>
<b>Tableau 16.</b>	Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide des huiles essentielles extraites.....	<b>60</b>
<b>Tableau 17.</b>	Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide des principaux constituants de l'huile essentielle de la nigelle.....	<b>61</b>

# *Introduction*

Les maladies infectieuses d'origine bactériennes ont toujours constitué une inquiétude majeure des établissements et des organisations engagés dans le domaine de la santé publique et de la recherche médicale. En effet, les antibiotiques qui sont des substances chimiques naturelles, d'hémi-synthèse ou de synthèse occupent une place éminente dans le traitement de ces maladies. Cependant, les  $\beta$ -lactamines (les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames) constituent une des principales familles d'antibiotiques largement utilisées en clinique en raison de l'étendue de leur spectre d'action, de leur pouvoir bactéricide, de leur faible toxicité et à leur faible coût. Ces molécules exercent leurs effets antibactériens en se fixant d'une manière covalente et irréversible sur leurs cibles membranaires, Protéines Liant-Pénicillines (PLP), conduisant ainsi à leurs inhibitions. Néanmoins, leurs utilisations intensives et inappropriées sont à l'origine de l'émergence des bactéries résistantes en développant différents mécanismes pour contrecarrer l'action de ces substances à travers la synthèse, constitutive ou inductible, d'enzymes inactivatrices, connues sous le nom de  $\beta$ -lactamases, la modification de la cible d'action, l'acquisition ou la surproduction des pompes d'efflux et la séquestration de l'antibiotique.

La lutte contre la résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut se faire suivant plusieurs approches entre autre : l'utilisation des antibiotiques non  $\beta$ -lactamines (les quinolones, les macrolides, les phénicoles...) et l'utilisation de la combinaison  $\beta$ -lactamines/inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (clavulanate, tazobactam, sulbactam). Comme les  $\beta$ -lactamines, l'utilisation souvent inadaptée de ces agents antibactériennes a entraîné la sélection des souches bactériennes multirésistantes comme les bactéries résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, les bactéries résistantes aux aminosides, aux fluoroquinolones, à la vancomycine, etc.

Devant ce défi, l'usage des métabolites secondaires particulièrement les huiles essentielles connues depuis des siècles par leur forte action antimicrobienne, semble être la seule alternative crédible au traitement par les antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

*Nigella sativa* ou la nigelle cultivée est une plante aromatique de la famille des Ranunculaceae, largement cultivée pour ces graines à des fins culinaires et médicinales dans plusieurs régions du monde. Les études phytochimiques des graines ont permis d'identifier divers composés chimiques parmi lesquels des protéines, des huiles fixes, des huiles essentielles, des polyphénols, des alcaloïdes, etc.

Au cours de ces dernières décennies, l'huile essentielle de la nigelle a fait l'objet de nombreuses études, mais aucune étude n'a pu établir la relation entre la composition chimique et l'activité

attribuée à ces essences avec exactitude. En effet, l'huile essentielle extraite des graines de *N. sativa* exhibent une activité antimicrobienne notable. Par ailleurs, des effets synergiques et additionnels de l'huile essentielle en associations avec certains antibiotiques tels que l'ampicilline, la gentamicine, la streptomycine et l'érythromycine ont été également établis. D'autre part, des effets anti-inflammatoires, antiallergiques et antiasthmatiques par inhibition de l'expression de la 2-cyclooxygénase (COX-2) et de la 5-lipooxygénase (5-LO) ont été établis pour le thymoquinone, constituant majeur (18%) de l'huile essentielle de la nigelle. Enfin, plusieurs d'autres activités tels que l'activité anti-oxydante, antidiabétique, anti-hépatite et anti-néphrotoxiques, anticancéreux et immunostimulantes ont été aussi attribués à l'huile essentielle de la nigelle.

Le but de ce travail est d'évaluer le pouvoir antibactérien des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir de deux huiles fixes commerciales de la nigelle et de certains de leurs constituants majeurs sur des souches bio-résistantes responsables d'infections nosocomiales de la région de Sétif, ainsi que sur des souches à phénotype sauvage provenant d'American Type Culture Collection (ATCC). D'autre part, une activité inhibitrice vis à vis d'une  $\beta$ -lactamase de type pénicillinase sera aussi établie.

# *Revue bibliographique*

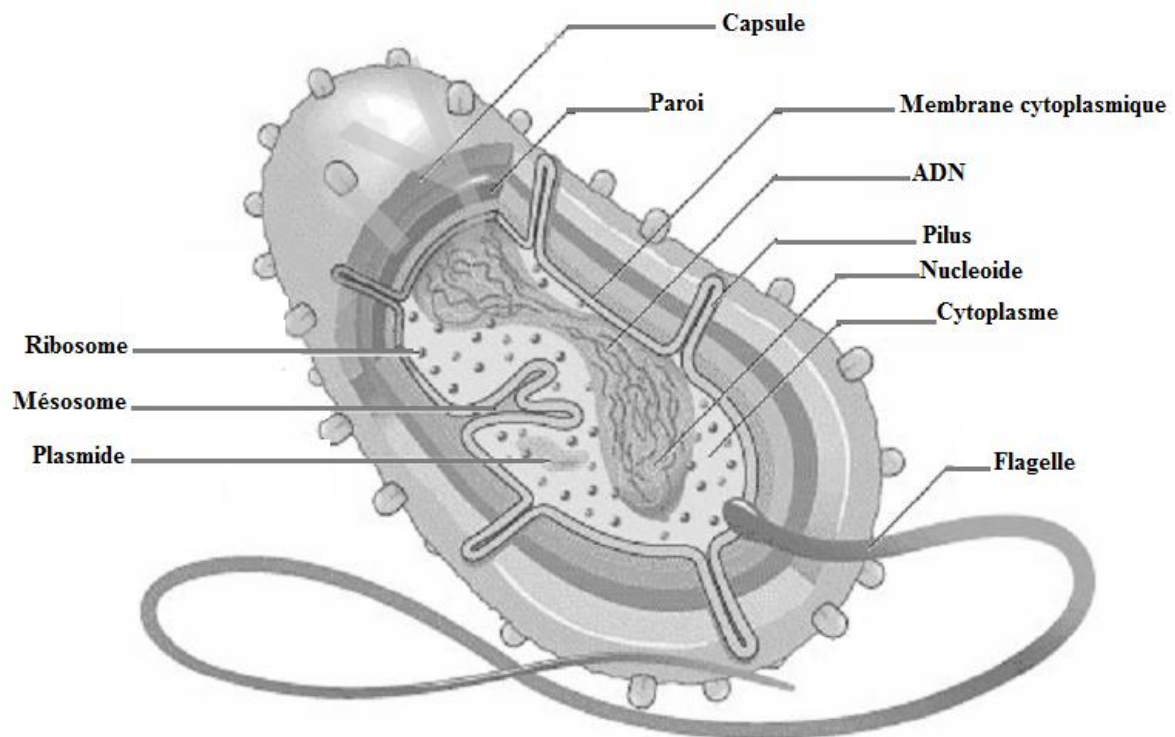
# *Revue bibliographique*



# I. Infections bactériennes

Les maladies infectieuses d'origine bactériennes sont des maladies dues au développement, chez l'homme ou l'animal, de bactéries (Figure 1) dont les espèces les plus connus et les plus redoutables pour l'homme sont consignées dans le tableau ci-dessous.

Au cours de la dernière décennie, un grand intérêt a été réservé à l'étude de ces affections, tant de point de vue thérapeutique que de point de vue microbiologique (1, 2). Cette importance donnée fait suite à l'apparition de la résistance des bactéries aux antibiotiques les plus communément utilisés (les  $\beta$ -lactamines et les antibiotiques de type non  $\beta$ -lactamines) d'une part, et aux complications que ces germes produisent chez des patients à profil clinique particulier surtout pour les immunodéprimés, les mucoviscidosiques ou les patients ayant une plaie chronique (pied diabétique, ulcères veineux, ...) d'autre part (1, 2, 3).



**Figure 1.** Structure fine d'une cellule bactérienne.

**Tableau 1.** Principales bactéries infectieuses.

Groupes bactériennes	Caractéristiques générales	Types d'infections
Bactéries à Gram <sup>-</sup> non fermentaires : famille de Pseudomonadaceae (1, 2, 3, 4, 5, 6)		
<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>A. baumannii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bâtonnets ou coccobacille</li> <li>• Aérobie stricts</li> <li>• Ubiquistes</li> <li>• Opportunistes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infections nosocomiales: pneumonies, méningites, etc.</li> <li>• Cholangites</li> <li>• Infections de la peau et des tissus mous...</li> </ul>
Bactéries à Gram <sup>-</sup> non exigeants: familles des Enterobacteriaceae (2, 7, 8, 9, 10, 11)		
<i>E. coli</i> , <i>Proteus spp</i> , <i>Klebsiella sp</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>S. marsecens</i> , etc.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aérobie-anaérobie facultatives</li> <li>• Bâtonnets</li> <li>• Mobiles par cils péritriches ou immobiles</li> <li>• Pathogènes commensales du tube digestif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infections communautaire ou urinaire (<i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i>)</li> <li>• Septicémies et pneumonies</li> <li>• Appendicite et péritonite (<i>E. coli</i>)</li> <li>• Méningites néonatales souvent due d'<i>E. coli</i></li> </ul>
Bactéries à Gram <sup>+</sup> (12, 13, 14, 15)		
<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i> , etc.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cocci généralement groupés en amas (grappe de raisin)</li> <li>• Aérobie ou anaérobie facultatifs</li> <li>• Immobiles et exigeants</li> <li>• Opportunistes</li> <li>• Ubiquistes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infections pyogènes de la peau (Impétigo, panaris,...)</li> <li>• Infections osseuses (Ostéite)</li> <li>• Digestives (Entérocolites post-antibiotiques)</li> <li>• Septicémies</li> <li>• Endocardites</li> </ul>
Streptococcus sp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cocci</li> <li>• anaérobie facultatifs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infections nosocomiales: pneumonies, méningites, septicémies, etc.</li> <li>• Otites</li> </ul>
Entérocoques spp, <i>Bacillus cereus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bacilles sporulés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intoxications alimentaires</li> </ul>

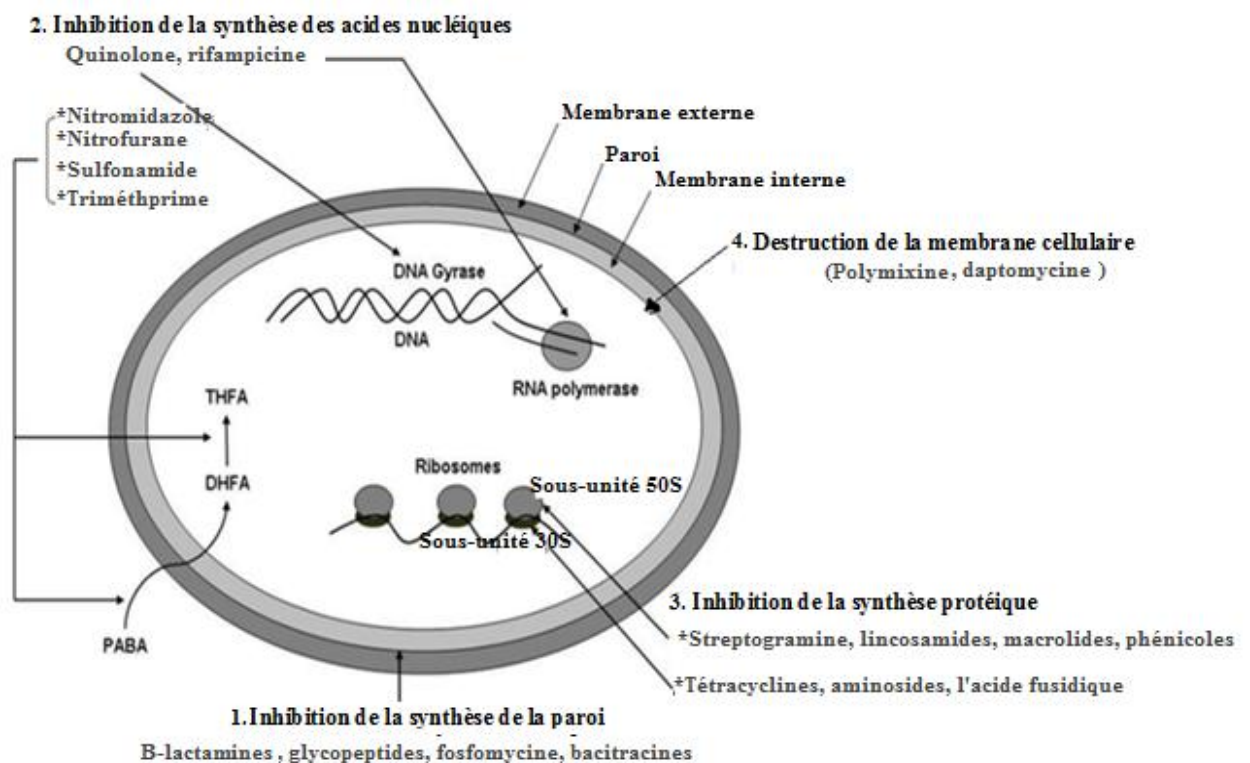
## I.1. L'antibiothérapie

L'antibiothérapie ou le traitement par les antibiotiques est la pierre angulaire du traitement des infections d'origine bactériennes. Elle débute en 1933 lorsqu'un jeune enfant est traité par le sulfamide et guérit d'une septicémie à *S. aureus*.

En clinique, le traitement par les antibiotiques doit être adapté à la sensibilité des germes aux antibiotiques, ainsi qu'à la sévérité et au type d'infections (15). En effet, l'utilisation intensive et irraisonnable de ces molécules a conduit à l'émergence des bactéries résistantes (2, 4, 5, 15). Récemment, les efforts pour réduire ce phénomène sont basés sur l'hypothèse que l'antibiorésistance est maintenue au sein des populations bactériennes du fait de leur exposition aux antibiotiques et que la restriction de leur utilisation pourrait, dès lors, diminuer l'importance des bactéries résistantes (16).

### I.1.1. Principales familles d'antibiotiques utilisés en clinique

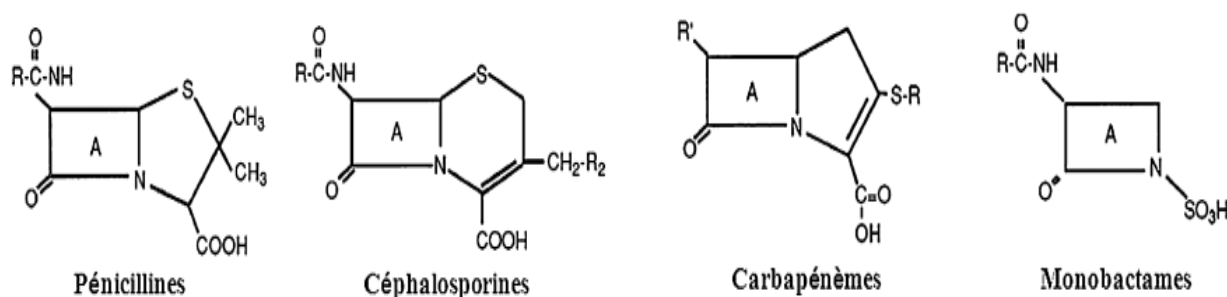
Les antibiotiques, au sens strict, sont des substances chimiques naturelles, d'hémi-synthèse ou de synthèse qui ont pour effets d'empêcher la multiplication des bactéries ou d'entraîner leurs destructions par action au niveau d'une ou plusieurs voies métaboliques indispensables à la vie de la bactérie (Figure 2) (17).



**Figure 2.** Sites et mécanismes d'action de principales familles d'antibiotiques (17), **PABA** : acide p-aminobenzoïque, **DHFA** : dihydrofolate, **THFA** : tétrahydrofolate.

### 1.1.1.1. les $\beta$ -lactamines

Du fait de l'étendue de leur spectre d'action, de leur pouvoir bactéricide, de leur faible toxicité et à leur faible coût, les  $\beta$ -lactamines constituent une des principales familles d'antibiotiques largement utilisés en clinique (2, 18). Les  $\beta$ -lactamines dont les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (annexe 1) sont des molécules qui ont en commun le noyau  $\beta$ -lactame "A" (Figure 3), support de l'activité antibactérienne (2, 18). Ainsi que les inhibiteurs suicides des  $\beta$ -lactamases (l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam) discutés plus loin et qui n'ont pas d'activité antibactérienne intrinsèque.



**Figure 3.** Structures chimiques de principales classes de  $\beta$ -lactamines (18).

### 1.1.1.2. Les antibiotiques non $\beta$ -lactamines

La résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines pose des problèmes progressivement croissants dans le traitement des infections graves (méningites, septicémies, etc.) ce qui a conduit au développement, lui aussi progressivement croissant, par les laboratoires de recherche et l'industrie pharmaceutique de nouveaux agents antibactériens tels que les aminosides (17), les tétracyclines (12, 19, 20), les macrolides (19), les quinolones (21, 22), etc. (annexe 2), issus soit de l'amélioration des familles existantes, soit du développement de molécules ayant de nouveaux sites et modes d'action.

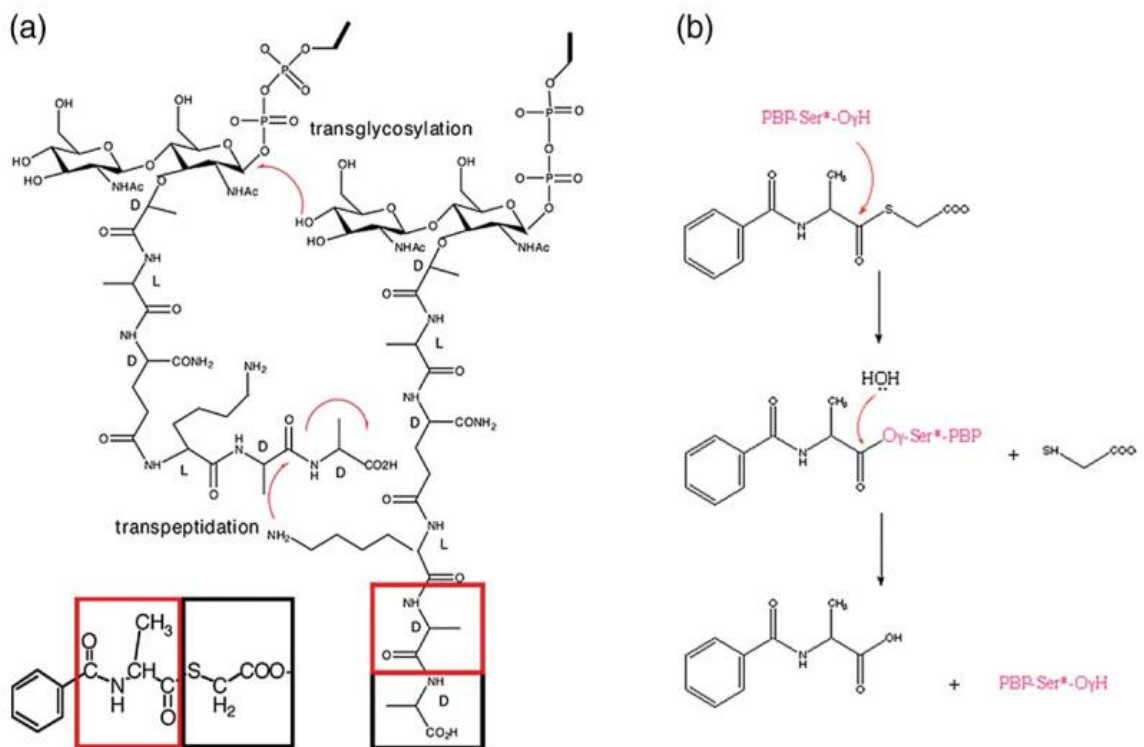
## 1.1.2. Modes d'action des antibiotiques

### 1.1.2.1. Modes d'action des $\beta$ -lactamines

Les cibles des  $\beta$ -lactamines sont des enzymes insérées sur la face externe de la membrane cytoplasmique des bactéries et appartenant à la famille des protéases à sérine. Ces cibles sont souvent dites protéines liants pénicillines (PLP), ou penicillin binding protein (PBP), ou tout simplement les D, D-transpeptidases (13, 23, 24). Le nombre et la nature des PLP varient selon les espèces bactériennes. Ainsi, en fonction du poids moléculaires on distingue les PLP de haut poids moléculaires (PLP 1, 2, 3) et celles de faible poids moléculaires (PLP 4, 5, 6). Les PLP de haut poids moléculaires se subdivisent en deux sous groupes dont le sous groupe A est le plus

importants (possède des activités de transglycosylation et de transpeptidation) et le sous groupe B à fonction transpeptidasique. Les PLP de faible poids moléculaires à fonction carboxypeptidasique jouent un rôle important dans la régulation du nombre de liaison dans le peptidoglycane (réaction d'hydrolyse) (13, 23). De façon générale, les PLP sont les principaux responsables de la polymérisation des molécules précurseurs de disaccharide penta-peptides impliqués dans l'étape finale (réaction de transglycosylation et de transpeptidation) de la synthèse du peptidoglycane, constituant majeur de la paroi bactérienne, (Figure 4a) (23).

De part de leur analogie structurale avec le dipeptide D-alanyl-D-alanine, substrat spécifique des PLP, les  $\beta$ -lactamines se fixent sur ces cibles essentiellement au niveau du domaine penicillin binding-transpeptidase du site actif des PLP, conduisant ainsi à leurs inhibitions par la formation d'un complexe covalent et irréversible (acyl-enzyme) (23) (Figure 4b). L'inhibition des PLP induit un arrêt de la synthèse du peptidoglycane (inhibition de leur polymérisation) et de la croissance bactérienne. L'effet bactéricide des  $\beta$ -lactamines est dû à l'incapacité du peptidoglycane altéré de maintenir la pression osmotique intra-cytoplasmique lors de la division cellulaire (formation des trous) et secondairement à l'activation déréglé d'autolysines (mureine hydrolase et endopeptidase) menant ainsi à la lyse ou la mort bactérienne.



**Figure 4.** Biosynthèse du peptidoglycane (a) et le mécanisme catalytique des PLP (b) (23), D : D-alanine, le produit d'hydrolyse est le N-benzyl-D-alanine et le thioglycolate.

### I.3.2.1. Modes d'action des antibiotiques non $\beta$ -lactamines

Le mode d'action de certaines molécules appartenant aux différentes classes d'antibiotiques non  $\beta$ -lactamines sont consignés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 2.** Mécanismes d'action des antibiotiques non  $\beta$ -lactamines.

Antibiotiques	Mécanisme d'action
<b>Inhibition de la synthèse du peptidoglycane</b>	
<b>Glycopeptides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fixent directement sur l'undécaprényl- phosphate (UDP), transporteur transmembranaire des précurseurs du peptidoglycane (25).</li> </ul>
<b>Fosfomycine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la synthèse des précurseurs du peptidoglycane en bloquant une pyruvyl-N-acétyl glucosamine-transférase (17).</li> </ul>
<b>Inhibition de la synthèse des protéines</b>	
<b>Aminosides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fixent irréversiblement à la sous-unité 30S du ribosome provoquant ainsi des erreurs dans la lecture, traduction, de l'ARNm (17).</li> </ul>
<b>Macrolides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fixent de façon réversible à la sous-unité 50S du ribosome inhibant la transpeptidation et la translocation (19).</li> </ul>
<b>Phénicol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fixent à la sous-unité 50S du ribosome empêchant ainsi la formation des liaisons peptidiques par inhibition de la peptidyl-transférase (17).</li> </ul>
<b>Tétracyclines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fixent à la sous-unité 30S du ribosome inhibant ainsi la phase d'élongation de la synthèse protéique (12, 17, 19, 20).</li> </ul>
<b>Linézolide</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fixe sur l'ARNr 23S, empêchant ainsi la formation du complexe 70S (12, 19).</li> </ul>
<b>A. fusidique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fixe au niveau du site amino-acyl de la sous-unité 50S du ribosome et bloque la translocation de la chaîne peptidique en formation.</li> </ul>
<b>Destruction de la membrane cellulaire</b>	
<b>Polymyxine B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fixe sur les phospholipides membranaire, les membranes ne peuvent plus se remanier, se déforment et deviennent perméables (17, 25).</li> </ul>
<b>Daptomycine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agit par insertion puis oligomérisation irréversibles <math>Ca^{++}</math> dépendante dans la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram<sup>+</sup> entraînant une fuite des ions de <math>K^+</math> avec une dépolarisation rapide (26).</li> </ul>
<b>Inhibition de la synthèse des acides nucléiques</b>	
<b>Quinolones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibent les processus de réplication et de transcription de l'ADN par fixation irréversibles sur l'ADN gyrase (bactéries à Gram<sup>-</sup>) et sur le topo-isomérase IV pour les bactéries à Gram<sup>+</sup> (21, 22, 26).</li> </ul>
<b>Sulfamides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiteurs spécifiques de la dihydrofolate réductase (DHFR), catalyseurs de la synthèse de l'acide tétra-hydrofolique nécessaire à la biosynthèse des purines et de certains acides aminés essentielles, par compétition avec l'acide p-amino-benzoïque (PABA) (17).</li> </ul>
<b>Rifampicine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la synthèse de l'ARNm par inhibition de l'ARN polymérase-ADN dépendante (27).</li> </ul>

## I.2. L'antibiorésistance

L'antibiorésistance ou la résistance des bactéries aux antibiotiques pose un grand problème dans le traitement de certaines maladies infectieuses. Elle peut être naturelle ou acquise ; la résistance naturelle "ou intrinsèque" est découverte chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle est liée à son patrimoine génétique et due, le plus souvent, à l'inaccessibilité ou à une faible affinité de la cible à l'antibiotique ou, plus rarement, à l'absence de la cible (28). A l'opposé, la résistance acquise ne concerne que quelques souches d'une espèce normalement sensible. Elle résulte d'une modification dans le patrimoine génétique (28, 29, 30). A côté des mutations probables (29), l'acquisition d'un fragment d'ADN étranger, pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes, est le plus souvent à l'origine de la résistance acquise. En effet, l'acquisition d'ADN se fait habituellement par conjugaison où une bactérie donneuse va transmettre à une bactérie receveuse un fragment d'ADN (transposon) ou une copie de son plasmide, dit le plasmide R ou le facteur R, qui peuvent porter un ou plusieurs gènes de résistances. Chez les *Neisseria* sp, l'acquisition peut se faire par transformation (réarrangement de la séquence d'ADN échangée entre deux bactéries). Le transfert de gènes de résistance par l'intermédiaire d'un bactériophage (transduction) est rare (2, 30).

### I.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des  $\beta$ -lactamines :

#### I.2.1.1. Résistance enzymatique

L'inactivation enzymatique par les  $\beta$ -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu chez les bactéries à Gram<sup>-</sup> (10, 11, 31, 32, 33). Les  $\beta$ -lactamases (E.C.3.5.2.6) sont des enzymes qui catalysent d'une manière irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame et qui rendent l'antibiotique inactif avant qu'il n'atteigne sa cible (PLP) (10, 11, 31, 32, 33). Chez les bactéries à Gram<sup>+</sup>, l'inactivation s'effectue à l'extérieur de la cellule bactérienne grâce à des  $\beta$ -lactamases extracellulaires (staphylocoques sp) ou liée à la membrane externe (mycobactéries), alors que chez les bactéries à Gram<sup>-</sup>, l'inactivation a lieu dans l'espace périplasmique. Cependant, l'activité de ces enzymes a été décrite pour la première fois par Abraham *et al.* (34) chez une souche d'*E. coli* résistante à la pénicilline. Après cette découverte, l'apparition et la dissémination de nouvelles  $\beta$ -lactamases n'a cessé de croître, plus de 500 types, à cause de l'utilisation abusive et inappropriée des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et à une prolongation de la durée de l'hospitalisation (35, 36).

Simultanément, la présence de gènes codant certaines  $\beta$ -lactamases sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons) a permis la diffusion de ces enzymes au sein des populations bactériennes phylogénétiquement éloignées (9, 31, 37).

### ❖ Structure et mode d'action des $\beta$ -lactamases

La détermination des structures tridimensionnelles des  $\beta$ -lactamases par cristallographie aux rayons **X** a contribué efficacement à la compréhension des mécanismes de résistance, à l'explication des mécanismes d'inhibition et à la démonstration des similitudes structurales existantes entre ces enzymes.

D'une manière générale, la structure tridimensionnelle des sérines  $\beta$ -lactamases est constituée d'un domaine en hélice  $\alpha$  et d'un domaine hybride en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  (Figure 5). Les sites actifs de ces enzymes comprennent trois éléments structuraux conservés (Tableau 3) contenant des chaînes latérales similaires (38, 39).

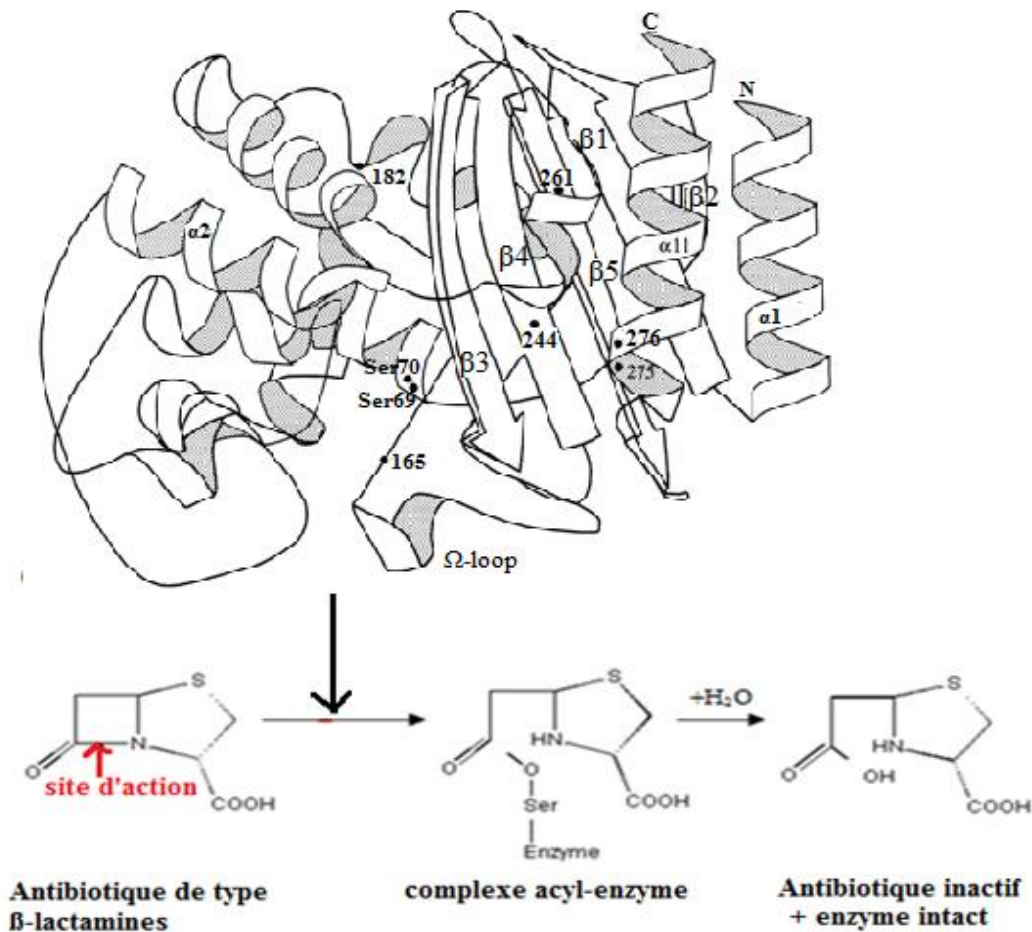
**Tableau 3.** Eléments structuraux des sites actifs des  $\beta$ -lactamases à sérine (38).

Classe	Elément 1	Elément 1	Elément 1
A	<sup>70</sup> S-X-X-K	<sup>130</sup> S-D-N S-D-S	<sup>234</sup> K-T-G K-S-G R-S-G R-T-G
C	<sup>64</sup> S-X-X-K	<sup>150</sup> Y-A-N	<sup>314</sup> K-T-G
D	<sup>70</sup> S-X-X-K	<sup>144</sup> Y-G-N	<sup>214</sup> K-T-G

**A** : alanine, **D** : aspartate, **G** : glycine, **K** : lysine, **N** : asparagine, **S** : serine, **T** : thréonine, **R** : arginine, **Y** : tyrosine et **X** : acide aminé variable.

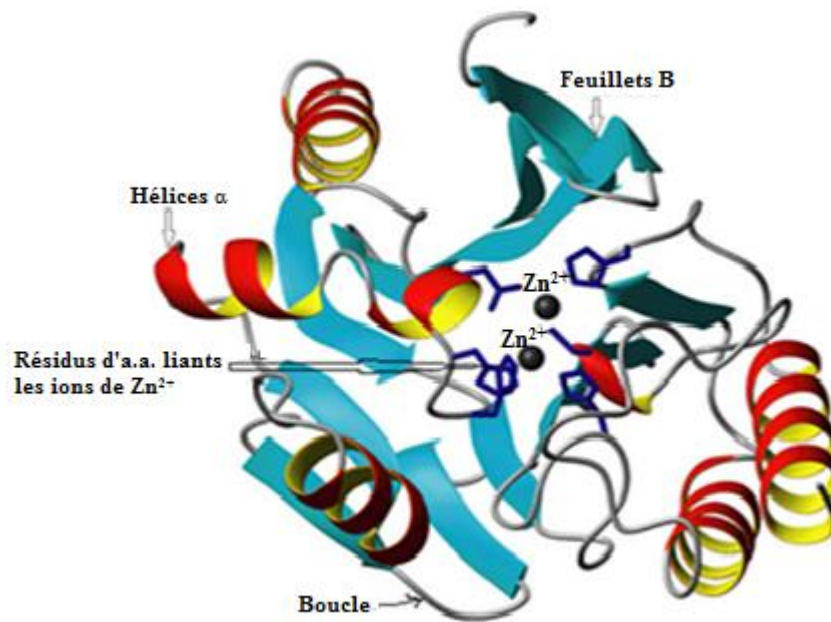
Les acides aminés de ces éléments sont impliqués dans l'étape d'acylation lors de l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines. La sérine du motif <sup>64/70</sup>S-X-X-K va mener à l'attaque nucléophile sur l'anneau  $\beta$ -lactame pour la production d'un intermédiaire séryl-enzyme (complexe non covalent) (Figure 5) (40). Les  $\beta$ -lactamases de la classe A d'Amblar ont un quatrième élément qui semble jouer un rôle important dans l'étape de la déacylation lors de l'hydrolyse de l'antibiotique. Il se situe sur une boucle appelée boucle oméga ( $\Omega$ ). Dans la plupart des cas, elle contient la séquence Glu<sub>166</sub>-X-Glu-Leu-Asn<sub>170</sub>. Le Glu<sub>166</sub> et l'Asp<sub>170</sub> sont liés par un pont d'hydrogène et semblent essentiels pour le positionnement de la molécule d'eau W1 près de site actif (38, 41).





**Figure 5.** Structure tridimensionnelle d'un  $\beta$ -lactamase à sérine de la classe A d'Ambler (TEM-1) isolé à partir d'*E. coli* (42) et le mécanisme catalytique général des  $\beta$ -lactamases à sérine (40).

Par contre, la structure des métallo-béta-lactamases est composée de deux domaines liés entre eux par une chaîne de 8 résidus d'acides aminés (121 à 128) (43). Le premier domaine, du côté de l'extrémité N-terminale, comporte 7 feuillets  $\beta$  et 3 hélices  $\alpha$ , et le second domaine est constitué de 5 feuillets  $\beta$  et de 2 hélices  $\alpha$  (44) (Figure 6). Ces enzymes possèdent dans leur site actif un cation indispensable à leur activité qui est invariablement le zinc ( $Zn^{2+}$ ) dont le mécanisme catalytique n'est pas encore élucidé (44). Par exemple, pour l'IMP-1 de *P. aeruginosa*, deux sites distinct de la liaison des ions de  $Zn^{2+}$  au niveau du site actif de l'enzyme ; le 1<sup>ère</sup> site nommé 3H (His116, 118 et 196) ; le 2<sup>ème</sup> site également appelé DCH (Asp 120, Cys221, His263) (45).



**Figure 6.** Structure tridimensionnelle d'un métallo-béta-lactamases (IMP-1) isolé à partir de *P. aeruginosa* (44).

#### ❖ Classification des $\beta$ -lactamases

Depuis la découverte des  $\beta$ -lactamases et la séparation classique entre les pénicillinases et les céphalosporinases, le profil de substrat (46), le poids moléculaires et le point isoélectrique (pI) (47), le support génétique (2, 31) ont été utilisés comme des principaux paramètres pour divers tentatives de classification. Actuellement, deux classifications sont adoptées :

- La classification d'Amblar (48) dite moléculaire ou structurale est basée sur les similitudes des séquences primaires en acides aminés du site actif et selon laquelle les  $\beta$ -lactamases ont été regroupées en quatre classes (A, B, C et D) (Tableau 4).
- La classification de Bush-Jacoby-Medeiros (47) prend en considération la diversité fonctionnelle des  $\beta$ -lactamases au sein des quatre classes structurales d'Amblar. Elle repose sur la sensibilité des enzymes aux inhibiteurs (acide clavulanique, EDTA) d'une part et du profil de leurs substrats préférentiels d'autre part (Tableau 4). Cette classification pose cependant un problème puisque différentes mutations ponctuelles peuvent influencer la susceptibilité des enzymes aux substrats et aux inhibiteurs (49).

**Tableau 4.** Classifications structurales et fonctionnelle des  $\beta$ -lactamases d'après Ambler et Bush-Jacoby-Meideros (31).

Classification		Enzymes représentatives	Activité enzymatique préférentielle							Inhibition par	
Structural d'Ambler	Fonctionnelle de Buch		P	CAR	OX	C1G	C3G	ATM	IMP	a.clav	EDTA
<b>Sérine-béta-lactamases</b>											
<b>Classe A</b>	<b>2a</b>	Pénicillines à spectre restreint ( <b>PC1</b> )	+++	++	-	+/-	-	-	-	+++	-
	<b>2b</b>	Pénicillines à spectre large ( <b>TEM-1, TEM-2, SHV-1</b> )	+++	++	+	++	-	-	-	+++	-
	<b>2be</b>	Pénicillines à spectre étendu ( <b>BLSE, TEM, SHV, CTX-M</b> )	+++	++	+	++	++	++	-	+++	-
	<b>2br</b>	TEM résistantes aux inhibiteurs ( <b>TRI</b> )	+++	++	+	+/-	-	-	-	-	-
	<b>2c</b>	Carbénicélinases ( <b>PSE-1</b> )	++	+++	+	+	-	-	-	+	-
	<b>2e</b>	Céfuroximase ( <b>FEC-1</b> )	++	++	-	++	+	-	-	+++	-
	<b>2f</b>	Carbapénémases ( <b>KPC-1, SME-1</b> )	++	+	?	+	+	++	++	+	-
<b>Classe C</b>	<b>1</b>	Céphalosporinases ( <b>Ampc, CMY-2, MIR-1</b> )	++	+	-	+++	+	-	-	-	-
<b>Classe D</b>	<b>2d</b>	Oxacilines ( <b>OXA-1</b> )	+	+++	V	V	-	-	V	-	/
<b>Métallo-béta-lactamases</b>											
<b>Classe B</b>	<b>3</b>	Carbapénémases ( <b>L-1, IMP-1, VIM-1, CcrA1</b> )	++	++	++	++	++	++	-	++	-

L'efficacité enzymatique et l'activité des molécules inhibitrices sont indiquées par les signes (+) et (-). **Car** : carboxy-pénicillines, **P** : pénicilline, **OX** : oxacilline, **C1G** : céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération, **C3G** : céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, **ATM** : aztreonam, **IPM** : imipénème, **a. clav** : acide clavulanique et **EDTA** : acide éthylène diamine tetracétique.

#### a. Classe A

La classe A est la plus diversifiée. Historiquement, elle était initialement représentée par les pénicillines et les céphalosporinases. Les enzymes de cette classe ont un poids moléculaires varient de 14 à 48 Kda et un pI compris entre 3,5 et 10 (47). Actuellement, les principaux représentants de cette classe sont :

**a.1.** Les  $\beta$ -lactamases de type TEM, groupe fonctionnel 2b de Bush, sont des pénicillinases à large spectre (TEM-1, TEM-2 et SHV-1) qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam mais non à la clavulanate (7, 50).

**a.2.** Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargie (BLSE), groupe fonctionnel 2be de Bush (47), sont des pénicillinases à spectre étendu qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam (47, 50, 51). Dans la littérature plus 230 BLSE ont été décrites (2) dont les plus importantes :

Les BLSE de type TEM dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou plusieurs acides aminés généralement à lieu au niveau de l'un des résidus d'acide aminés (Gly<sub>238</sub>  $\rightarrow$  Ser, Glu<sub>240</sub>  $\rightarrow$  Lys, Arg<sub>164</sub>  $\rightarrow$  Ser/ His et le Glu<sub>10</sub> (ou Asp<sub>104</sub>)  $\rightarrow$  Lys) impliqués dans la structure primaire de l'enzyme (52, 53). Bien que, les BLSE de type TEM (> 150) soient le plus souvent produites par *E. coli* et *K. pneumoniae*, ces enzymes ont été aussi rapportées chez *P. aeruginosa* (TEM-42) (54).

Les BLSE de type SHV (Sulfhydryl variable) sont des enzymes (>70) qui ont pour substrat les pénicillines, les céphalosporines et l'aztreonam (50, 52, 53, 55). Comme les dérivés de TEM, les mutations dans SHV-1 chez la majorité des souches de *K. pneumoniae* (chromosomique) et chez *E. coli* (plasmidique) ont lieu classiquement au niveau des positions 238 et 240 (52, 53).

Les BLSE de type CTX-M (Céfotaximase-Munich) sont des BLSE qui possèdent 40% d'homologie, de point de vue structurale, avec les BLSE de type TEM et SHV (56). Elles ont été essentiellement isolées chez *E. coli* en 1986 (2, 50). A partir de 1995, de nouvelles CTX-M ont émergés de façon explosive chez *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* et chez les entérobactéries, (2, 3). Au niveau de leur spectre d'activité, les CTX-M d'origine plasmidiques (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-28 et CTX-M-45) hydrolysent préférentiellement le céftriaxone et le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases (2, 3, 22, 51, 57, 58). De plus, le CTX-M-15 et le CTX-M-32 dites également les céftazidimases, enzymes conférant à la bactérie une résistance à haut niveau au céftazidime qu'au céfotaxime, ont été aussi décrites (22, 37, 59).

**a.3.** Les TEM résistantes aux inhibiteurs (TRI), groupe fonctionnel 2br de Bush (47), sont des dérivés de TEM. Ces enzymes (environ 30) ont une sensibilité diminuée aux inhibiteurs suicides de  $\beta$ -lactamases, avec une efficacité hydrolytique moindre sur les céphalosporines

comparativement aux TEM-1 ou TEM-2 (8, 55). Ce phénotype a été initialement décrit chez *P. mirabilis* et *E. coli* en 1991 (8).

**a.4.** Les carbapénémases, groupe fonctionnel 2f de Bush (47), sont insensibles à l'EDTA, plus ou moins sensibles à l'acide clavulanique et qui actives sur toutes les  $\beta$ -lactamines (KPC de *P. aeruginosa* et des entérobactéries), à l'exception des céphalosporines (SME de *S. marcescens* NMC-A et IMI d'*E. cloacae*), ou seulement sur les carbapénèmes et les céphalosporines comme les GES largement décrites chez *P. aeruginosa* (2, 60, 61, 62).

## **b. Classe B**

Les enzymes de la classe B d'Ambler, les carbapénémases ou encore dites les métallo-bêta-lactamases (MBLs) font partie au groupe fonctionnel 3 de Bush (47), groupe qui renferme un ensemble hétérogènes d'enzymes d'un poids moléculaires varient de 25 à 118 Kda avec un pI compris entre 2,5 et 10,5 (63). Elles sont largement décrites chez *A. baumannii* (1, 2, 5, 6, 64), chez *P. aeruginosa* (1, 2, 64, 65, 66, 67) et certains souches d'entérobactéries (68). Les bactéries productrices de ces enzymes sont résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines, à l'exception de l'aztreonam et aux inhibiteurs suicides de  $\beta$ -lactamases mais, elles sont susceptibles à l'action inhibitrice de l'EDTA.

## **c. Classe C**

Les enzymes de la classe C ou les céphalosporinases de type AmpC, font partie au groupe fonctionnel 1 de Bush (47), groupe qui renferme un ensemble hétérogènes d'enzymes d'un poids moléculaires varient de 29 à 43 Kda avec un pI compris entre 6,8 et 10 (69). En effet, selon l'origine des gènes codants ces enzymes on distingue :

- Les céphalosporinases de type AmpC à médiation chromosomique se manifestent par deux phénotypes distinctes ; le phénotype céphalosporinase de bas niveau qui se traduit par une résistance aux amino-pénicillines, à leurs associations aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases et aux C1G a été caractérisé principalement chez *C. freundii*, *M. morgani*, *Hafnia alvei*, *Providencia stuartii*, *S. marcescens* et *Enterobacter sp.* Chez ces espèces, l'expression des gènes (*bla<sub>ampC</sub>*) codant pour ces enzymes est inductible par les  $\beta$ -lactamines notamment par l'imipénème, le céfoxitine et le clavulanate. Par contre, le phénotype céphalosporinase de haut niveau, qui se traduit par une résistance à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines excepté les carbapénèmes, a été retrouvé chez les bactéries possédant naturellement une céphalosporinase de type AmpC qui peut être alors surexprimée (les entérobactéries) (50, 69, 70, 71).

- Les céphalosporinases de type AmpC à médiation plasmidique ont été décrits pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1980 chez *E. coli* et *K. pneumoniae* (50, 70, 71), puis chez *E. cloacae* (ACT-1 et MIR-1), *Citrobacter* (CMY), *M. morgani* (DHA), *Hafnia* (ACC-1) et chez d'autres entérobactéries (MOX, FOX,...) (50, 72). Les bactéries productrices de ces enzymes sont résistantes à la céfoxitine, à la céfotétane, à la céfotaxime, à la céftazidime et à l'aztreonam (50, 70, 71, 72).

#### **d. Classe D**

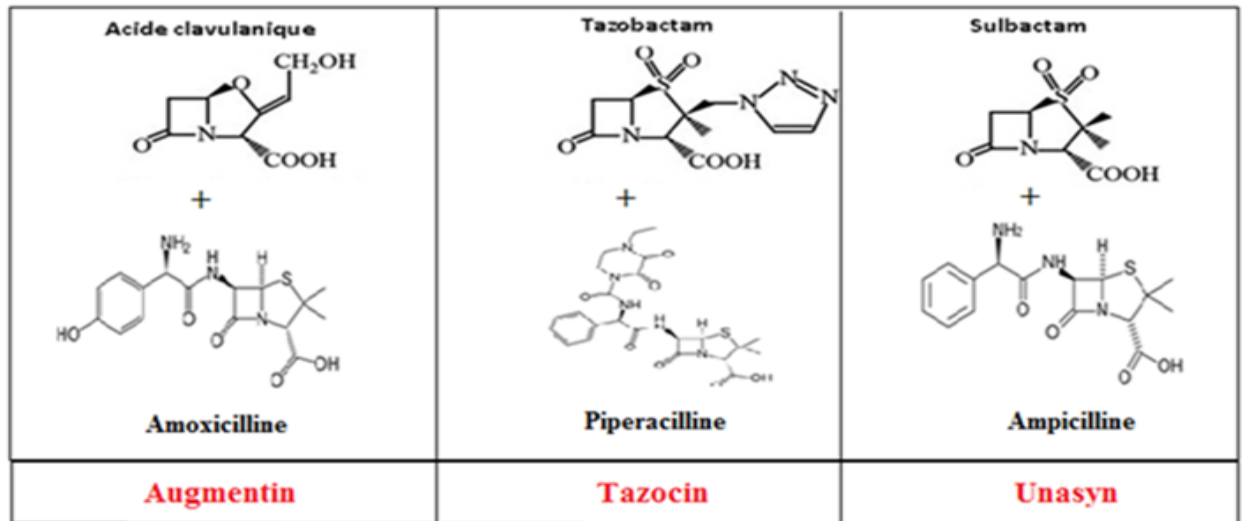
Les enzymes de la classe D, groupe 2d de Bush (47) comprennent les oxacillinases (OXA) ou également appelé OXA  $\beta$ -lactamases résistants à l'acide clavulanique (31, 54, 73, 74), enzymes de poids moléculaires varient de 23 et 44 Kda avec un pI compris entre de 8,2 et 8,6 (73). Elles sont caractérisées par une forte activité hydrolytique vis-à-vis de l'oxacilline que les benzyl-pénicillines (31, 47). La plupart d'entre eux n'hydrolysent pas de façon significative les céphalosporines, mais leurs évolutions par mutation(s) ponctuelle(s) semblable à ceux des TEM/SHV tend à élargir leurs spectre d'activités (74). En effet, les OXA d'origine chromosomique de type carbapénèmases retrouvées chez *A. baumannii* (OXA-23, 24, 40, 51, 58) et *K. pneumoniae* (OXA-48) ont la capacité d'hydrolyser les pénicillines et l'imipénème, mais non le céfotaxime et la céftazidime (2, 3, 5, 75). Par contre, les BLSE de la classe D identifiés chez *P. aeruginosa* (dérivés d'OXA-10) et chez certaines entérobactéries (51, 54) sont caractérisés par une résistance plus élevée au céfotaxime.

#### **❖ Inhibitions des $\beta$ -lactamases et résistances aux inhibiteurs**

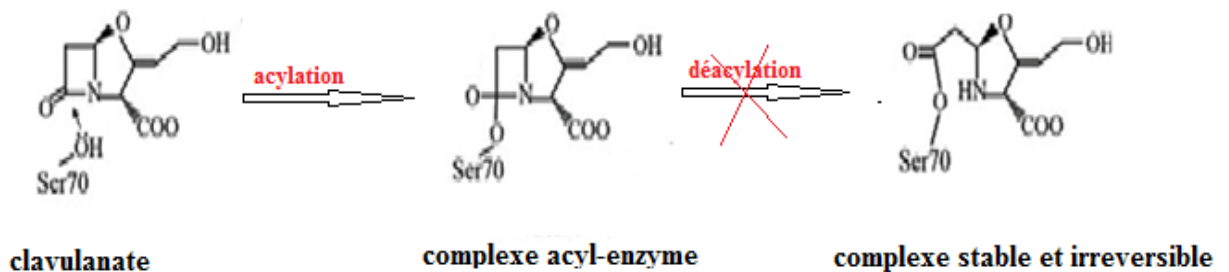
La lutte contre la résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines par production de  $\beta$ -lactamases peut se faire suivant plusieurs approches entre autre l'utilisation d'antibiotiques non  $\beta$ -lactamines qui rendent l'enzyme incapable de l'hydrolyser tout en gardant son activité antibactérienne d'une part (17, 21, 22, 26, 27), les  $\beta$ -lactamines stables aux  $\beta$ -lactamases (C3G, les carbapénèmes dont l'imipénème) et l'utilisation de la combinaison  $\beta$ -lactamines/inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases d'autre part (Figure 7). En effet, cette dernière représente l'approche thérapeutique la plus utilisée en clinique (31, 76, 77) qui repose sur l'effet synergique des deux molécules: l'inhibiteur (le clavulanate, le tazobactam et le sulbactam) agit comme une substrat analogue des  $\beta$ -lactamases domptent à une acylation et en absence de la déacylation, il restent attaché à l'enzyme entraînant ainsi l'inactivation irréversible de ce dernier (formation d'un complexe très stable) (Figure 8) et le  $\beta$ -lactamine peut alors se lier à leur cible (PLP) et exerce leur activité antibactériens (78, 79).

En clinique, le clavulanate est utilisé en association avec l'amoxicilline ou avec la ticarcilline, ces combinaison est mise sur le marché sous le nom d'Augmentin<sup>®</sup> ou du Timentin<sup>®</sup>

respectivement (76, 77). Tandis que, le tazobactam est utilisés en association avec la piperacilline (Tazocin<sup>®</sup>) (76, 77) et le sulbactam est commercialisé en combinaison avec l'ampicilline sous le nom d'Unasyn<sup>®</sup> et dans certains pays avec la céfopérazone sous le nom de Sulpérazone<sup>®</sup> (76).



**Figure 7.** Structure chimique des trois combinaisons  $\beta$ -lactamines/inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.



**Figure 8.** Mécanisme d'inactivation des  $\beta$ -lactamases à serine par le clavulanate (78).

L'utilisation abusive de ces combinaisons est à l'origine de l'apparition de la résistance des bactéries aux inhibiteurs. En effet, de nouvelles  $\beta$ -lactamases confèrent une résistance à l'acide clavulanique ont été mises en évidence en France chez des souches d'*E. coli* (80). L'analyse de la séquence de résistance de ces enzymes a révélé qu'elles sont une variante de  $\beta$ -lactamases de type TEM et dérivent par mutations, ponctuelle, de TEM-1 et TEM2 (Met<sub>69</sub>  $\rightarrow$  Val, Leu ou Ile, Arg<sub>244</sub>  $\rightarrow$  Ser, Cys ou His (*E. coli*, *K. pneumoniae*), Ser<sub>130</sub>  $\rightarrow$  Glu et de Arg<sub>275</sub>  $\rightarrow$  Leu ou Glu) (76, 81), d'où leur dénomination des TRI (8, 55).

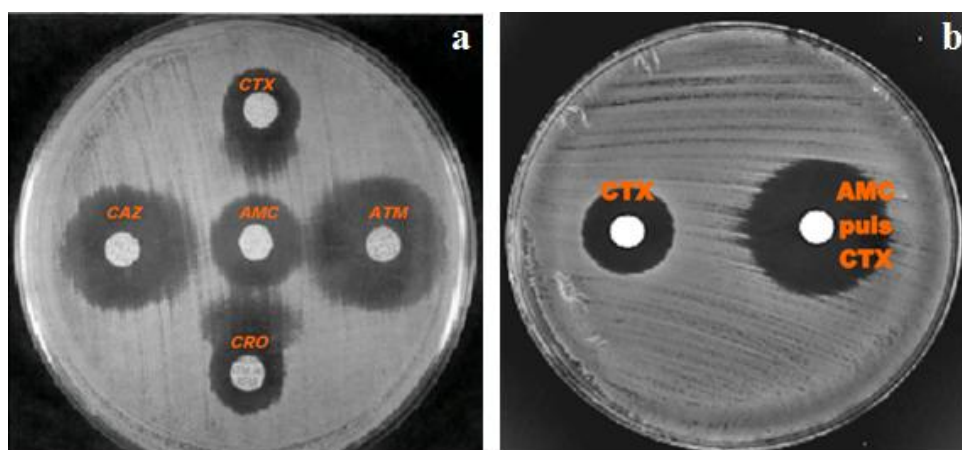
#### ❖ Détections des $\beta$ -lactamases

Différents approches ont été développées pour accroître la détection en routine des souches productrices de  $\beta$ -lactamases et qui peuvent être classées en deux catégories :

##### a. Les techniques phénotypiques

Comme l'antibiogramme ou l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé, la plupart des tests de dépistage des  $\beta$ -lactamases sont basés sur l'observation d'une image caractéristique et/ou la mesure du diamètres des zones d'inhibition résultants de la diffusion de l'antibiotique à partir des disques déposer à la surface du milieu gélosé préalablement ensemencé par une suspension bactérienne standardisée (0.5Mc Farland) après 24 heures d'incubation. En effet, pour les bacilles à Gram<sup>-</sup> détectés résistants aux C3G, le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (82) propose de faire utilisés des tests complémentaires à l'antibiogramme standard dont :

- Le test de synergie (83) est le test le plus utilisé dans les laboratoires de Bactériologie pour la détection de BLSE. Le test est basé sur la mise en évidence d'une image de synergie (8, 9, 82, 83, 84) ou en bouchon de champagne (2, 37) entre un disque de C3G et/ou d'ATM et un disque contenant l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases déposer à une distance de 30 ou 20mm après 24 heures d'incubation à 37<sup>0</sup>C (Figure 9a) (82).
- Le test du double disque (82, 84) est utilisé pour la confirmation de la production de BLSE. Le test est positif quand le diamètre de la zone d'inhibition autour d'un disque de C3G associés à l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases est supérieur ou égal à 5mm par rapport à ceux obtenus autours du disque de C3G seul (Figure 9b) (82).

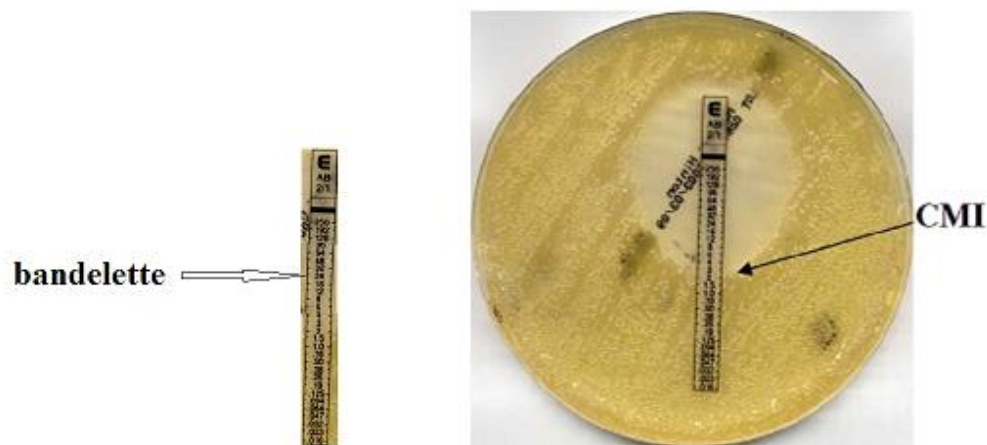


**Figure 9.** Souche de *K. pneumoniae* productrice de BLSE (82), AMC : la combinaison amoxicilline/clavulanate, CAZ : céftazidime, CTX : céfotaxime, ATM : aztreonam, CRO : ceftriaxone

- Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test) est aussi un test de confirmation (5, 85). Le test est basé sur la diffusion de l'antibiotique contenu dans une bandelette, imprégnée d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester, déposé sur la surface du milieu gélosé préalablement ensemencé d'un inoculum standardisé. Après incubation, l'inhibition de la croissance



bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (Figure 10) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.



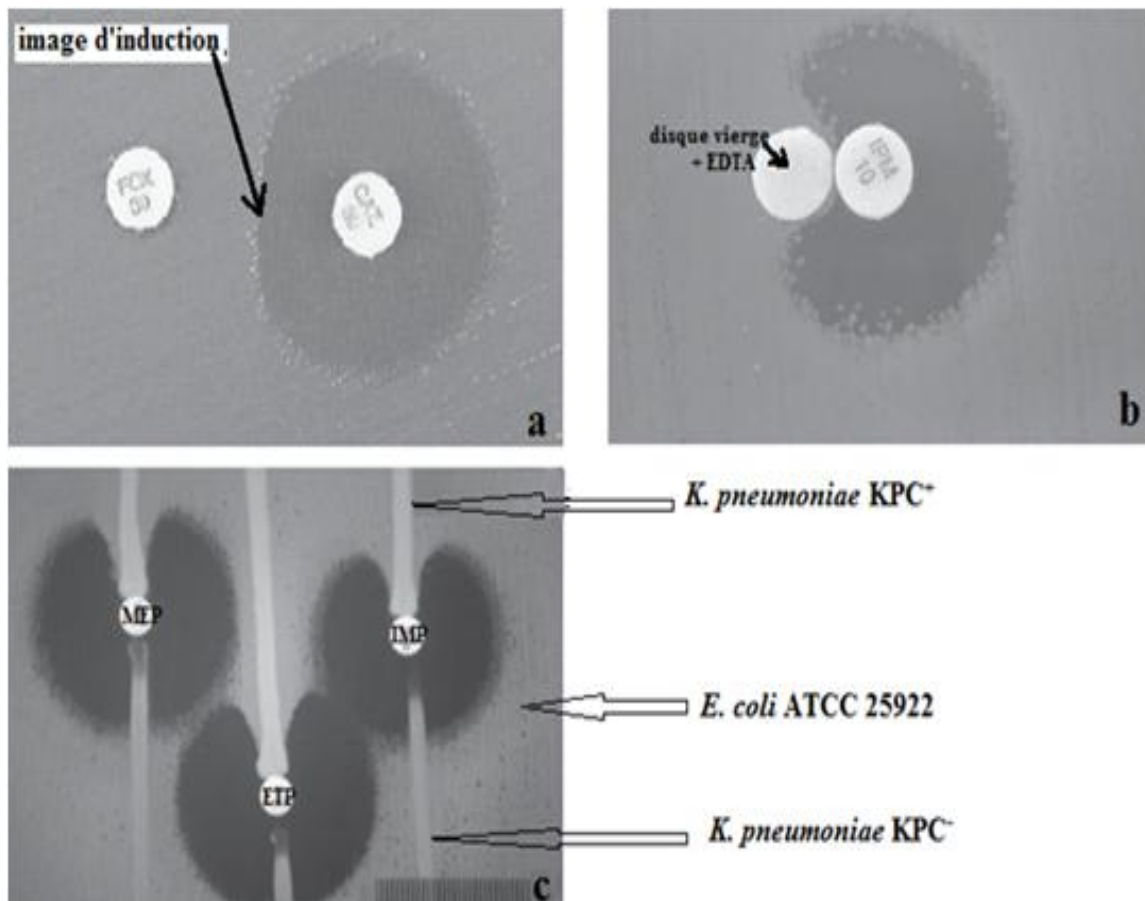
**Figure 10.** Mesure de la CMI par la méthode d'E-test.

- Le screening test est une nouvelle technique de détection de BLSE en milieu gélosé. Le test est basé sur l'inoculation de la suspension bactérienne standardisée de 0.5Mc Farland à la surface du milieu gélosé spécifique (ESBL Screening agar) dont la production se traduit par le virage de la couleur du milieu du pourpre en bleu (86).

D'autres techniques ont été aussi décrites dans de nombreux travaux pour la détection de  $\beta$ -lactamases non BLSE, mais leurs utilisations est restreints au niveau des laboratoires d'analyse comme :

- Le test d'induction ou le test de la céfoxitine (FOX) est proposé pour la détection phénotypique de la céphalosporinases de type AmpC chez *Citrobacter freundii*. L'enzyme est suspecté lorsque la souche est apparue résistante à la FOX avec l'observation d'une image d'induction entre la CAZ et le FOX déposés à la surface du gélosé inoculé (Figure 11a) (60).
- Les tests de synergie (60) et du disque combiné IPM/EDTA (1, 3, 75) visent à détecter la production par les bactéries de carbapénémases de classe B d'Ambler dans un milieu gélosé. Ces test mettent à profit la faculté de l'EDTA à chélater les ions de  $Zn^{2+}$  indispensables à l'activité de ces enzymes restaurant ainsi l'activité de l'IMP (5, 64, 66, 75). Ils sont basés sur la mise en évidence d'une image de synergie entre le disque d'IMP et le disque vierge imbibé par l'EDTA (Figure 11b) (60) ou d'une restauration de l'activité de l'imipénème en présence de l'EDTA (diamètre est supérieur à 17mm) (1, 3, 64, 75) respectivement.
- Le Modified Hodge Test (61) est mise en œuvre pour dépister la résistance des entérobactéries à l'IMP par production de carbapénémases de la classe A d'Ambler. Le test

est positif lors de l'observation d'une croissance normale de la souche suspectée productrice d'enzyme comparativement à une souche non productrice étalée, en strie à partir du disque de l'imipénème (IMP, 10 $\mu$ g), d'ertapénème (ETP, 10 $\mu$ g) et de meropenème (MEP, 10 $\mu$ g), à la surface du milieu gélosé (Mueller-Hinton) préalablement inoculé par une suspension d'une souche sauvage d'*E. coli* ATCC 25922 (Figure 11c) (61).



**Figure 11.** Détection phénotypique de la céphalosporinases de type AmpC chez *Citrobacter freundii* (a) (60), de la production de carbapénémase de la classe B et A d'Amblar chez *K. pneumoniae* par le test de synergie IMP/EDTA (b) (60) et Modified Hodge Test (c) (61) respectivement.

## b. Les techniques moléculaires

En général, les méthodes phénotypiques sont des méthodes de suspicions qui permettent de manière présomptive d'identifier la présence de  $\beta$ -lactamases. Pour connaître le type de l'enzyme que produisent les souches cliniques, il faut avoir recours aux méthodes génotypiques (ou moléculaires) qui sont assez complexes et laborieuses.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est la technique de la biologie moléculaire la plus utilisée dans les laboratoires qui peut être applicable directement sur les produits pathologiques, mais, elle n'est pas facilement réalisables en routine surtout dans les pays en développement. La méthode a mis en évidence le gène qui code pour l'enzyme (5, 9, 22, 57, 84, 86), l'existence de

structures génétiques mobiles qui jouent un rôle très important dans la dissémination de la résistance : les plasmides (9, 87), les intégrons (87) et les transposons en utilisant des amorces spécifiques (de référence). Elle permet également de caractériser et d'analyser pour la présence des facteurs de virulence ou encore dite de pathogénicité correspondant à différents gènes sur l'ADN (3, 15, 16).

### ***1.2.1.2. Résistance non enzymatique***

#### **a. Modification des cibles d'action (PLP)**

Plusieurs facteurs peuvent concourir à la résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines par modification de la cible d'action :

- Soit par perte de l'affinité des PLP pour les  $\beta$ -lactamines due à des mutations touchant leur structure primaire (les mutations touchant la PLP2 et la PLP3 d'*E. coli* s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines et l'imipénème) (88), ou par l'acquisition de gènes ou de fragments de gènes codant pour de nouvelle PLP d'affinité diminuée. Ce dernier mécanisme est constaté chez la plupart des bactéries à Gram<sup>+</sup> tel que le *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) via l'acquisition du gène *mecA* codant pour la synthèse d'une PLP appelée PLP2a présentant peu d'affinité pour la majorité des  $\beta$ -lactamines (25, 89, 90, 91) et chez *P. aeruginosa*, mais en association avec d'autres mécanismes de résistances, systèmes d'efflux (88, 92).
- Soit par hyperproduction ou diminution de la quantité des PLP normal (la résistance de *P. mirabilis* à l'imipénème est due à la diminution de la quantité de PLP1A).

De façon générale, ces PLP modifiées ne sont pas par conséquence inhibées même en présence de fortes concentrations d'antibiotiques et sont capables de remplir les fonctions des PLP lorsque ces dernières sont inactivées (25).

#### **b. Imperméabilité membranaire**

Les porines ou les Outer membrane proteins (Omps), localisées au niveau de la membrane externe des bactéries à Gram<sup>-</sup>, jouent un rôle important dans les échanges par diffusion passive des substances dont les antibiotiques entre le périplasme et le milieu extérieur de la bactérie. Chez certaines bactéries à Gram<sup>-</sup>, la perte ou la diminution de l'expression de porines OmpF et OmpC (*E. coli*) (62, 92), d'OmpK35 et OmpK36 (*K. pneumoniae*) (61, 62, 92), d'OmpF et OmpD (*E. cloacae*) (62) et d'Opr D2 chez *P. aeruginosa* (66, 88, 93, 94) contribue également à

la résistance des souches à l'imipénème. Afin de limiter l'accumulation de quelque  $\beta$ -lactamines dans le l'espace périplasmique (95), la surexpression des systèmes d'efflux (pompes insérés dans la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram<sup>-</sup>) tels que les systèmes AcrAB et MexAB de la famille RND (Resistance Nodulation Division) souvent associés aux protéines accessoires (TolC) chez *E. coli* (96) et aux porines (OprM) chez *P. aeruginosa* (88, 96, 97) respectivement, explique la résistance croisée et à bas niveau (intrinsèque) de ces bactéries aux pénicillines, aux céphalosporines, aux aminosides et aux fluoroquinolones (96, 97).

#### **c. Séquestration de l'antibiotique et protection de la cible**

La séquestration de l'antibiotique est l'une des stratégies évoquée par les bactéries pour tenter d'expliquer la résistance aux C3G chez les mutants de certains bacilles à Gram<sup>-</sup> (*K. pneumoniae*) surproduisant une céphalosporinase de type AmpC, en raison de la relative stabilité de ces molécules vis-à-vis de l'enzyme (7, 50, 70, 71). L'antibiotique sera donc neutralisé dans des complexes stables avec l'enzyme en excès et ne sera plus en concentration suffisante pour saturer les PLP.

#### **d. Autres mécanismes de résistance (Altération du LPS)**

La modification de la composition du lipopolysaccharide (LPS), constituant majeur de la membrane externe des bacilles à Gram<sup>-</sup>, dont le polysaccharide semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique de *P. aeruginosa* à  $\beta$ -lactamines (98).

### **I.2.2. Résistances aux antibiotiques non $\beta$ -lactamines**

Les mécanismes de résistance biochimiques principalement invoqués par les bactéries peuvent être regroupés en quatre grands types : la modification de la cible de l'antibiotique, la production d'enzymes inactivant, l'efflux, et la séquestration de l'antibiotique. Les principaux mécanismes de résistance pour quelques familles d'antibiotiques non  $\beta$ -lactamines sont recensées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 5.** Principaux mécanismes de résistances aux antibiotiques non  $\beta$ -lactamases.

Antibiotiques	Mécanismes de résistance
<b>Inactivations enzymatiques</b>	
<b>Les aminosides</b>	Production constitutive d'enzymes modificatrices de la fonction hydroxyles de l'agent antibactérien (phospho-transférases, nucléotidyl-transférases) ou amines (acétyl-transférases) (17).
<b>Les macrolides</b>	L'acquisition d'enzymes (estérases, phospho-transférases) codées par des gènes ( <i>ere</i> , <i>mph</i> ) peuvent concourir à la résistance à l'erythromycine chez <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> ou par production de méthylases codés par les gènes <i>tn1545</i> , <i>tn917</i> , etc. (19, 100)
<b>La rifampicine</b>	Acquisition de l'ADP-ribosyl-transférase (Arr2) par les bacilles à Gram <sup>-</sup> (27).
<b>La fosfomycine</b>	Cible des métallo-glutathion transférases (FosA, FosB ou FosX), observées chez les souches de <i>P. aeruginosa</i> (99)
<b>Les tétracyclines</b>	Substrat de NADH-oxdoréductase dénommée Tet(X) identifiée chez une souche de <i>Bacteroides sp</i> (12, 17, 19, 20).
<b>Les phénicols, l'acide fusidique</b>	Acquisition d'un gène <i>cat</i> codant pour le chloramphénicol acétyl-transférases de type A ou B dont le support génétique est chromosomique, plasmidique ou des transposons.
<b>Imperméabilités et excréctions des antibiotiques</b>	
<b>Les aminosides</b>	Hyperproduction de la porine OprH chez les souches mutants de <i>P. aeruginosa</i> ou excréction par le système d'efflux de type Resistance Nodulation Division (RND) : le système AcrD chez <i>E. coli</i> et les systèmes MexXY-OprM et AdeABC chez les souches de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>A. baumannii</i> respectivement (99).
<b>Les macrolides</b>	Systèmes d'efflux due à deux classes de pompes : familles des ATP-binding cassette transporteur (ABC) et Major Facilitateur Superfamily (MFS).
<b>Les quinolones</b>	Diminution quantitative de la porine OmpF ou par surexpression du système d'efflux: AcrA-AcrB-Tolc d' <i>E. coli</i> , MexA-MexB-OprM et MexC-MexD-OprJ de <i>P.aeruginosa</i> (96, 97).
<b>Les tétracyclines</b>	Les gènes <i>tet</i> code pour des protéines membranaire (PM~46Kd) qui permettent l'efflux de l'antibiotique hors de la cellule (Gram <sup>-</sup> ) empêchant ainsi son accumulation intracellulaire et sa fixation au cible (ribosome) (17)
<b>Les phénicols</b>	Systèmes d'efflux due à deux types de transporteur transmembranaire : transporteur drogues-spécifiques codé par les gènes <i>cml</i> ( <i>P. aeruginosa</i> ) et <i>flo</i> ( <i>E. coli</i> ), ou transporteur multi-drogues (pompes de type RND), identifiés surtout chez <i>E. coli</i> (AcrA-AcrB-Tolc), chez <i>P. aeruginosa</i> (MexA-MexB-OprM et MexC-MexD-OprJ) et chez d'autre bacilles à Gram <sup>-</sup> (99).
<b>Modification des cibles d'action</b>	
<b>Les aminosides</b>	Mutation dans l'ARN16S (17).
	La méthylation enzymatique de certains résidus adénine (A <sub>2058</sub> chez <i>E. coli</i> ) de l'ARNr 23S, décrites initialement chez <i>Helicobacter pylori</i> et les Mycobactéries.

<b>Les macrolides</b>	
<b>Polymyxine B et la colistine</b>	Surproduction d'enzymes capables de greffer des résidus 4-amino-4-désoxy-L-arabinose ou 2-amino-éthyl sur les groupements phosphates des lipopolysaccharides (17, 25).
<b>Les quinolones</b>	Mutation ponctuelles dans les gènes de structure de l'une et/ou l'autre des deux cibles d'action que sont l'ADN gyrase ( <i>gyr A</i> où la mutation à lieu au niveau du Ser <sub>83</sub> ou Asp <sub>87</sub> ) et la topoisomérase IV ( <i>par C</i> ou <i>par E</i> ) (22, 101).
<b>Les glycopeptides (vancomycine)</b>	La transformation de la séquence D-alanyl-D-alanine dans le précurseur de la muréine, l'UDP-N-acétyl-muramique acide-pentapeptide, en D-alanyl-D-lactate ou D-alanyl-D-sérine sous l'effet de diverses enzymes de type Van.
<b>Les tétracyclines et les macrolides</b>	Altération des ARN ribosomiaux (ARN16S) pour <i>Helicobacter pylori</i> (20).
<b>Sulfamides/ triméthoprime</b>	Modification qualitative et/ou quantitative (hyperproduction) de la dihydrofolate réductase (DHFR), retrouvés surtout chez les staphylocoques, les entérobactéries et <i>Haemophilus influenzae</i> (17).
<b>Linézolide</b>	Mutations dans l'ARN 23S, retrouvés surtout chez les souches d' <i>Enterococcus faecium</i> , de <i>S. aureus</i> et chez <i>S. pneumoniae</i> (12, 19).
<b>Séquestration de l'antibiotique et protection de la cible</b>	
<b>Les glycopeptides (vancomycine)</b>	Augmentation de l'épaisseur de la paroi, une accumulation de précurseurs pariétaux, l'inactivation de la PLP4 et une diminution de la réticulation de la muréine ont été observées surtout chez les souches de <i>S. aureus</i> de sensibilité diminuée aux glycopeptides.
<b>Les tétracyclines</b>	Les protéines Tet (M) et Tet (O) sont capables de déloger du site A ribosomal (Amino-acyl-ARNt) et de permettre à la synthèse protéique de se dérouler normale.
<b>Les quinolones</b>	Les protéines (QnrA, QnrA2, QnrB, QnrS), se fixeraient sur les deux sous-unités GyrA et GyrB au moment de la formation du complexe enzyme-ADN en augmentant l'instabilité de ce dernier (101).

## II. Aromathérapie

Depuis longtemps, la phytothérapie des infections d'origine microbienne notamment la gingivite, les lésions superficielles purulentes et les infections urinaires a pris sa part que ce soit dans la médecine traditionnelle ou la recherche scientifique dont *N. sativa* est l'une des plantes médicinales traditionnellement utilisées et scientifiquement évaluées pour leurs activités antimicrobiennes (102). En revanche, la découverte des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire. En tenant compte que dès le début de l'ère de l'antibiothérapie, la résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue l'un des problèmes les plus importants de la thérapeutique anti-infectieuse dans le monde et dans l'industrie pharmaceutique. De ce fait, de nombreuses alternatives aux antibiotiques sont donc proposées parmi lesquelles, les métabolites secondaires des plantes médicinales tels que les alcaloïdes, les polyphénols et les huiles essentielles. Ces derniers ont un potentiel antimicrobien puissant favorisant donc leurs utilisations dans les systèmes de soins primaires, une voie de retour à la phytomédecine.

### II.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, les essences ou encore dite les huiles volatiles, sont des produits de composition chimique généralement assez complexe et qui est plus ou moins modifiée au cours de la préparation (103). En général, elles sont synthétisées et stockées avec des concentrations faibles de l'ordre de 0,1 à 2% au niveau des structures histologiques spécialisées tel que les poches sécréteurs des *Myrtaceae*, les poils sécréteurs ou les trichomes glandulaires des *Lamiaceae*, etc. (103).

#### II.1.1. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles produits du métabolisme secondaire des plantes se composent généralement de :

- a. Groupe des composés volatils, les terpènes ou encore dit les terpénoïdes (103), synthétisés via le précurseur isopentenyl pyrophosphate (IPP) déjà, reconnue par Wallash dès 1887 sous le nom d'unités isopréniques ( $C_5H_8$ ). Ce sont des mélanges complexes de mono et de sesquiterpènes, composés hydrocarbonés acycliques, monocycliques, ou bicycliques résultants du couplage tête à queue d'un nombre entier d'unités isopréniques, et de composés dérivés d'eux tels que les alcools, les cétones, les aldéhydes, etc. (annexes 3 et 4) (104) représentant

plus de 90 % de l'huile essentielle et qui sont responsables des propriétés, de la saveur et de l'arôme caractéristiques que possède la plante (103).

- b. Groupe de composés aromatiques, dérivés du phénylpropanes ( $C_6-C_3$ ), beaucoup moins fréquent que le précédent. Ce sont le plus souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes (l'anéthol, l'anis-aldéhyde et l'eugénol) caractéristiques de certaines huiles essentielles. Ces derniers peuvent renfermés d'autres composés tels que la vanilline (composés en  $C_6-C_1$ ) et les lactones (dérivés de l'acide cinnamique) (103).
- c. Groupe de composés d'origine divers résultants de la transformation des molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits (103).

La composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, varie de façon appréciable avec l'existence de races chimique (103, 105), le milieu et la période de la végétation (facteurs pédoclimatiques) (102, 103, 105), et l'âge et la partie de la plante utilisée (103, 106). D'autres facteurs tels que les traitements survenus avant ou pendant l'extraction (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) et les conditions de conservation contribuent également à la variation observée dans la proportion des différents constituants d'une huile essentielle (102, 103, 105, 106).

### **II.1.2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles peuvent être obtenues par différents procédés parmi lesquels on distingue :

- L'hydrodistillation ou l'extraction par entraînement à la vapeur est la méthode la plus simple, la plus ancien et la plus employée pour l'extraction des huiles essentielles. Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les huiles essentielles s'évaporent alors avec les vapeurs dégagées, se condensent puis s'écoulent à l'état liquide sous forme d'une émulsion en traversant une surface froide, le réfrigèrent, et se séparent par la suite de l'eau par différence de densité (103).
- L'hydrodistillation par micro-ondes est une technique d'extraction relativement récente, rapide et permet d'obtenir un rendement en huiles essentielles le plus souvent supérieur à celui obtenu par hydrodistillation (107, 108). Dans ce procédé, le matériel végétal placé dans une enceinte clos est chauffé sélectivement à une température de 60 à 80 °C pendant 2min par un rayonnement micro-ondes. L'huile essentielle est entraîné avec les vapeurs d'eau propre à



la plante se condense sur un système de refroidissement à l'extérieur puis se sépare du distillat par une simple décantation (103, 107, 108).

- L'extraction supercritique est une technique aussi récente qui occupe une place notable dans les procédés d'extraction des huiles essentielles après l'hydrodistillation. Il s'agit d'une extraction à froid des matières végétales utilisant le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) sous une pression de 8 à 10 méga-pascal et à une température comprise entre 40 et 50<sup>0</sup>C (109). Dans ces conditions, le CO<sub>2</sub> se trouve à l'état supercritique et possède un bon pouvoir dissolvant ce qui permet d'obtenir un extrait dont les caractéristiques sont proches du produit naturel d'origine sans trace de solvant (103, 109).

En plus, l'extraction à l'aide du solvant organique et l'extraction par pression à froid (cas des agrumes) (103) peuvent être aussi utilisées.

De façon générale, les huiles essentielles obtenues sont des liquides pas ou peu colorés, communément moins dense de l'eau, solubles dans les solvants organiques, volatiles à température ambiante, altérables et très sensibles à l'oxydation (103).

Pour caractériser ces essences et établir leur composition, diverses méthodes d'analyse qualitative et quantitative sont utilisées parmi lesquelles: la chromatographie sur couche mince (CCM) (110), la chromatographie en phase gazeuse (CPG) seule ou couplée à la spectrométrie de masse (SM), etc. Cette dernière est la méthode de référence récemment utilisée pour l'analyse des huiles essentielles, car elle permet une caractérisation fine de ce mélange complexe très souvent constitué de dizaines de substances ayant des structures et des fonctions chimiques très diverses sur la base des indices de rétention (IR) ou de Kováts (IK) des différents composés en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données (102, 103, 106, 107, 108, 109).

### **II.1.3. Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles**

Les huiles essentielles des plantes aromatiques dont les composés terpéniques tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol occupent une place importante dans les industries agro-alimentaire (conservation et aromatisation des aliments), en cosmétique (parfums, savon et shampoings,...), en pharmacie et en aromathérapie (103, 111, 113). Au regard de leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues principalement pour leurs propriétés antimicrobiennes, il est nécessaire de diluer ces huiles (dans les huiles végétales, le miel,...) pour les utiliser en thérapeutique.

Récemment, Govaris *et al.* (114) ont montré que les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. riche en carvacrol (80.05%) et d'*Oreganum vulgare* riches en thymol (44.30%) inhibent fortement la croissance des bactéries (*L. monocytogenes* et *E. coli* O157:H7) responsable de la contamination de la viande conservée dans le réfrigérateur. En plus, les huiles essentielles de sept variétés d'*Ocimum taxa* ont été testées par la méthode des disques contre 8 bactéries contaminants les aliments (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *P. vulgaris*, *S. aureus* et *S. epidermis*). Il ressort que la souche d'*E. coli* O157:H7 est la plus sensible à l'essence d'*Ocimum basilicum* qui a comme constituants majeurs le linalool (66.40%) et que les huiles essentielles d'*Ocimum americanum* et d'*Ocimum citriodorum* riches en géraniol, 28.58% et 31.21% respectivement, sont les plus efficaces sur les autres bactéries, à l'exception des souches de *Listeria sp.* (115, 116). Par ailleurs, il a été démontré que les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir des feuilles de 29 plantes médicinales d'origine Brésilien exercent une excellente activité antibactérienne vis-à-vis de 13 souches entéropathogènes d'*E. coli* de sérotypes différents (isolées des patients ayant des diarrhées aiguës et hémorragiques) (117). D'autre part, il a été établi que l'huile essentielle extraite des graines de *Nigella sativa*, récoltés en Tunisie, riche en p-Cymène (60.5%) possède également un pouvoir antibactérien supérieur à celui du chloramphénicol sur les souches de *S. aureus* (ATCC 25923) et d'*E. coli* (ATCC 25922) (102). Cependant, L'effet antibactérien vis-à-vis de *Clostridium perfringens* ATCC 3624 (type A), bactéries à Gram<sup>+</sup> anaérobies stricts, a été attribué à l'huile essentielle de *Satureja montana* L. (118). En outre, l'eugénol, constituant majeur de l'essence d'*Eugenia aromatica*, testé à l'état pure avec des concentrations croissantes de 1% à 10% (v/v) contre les souches de *S. typhimerium* provoque l'inhibition transitoire du développement de l'agent infectieuse (effet bactériostatique) après 60 min d'exposition à 37<sup>0</sup>C et à pH alcalin (119). Enfin, les huiles essentielles de *Thymus maroccanus* riches en carvacrol (89.15%) et de *Thymus broussonetii* riches en thymol (39.64%) ont montré des effets inhibiteurs notables sur la croissance ou le développement des champignons (*dermatophytes*) et des levures (*Candida albicans*) responsables des mycoses chez l'être humain et agissent en synergie avec certain agents synthétiques comme l'amphotéricin B et le fluconazol (120).

De façon général, il semblerait que ces effets seraient liés d'une part à l'hydrophobicité des essences testées qui s'accumulent souvent dans la bicouche lipidique des membranes cytoplasmiques et provoque des dégâts graves et irréversibles au niveau de la paroi des microorganismes (102, 106, 113, 118, 119, 121, 122) entraînant la perte des constituants cellulaires telles que les ions de potassium (K<sup>+</sup>), les protons (H<sup>+</sup>) et l'ATP, prémices ainsi la mort cellulaire (apoptose) (118, 123, 124). La présence des composés terpéniques dont les alcools

(114, 119, 120, 125) et les cétones (102) dans ces huiles seraient probablement responsables de ces activités. En outre, l'inactivation des enzymes (altération de leur structure) impliquées dans la production de l'énergie et la synthèse des composants de structure de la cellule bactérienne (105, 126), la destruction du matériel génétique (119, 121, 123, 127, 128, 129) et la diminution de la virulence des bactéries par inhibition de la production des toxines (119, 120, 130) constituent des modes d'action secondaires de ces activités.

#### **II.1.4. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles**

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles peut être mise en évidence par plusieurs techniques, parmi lesquelles:

- la méthode de Vincent (la méthode de diffusion en milieu gélosé ou l'aromatogramme) qui est la méthode de référence la plus employée (105, 111, 121, 123, 125, 127, 131). La méthode est basée sur la diffusion uniforme de l'huile au sein de la géloseensemencée. Dans cette méthode, des disques de papier filtre (6 mm de diamètre) imprégnés d'un volume donné d'huile essentielle généralement dilué dans le DMSO (diméthyl sulfoxyde), dans le Tween 80 ou dans l'éthanol sont déposés à la surface de la géloseensemencée. Après incubation, la zone d'inhibition est démarquée et la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition.

Une variante de cette technique consiste à réaliser des puits de 8mm de diamètre à l'emporte pièce, dans la gélose coulée en boîte qui seront ensuite remplis d'un volume donné d'huile essentielles (132, 133). Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition de la même manière que précédemment.

- La méthode de micro-atmosphère repose sur l'évaluation qualitative (détermination du diamètre des zones d'inhibition) et/ou quantitative (détermination de la quantité minimale inhibitrice) de l'activité antimicrobienne de la fraction volatile des huiles essentielles (128, 129, 134, 135). Le protocole est techniquement proche de celle de l'aromatogramme, la différence réside principalement dans la position et le diamètre du disque imprégné (généralement de 80mm). Dans cette technique, le disque imprégné par une quantité déterminée d'huile essentielle sera déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'incubation. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu géloséensemencé.
- La méthode de Marzuella (136) est basée sur le contact direct de l'agent antimicrobien avec le germe tests dans un milieu liquide. Récemment, la méthode est appelée la méthode de

macrodilution (137) ou de microdilution (102, 105, 126, 138, 139) selon le volume réactionnel.

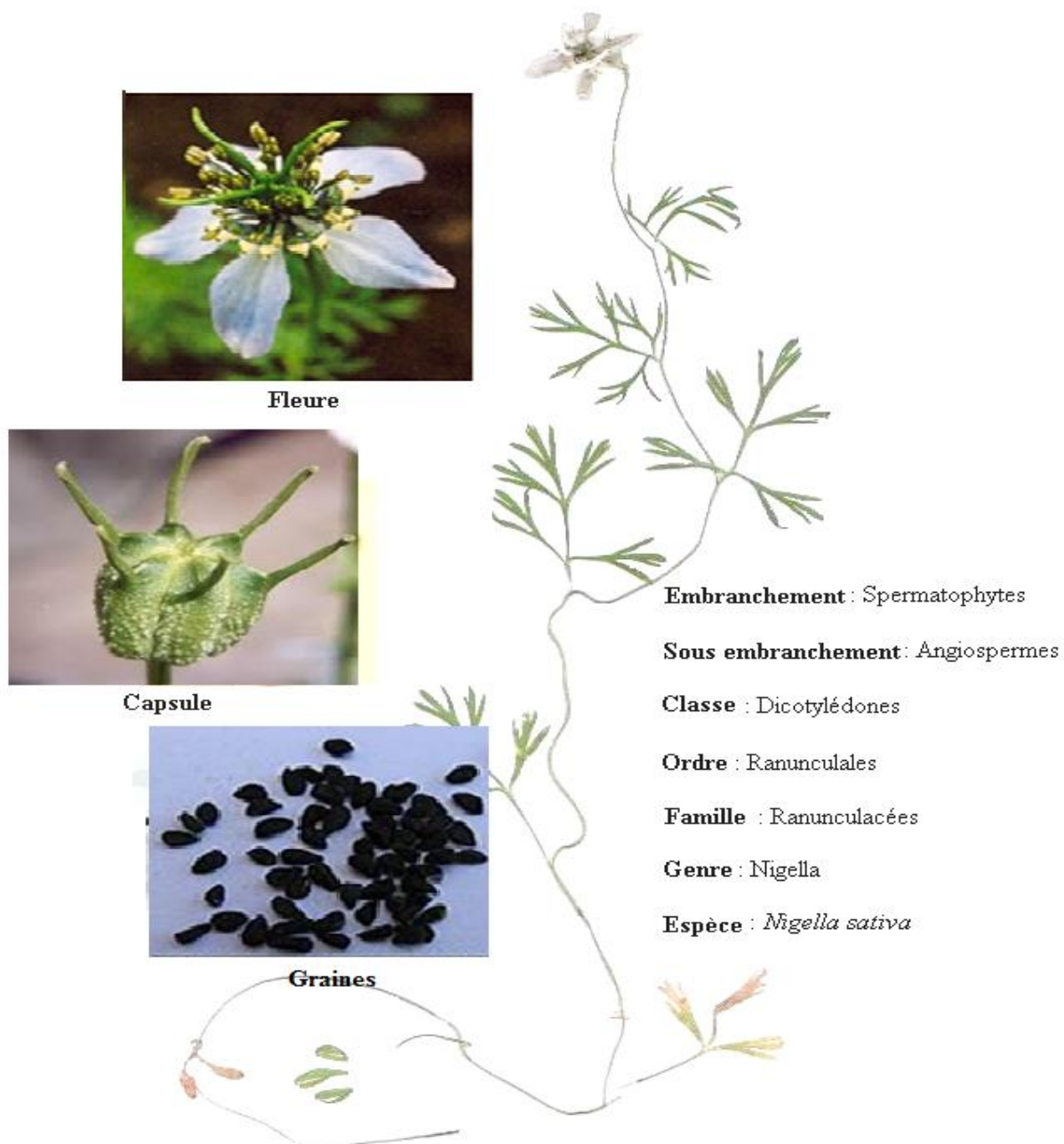
En plus, les méthodes de Sarbach (140) et de Morel et Rochaix (Méthode de dilution en milieu gélosé) (141, 142, 143) peuvent être aussi utilisées.

## **II.2. La nigelle cultivée "*Nigella sativa* L."**

*Nigella sativa*, *Cuminum nigrum* ou encore appelé la *nigelle cultivée*, du nom latin « *Nigellus* » qui signifie noir reflet de la couleur de ses graines (144), est une plante aromatique, d'un grand intérêt thérapeutique et appartenant à la famille des *Ranunculaceae* (145, 146, 147) (Figure 12). Elle est communément connue sous le nom de "*Cumin noir*" en Français, "*black seed* ou *black caraway*" en Anglais, "*Habbat el baraka* ou encore *El habbat sauda* dans les pays arabes, "*El-sinouj*" en Algérie (146), etc. La plante est originaire du Moyen Orient, de l'Europe centrale et de l'Ouest de l'Asie (145, 146). Elle est maintenant cultivée pour ses graines à des fins culinaires et médicinales dans plusieurs régions du monde, dans presque toute l'Asie, le bassin méditerranéen, en Afrique du Nord et en Inde (148, 149).

### **II.2.1. Aspect botanique de *N. sativa* L.**

*N. sativa* est une plante annuelle qui développe sur les terres semi aride et dans les régions côtières de l'Afrique du nord (150). La nigelle est une plante herbacée (Figure 12) à tige dressée de 30 à 60cm de haut, côtelée, rameuse portant des feuilles petites et pétiolées (les feuilles inférieures) et longues et sessiles (feuilles supérieures) (146). Les fleurs sont hermaphrodites, à reproduction autonome et elles sont caractérisées par la présence des onglets nectarifères. Les pétales au nombre de 5 à 10 par fleurs sont petits de 3.5 à 4.5cm de diamètre (144), de couleur blanche mêlées de bleu et présentent une tache verte au sommet (145). Les sépales sont pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (144). Le fruit est une capsule au nombre de 3 à 7 par plante, largement ovoïde et couverte de tubercules granuleux. Il est formé de 3 à 6 carpelles soudées entre elles jusqu'à la base des styles persistants (147) et renferment des graines triangulaires de 2 à 3.5mm de long et ridées transversalement, blanchâtres et à maturité, elle s'ouvre et les graines exposées à l'air deviennent noires (144, 145, 147).



**Figure 12.** Classification (145) et l'aspect morphologique de *N. sativa*.

### II.2.2. Aspects phytochimiques

Les graines de *Nigella sativa* de différentes origines ont été analysées et caractérisées en termes de différents principes actifs qu'elles contiennent. Ces études ont montré la présence d'une diversité de substances naturelles dont la majorité sont dotés de nombreux propriétés pharmacologiques bénéfiques pour l'être humain (102, 146, 149, 151, 152, 153). Les teneurs en principes actifs ainsi que les constituants majoritaires fournis varient selon les conditions géographiques et climatiques, la variété et l'origine des échantillons, les méthodes de

conservation et d'études (extraction et détection) peuvent en être partiellement responsables (102, 154). Les graines de *Nigella sativa* contiennent 37,9%-39,2% d'huiles fixes et environ 0,18 à 0,5% d'huiles essentielles (102, 107, 110, 155). Ce dernier présente un polymorphisme dont les plus abondants sont les dérivés de monoterpènes tels que le thymoquinone, le carvacrol, le thymol et le thymohydroquinone (dimérisation de la thymoquinone) Au même, le sesquiterpène (longifolène) et la nigellone (polymérisation de la thymoquinone) ont été aussi détecté (156). Outre les composés lipidiques, les graines de la nigelle comprennent des carbohydrates, des protéines, des enzymes dont la lipase, des vitamines, de sels minéraux, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des saponines et plusieurs d'autres (144, 153, 156, 157, 158).

### II.2.3. Usages et propriétés pharmacologiques

Par leur nature aromatique, les graines de *N. sativa* sont très utilisées comme épices de cuisson, en boulangerie et récemment en industrie pharmaceutique (préparations de sirops ou pommade) et cosmétiques (148, 154, 158, 159). Ces graines sont largement utilisées en médecine traditionnelle depuis des siècles, à travers le monde, contre une multitude de maux. Notre prophète Mohammed (que la prière et le salut d'Allah soient sur lui ﷺ) nous a en effet enseigné depuis plus de quatorze siècles que la graine de nigelle était un remède contre tous les maux et a dit: " Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ". Elle peut être employée seul ou en combinaison avec d'autre produits dont le miel ou l'huile d'olive (149, 159). La macération des graines dans l'huile d'olive a été utilisée sous forme de gouttes auriculaires et nasales respectivement (trois gouttes) pour traiter les affections douloureuses de l'oreille et la grippe qui s'accompagnent d'éternuements en salves, pour le traitement des maladies de la peau (l'eczéma). En outre, les graines grillées et réduites en poudre sont mises dans une bourse en tissu; qu'on fait inhaler quotidiennement pour désobstruer les voies nasales. Cette même préparation, prise avec de l'eau bouillie, possède des actions antitussives, antiasthmatiques (149), fébrifuges, hypotensives, hypoglycémiantes, diurétiques, dissolvantes des calculs rénaux, carminatifs, emménagogues, cholagogues et vermifuges (144). Par la même, ces graines elles peuvent être utilisée en cataplasme avec du vinaigre comme anti-inflammatoire dans le rhumatisme et résolutive dans les pustules et la gale sur infectée.

Au cours de ces dernières décennies, les graines de *Nigella sativa* ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et pharmacologiques qui ont établi leur grande capacité thérapeutique en tant que source de substances douées d'activités biologiques très diversifiées dont l'activité anti-microbienne semble la plus importante. En effet, des études ont montré que les huiles

essentielles (même diluée à 1%) et leurs constituants (la thymohydroquinone) exercent une activité antibactérienne importante sur des bactéries à Gram<sup>+</sup> que sur des bactéries à Gram<sup>-</sup> (160). Par ailleurs, il a été établi que les huiles essentielles de *Nigella sativa* associées à différents antibiotiques (gentamicine, streptomycine, ampicilline et érythromycine) ont des effets synergiques et additionnels et sont dépourvues de tout effet antagoniste (161). Récemment, Bourgou *et al.* (102) ont montré que l'huile essentielle extraite des graines de *N. sativa* récoltées en Tunisie possède également un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de chloramphénicol vis-à-vis de *S. aureus* (ATCC 25923) et d'*E. coli* (ATCC 25922). Cette activité est attribuée selon ces auteurs au longifolène et au thymoquinone présent dans cette huile et peut être due à une perturbation de la structure membranaire des microorganismes. D'autre part, il a été démontré que les graines de *N. sativa* et l'extrait huileux ont développés une activité inhibitrice importante vis à vis de 5 souches de *listeria monocytogenes* impliquées dans l'altération des aliments avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ordre de 0,5% (p/v) et 1,5% (v/v) respectivement (162). De plus, l'huile fixe de la nigelle possède également une excellente activité antifongique notamment sur *Aspergillus niger* (163) et un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes*. Cette activité semble due aux huiles essentielles qu'elle contient (151).

D'autre part, il a été démontré que l'extrait méthanolique de *N. sativa*, à une concentration de 1000µg/disque, s'est avéré hyper actif sur *S. aureus* ATCC 25923 (d=25mm) et *Bacillus cereus* ATCC11778 (21mm) avec une activité modérée sur *K. pneumoniae* ATCC 19615 (productrices de β-lactamases) et dépourvu de toute activité envers *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 (164). Ainsi que l'étude de Mohadjir *et al.* (165) a montré que l'extrait méthanolique possède un effet inhibiteur sur la croissance d'un grand nombre de bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> mais sans aucun effet sur les deux souches de champignons testés (*Candida albicans* et *Trichophyton mentagrophytes*). En revanche, l'étude menée par Morsi *et al.* (166) sur le pouvoir inhibiteur de divers extraits de la nigelle sur 16 souches bactériennes à Gram<sup>-</sup> et 6 à Gram<sup>+</sup> résistantes aux antibiotiques a permis d'asseoir que les extraits d'alcaloïdes et aqueux possèdent une activité inhibitrice importante envers les bactéries à Gram<sup>+</sup>. Par ailleurs, Khan *et al.* (167) ont trouvé que l'extrait aqueux des graines de *N. sativa* inhibe la croissance du champignon responsable de la candidose chez les souris dû probablement à un effet indirect en stimulant le système immunitaire et en améliorant la défense antimicrobienne. Enfin, Mashhadian et Rakhshandeh. (168) ont révélé que l'extrait méthanolique et hexanique des graines de *Nigella sativa* possèdent également des effets inhibiteurs très considérables sur *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *Candida albicans*.

Des effets anti-inflammatoire, antiallergique et antiasthmatique par inhibition de l'expression de la 2-cyclooxygénase (COX-2) et la 5-lipooxygénase (5-LO), enzymes impliquées dans la génération des médiateurs de l'inflammation, les cytokines et les leucotréines respectivement ont été établis pour le thymoquinone et l'huile essentielle de la nigelle (149, 153, 169, 170). L'activité de l'huile fixe sur ces enzymes est plus importante que le thymoquinone et ne semble pas due entièrement à ce dernier; des acides gras insaturés de type C20: 2 peuvent être impliqués (171). Par ailleurs, il a été démontré que le thymoquinone exerce une importante activité inhibitrice vis-à-vis de la 5-lipooxygénase, enzyme clé de la génération des médiateurs de l'inflammation, les leukotriènes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub> à partir de l'acide arachidonique (169). En effet, après traitement des patients, ayant une inflammation induite par l'ovalbumin, par le thymoquinone (3mg de poudre dans 10% DMSO/kg) pendant 3jours, l'activité enzymatique spécifique de la 5-lipooxygénase présent dans l'extrait cellulaire est de 1.5µmole de l'acide 5-hydro-eicosatétraénoïque/min/mg d'enzyme. Cependant, la mesure de cette activité dans les mêmes conditions chez les mêmes patients avant traitement par le thymoquinone est de 4.5µmole de l'acide 5-hydro-eicosatétraénoïque/min/mg d'enzyme (169).

En plus de ces activités, l'huile essentielle de la nigelle possède aussi un effet antiviral vis-à-vis de virus de l'herpe (cytomégalovirus murin) (152), des propriétés anti-cestodales et anti-nématiques comparables à celles de la pipérazine. Des effets antioxydants (102, 172), antidiabétiques (148, 173, 174), anti-hépatite et anti-néphrotoxiques (157), antimutagène, antinéoplasique, anticancéreux (102, 152, 175, 176, 177) et immunostimulantes (152) ont été aussi rapporté dans la littérature.



# *Matériels et Méthodes*

# I. Matériels

## I.1. Matériel végétal

Les huiles essentielles ayant fait l'objet de cette étude ont été préparées à partir de deux huiles fixes commerciales de la nigelle (*Abou el Kacem* et *Miracle*) (Tableau 7) qui ont été procurées de la marché local de Sétif. Ces huiles ont été choisies par rapport à l'origine des graines pressées d'une part et à leurs effets précédemment démontrés d'autre part.

**Tableau 6.** Les informations générales concernant les huiles commerciales de la nigelle utilisées.

Huiles commerciales	Origines des graines	Adresses	Date de fabrication
Huile d' <i>Abou El Kacem</i>	Syrie	Huilerie d' <i>Abou el Kacem</i> . P.n <sup>o</sup> 118. les sept merveilles- Alger.	Juin 2010
Huile de <i>Miracle</i>	Ethiopie	Huilerie Mecqa. Douzi 1. Lot. 21. Beb Ezzouar- Alger.	Juillet 2010

## I.2. Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des différents agents antibactériens testés (les antibiotiques, les huiles essentielles, le carvacrol, le thymol et le thymoquinone) a été évaluée contre 12 isolats collectés à partir de divers produits pathologiques provenant des patients hospitalisés ou externe (Tableau 8) au niveau du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU, Sétif) et vis-à-vis de trois souches de référence (*S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922) à phénotype sauvage et provenant d'American Type Culture Collection (ATCC). Ces souches choisies représentent les germes les plus courants et numériquement majoritaires et couramment responsables d'infections nosocomiales en milieu hospitalier. Les bactéries isolées ont été identifiées sur la base de caractéristiques morphologiques (la forme et la taille des colonies, leurs couleurs et leurs odeurs pour certaines souches) et biochimiques via l'utilisation des galeries Api 20<sup>E</sup> (Bio Mérieux<sup>®</sup>, Français) pour les entérobactéries et complété par un test d'oxydase pour les bacilles à Gram<sup>-</sup> non fermentant. Les tests de catalase et de coagulase ont été utilisés pour les bactéries à Gram<sup>+</sup>.

**Tableau 7.** Souches cliniques étudiées.

<i>Bactéries</i>	<i>Identifiant patient</i>	<i>Produit pathologique</i>	<i>Date d'isolement</i>	<i>Mécanismes de résistances aux <math>\beta</math>-lactamines</i>
<i>E. coli</i>	(975/D <sub>2</sub> )	Prélèvement trachéal	19-04-2010	$\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE)- classe A d'Amber-
<i>P. mirabilis</i>	(807/D <sub>1</sub> )	Pus	22-04-2010	$\beta$ -lactamase de type pénicillinase
<i>E. coli</i>	(142/U)	Urine	26-04-2010	$\beta$ -lactamase de type pénicillinase- classe A d'Amber-
<i>M. morgani</i>	(185/U)	Urine	28-04-2010	$\beta$ -lactamase de type TRI- classe A d'Amber-
<i>K. pneumoniae</i>	(13/D)	Cathéter fémoral	09-05-2010	$\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE) - classe A d'Amber-
<i>S.marcescens</i>	(13/D)	Cathéter fémoral	09-05-2010	$\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE) - classe A d'Amber-
<i>S. maltophilia</i>	/	Pus	12-05-2010	Métallo-béta-lactamases (L1) + $\beta$ -lactamase à spectre élargie (L2)
<i>P. aeruginosa</i>	(890/D)	Pus	16-05-2010	Imperméabilité membranaire (Perte ou diminution de l'expression de Porine D2)
<i>A. baumannii</i>	(720/P)	Liquide pleurale	16-05-2010	Métallo-béta-lactamases (MBL) - classe B d'Amber-
<i>S. aureus</i>	(917/D)	Pus	18-05-2010	modification de la cible d'action
<i>S. haemolyticus</i>	(329/U)	Urine	01-06-2010	modification de la cible d'action
<i>P. aeruginosa</i>	(49/D)	Sonde urinaire	01-06-2010	Métallo-béta-lactamases (MBL) - classe B d'Amber-

### I.3. Produits chimiques

- Les solvants utilisés (éther diéthylique, éther de pétrole et méthanol) lors de différentes étapes d'extraction et de caractérisation des huiles essentielles et le DMSO pour les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne et inhibitrice de  $\beta$ -lactamases ont été fournis par Sigma, Aldrich et Fluka.
- Le carvacrol, le thymol, le carvone et le thymoquinone (constituants purs des huiles essentielles) utilisés dans les différents tests (caractérisation des huiles essentielles et activités antibactérienne et inhibitrice de  $\beta$ -lactamase) ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (Germany).
- EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid) (Merck, Germany).
- La gélose nutritive et le bouillon nutritif (milieux d'enrichissement) proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger.

- La gélose *Mueller Hinton* (Fluka), milieu utilisé pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (antibiogrammes) et aux différents extraits préparés (aromatogramme).
- Le céfotaxime (CTX, 30µg), la ticarciline (TIC, 75µg), le céfazoline (CZ, 30µg), la céftazidime (CAZ, 30µg), le céfoxitine (FOX, 30µg), l'oxacilline (OX, 5µg), l'ampicilline (AMP, 10µg), la combinaison amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10µg), l'imipénème (IMP, 10µg), la kanamycine (K, 30µg), l'amikacine (AN, 30µg), la gentamicine (GN, 10µg), la fosfomycin (FOS, 50µg), la colistine (CS, 50µg), l'acide nalidixique (NA, 30µg), la ciprofloxacine (CIP, 5µg), le nitrofurane (FT, 300µg), et la rifampicine (RA, 30µg), antibiotiques utilisés sous forme de disques pour établir l'antibiogramme des souches bactériennes proviennent de Bio-Rad (Marnes la Coquette, France). La combinaison piperacilline/tazobactam (TZP, 75ug/110µg), l'erythromycin (E15, 15µg), la doxycycline (DO, 30µg), et la vancomycine (VA, 30µg) ont été obtenus auprès de Oxoid (France).
- La pénicillinase de *Bacillus cereus* (P 0389-1KU) et la nitrocéfine ont été obtenues auprès de Sigma et Oxoid respectivement.

## II. Méthodes

### II.1. Extraction des huiles essentielles

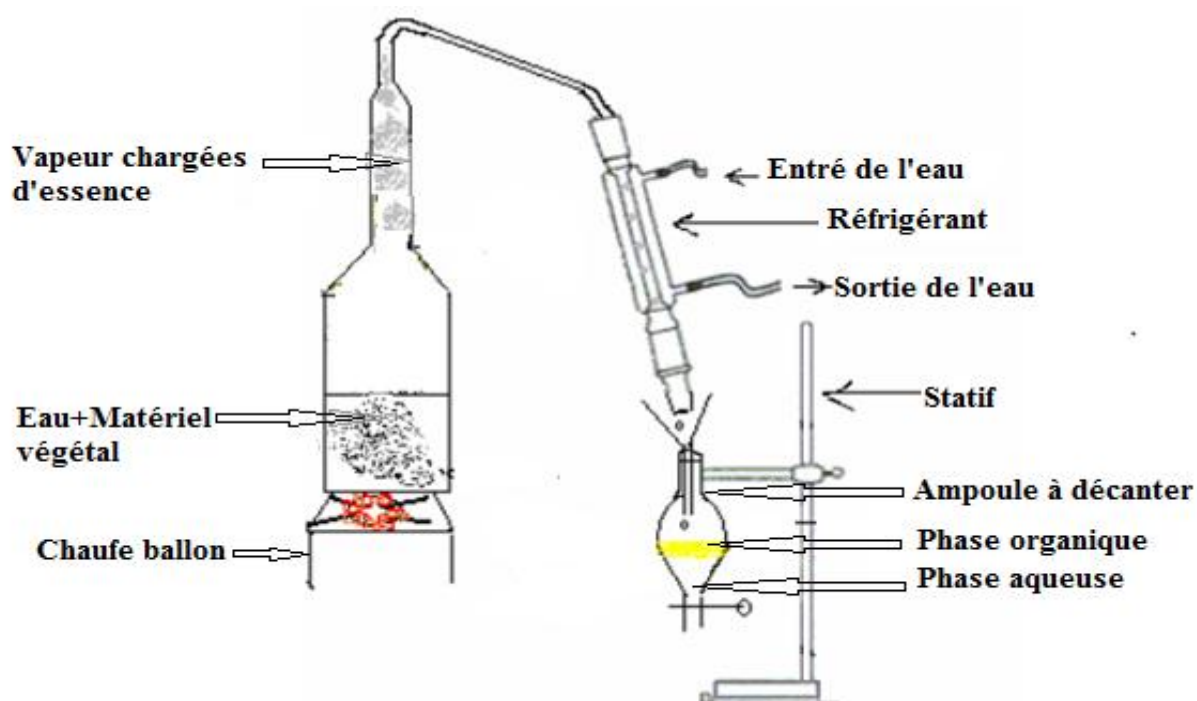
Les huiles essentielles de la nigelle ont été préparées à partir des huiles fixes par hydro distillation. A 50 g de chaque échantillon d'huiles fixes commerciales placés dans un ballon d'un litre contenant environ 300 à 400 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon électrique pendant environ 3 heures avec un débit de d'écoulement du distillat régulier d'environ 3ml/min. Les vapeurs d'eau chargées d'huile essentielles en traversant une surface froide (tube réfrigérant ou condensateur) se condensent puis s'écoulent à l'état liquide dans un récipient de récupération (Figure 13). L'opération est poursuivi jusqu'à ce que le distillat devienne parfaitement limpide. L'addition d'un solvant organique (éther diéthylique) à l'émulsion obtenue permet de récupérer les huiles essentielles dans la phase organique (légèrement colorée et d'odeur assez forte) après décantation. La phase aqueuse est séparée puis lavée de nouveau par le même solvant jusqu'à son éclaircissement afin d'augmenter le rendement en huile essentielle.

La phase organique ainsi récupérée est traitée par filtration sur un déshydratant, le sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pour éliminer toute trace d'eau susceptible d'être retenue dans

l'huile suivie d'une évaporation totale du solvant utilisé à l'aide d'un évaporateur rotatif (BÜCHI) maintenue à 35<sup>0</sup>C (température d'ébullition du solvant utilisé). Le rendement en huile essentielle est déterminé par rapport à la masse initiale du matériel utilisé et est exprimé en pourcentage selon la formule ci-dessous. L'huile essentielle ainsi obtenue est conservée à 4°C dans un flacon étanche et à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation des les différentes activités.

$$R = P_B / P_A \times 100$$

**R** : le rendement en %, **P<sub>B</sub>** : poids de l'huile essentielle obtenu en g, **P<sub>A</sub>** : poids du matériel à traiter en g.



**Figure 13.** Montage du dispositif simple employé pour l'extraction des huiles essentielles.

## II.2. Identification ou analyse qualitative des huiles essentielles.

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice) sur la base des phénomènes d'adsorption et de partage.

L'analyse des huiles essentielles extraites a été effectuée sur des plaque de gel de silice fluorescent prête à l'emploi (Kiessel gel 60F<sub>254</sub>; 0,2mm; 20x20cm) dans un système de migration constitué de trois solvants à polarité croissante (éther de pétrole/éther

diéthylique/méthanol) dans les proportions de 40:10:1,5 (v/v/v) respectivement. Les extraits dilués dans le méthanol (1/80) ainsi que les standards préparés à différentes concentrations sont déposés à raison de 4µl à des points de repère de 1,5cm du bord inférieur de chaque plaque. Les plaques sont ensuite introduites dans une chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile. Après développement, elles sont séchées sous hotte, puis les taches ou les spots sont visualisées séparément par observation sous une lampe UV à 254nm, à l'aide de vapeurs d'iode et par pulvérisation d'une solution de révélation (0,5% d'anisaldéhyde préparé dans l'acide acétique, le méthanol et l'acide sulfurique dans les proportions de 10:85:5 (v/v/v) successivement).

Après révélation, l'identification de la nature chimique des divers constituants des huiles essentielles est établie en comparant les rapports frontaux ( $R_f$ ) des taches avec ceux des témoins en prenant en considération leurs couleurs caractéristiques.

$$R_f = \frac{\text{Distance (en mm) parcourue par le constituant}}{\text{Distance (en mm) parcourue par la phase mobile}}$$

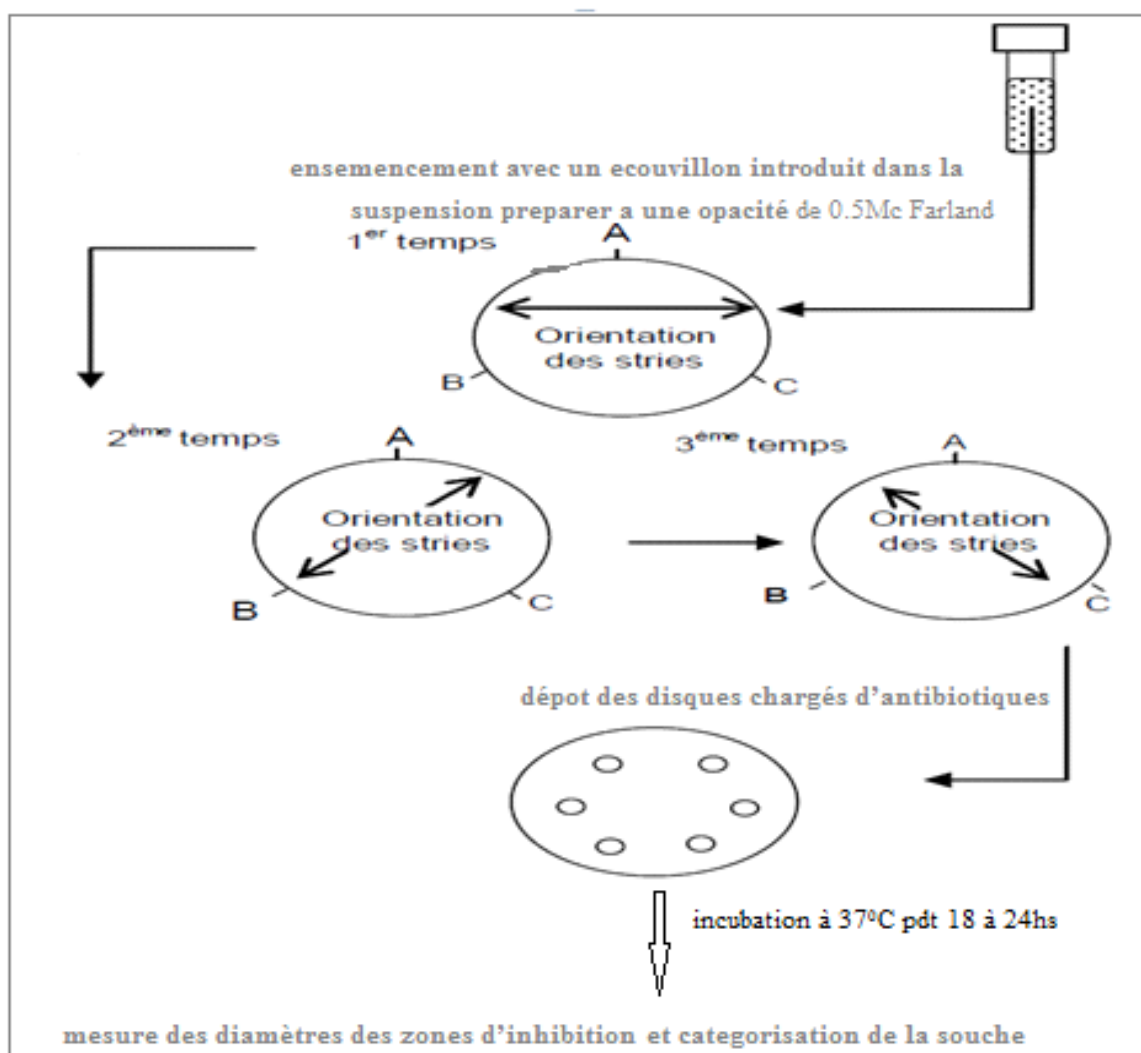
### **II.3. Caractérisation microbiologique des souches étudiées**

#### **❖ Etudes de la sensibilité des souches aux antibiotiques**

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode standard de l'antibiogramme également dite de diffusion en milieu gélosé (82). La méthode consiste à préparer une suspension bactérienne à partir d'une culture pure et jeune (de 18 à 20 heures) de la souche à tester (quelques colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9‰). Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland. Suivant les recommandations de l'OMS, un écouvillon stérile est plongé dans la suspension préparée et après un bref essorage sur les parois du tube, l'inoculum estensemencé par écouvillonnage (sous forme de stries serrées) en le frottant sur toute la surface du milieu de culture (Muller-Hinton) préalablement coulé dans des boîtes de pétri stériles. Une fois l'ensemencement effectué, les disques chargés d'antibiotiques sont déposés à la surface (6 disques par boîtes) (Figure 14) et les boîtes sont mises en incubation.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque et comparés aux valeurs critiques définies par le NCCLS (82)

(annexes 5 à 8) permettant ainsi de classer les isolats comme sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistants (R).



**Figure 14.** Méthodologie de réalisation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

#### ❖ Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance

Après classification des différentes souches cliniques obtenues, il est impérieux de faire une caractérisation phénotypique de ces souches afin d'établir leurs mécanisme de résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines. Pour cela, divers tests ont été utilisés parmi lesquels le test de synergie (83) pour la détection des souches productrices de BLSE, souches catégorisées résistantes ou intermédiaires à l'ATM (diamètre d'inhibition est inférieur ou égal à 27mm) ou aux C3G dont le diamètre d'inhibition est inférieur ou égal à 22mm pour la CAZ, à 25mm pour le CRO et/ou à 27mm pour la CTX (82) avec une sensibilité conservée à la FOX et à l'IMP (54).

Dans les conditions standards de l'antibiogramme (82), ce test consiste à déposer autour d'un disque contenant l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases (d'AMC, de TCC ou de TZP) sous forme de croix les disques de C3G précédemment citées sur la gélose M-H préalablement ensemencée par la suspension de la souche concernée. La distance entre les disques (centre à centre) est comprise entre 15 à 20 mm. La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou en bouchon de champagne entre les disques de C3G (ou de l'aztréonam) et les disques contenant l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases après 24 heures d'incubation à 37<sup>0</sup>C (82).

En absence d'une image de synergie, le test du double disque est obligatoire pour confirmer la production de BLSE. Ce test consiste à déposer un disque d'AMC, de TZP, ou de TCC à distance de 25 à 30 mm (centre à centre) d'un disque de C3G (CRO ou CTX, ou CAZ) selon les espèces bactériennes sur la surface de la gélose inoculée. Après une heure d'incubation à température ambiante, le disque de l'association  $\beta$ -lactamines/inhibiteur de  $\beta$ -lactamases est ôté puis remplacé par un disque de C3G (113). Le test est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après pré diffusion du contenu du disque d'AMC ou TCC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G seul (82). La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 non productrice de BLSE a été utilisée comme contrôle négatif pour les bacilles à gram<sup>-</sup>.

Pour les souches catégorisées résistantes à l'imipénème, le test du disque combiné IMP/EDTA (1) a été utilisé. Cependant, sur une gélose ensemencée par un inoculum d'opacité standard (0,5 Mc Farland) de la souche concernée, un disque d'IMP (10ug) et un disque d'IPM (10 $\mu$ g) imbibé de 10ul d'EDTA (0,5M, pH 8) sont déposés à une distance de 20mm (centre à centre). Après incubation à 37<sup>0</sup>C pendant 24 heures, le test est positif quand le diamètre d'inhibition autour du disque d'IMP/EDTA est supérieur ou égal à 7mm par rapport aux diamètres d'inhibition autour du disque d'IMP seul ou également supérieur à 17mm traduisant ainsi la production de métallo-béta-lactamases (1). En plus, la mise en évidence d'une image de synergie entre le disque d'IMP et le disque vierge imbibé par l'EDTA (60) traduit la présence de cet enzyme. Dans le cas où le test est négatif, le test de synergie IMP/TZP ou d'AMC est mis en œuvre pour dépister la résistance des entérobactéries à l'IPM (la distance entre les disques centre à centre est de 15mm). L'apparition d'une image de synergie entre ces disques traduit la production de carbapénémases de la classe A d'Ambler. La souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 non productrice de carbapénémases a été utilisée comme un témoin.



La résistance des staphylocoques à la méthicilline est recherchée à l'aide d'un disque de céfoxitine (FOX, 30µg) dans les conditions standard de l'antibiogramme (82). Lorsque le diamètre de la FOX est inférieur ou égal à 19mm ou à 24mm pour les *Staphylococcus* à coagulase positive et négative respectivement, la souche est dite résistante à l'oxacilline (82) par modification de la cible d'action (89). Une souche de *S. aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme un témoin négatif.

## II.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Pour déterminer l'activité antibactérienne des extraits préparés et de certains de leurs constituants, nous avons utilisé trois méthodes :

- ❖ la méthode de diffusion en milieu gélosé ou l'aromatogramme est techniquement semblable à l'antibiogramme, à la différence qu'elle consiste à déposer les disques stériles de 6 mm de diamètre (papier Whatman n°1) à la surface de la gélose (M-H) inoculée par le germe tests et qui sont ensuite imprégnés avec les extraits et leurs divers constituants à des concentrations croissantes (25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml) repris avec le DMSO à raison de 10µl par disque. A noter que, les tests sont réalisés en triplicata et un disque vierge imbibé de 10µl de DMSO a été aussi déposé sur la même culture pour chaque bactéries. Après une pré-incubation de 45 min à température ambiante et une incubation à 37°C pendant 24 heures, les résultats sont exprimés par la mesure des diamètres des halos d'inhibition (en mm). L'effet bactériostatique ou bactéricide de ces huiles et de leurs composés a été également déterminé en réensemencement dans un milieu liquide (bouillon nutritif) ou en milieu solide (gélose nutritif) l'inoculum de la zone d'inhibition.
- ❖ La méthode en phase gazeuse ou de micro atmosphère décrite par Nedorostova *et al.* (129) vise à déterminer la quantité minimale inhibitrice (QMI) des huiles essentielles, à une concentration de 100mg/ml, déposées sous différents volumes (10, 20 et 30µl) avant fermeture de la boîte sur un papier filtre de 80 mm de diamètre (WATMANN n°1) placé au fond du couvercle. Au préalable, les boîtes de Pétri sont préparées extemporanément par dépôt de 20 ml de milieu Mueller Hinton (ou M-H additionné de 5% de sang pour les staphylocoques sp) puis inoculées en surface sous forme de stries comme décrit précédemment pour l'antibiogramme. Les boîtes sont alors maintenues en position inverse puis incubées à 37°C pendant 24 heures. La QMI est définie comme la plus petite quantité (en µl) d'huile pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin (disque vierge imbibé de DMSO). L'effet bactériostatique ou bactéricide de ces huiles a été

également déterminé en repiquant dans un milieu liquide (bouillon nutritif) ou en milieu solide (gélose nutritif) l'inoculum de la zone d'inhibition. La QMB (quantité minimale bactéricide) est alors définie comme étant la plus petite quantité d'huile (en  $\mu\text{l}$ ) pour laquelle aucune croissance n'est visible après 7 jours d'incubation en subculture.

- ❖ La méthode de microdilution permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles et de leurs constituants majeurs (le thymoquinone, le thymol et le carvacol) sur la base de la méthode décrite par Flesar *et al.* (178) avec certaines modifications. L'essai est réalisé dans des plaques de microtitration stériles de 96 puits à fond rond contenant 50 $\mu\text{l}$  de bouillon nutritif auxquels sont ajoutés 50 $\mu\text{l}$  d'un mélange de l'agent antibactérien testé (aux différentes concentrations) et de bouillon nutritif, double concentré, (v/v). Cent microlitres de la suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland de chaque souche sont alors ajoutés dans chaque puits. La lecture des résultats est faite à la lumière du jour et à l'œil nu après 24 heures d'incubation à 37<sup>0</sup>C. La limpidité du milieu implique l'effet antibactérien de l'agent testé, tandis que la présence d'un trouble (signe de croissance bactérienne) traduit l'absence de cet effet. La CMI est définie comme étant la plus petite concentration (en mg/ml) de l'agent pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit (178). Après détermination de la CMI, la concentration minimale bactéricide (CMB) est déterminée par des repiquages en stries de 5cm de long à la surface des géloses nutritives (178) du contenu des puits ou aucune croissance n'est visible après incubation de 24 heures à 37°C. La CMB est définie comme étant la plus faible concentration (en mg/ml) de l'agent antibactériens qui tue au moins 99,99% de l'inoculum bactérien (178).

## **II.5. Effet des huiles essentielles sur l'activité de la pénicillinase**

L'objectif de cette partie de notre travail est d'évaluer l'effet des huiles essentielles et de certains de leurs composés sur l'activité de la pénicillinase du *Bacillus cereus*. Cette enzyme a pour substrat spécifique la nitrocéfine dont l'interaction enzyme-substrat se traduit par le virage de la couleur du milieu réactionnel de jaune en rose indiquant ainsi la dégradation du substrat par l'enzyme. L'activité enzymatique a été déterminée *in vitro* en absence et en présence de ces substances (10 $\mu\text{l}$ ) dans un volume réactionnel de 200 $\mu\text{l}$  (10 $\mu\text{l}$  d'enzyme (1nM) + X $\mu\text{l}$  de tampon phosphate "50mM, pH 7.0" + 10 $\mu\text{l}$  de nitrocéfine à des concentrations de 1, 0.5, 0.25, 0.12 et 0.06mM) par la mesure des absorbances après

incubation à 25°C aux temps zéro ( $T_0$ ) et 20min. à 490nm (lecteur de Micoplaque Powerwave X, Biotek, UK).

Les vitesses initiales d'hydrolyse en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  sont calculées en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire de la nitrocéfine ( $\epsilon_{490\text{nm}} = 25600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) et les paramètres cinétiques ( $V_{\text{max}}$  et  $K_M$ ) sont déterminés par la représentation de Linweaver et Burk.

# *Matériels et Méthodes*

# I. Matériels

## I.1. Matériel végétal

Les huiles essentielles ayant fait l'objet de cette étude ont été préparées à partir de deux huiles fixes commerciales de la nigelle (*Abou el Kacem* et *Miracle*) (Tableau 7) qui ont été procurées de la marché local de Sétif. Ces huiles ont été choisies par rapport à l'origine des graines pressées d'une part et à leurs effets précédemment démontrés d'autre part.

**Tableau 6.** Les informations générales concernant les huiles commerciales de la nigelle utilisées.

Huiles commerciales	Origines des graines	Adresses	Date de fabrication
Huile d' <i>Abou El Kacem</i>	Syrie	Huilerie d' <i>Abou el Kacem</i> . P.n <sup>o</sup> 118. les sept merveilles-Alger.	Juin 2010
Huile de <i>Miracle</i>	Ethiopie	Huilerie Mecqa. Douzi 1. Lot. 21. Beb Ezzouar-Alger.	Juillet 2010

## I.2. Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des différents agents antibactériens testés (les antibiotiques, les huiles essentielles, le carvacrol, le thymol et le thymoquinone) a été évaluée contre 12 isolats collectés à partir de divers produits pathologiques provenant des patients hospitalisés ou externe (Tableau 8) au niveau du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU, Sétif) et vis-à-vis de trois souches de référence (*S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922) à phénotype sauvage et provenant d'American Type Culture Collection (ATCC). Ces souches choisies représentent les germes les plus courants et numériquement majoritaires et couramment responsables d'infections nosocomiales en milieu hospitalier. Les bactéries isolées ont été identifiées sur la base de caractéristiques morphologiques (la forme et la taille des colonies, leurs couleurs et leurs odeurs pour certaines souches) et biochimiques via l'utilisation des galeries Api 20<sup>E</sup> (Bio Mérieux<sup>®</sup>, Français) pour les entérobactéries et complété par un test d'oxydase pour les bacilles à Gram<sup>-</sup> non fermentant. Les tests de catalase et de coagulase ont été utilisés pour les bactéries à Gram<sup>+</sup>.

**Tableau 7.** Souches cliniques étudiées.

<i>Bactéries</i>	<i>Identifiant patient</i>	<i>Produit pathologique</i>	<i>Date d'isolement</i>	<i>Mécanismes de résistances aux <math>\beta</math>-lactamines</i>
<i>E. coli</i>	(975/ D <sub>2</sub> )	Prélèvement trachéal	19-04-2010	$\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE)- classe A d'Ambler-
<i>P. mirabilis</i>	(807/D <sub>1</sub> )	Pus	22-04-2010	$\beta$ -lactamase de type pénicillinase
<i>E. coli</i>	(142/U)	Urine	26-04-2010	$\beta$ -lactamase de type pénicillinase- classe A d'Ambler-
<i>M. morgani</i>	(185/U)	Urine	28-04-2010	$\beta$ -lactamase de type TRI- classe A d'Ambler-
<i>K. pneumoniae</i>	(13/D)	Cathéter fémoral	09-05-2010	$\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE) - classe A d'Ambler-
<i>S.marcescens</i>	(13/D)	Cathéter fémoral	09-05-2010	$\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE) - classe A d'Ambler-
<i>S. maltophilia</i>	/	Pus	12-05-2010	Métallo-béta-lactamases (L1) + $\beta$ -lactamase à spectre élargie (L2)
<i>P. aeruginosa</i>	(890/D)	Pus	16-05-2010	Imperméabilité membranaire (Perte ou diminution de l'expression de Porine D2)
<i>A. baumannii</i>	(720/P)	Liquide pleurale	16-05-2010	Métallo-béta-lactamases (MBL) - classe B d'Ambler-
<i>S. aureus</i>	(917/D)	Pus	18-05-2010	modification de la cible d'action
<i>S. haemolyticus</i>	(329/U)	Urine	01-06-2010	modification de la cible d'action
<i>P. aeruginosa</i>	(49/D)	Sonde urinaire	01-06-2010	Métallo-béta-lactamases (MBL) - classe B d'Ambler-

### I.3. Produits chimiques

- Les solvants utilisés (éther diéthylique, éther de pétrole et méthanol) lors de différentes étapes d'extraction et de caractérisation des huiles essentielles et le DMSO pour les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne et inhibitrice de  $\beta$ -lactamases ont été fournies par Sigma, Aldrich et Fluka.
- Le carvacrol, le thymol, le carvone et le thymoquinone (constituants purs des huiles essentielles) utilisés dans les différents tests (caractérisation des huiles essentielles et activités antibactérienne et inhibitrice de  $\beta$ -lactamase) ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (Germany).
- EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid) (Merck, Germany).
- La gélose nutritive et le bouillon nutritif (milieux d'enrichissement) proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger.

- La gélose *Mueller Hinton* (Fluka), milieu utilisé pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (antibiogrammes) et aux différents extraits préparés (aromatogramme).
- Le céfotaxime (CTX, 30µg), la ticarciline (TIC, 75µg), le céfazoline (CZ, 30µg), la céftazidime (CAZ, 30µg), le céfoxitine (FOX, 30µg), l'oxacilline (OX, 5µg), l'ampicilline (AMP, 10µg), la combinaison amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10µg), l'imipenème (IMP, 10µg), la kanamycine (K, 30µg), l'amikacine (AN, 30µg), la gentamicine (GN, 10µg), la fosfomycin (FOS, 50µg), la colistine (CS, 50µg), l'acide nalidixique (NA, 30µg), la ciprofloxacine (CIP, 5µg), le nitrofurane (FT, 300µg), et la rifampicine (RA, 30µg), antibiotiques utilisés sous forme de disques pour établir l'antibiogramme des souches bactériennes proviennent de Bio-Rad (Marnes la Coquette, France). La combinaison piperacilline/tazobactam (TZP, 75ug/110µg), l'erythromycin (E15, 15µg), la doxycycline (DO, 30µg), et la vancomycine (VA, 30µg) ont été obtenus auprès de Oxoid (France).
- La pénicillinase de *Bacillus cereus* (P 0389-1KU) et la nitrocéfine ont été obtenues auprès de Sigma et Oxoid respectivement.

## II. Méthodes

### II.1. Extraction des huiles essentielles

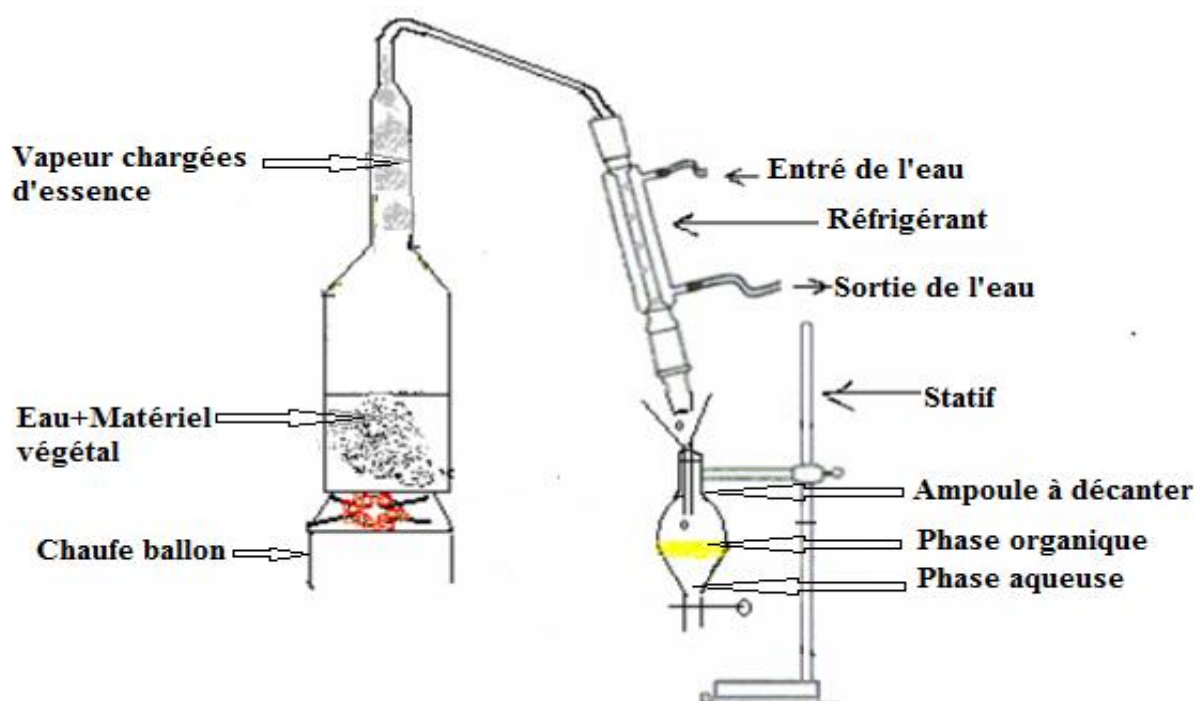
Les huiles essentielles de la nigelle ont été préparées à partir des huiles fixes par hydro distillation. A 50 g de chaque échantillon d'huiles fixes commerciales placés dans un ballon d'un litre contenant environ 300 à 400 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon électrique pendant environ 3 heures avec un débit de d'écoulement du distillat régulier d'environ 3ml/min. Les vapeurs d'eau chargées d'huile essentielles en traversant une surface froide (tube réfrigérant ou condensateur) se condensent puis s'écoulent à l'état liquide dans un récipient de récupération (Figure 13). L'opération est poursuivi jusqu'à ce que le distillat devienne parfaitement limpide. L'addition d'un solvant organique (éther diéthylique) à l'émulsion obtenue permet de récupérer les huiles essentielles dans la phase organique (légèrement colorée et d'odeur assez forte) après décantation. La phase aqueuse est séparée puis lavée de nouveau par le même solvant jusqu'à son éclaircissement afin d'augmenter le rendement en huile essentielle.

La phase organique ainsi récupérée est traitée par filtration sur un déshydratant, le sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pour éliminer toute trace d'eau susceptible d'être retenue dans

l'huile suivie d'une évaporation totale du solvant utilisé à l'aide d'un évaporateur rotatif (BÜCHI) maintenue à 35<sup>0</sup>C (température d'ébullition du solvant utilisé). Le rendement en huile essentielle est déterminé par rapport à la masse initiale du matériel utilisé et est exprimé en pourcentage selon la formule ci-dessous. L'huile essentielle ainsi obtenue est conservée à 4°C dans un flacon étanche et à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation des les différentes activités.

$$R = P_B / P_A \times 100$$

**R** : le rendement en %, **P<sub>B</sub>** : poids de l'huile essentielle obtenu en g, **P<sub>A</sub>** : poids du matériel à traiter en g.



**Figure 13.** Montage du dispositif simple employé pour l'extraction des huiles essentielles.

## II.2. Identification ou analyse qualitative des huiles essentielles.

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice) sur la base des phénomènes d'adsorption et de partage.

L'analyse des huiles essentielles extraites a été effectuée sur des plaque de gel de silice fluorescent prête à l'emploi (Kiesel gel 60F<sub>254</sub>; 0,2mm; 20x20cm) dans un système de migration constitué de trois solvants à polarité croissante (éther de pétrole/éther



diéthylique/méthanol) dans les proportions de 40:10:1,5 (v/v/v) respectivement. Les extraits dilués dans le méthanol (1/80) ainsi que les standards préparés à différentes concentrations sont déposés à raison de 4µl à des points de repère de 1,5cm du bord inférieur de chaque plaque. Les plaques sont ensuite introduites dans une chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile. Après développement, elles sont séchées sous hotte, puis les taches ou les spots sont visualisées séparément par observation sous une lampe UV à 254nm, à l'aide de vapeurs d'iode et par pulvérisation d'une solution de révélation (0,5% d'anisaldéhyde préparé dans l'acide acétique, le méthanol et l'acide sulfurique dans les proportions de 10:85:5 (v/v/v) successivement).

Après révélation, l'identification de la nature chimique des divers constituants des huiles essentielles est établie en comparant les rapports frontaux ( $R_f$ ) des taches avec ceux des témoins en prenant en considération leurs couleurs caractéristiques.

$$R_f = \frac{\text{Distance (en mm) parcourue par le constituant}}{\text{Distance (en mm) parcourue par la phase mobile}}$$

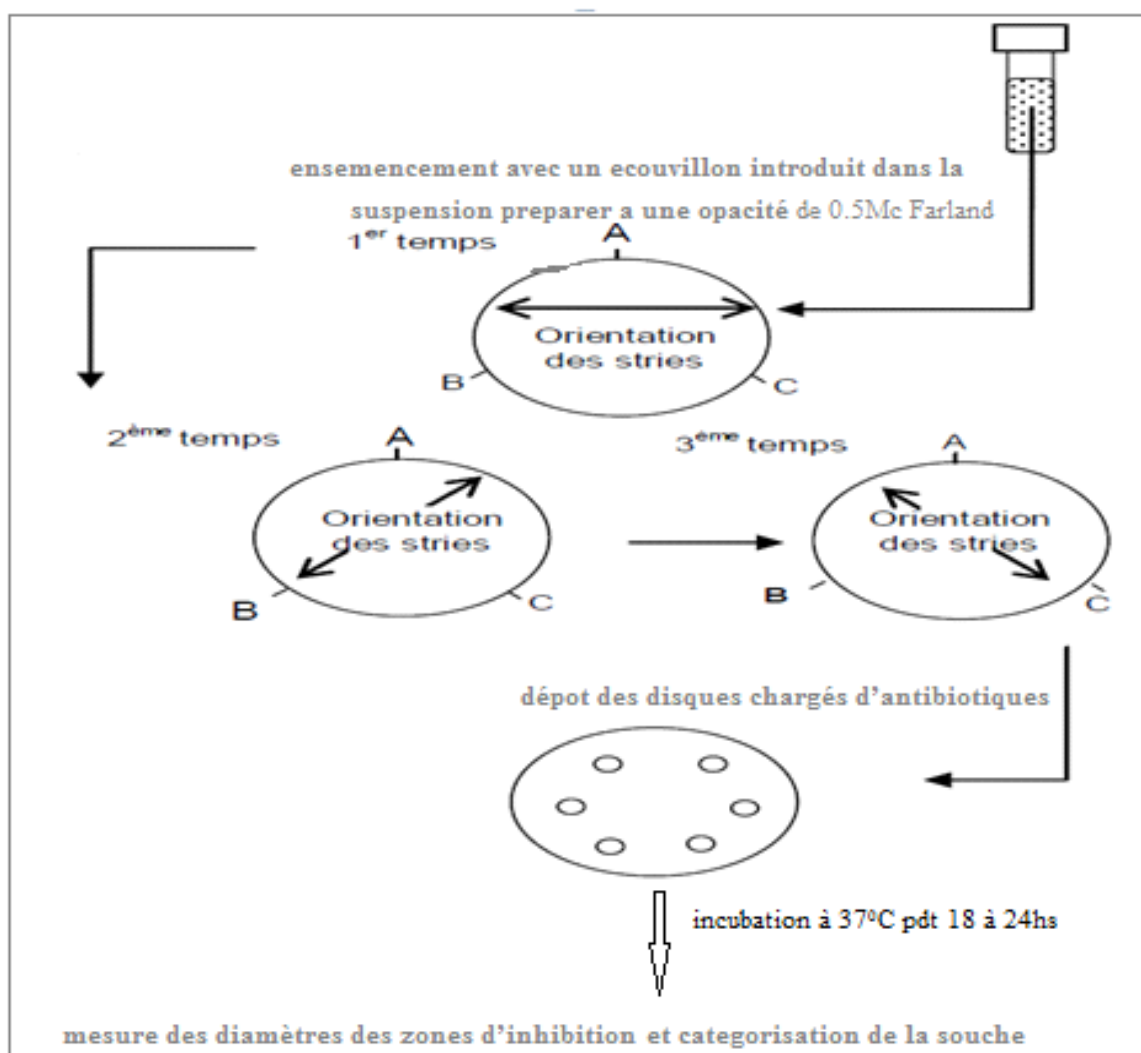
### **II.3. Caractérisation microbiologique des souches étudiées**

#### **❖ Etudes de la sensibilité des souches aux antibiotiques**

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode standard de l'antibiogramme également dite de diffusion en milieu gélosé (82). La méthode consiste à préparer une suspension bactérienne à partir d'une culture pure et jeune (de 18 à 20 heures) de la souche à tester (quelques colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9‰). Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland. Suivant les recommandations de l'OMS, un écouvillon stérile est plongé dans la suspension préparée et après un bref essorage sur les parois du tube, l'inoculum estensemencé par écouvillonnage (sous forme de stries serrées) en le frottant sur toute la surface du milieu de culture (Muller-Hinton) préalablement coulé dans des boîtes de pétri stériles. Une fois l'ensemencement effectué, les disques chargés d'antibiotiques sont déposés à la surface (6 disques par boîtes) (Figure 14) et les boîtes sont mises en incubation.

Après incubation à 37<sup>0</sup>C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque et comparés aux valeurs critiques définies par le NCCLS (82)

(annexes 5 à 8) permettant ainsi de classer les isolats comme sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistants (R).



**Figure 14.** Méthodologie de réalisation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

#### ❖ Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance

Après classification des différentes souches cliniques obtenues, il est impérieux de faire une caractérisation phénotypique de ces souches afin d'établir leurs mécanisme de résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines. Pour cela, divers tests ont été utilisés parmi lesquels le test de synergie (83) pour la détection des souches productrices de BLSE, souches catégorisées résistantes ou intermédiaires à l'ATM (diamètre d'inhibition est inférieur ou égal à 27mm) ou aux C3G dont le diamètre d'inhibition est inférieur ou égal à 22mm pour la CAZ, à 25mm pour le CRO et/ou à 27mm pour la CTX (82) avec une sensibilité conservée à la FOX et à l'IMP (54).

Dans les conditions standards de l'antibiogramme (82), ce test consiste à déposer autour d'un disque contenant l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases (d'AMC, de TCC ou de TZP) sous forme de croix les disques de C3G précédemment citées sur la gélose M-H préalablement ensemencée par la suspension de la souche concernée. La distance entre les disques (centre à centre) est comprise entre 15 à 20 mm. La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou en bouchon de champagne entre les disques de C3G (ou de l'aztréonam) et les disques contenant l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases après 24 heures d'incubation à 37<sup>0</sup>C (82).

En absence d'une image de synergie, le test du double disque est obligatoire pour confirmer la production de BLSE. Ce test consiste à déposer un disque d'AMC, de TZP, ou de TCC à distance de 25 à 30 mm (centre à centre) d'un disque de C3G (CRO ou CTX, ou CAZ) selon les espèces bactériennes sur la surface de la gélose inoculée. Après une heure d'incubation à température ambiante, le disque de l'association  $\beta$ -lactamines/inhibiteur de  $\beta$ -lactamases est ôté puis remplacé par un disque de C3G (113). Le test est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après pré diffusion du contenu du disque d'AMC ou TCC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G seul (82). La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 non productrice de BLSE a été utilisée comme contrôle négatif pour les bacilles à gram<sup>-</sup>.

Pour les souches catégorisées résistantes à l'imipénème, le test du disque combiné IMP/EDTA (1) a été utilisé. Cependant, sur une gélose ensemencée par un inoculum d'opacité standard (0,5 Mc Farland) de la souche concernée, un disque d'IMP (10ug) et un disque d'IPM (10 $\mu$ g) imbibé de 10ul d'EDTA (0,5M, pH 8) sont déposés à une distance de 20mm (centre à centre). Après incubation à 37<sup>0</sup>C pendant 24 heures, le test est positif quand le diamètre d'inhibition autour du disque d'IMP/EDTA est supérieur ou égal à 7mm par rapport aux diamètres d'inhibition autour du disque d'IMP seul ou également supérieur à 17mm traduisant ainsi la production de métallo-béta-lactamases (1). En plus, la mise en évidence d'une image de synergie entre le disque d'IMP et le disque vierge imbibé par l'EDTA (60) traduit la présence de cet enzyme. Dans le cas où le test est négatif, le test de synergie IMP/TZP ou d'AMC est mis en œuvre pour dépister la résistance des entérobactéries à l'IPM (la distance entre les disques centre à centre est de 15mm). L'apparition d'une image de synergie entre ces disques traduit la production de carbapénémases de la classe A d'Ambler. La souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 non productrice de carbapénémases a été utilisée comme un témoin.

La résistance des staphylocoques à la méthicilline est recherchée à l'aide d'un disque de céfoxitine (FOX, 30µg) dans les conditions standard de l'antibiogramme (82). Lorsque le diamètre de la FOX est inférieur ou égal à 19mm ou à 24mm pour les *Staphylococcus* à coagulase positive et négative respectivement, la souche est dite résistante à l'oxacilline (82) par modification de la cible d'action (89). Une souche de *S. aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme un témoin négatif.

## II.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Pour déterminer l'activité antibactérienne des extraits préparés et de certains de leurs constituants, nous avons utilisé trois méthodes :

- ❖ la méthode de diffusion en milieu gélosé ou l'aromatogramme est techniquement semblable à l'antibiogramme, à la différence qu'elle consiste à déposer les disques stériles de 6 mm de diamètre (papier Whatman n°1) à la surface de la gélose (M-H) inoculée par le germe tests et qui sont ensuite imprégnés avec les extraits et leurs divers constituants à des concentrations croissantes (25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml) repris avec le DMSO à raison de 10µl par disque. A noter que, les tests sont réalisés en triplicata et un disque vierge imbibé de 10µl de DMSO a été aussi déposé sur la même culture pour chaque bactéries. Après une pré-incubation de 45 min à température ambiante et une incubation à 37°C pendant 24 heures, les résultats sont exprimés par la mesure des diamètres des halos d'inhibition (en mm). L'effet bactériostatique ou bactéricide de ces huiles et de leurs composés a été également déterminé en réensemencement dans un milieu liquide (bouillon nutritif) ou en milieu solide (gélose nutritif) l'inoculum de la zone d'inhibition.
- ❖ La méthode en phase gazeuse ou de micro atmosphère décrite par Nedorostova *et al.* (129) vise à déterminer la quantité minimale inhibitrice (QMI) des huiles essentielles, à une concentration de 100mg/ml, déposées sous différents volumes (10, 20 et 30µl) avant fermeture de la boîte sur un papier filtre de 80 mm de diamètre (WATMANN n°1) placé au fond du couvercle. Au préalable, les boîtes de Pétri sont préparées extemporanément par dépôt de 20 ml de milieu Mueller Hinton (ou M-H additionné de 5% de sang pour les staphylocoques sp) puis inoculées en surface sous forme de stries comme décrit précédemment pour l'antibiogramme. Les boîtes sont alors maintenues en position inverse puis incubées à 37°C pendant 24 heures. La QMI est définie comme la plus petite quantité (en µl) d'huile pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin (disque vierge imbibé de DMSO). L'effet bactériostatique ou bactéricide de ces huiles a été

également déterminé en repiquant dans un milieu liquide (bouillon nutritif) ou en milieu solide (gélose nutritif) l'inoculum de la zone d'inhibition. La QMB (quantité minimale bactéricide) est alors définie comme étant la plus petite quantité d'huile (en  $\mu\text{l}$ ) pour laquelle aucune croissance n'est visible après 7 jours d'incubation en subculture.

- ❖ La méthode de microdilution permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles et de leurs constituants majeurs (le thymoquinone, le thymol et le carvacol) sur la base de la méthode décrite par Flesar *et al.* (178) avec certaines modifications. L'essai est réalisé dans des plaques de microtitration stériles de 96 puits à fond rond contenant 50 $\mu\text{l}$  de bouillon nutritif auxquels sont ajoutés 50 $\mu\text{l}$  d'un mélange de l'agent antibactérien testé (aux différentes concentrations) et de bouillon nutritif, double concentré, (v/v). Cent microlitres de la suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland de chaque souche sont alors ajoutés dans chaque puits. La lecture des résultats est faite à la lumière du jour et à l'œil nu après 24 heures d'incubation à 37°C. La limpidité du milieu implique l'effet antibactérien de l'agent testé, tandis que la présence d'un trouble (signe de croissance bactérienne) traduit l'absence de cet effet. La CMI est définie comme étant la plus petite concentration (en mg/ml) de l'agent pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit (178). Après détermination de la CMI, la concentration minimale bactéricide (CMB) est déterminée par des repiquages en stries de 5cm de long à la surface des géloses nutritives (178) du contenu des puits ou aucune croissance n'est visible après incubation de 24 heures à 37°C. La CMB est définie comme étant la plus faible concentration (en mg/ml) de l'agent antibactériens qui tue au moins 99,99% de l'inoculum bactérien (178).

## **II.5. Effet des huiles essentielles sur l'activité de la pénicillinase**

L'objectif de cette partie de notre travail est d'évaluer l'effet des huiles essentielles et de certains de leurs composés sur l'activité de la pénicillinase du *Bacillus cereus*. Cette enzyme a pour substrat spécifique la nitrocéfine dont l'interaction enzyme-substrat se traduit par le virage de la couleur du milieu réactionnel de jaune en rose indiquant ainsi la dégradation du substrat par l'enzyme. L'activité enzymatique a été déterminée *in vitro* en absence et en présence de ces substances (10 $\mu\text{l}$ ) dans un volume réactionnel de 200 $\mu\text{l}$  (10 $\mu\text{l}$  d'enzyme (1nM) + X $\mu\text{l}$  de tampon phosphate "50mM, pH 7.0" + 10 $\mu\text{l}$  de nitrocéfine à des concentrations de 1, 0.5, 0.25, 0.12 et 0.06mM) par la mesure des absorbances après

incubation à 25°C aux temps zéro ( $T_0$ ) et 20min. à 490nm (lecteur de Micoplaque Powerwave X, Biotek, UK).

Les vitesses initiales d'hydrolyse en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  sont calculées en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire de la nitrocéfine ( $\epsilon_{490\text{nm}} = 25600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) et les paramètres cinétiques ( $V_{\text{max}}$  et  $K_M$ ) sont déterminés par la représentation de Linweaver et Burk.

## *Résultats et discussions*

## **I. Extraction des huiles essentielles de la nigelle**

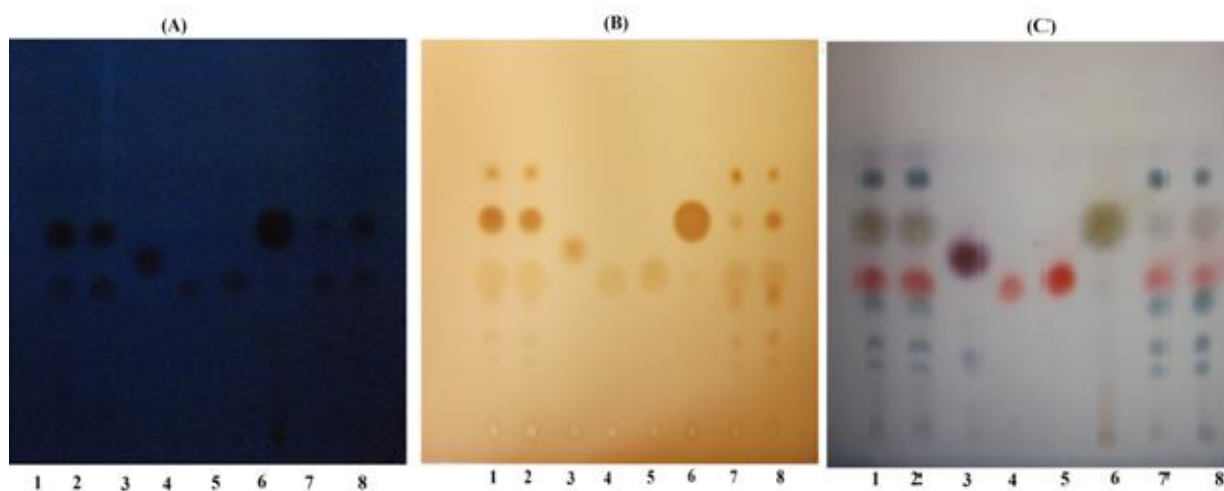
L'hydrodistillation de 50g d'huile fixe commerciale d'*Abou el Kacem* a fourni un rendement en huile essentielle (HE<sub>1</sub>) de 1.02% (p/p), alors que celui de l'huile *Miracle* (HE<sub>2</sub>) est de 4,03%. L'HE<sub>1</sub> est d'une couleur marron très foncé, tandis que l'HE<sub>2</sub> est d'une couleur marron jaunâtre. Les deux huiles ont une odeur aromatique semblable très prononcée, puissante et pénétrable d'une saveur brûlante, forte âcre et piquante caractéristique des graines de *N. sativa*.

L'huile fixe de *Miracle* obtenu par pression à froid à partir des graines de *N. sativa* d'origine Ethiopique présente le rendement le plus élevé en huile essentielle en comparaison avec l'huile d'*Abou El Kacem* obtenu par la même méthode à partir des graines de *N. sativa* d'origine Syrienne. Cette dernière a donné un taux inférieur de presque de 46% par rapport à celui obtenu à partir de l'huile fixe de graines de *N. sativa* d'origine Egyptienne (110, 179). Les deux huiles commerciales de la nigelle ont donné des rendements en huile essentielle largement variables et significativement supérieurs à celui obtenu à partir des graines de *N. sativa* par hydrodistillation. En effet, diverses études ont montré que l'extraction des huiles essentielles directement des graines a donné lieu à des rendements faibles de l'ordre d'environ de 0,4% (107, 110, 179) à 0,5% (p/p) (102). Ces teneurs en huiles essentielles obtenues reflètent une très grande variabilité essentiellement liée à l'origine des graines, les conditions agro-climatique de conduite de la culture, mais aussi avec les conditions de conservation et d'obtention qui peuvent être plus ou moins responsables de ces variations (102, 154).

## **II. Identification ou analyse qualitative des huiles essentielles**

Les chromatogrammes obtenus après révélation des plaques comportent une série de spots de différentes couleurs (Figure 15). L'identification des divers composés est établie par la comparaison des R<sub>f</sub> et des couleurs des taches qui constituent les extraits avec ceux des étalons déterminés dans les mêmes conditions expérimentales (Tableau 8).





**Figure 15.** Chromatogrammes de l'analyse des huiles essentielles sous observation UV à 256nm (A), par révélation à l'aide de vapeurs d'iode (B) et par une solution d'anisaldéhyde (C), (1-2) et (7-8): huiles essentielles obtenues à partir d'huile *Miracle* et *Abou El-Kacem* respectivement, (3-6): huiles essentielles étalons (carvone, carvacrol, thymol et thymoquinone).

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que les huiles essentielles extraites ont le même chimiotypes. La comparaison des caractéristiques des spots ( $R_f$  et couleur) correspondant aux étalons (principaux constituants) laisse supposer que le thymoquinone, le thymol et/ou le carvacrol sont les composés majeurs qui constituent ces huiles. Par ailleurs, la couleur et le  $R_f$  du spot issu de la migration du carvone observé sur les chromatogrammes ne correspond à aucun  $R_f$  des spots issus de la séparation des extraits, ce qui signifie que ce composé n'est pas un des constituants de ces huiles. D'autre part, l'identité ou la nature chimique des autres spots dont les  $R_f$  sont inférieurs à celui du thymoquinone reste indéterminée car ils ne correspondent à aucun  $R_f$  des principaux constituants utilisés. Enfin, il semble que le spot dont le  $R_f$  est égal à 0.60, situé juste au dessus du thymoquinone pourrait correspondre au dithymoquinone (dimère de la thymoquinone). En effet, il a été démontré que le taux de dithymoquinone dans l'huile fixe de la nigelle obtenu par pression à froid est très négligeable et que les traitements thermiques lors de l'extraction ainsi que les conditions de conservation (l'exposition à la lumière) sont à l'origine de la présence de ce composé dans les huiles essentielles (180).

**Tableau 8.** Rapports frontaux et couleurs des spots constituant les échantillons et des étalons.

Paramètres	Révélation sous UV (254 nm)		Révélation par l' iode		Révélation par l' anis aldéhyde/a. sulfurique (0,5%)	
	Couleurs	Rfs (cm)	Couleurs	Rfs (cm)	Couleurs	Rfs (cm)
<b>Huile essentielle d'Abou El Kacem</b>	Pourpre sombre	0,39	Marron clair	0,17	Bleu clair	0,17
				0,21		0,21
				0,33		0,33
	Jaune	0,51	Marron clair	0,39	Rouge brique/rose	0,39
			Marron foncé	0,51	Jaune verdâtre	0,51
			Marron clair	0,60	Bleu foncé	0,60
<b>Huile essentielle de Miracle</b>	Pourpre sombre/rose	0,39	Marron clair	0,16	Bleu clair	0,16
				0,22		0,22
				0,34		0,34
	Jaune	0,51	Marron clair	0,37	Rouge brique/rose	0,37
			Marron foncé	0,51	Jaune verdâtre	0,51
			Marron clair	0,60	Bleu foncé	0,60
<b>Thymoquinone</b>	Jaune	0,51	Marron foncé	0,51	jaune verdâtre	0,51
<b>Thymol</b>	Pourpre sombre	0,40	Marron clair	0,40	Rouge brique	0,40
<b>Carvacrol</b>	Rose sombre	0,37		0,37	Rose	0,37
<b>Carvone</b>	Marron	0,44		0,44	Violet	0,44

Selon la littérature scientifique, très peu de travaux de recherches se sont intéressées aux caractérisations des huiles essentielles des graines de *N. sativa* par les méthodes analytiques de routine telle que la CCM (110), l'HPLC (High performance liquid chromatography) (110) ou par CPG ou CPG/SM (102, 107).

Les résultats obtenus ont montré que ces huiles présentent un polymorphisme très important aussi bien sur le plan quantitatif comme sur le plan qualitatif (les constituants majoritaires et leurs proportions) vraisemblablement à mettre en rapport avec des facteurs précédemment cités. En effet, Bourgou *et al.* (102) ont trouvé que le composant major de l'huile essentielle extraite des graines cultivé en Tunisie est le p-cymène (60,5%) suivi de l' $\alpha$ -Thujene (6,9%), alors que la thymoquinone et le carvacrol présentent un taux faible de 3% et 2,4% respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Benkaci-Ali *et al.* (107) où le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant qui a été également identifié

dans l'huile essentielle extraite par deux méthodes différentes; l'hydrodistillation et distillation par micro-onde à partir des graines de *N. sativa* cultivées au Sahara algérien (Timimoune et Adrar).

### III. Caractérisation microbiologique des souches étudiées

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée selon la méthode standard de l'antibiogramme (82). L'antibiogramme effectué sur chaque souche a permis d'étudier leur comportement vis-à-vis de plusieurs antibiotiques incluant les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les macrolides, les fluoroquinolones et autres.

Pour les souches cliniques de staphylocoques et à la lumière des antibiogrammes obtenus (Tableau 9), il ressort que ces souches sont caractérisées par une résistance à haut niveau (absence totale d'inhibition) vis-à-vis de certains antibiotiques de type  $\beta$ -lactamines (pénicilline, oxacilline) et de types non  $\beta$ -lactamines (ciprofloxacine, erythromycine et kanamycine). Cette résistance apparaît moindre pour certains antibiotiques tels que la céfoxitine, l'amikacine et l'acide fusidique (zone d'inhibition comprise entre 12 à 16cm). Par ailleurs, il semble que *S. haemolyticus* est sensiblement plus résistante vis-à-vis de la pristnamycine, de la vancomycine et de la gentamycine que *S. aureus* (917/D<sub>1</sub>). Le dépistage de la résistance à l'oxacilline par le test du disque de céfoxitine (30 $\mu$ g) sur gélose M-H normale est positif pour ces souches et les diamètres d'inhibition obtenus sont inférieurs aux diamètres critiques (82). Enfin, la rifampicine reste l'antibiotique le plus actif sur ces souches.

**Tableau 9.** Antibiogrammes des souches à Gram<sup>+</sup>.

Antibiotiques	OX	P	FOX	AN	GN	K	PT	E	FA	CIP	VA	RA
	Diamètres des zones d'inhibitions en mm											
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	50	44	28	23	25	25	28	30	27	28	19	30
<i>S. aureus</i> (917/D)	R	R	16	16	24	R	25	R	12	R	18	30
<i>S. haemolyticus</i> (329/U)	R	R	16	14	15	R	16	R	14	R	13	30

L'analyse globale des résultats obtenus confirme la multi-résistance de ces souches isolées à plusieurs groupes d'antibiotiques comparativement au *S. aureus* ATCC 25923.

Conformément à la littérature scientifique, des résultats similaires ont été rapportés en Tunisie par Hamdad *et al.* (89) et Mastouri *et al.* (181) qui ont démontré que la résistance des souches clinique de *S. aureus* à l'oxacilline est due à la modification de la cible d'action par production d'une nouvelle PLP appelée PLP2a ou PLP2'. Ce PLP (codé par le gène *mecA*) présente une affinité moindre pour la plupart des  $\beta$ -lactamines (résistance croisée entre les différentes molécules de la famille des  $\beta$ -lactamines) (25, 89, 90, 91, 182). Le phénotype observé chez *S. aureus* (917/D<sub>1</sub>) et *S. haemolyticus* laisse supposer que ces souches sont résistantes à la méthicilline ou à l'oxacilline par modification de la cible. D'un point de vue épidémiologique, la résistance par acquisition du gène *mecA* est plus grave car ce gène est porté par un élément génétique mobile pouvant non seulement favoriser la dissémination de la résistance à l'oxacilline mais aussi à transporter d'autres gènes codant pour la résistance à d'autres classes d'antibiotiques (89, 181, 182). En outre, *S. haemolyticus* a montré une sensibilité diminuée à la vancomycine (d=13mm). Le mécanisme de la diminution de sensibilité des souches au vancomycine (glycopeptide) d'une manière générale est mal déterminé. Le principal élément notable est l'existence d'un épaissement de la paroi de la bactérie mais le support génétique de cette modification structurale reste encore inconnu (182).

Concernant les entérobactéries étudiées et d'après les antibiogrammes obtenus (Tableau 10), il apparaît que toutes les souches étudiées présentent une résistance de haut niveau à l'amoxicilline et au chloramphénicol. En revanche, ces souches sont sensibles à l'imipénème, à la céfoxitine et à la fosfomycine. Les souches de *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. coli* (975/D) et *M. morganii* sont sensiblement résistantes à la céfazoline et à la combinaison clavulanate/amoxicilline. Alors que, *P. mirabilis* et *E. coli* (142/U) sont globalement sensibles à ces antibiotiques. De même, les isolats ont des profils de résistance variés au céfotaxime, au céftazidime, à la gentamycine, à l'amikacine et au ciprofloxacine. Pour les souches résistantes aux C3G et à l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, la détection de BLSE réalisée grâce au test de synergie est positive dans 100% des cas, elle est confirmée par le test de doubles disques.

**Tableau 10.** Antibiogrammes des souches à Gram<sup>-</sup> (Familles d'entérobactériaceae).

Antibiotiques	AMX	CZ	CTX	CAZ	FOX	IMP	AMC	FOS	AN	GN	CS	CIP	C
	Diamètres des zones d'inhibitions en mm												
<i>E. coli</i> ATCC 25922	26	18	34	36	34	38	30	30	27	24	27	40	30
<i>K. pneumoniae</i> (13/D)	R	R	18	14	19	37	14	26	R	14	16	30	R
<i>S. marcescens</i> (13/D)	R	R	15	14	19	32	14	24	12	13	R	30	8
<i>E. coli</i> (975/D)	R	R	20	12	21	30	15	26	23	20	21	R	R
<i>M. morgani</i> (185/U)	R	R	30	26	21	30	14	15	24	26	R	22	R
<i>E. coli</i> (142/U)	R	13	34	34	25	31	30	26	22	24	18	40	R
<i>P. mirabilis</i> (807/D)	8	13	34	28	26	25	24	12	24	19	R	20	8

D'une manière générale, la résistance acquise par production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme le plus prépondérant chez les entérobactéries. Sur les six souches testées, les résultats et l'aspect des antibiogrammes retrouvés chez *K. pneumoniae*, *S. marcescens* et chez *E. coli* (975/D<sub>2</sub>) sont fortement évocateurs d'une BLSE de classe A d'Ambler, plasmidiques vraisemblablement de type CTX-M. Ces résultats sont en concordance avec ceux rapportés dans la littérature (37, 57, 183, 184) qui ont démontrés que la résistance au céfotaxime est due à ce type d'enzyme. Ces souches ont aussi des profils de résistances associé à d'autres antibiotiques non  $\beta$ -lactamines (gentamycine, amikacine, colistine et au chloramphénicol). La multirésistance de ces souches pourrait être liée à la présence de séquences d'insertions (*ISEcp1*) qui leur permettent d'acquérir de nombreux gènes de résistances (notamment aux aminosides et aux quinolones) (2, 3, 57, 58, 185). De plus, la plupart des souches productrices de BLSE de type CTX-M sont résistantes aux fluoroquinolones comme la ciprofloxacine. Cette résistance est due principalement aux modifications des topoisomérases (22, 101) ou

pourrait être expliquée par la diffusion de déterminants plasmidiques (Qnr et AAC (6')-Ib-cr) associés aux CTX-M (2, 3, 51, 55, 56, 57).

Pour la souche de *M. morginanii* (185/U), le phénotype de résistance observé semble appartenir aux  $\beta$ -lactamases de type TRI. Cette souche est naturellement résistante à la combinaison l'amoxicilline/clavulanate et à la colistine. Par contre, l'utilisation de la combinaison tazobactam/piperacilline est la plus efficace sur cette souche (donne des zones d'inhibition plus importante) (Figure 20c) comme il a été démontré dans de nombreux travaux (8, 55).

Les souches de *P. mirabilis* et *E. coli* (142/U) qui présentent une hypersensibilité vis-à-vis de l'ensemble des  $\beta$ -lactamines testés, à l'exception de l'amoxicilline, sont probablement productrices de pénicillinases. La résistance d'*E. coli* (142/U) au chloramphénicol pourrait être lié au phénomène de l'imperméabilité via l'expression d'un systèmes d'efflux de type AcrA-AcrB-Tolc (transporteur multi-drogues) (99), ou à l'acquisition d'un gène *cat* codant pour une enzyme, le chloramphénicol acétyl transférase (CAT), capable d'inactiver l'antibiotique par transfert de groupes acétyles à partir d'acétyl COA sur l'antibiotique (186).

Concernant les autres bacilles à Gram<sup>-</sup> et d'après les antibiogrammes obtenus (Tableau 11), il apparaît que toutes les souches présentent une résistance de haut niveau à la ticarcilline, à l'exception de *P. aeruginosa* (890/D), et à l'imipénème (diamètre d'inhibition inférieur à 11mm). De ce fait, elles sont désignées comme le groupe des souches résistantes à l'imipénème ou plus significativement de phénotype «Imipénème<sup>R</sup> ». En revanche, la pipéracilline, la céftazidime, l'association piperacilline/tazobactam et l'aztreonam agissent à des niveaux variables selon les souches. Enfin, toutes ces souches sont sensibles à l'ensemble des antibiotiques de type non  $\beta$ -lactamines testées.

**Tableau 11.** Antibiogrammes des souches à Gram<sup>-</sup> (Familles de pseudomonaceae).

Antibiotiques	TIC	CAZ	ATM	PIP	TZP	IMP	IMP+EDTA	GN	AN	TM	CIP	CS
	Diamètres des zones d'inhibitions en mm											
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25927	32	38	26	30	28	29	29	27	26	24	32	20
<i>A. baumannii</i> (720/P)	R	R	22	R	R	11	23	23	16	20	22	18
<i>P. aeruginosa</i> (49/D)	R	13	21	20	18	11	25	25	24	23	26	18

<i>P. aeruginosa</i> (890/D)	23	27	19	30	26	10	11	22	26	24	30	22
<i>S. maltophilia</i>	13	38	11	R	16	R	27	15	20	21	26	18

Pour la souche clinique d'*A. baumannii* (720/P) qui s'est avérée résistante à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines testés incluant l'imipénème, à l'exception de l'aztreonam, les tests du disque combiné et de synergie (IMP/EDTA) sont positif (augmentation du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque d'IMP imbibées par 10ul d'EDTA avec observation d'une image de synergie entre les deux disques), alors que le test de synergie IMP/TZP est négatif contre cette souche. Dans ce cas, le phénotype obtenu laisse supposer que cette résistance pourrait être due à la production par la bactérie d'une métallo-béta-lactamases ou encore dite carbapénémase de classe B d'Ambler (souvent de type IMP-2). Les résultats obtenus sont en concordance avec ceux rapportés dans plusieurs travaux (1, 2, 5, 6, 64, 74) à travers lesquels, il a été démontré que la résistance des souches d'*A. baumannii* à l'imipénème est principalement due à ce type d'enzyme codé par le gène *bla*<sub>IMP</sub>. En outre, la résistance des souches d'*A. baumannii* à l'imipénème pourrait être liée secondairement à d'autre mécanisme à savoir l'AmpC et son hyperproduction, à l'oxacillinases naturelle (de type OXA23) à activité carbapénémase, hydrolyse les pénicillines et l'imipénème, mais non le céfotaxime et la céftazidime, (75) et à l'imperméabilité membranaire. Cette imperméabilité pourrait être confirmée phénotypiquement par la forte résistance des souches à la fois à l'imipénème et à l'aztreonam ; étant donné que les deux antibiotiques utilisent la même porine pour accéder à l'espace périplasmique de la bactérie.

Pour la souche de *P. aeruginosa* (49/D<sub>2</sub>), les résultats obtenus sont compatibles à ceux trouvés chez *A. baumannii* (720/P). De ce fait, le phénotype métallo-béta-lactamases a été suspecté en autre pour cette souche. Il peut être de type *imipenèmases* (1, 64, 65, 66, 67). Ce phénotype se distingue des BLSE de la classe D d'Ambler qui correspondent aux oxacillinases à spectre étendu, caractérisés phénotypiquement par la résistance à la céftazidime et une sensibilité souvent marquée à l'imipénème (66, 187). De plus, plusieurs auteurs ont montré l'existence chez les souches de *P. aeruginosa* d'une porine nommé Opr D<sub>2</sub>, responsable du transport spécifique des carbapénèmes, qui dont l'absence ou leur altération par mutation chromosomique explique la résistance isolée de ces souches à l'imipénème (résistance non croisé aux autres antibiotiques de type  $\beta$ -lactamines) (66, 88, 93, 94). Ce phénotype a été

observé chez la souche clinique de *P. aeruginosa* (890/D), sensible à toutes les  $\beta$ -lactamines sauf à l'imipénème, qui dont les tests du disque combiné IMP/EDTA et de synergie IMP/TZP sont négatifs.

Concernant la souche de *S. maltophilia* testée, les tests de synergie pour la détection de BLSE et du disque combiné IMP/EDTA sont positifs, alors que le test de synergie IMP/TZP est négatif. De ce fait, il est fortement probable que cette souche exprime deux enzymes distinctes à savoir une métallo-béta-lactamase (résistance à l'imipénème) et une sérine  $\beta$ -lactamases qui semble explique la résistance de la souche à la ticarciline et au céfotaxime d'une part et la synergie observée entre le disque de la céftazidime de la ticarcilline et le disque contenant l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases d'autre part. En effet, il a été rapporté que ces enzymes chromosomiques inductibles, désignés L1 et L2 respectivement, sont présentes naturellement chez les souches de *S. maltophilia* (3, 4, 188) dont l'hyperproduction de L2 par rapport à L1 explique les synergies quelque fois obtenues entre le disque de la céftazidime, le céfotaxime ou encore l'aztreonam et le disque contenant l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases. En Outre, l'existence d'autres  $\beta$ -lactamases que L1 et L2 produites par *S. maltophilia* a été suggérée pour la première fois par Cullman et Dick (189). D'autres études ont confirmé la présence de BLSE de type CTX-M chez ces souches (3). Enfin, le phénomène d'imperméabilité ou d'efflux peuvent expliquer également la résistance de la souche aux  $\beta$ -lactamines (3, 4).

## **IV. Activité antibactérienne des huiles essentielles**

### **• La méthode de diffusion en milieu gélosé**

L'activité antibactérienne des différents agents testés a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur 15 souches bactériennes. Cette activité varie en fonction du diamètre des halos d'inhibition obtenus autour des disques imprégnés de 10 $\mu$ l d'huiles essentielles ou d'autres agents. Selon la classification de *Carovic–Stanko et al.* (116), lorsque le diamètre est inférieur ou égal à 10mm, l'agent antibactérien n'a pas d'effet inhibiteur et la sensibilité de la souche est nulle. Pour un diamètre compris entre 10mm à 15mm, l'agent antibactérien présente un effet modéré et la souche est de sensibilité moyenne. Enfin, pour un



diamètre supérieur à 15mm, l'agent est hautement actif et la souche est de phénotype hyper sensible.

Sur l'ensemble des souches à Gram<sup>+</sup> testées (Tableau 12), le phénotype hypersensible a été observé chez *S. aureus* ATCC 25923 et *S. haemolyticus* vis-à-vis de l'huile essentielle obtenus à partir de l'huile commerciale d'*Abou el Kacem* (HE<sub>1</sub>) et des principaux constituants utilisés (le thymoquinone, le thymol et le carvacrol). A l'opposé, l'huile essentielle obtenue à partir de l'huile de *Miracle* (HE<sub>2</sub>) s'est avérée inactive vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923. En effet, les deux huiles extraites exercent une activité bactériostatique, à la concentration de 1000µg/disque, vis-à-vis de *S. haemolyticus*. En revanche, à la concentration de 500µg/disque, les principaux constituants utilisés exercent un effet bactéricide contre les deux souches. Par ailleurs, la souche de *S. aureus* (917/D) résistante à l'oxacilline s'est avérée aussi résistante aux huiles extraites. D'autre part, le thymol et le carvacrol ont un effet modéré et bactéricide sur cette souche alors que le thymoquinone semble être l'agent le plus actif dont l'effet est bactéricide (d=30mm) équivalent à celui de la rifampicine (d=30mm). Enfin, il apparaît que ces monoterpènes testés ont une activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 et *S. haemolyticus* supérieure à celle de la rifampicine comparativement aux huiles extraites qui ont exhibé une activité moindre mais supérieure à la pristinamycine (d=28 mm et 16mm pour les deux souches respectivement).

**Tableau 12.** Activité antibactérienne des huiles essentielles extraites et des principaux constituants, exprimée par le diamètre d'inhibition (en mm), vis-à-vis des bactéries à Gram<sup>+</sup>.

Concentrations Agents		250µg/disque		500µg/disque		1000µg/disque	
		Paramètres					
		diamètres (en mm)	nature de l'effet	diamètres (en mm)	nature de l'effet	diamètres (en mm)	nature de l'effet
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	HE <sub>1</sub>	12	S	17	S	32	S
	HE <sub>2</sub>	R	—	R	—	R	—
	Thymoquinone	17	C	45	C	55	C
	Thymol	11	—	16	C	48	C
	Carvacrol	12	—	17	C	30	C
<i>S. aureus</i> (917/D)	HE <sub>1</sub>	R	—	8	—	10	—
	HE <sub>2</sub>	R	—	7	—	9	—
	Thymoquinone	10	—	18	C	30	C
	Thymol	10	—	10	—	15	C
	Carvacrol	10	—	10	—	13	C
<i>S. haemolyticus</i> (329/U)	HE <sub>1</sub>	7	—	8	—	19	S
	HE <sub>2</sub>	9	—	17	S	26	S
	Thymoquinone	28	C	36	C	44	C
	Thymol	17	C	25	C	31	C
	Carvacrol	9	—	10	—	16	C

**C** : effet bactéricide, **S** : effet bactériostatique de l'agent testé, **R** : pas d'inhibition.

Concernant les bactéries à Gram<sup>-</sup> testées (Tableau 13), les huiles essentielles extraites ont présentées une forte activité inhibitrice et bactéricide vis-à-vis de *S. maltophiliae* et *A. baumannii* à la concentration de 1000µg/disque supérieure à celle de la ciprofloxacine (d= 22 et 26mm) et de la combinaison IMP/EDTA (d= 25 et 23mm) pour les deux souches respectivement. Par ailleurs, l'HE<sub>1</sub> s'est avérée très active sur *E. coli* ATCC 25922 et *P. mirabilis* avec des effets bactéricides et bactériostatiques respectivement comparativement à l'HE<sub>2</sub> qui présente des effets similaires avec une activité modérée sur ces souches. D'autre part, les autres bactéries, à l'exception de *M. morgani* qui a montré une sensibilité intermédiaire (d=13mm), se sont avérées résistantes et l'activité des huiles extraites est considérée comme nulle (Tableau 13). Enfin, les principaux constituants utilisés ont exhibés des activités antibactériennes et bactéricides très significative, à la concentration de 1000µg/disque contre toutes les souches, à l'exception des deux souches cliniques de *P. aeruginosa*, en dépit de leur morphologie et de leur sensibilité ou de résistance aux antibiotiques. Cette activité est supérieure à celle des antibiotiques non β-lactamines testés (gentamycine, amikacine, colistine, ciprofloxacine et au chloramphénicol) vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 et de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Tableau 13.** Activité antibactérienne des huiles essentielles et des principaux constituants, exprimée par le diamètre d'inhibition (en mm), vis-à-vis des bactéries à Gram<sup>-</sup>.

Agents	250µg/disque		500µg/disque		1000µg/disque		
	Paramètres						
	diamètres (en mm)	nature de l'effet	diamètres (en mm)	nature de l'effet	diamètres (en mm)	nature de l'effet	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	HE <sub>1</sub>	10	—	13	S	17	C
	HE <sub>2</sub>	R	—	9	—	13	C
	Thymoquinone	19	C	30	C	30	C
	Thymol	14	C	21	C	42	C
	Carvacrol	20	C	32	C	46	C
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25927	HE <sub>1</sub>	8	—	8	—	8	—
	HE <sub>2</sub>	8	—	8	—	8	—
	Thymoquinone	10	—	10	—	14	S
	Thymol	10	—	15	C	17	C
	Carvacrol	10	—	13	S	17	S
<i>K. pneumoniae</i> (13/D)	HE <sub>1</sub>	R	—	R	—	8	—
	HE <sub>2</sub>	R	—	R	—	R	—
	Thymoquinone	8	—	9	—	13	C
	Thymol	15	C	19	C	42	C
	Carvacrol	15	—	21	—	31	C
<i>S. maecescens</i> (13/D)	HE <sub>1</sub>	R	—	R	—	8	—
	HE <sub>2</sub>	R	—	R	—	R	—
	Thymoquinone	8	—	9	—	13	C
	Thymol	10	—	14	C	17	C
	Carvacrol	13	C	15	C	22	C
<i>E. coli</i> (975/D)	HE <sub>1</sub>	R	—	R	—	R	—
	HE <sub>2</sub>	R	—	R	—	R	—
	Thymoquinone	9	—	9	—	11	—
	Thymol	10	—	16	C	34	C
	Carvacrol	14	C	23	C	27	C
<i>E. coli</i> (142/U)	HE <sub>1</sub>	R	—	R	—	R	—
	HE <sub>2</sub>	R	—	R	—	R	—
	Thymoquinone	11	—	13	C	17	C
	Thymol	13	C	18	C	40	C
	Carvacrol	12	C	19	C	32	C
<i>P. mirabilis</i> (807/D)	HE <sub>1</sub>	R	—	R	—	17	S
	HE <sub>2</sub>	8	—	10	—	13	S
	Thymoquinone	8	—	10	—	12	S
	Thymol	13	S	17	S	22	S
	Carvacrol	10	—	13	S	18	S
<i>M. morgani</i> (185/U)	HE <sub>1</sub>	8	—	10	—	13	C
	HE <sub>2</sub>	10	—	10	—	13	S
	Thymoquinone	15	C	21	C	24	C
	Thymol	11	—	16	C	27	C
	Carvacrol	14	C	19	C	44	C
<i>A. baumannii</i> (720/P)	HE <sub>1</sub>	14	S	19	S	26	C
	HE <sub>2</sub>	12	C	15	C	34	C
	Thymoquinone	19	C	22	C	24	C
	Thymol	16	C	34	C	57	C
	Carvacrol	18	C	40	C	59	C
<i>S. maltophilia</i>	HE <sub>1</sub>	10	—	18	C	24	C
	HE <sub>2</sub>	R	—	14	C	21	C
	Thymoquinone	15	C	19	C	25	C
	Thymol	12	C	30	C	45	C
	Carvacrol	15	C	40	C	47	C
<i>P. aeruginosa</i> (49/D)	HE <sub>1</sub>	8	—	8	—	8	—
	HE <sub>2</sub>	R	—	R	—	R	—
	Thymoquinone	9	—	9	—	9	—
	Thymol	9	—	9	—	9	—
	Carvacrol	8	—	8	—	8	—
<i>P. aeruginosa</i> (890/D)	HE <sub>1</sub>	8	—	8	—	8	—
	HE <sub>2</sub>	R	—	R	—	R	—
	Thymoquinone	8	—	8	—	8	—
	Thymol	8	—	10	—	15	S
	Carvacrol	9	—	10	—	13	S

C : effet bactéricide, S : effet bactériostatique de l'agent testé, R : pas d'inhibition.

A la lumière des résultats obtenus, il apparaît que les diamètres d'inhibition et les effets exercés (bactériostatique ou bactéricide) varient selon la nature et la concentration de l'agent antibactérien et la bactérie testée. En effet, l'activité antibactérienne attribuée aux huiles

essentielles extraites sur certaines souches pourrait être expliquée par son profil chimique probablement riche en monoterpènes oxygénés (le thymoquinone, le thymol et le carvacrol) composés connus par leurs pouvoirs antibactériens et préalablement identifiés comme l'un des constituants majeurs de ces essences par chromatographie. Ces mêmes constatations ont été rapportées par plusieurs auteurs qui ont montré que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la nigelle est vraisemblablement due à leurs constituants majeurs notamment le thymoquinone, le thymohydroquinone, le longifolène, le thymol et le carvacrol (102, 151, 190). D'autre part, il a été établi que l'huile fixe de la nigelle testée sur 20 souches de *Listeria monocytogenes* de diverses origines a donné des zones d'inhibition, varient de 25 à 39mm, supérieures à celle de la gentamycine. Cette activité semble être attribuée à l'huile essentielle contenue dans ces huiles fixes particulièrement à la thymoquinone, au thymol, au carvacrol (151) et au dithymoquinone (163). En revanche, le faible pouvoir antibactérien de l'HE<sub>2</sub> comparativement à l'HE<sub>1</sub> est probablement en relation avec sa teneur élevée en p-cymène, monoterpène hydrocarboné, connu pour sa faible activité antibactérienne et qui agit le plus souvent par synergie avec le carvacrol dans l'huile essentielle de la nigelle (102). L'activité peut-être également expliquée par l'interaction probable (synergie, antagoniste) entre les composés mineurs et certains constituants majeurs de ces huiles dont l'efficacité dépend de l'activité de chaque composé (102, 113, 116, 121, 122, 126, 191). Enfin, la faible activité des huiles essentielles par rapport aux principaux constituants testés pourrait être le résultat d'un effet antagoniste probable entre leurs différents constituants (123, 127, 128) d'une part, à leur faible diffusion à travers la membrane cellulaire notamment la membrane externe qui entoure la paroi des bactéries à Gram<sup>-</sup> (caractères hydrophiles) et à leur faible solubilité au sein du milieu de culture d'autre part (102, 114, 121, 126).

De façon général, l'activité antibactérienne des huiles essentielles peut-être expliquée par le fait que ces composés lipophiles s'accumulent souvent dans la bicouche phospholipidique de la membrane cytoplasmique, principale cible des huiles, provoquant ainsi l'augmentation de leur fluidité (102, 106, 113, 118, 119, 121, 122) et de leur perméabilité au biomolécules intracellulaires telles que les ions de potassium (K<sup>+</sup>), les protons (H<sup>+</sup>), l'ATP et les acides nucléiques et/ou d'interférer avec la chaîne respiratoire de la bactérie ce qui entraîne la mort cellulaire (apoptose) (102, 118, 123, 124). Ces modes d'action ont été attribués à l'huile essentielle de *Zataria multiflora* Boiss (126, 132, 138), d'*Origanum vulgare* (121, 123, 124, 129), de *Thymus vulgaris* (114, 127, 129, 192), de *Nigella sativa* (102) et de *Croton zehntneri*

(122) contre *S. aureus* et *E. coli*. En outre, il a été démontré que l'huile essentielle de *Croton zehntneri* possède un effet synergique avec les antibiotiques comme la gentamicine diminuant ainsi l'antibiorésistance de *P. aeruginosa* (122). Mann *et al.* (193), ont déjà démontré que la membrane externe de *P. aeruginosa* forme une barrière face à la perméabilité des huiles essentielles. La présence de la polymixine B lors de l'exposition de la culture de *P. aeruginosa* à l'huile essentielle de *Malaleuca alternifolia* augmente la perméabilité de la membrane à cette essence et la souche devient alors sensible (193).

En plus, la différence de sensibilité des bactéries à Gram<sup>-</sup> aux huiles extraites peut être due aux mécanismes de résistance développée par chaque germe pour contrecarrer leur action. Ainsi, il ressort que les souches productrices de métallo-béta-lactamases sont les plus sensibles que celle productrices de BLSE ou de pénicillinases, ce qui laisse supposer que les huiles essentielles de la nigelle exercent un effet inhibiteur sur les β-lactamases de la classe B, mais non pas sur ceux de la classe A d'Ambller.

En ce qui concerne les principaux constituants utilisés (Thymoquinone, thymol et carvacrol), les résultats obtenus ont permis de confirmer leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de tous les bactéries testées indépendamment de leur Gram, de leur morphologie et de leur sensibilité ou résistance aux antibiotiques à l'exception des deux souches cliniques de *P. aeruginosa* souvent reconnues par leur résistance intrinsèque vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens naturelles ou synthétiques (190). Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Halawani (190) qui a prouvé que le thymoquinone avait une activité antibactérienne très significative vis-à-vis des souches à Gram<sup>+</sup> (*S. aureus*) et à Gram<sup>-</sup> (*P. aeruginosa*, *S. typhirium*, *S. enteritidis* et *Shigella flexeneri*) résistantes aux antibiotiques standards tels que les aminosides, les macrolides, le chloramphénicol, les tétracyclines et les fluoroquinolones.

Selon la littérature scientifique, le mécanisme d'action de la thymoquinone de la nigelle peut être dû à une perturbation de la structure membranaire des microorganismes (102). En plus, il a été rapporté que les quinones sont capables de se complexer irréversiblement avec les acides aminés nucléophiles des protéines conduisant souvent à leur inactivation et à la perte de leurs fonctions ce qui explique leur activité antimicrobienne (194). Leurs cibles probables au sein de la cellule microbienne seraient les protéines d'adhésion de surface, les polypeptides de la paroi et les enzymes membranaires (194).

Par ailleurs, il a été démontré que les huiles essentielles riches en dérivés phénoliques (carvacrol et thymol) (105, 114, 119, 120, 121, 125, 126), aldéhydes et cétones (102) possèdent une forte activité antimicrobienne. D'autre part, Mahboubi et Bidgoli, (138) ont établis que l'activité anti-staphylocoques (*S. aureus*) de l'huile essentielle de *Zataria multiflora* semble due au composés phénoliques majeurs qu'elle renferme notamment le thymol et le carvacrol. Des études réalisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1999) ont également montrés que le thymol n'est pas actif sur *P. aeruginosa* mais exerce un effet inhibiteur et létal sur *S. aureus*, *E.coli* et *S. typhimurium* par fuite d'ions de  $K^+$ . Ce phénomène est expliqué par le fait que le thymol se lie aux protéines membranaires hydrophobes par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes altérant ainsi la perméabilité membranaire de la cellule bactérienne (124, 195). Enfin, Ultee *et al.* (196) ont montré que le carvacrol agit sur la membrane de *Bacillus cereus* par dissolution des phospholipides de la bicouche lipidique entraînant probablement l'alignement observés entre les chaînes des acides gras. Ce changement de conformation physique augmente la fluidité et la perméabilité membranaire notamment aux ions  $K^+$  réduisant ainsi le pH du milieu intra cellulaire de la bactérie ce qui conduit à leur mort (121, 124, 195, 196). D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes (altération de leur structure) y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure, traduisant ainsi l'effet bactéricide connus pour ce composé (118, 121, 124, 127, 129).

- **Méthode en phase gazeux (la micro-atmosphère)**

La méthode de micro-atmosphère est utilisée dans le but d'estimer les propriétés antibactériennes des composés volatiles constituant les huiles essentielles extraites pour les utiliser ultérieurement comme désinfectant atmosphérique. La quantité minimale inhibitrice (QMI) ou bactéricide (QMB) de la croissance bactérienne des extraits est évaluée sur les quinze souches. L'apparition d'une zone translucide (halo d'inhibition) dans les boîtes contenant l'huile essentielle imprégnant les disques reflète l'effet inhibiteur et bactéricide de ces composés volatiles. La mesure du diamètre de ces zones permet de classer les bactéries qui peuvent appartenir aux phénotypes résistant (inférieur ou égal à 0,5 cm), peu sensible (supérieur ou égal à 1cm), sensible (compris entre 2 à 3cm) et hypersensible (supérieur à 3cm) (134).

A la lumière des résultats obtenus, il apparaît que l'activité inhibitrice de la phase volatile des huiles essentielles extraites sur les bactéries à Gram<sup>+</sup> est comparable surtout vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923. En effet, pour 10µl et 20µl d'extraits et après 24 heures d'incubation, les diamètres d'inhibition mesurables vis-à-vis de cette souche sont de l'ordre de 4,2 et 5,5cm pour l'HE<sub>1</sub> et de 3 et 4,5cm pour l'HE<sub>2</sub> respectivement (Figure 16a). Par ailleurs, aucune croissance n'est visible à partir de la quantité de 30µl pour l'HE<sub>1</sub>, les boîtes gélosées sont entièrement translucides. Par contre, le diamètre du halo d'inhibition est de 7,2cm pour l'HE<sub>2</sub>. Ces résultats sont sensiblement semblables à ceux obtenus contre la souche clinique de *S. haemolyticus*. Dans les deux cas, la concentration de 1000µg/disque (10µl) correspond à la quantité minimale inhibitrice en huile essentielle à effet bactériostatique (Tableau 14) car après 7 jours de ré-incubation à 37<sup>0</sup>C, les souches bactériennes ont repoussé à nouveau. En revanche, cette quantité est insuffisante pour inhiber la croissance de *S. aureus* (917/D). Par contre, lorsque cette concentration est de 2000µg/disque (20µl), la souche devient sensible avec une zone translucide de 2,4 et 1,3cm pour l'HE<sub>1</sub> et l'HE<sub>2</sub> respectivement. Cette concentration est bactériostatique pour cette souche (Tableau 14). Enfin, l'apparition de colonies blanches à partir de 48 heures d'incubation jusqu'aux 7 jours est vraisemblablement l'un des comportements typique des *Staphylococcus sp* face à ce nouveau environnement. En effet, les colonies nouvellement apparues sont relativement corpulentes, éparées proche de la zone d'inhibition et se densifient progressivement jusqu'à être aussi confluentes que le tapis bactérien des témoins.

**Tableau 14.** Activité antibactérienne des huiles essentielles extraites en micro atmosphère vis-à-vis des bactéries à Gram<sup>+</sup>.

Bactéries	Paramètres		QMI (µl)	QMB (µl)
	Agents			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	HE <sub>1</sub>		10	Nd
	HE <sub>2</sub>		10	Nd
<i>S. aureus</i> (917/D)	HE <sub>1</sub>		20	Nd
	HE <sub>2</sub>		20	Nd
<i>S. haemolyticus</i> (329/U)	HE <sub>1</sub>		10	Nd
	HE <sub>2</sub>		10	Nd

**Nd:** les QMB n'ont pas déterminées (Supérieurs à 30µl).

Pour les bactéries à Gram<sup>-</sup>, les souches d'*E. coli* ATCC 25922, de *S. maltophiliae*, d'*A. baumannii* et de *P. mirabilis* se sont avérées les plus sensibles en micro atmosphère

quelque soit la concentration de l'huile utilisée (Tableau 15). Les halos d'inhibitions centrales obtenus, à la concentration de 1000µg/ml, varient entre 1,3 et 1.4cm et entre 2.3 et 2.5cm pour les deux huiles, HE<sub>1</sub> et HE<sub>2</sub>, vis-à-vis d'*A. baumannii* et *S. maltophilia* respectivement. Ces halos restent totalement translucides, même après 7j ours d'incubation à 37<sup>0</sup>C ce qui signifie que la QMI (1000µg/disque) est la QMB. A noter que l'HE<sub>1</sub> présente une activité plus forte vis-à-vis de *M. morgani* avec un diamètre de 3cm à la concentration de 1000µg/disque en comparaison à l'HE<sub>2</sub> dont le diamètre n'est que de 1.7cm à une concentration de 2000µg/disque. Enfin, les souches de *K. pneumonie*, *S. marcescens*, *E. coli* (142/U), *E. coli* (975/D) et les souches de *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa* ATCC 25927, *P. aeruginosa* (49/D) et *P. aeruginosa* (890/D), apparaissent résistantes à ces huiles même à des concentrations élevées (3000µg/disque).

**Tableau 15.** Activité antibactériennes des huiles essentielles de la nigelle en micro atmosphère vis-à-vis des bactéries à Gram<sup>-</sup>.

Bactéries	Paramètres		QMI (µl)	QMB (µl)
	Agents			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	HE <sub>1</sub>		10	10
	HE <sub>2</sub>		10	10
<i>A. baumannii</i> (720/P)	HE <sub>1</sub>		10	10
	HE <sub>2</sub>		10	10
<i>S. maltophilia</i>	HE <sub>1</sub>		10	10
	HE <sub>2</sub>		10	10
<i>M. morgani</i> (185/U)	HE <sub>1</sub>		10	10
	HE <sub>2</sub>		20	30
<i>P. mirabilis</i> (807/D)	HE <sub>1</sub>		10	30
	HE <sub>2</sub>		10	30

De façon général, l'hyper sensibilité de ces bactéries aussi bien en micro atmosphère qu'en milieu gélosé a déjà été observée par plusieurs auteurs (128, 129, 134, 135). Ceci peut être expliqué par le fait que la diffusion des composés volatiles de l'huile essentielle se fait essentiellement dans la phase gazeuse à cause de leur faible solubilité en milieu gélosé. La volatilité des composés des huiles essentielles dépend de leurs polarités et de leurs points d'ébullition. Le mode d'action de la phase volatile de l'huile essentielle résulte de l'effet indirect à travers l'adsorption de la vapeur à la surface du milieu de culture suivie par une diffusion dans les microorganismes, il est difficile de donner une idée précise sur leur mode d'action. Il est probable que chacun des constituants d'une huile essentielle à son propre mécanisme. D'autre part, Nedorostova *et al.* (129) ont montré que les vapeurs de l'huile



essentielle de *Thymus vulgaris* et de *Mentha piperita* exhibent une forte activité antibactérienne vis-à-vis de nombreuses souches pathogènes de *S. aureus* colonisant la trachée respiratoire. Enfin, il a été établi que les huiles essentielles d'*Armoracia rusticana*, *Allium sativum*, *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Satureja montana* et de *Thymus vulgaris* sont fortement efficaces sur les souches responsables de la contamination des aliments tels que *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. typhimurium* aussi bien en phase gazeuse qu'en milieu gélosé (129).

#### • **La méthode de microdilution**

Les CMI et les CMB des huiles essentielles extraites et des principaux constituants (le thymoquinone, le thymol et le carvacrol) ont été déterminées par microdilution et en milieu solide (gélose nutritif) respectivement vis-à-vis de l'ensemble des souches étudiées. Selon la classification de Duarte *et al.* (117), lorsque la CMI est inférieure ou égale à 0.5mg/ml, comprise entre 0.6 et 1.5mg/ml ou supérieure ou égale à 1.6mg/ml ; l'activité de l'agent antibactérien utilisé sur la souche étudiée est considérée comme haute, modérée ou nulle respectivement. Par ailleurs, le calcul du rapport CMB/CMI est important pour pouvoir caractériser la nature de l'action des différents agents antibactériens testés sur une souche bactérienne. D'après Oussou *et al.* (137), un rapport CMB/CMI inférieur à 4, l'agent est dit bactéricide alors qu'un rapport supérieur ou égal à 4, l'agent est bactériostatique.

A la lumière des résultats obtenus (Tableau 16), il ressort que les deux huiles essentielles (HE<sub>1</sub> et HE<sub>2</sub>) sont hyper actives sur *E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* et sur *S. maltophilia* avec des CMI inférieures à 0.5mg/ml de l'ordre de 0.097mg/ml respectivement. Ces concentrations sont bactéricides car aucune croissance de ces souches n'a été observée après 24 heures d'incubation (CMB proche ou égale aux CMI selon les souches). Par ailleurs, les deux extraits sont également hautement actifs vis-à-vis de *S. haemolyticus* et de *P. mirabilis* avec un effet bactériostatique car les CMB trouvées (3.12 et 1.56mg/ml respectivement) sont très éloignées des CMI correspondantes (0.39mg/ml). D'autre part, l'HE<sub>1</sub> exhibe une forte activité bactéricide (CMI= CMB= 0.047mg/ml) vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 et un effet modéré et bactéricide (CMI= CMB= 0.78mg/ml) sur *M. morgani*. En revanche, l'HE<sub>2</sub> s'est avérée inactive sur *S. aureus* ATCC 25923 (CMI= 3.12mg/ml) mais très active (CMI= 0.39mg/ml) sur *M. morgani* avec un effet bactériostatique (CMB= 3.12mg/ml). Enfin, les essences testées se sont avérées inactives sur les autres souches à Gram<sup>-</sup>. Ces résultats

particulièrement pour l'HE<sub>1</sub> sont comparables avec les travaux de Bourgou *et al.* (102) qui ont évalué par la méthode de microdilution l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la nigelle récoltés en Tunisie dont les IC<sub>50</sub> sont de l'ordre de 12.0 µg/ml pour *S. aureus* ATCC 25923 et 62.0 µg/ml pour *E. coli* ATCC 25922. D'autre part, Oussou *et al.* (137, 197) ont mis en évidence les effets antibactériens (bactériostatique, bactéricide) des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum*, *Lippia multiflora* et de *Monodora myristica* sur diverses souches cliniques (*K. pneumoniae*, *Proteus sp.*, *E. coli*, *A. baumannii*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *S. marcescens* et *S. aureus*) et de références (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218). Ces effets sont certainement attribuables à la présence des composés terpéniques tels que le thymol, le carvacrol et le linalol.

Concernant les principaux constituants utilisés, il semble que toutes les bactéries testées se sont avérées hyper sensibles à ces composés (CMI inférieures à 0.5mg/ml) à l'exception de *P. aeruginosa* (49/D). A l'opposé, *P. aeruginosa* (890/D) paraît résistant à la thymoquinone (Tableau 17). Les CMI déterminées sur ces souches sont bactéricides car ces concentrations sont égales ou un peu éloignées aux CMB trouvées. Le rapport CMB/CMI est égal à 1 et reflète ainsi leurs effets bactéricides sauf pour la thymoquinone dont l'effet est bactériostatique envers *P. mirabilis* et *P. aeruginosa* ATCC 27853 car la CMB trouvée est très éloignée (CMB= 6.25mg/ml) de la CMI correspondante avec des rapports de 16 et 32 respectivement. Ces résultats particulièrement ceux de la thymoquinone sont en concordance avec les résultats obtenus par Bougou *et al.* (102) qui ont trouvé que ce composé est très actif sur *S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922 avec des IC<sub>50</sub> (Concentration inhibitrice à 50%) de l'ordre de 0.3µg/ml et 0.6µg/ml respectivement. Ces auteurs ont montré aussi que le p-Cymène (60.05%), constituant majeur de l'huile extraite, est dépourvue de toutes activités antibactériennes vis-à-vis de ces deux souches. Par ailleurs, il a été établi que la thymoquinone exhibe une activité modérée avec un effet bactéricide (CMI= CMB= 800µg/ml) sur les deux souches cliniques à savoir *E. coli* (résistante à l'acide nalidixique) et *Salmonella thyphimerium* (résistante à l'ampicilline et aux tétracyclines) et apparaît très actif sur *S. aureus* ATCC 25923 (CMI= 3µg/ml) et sur *S. aureus* résistante à l'ampicilline et à la gentamycine (CMI= 6µg/ml) avec un effet bactériostatique (CMB= 400µg/ml) (190).

**Tableau 16.** Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide des huiles essentielles extraites.

	Agents	Paramètres			
		CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétations
<b>Bactéries à Gram<sup>+</sup></b>					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	HE <sub>1</sub>	0.047	0.047	1	C
	HE <sub>2</sub>	3.12	Nd	/	/
<i>S. aureus</i> (917/D)	HE <sub>1</sub>	3.12	Nd	/	/
	HE <sub>2</sub>	3.12	Nd	/	/
<i>S. haemolyticus</i> (329/U)	HE <sub>1</sub>	0.39	3.12	8	S
	HE <sub>2</sub>	0.39	1.56	4	S
<b>Bactéries à Gram<sup>-</sup></b>					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	HE <sub>1</sub>	0.097	0.195	2	C
	HE <sub>2</sub>	0.195	0.195	1	C
<i>K. pneumoniae</i> (13/D <sub>2</sub> )	HE <sub>1</sub>	3.12	Nd	/	/
	HE <sub>2</sub>	3.12	Nd	/	/
<i>S. marcescens</i> (13/D <sub>2</sub> )	HE <sub>1</sub>	3.12	Nd	/	/
	HE <sub>2</sub>	6.25	Nd	/	/
<i>E. coli</i> (975/D)	HE <sub>1</sub>	6.25	Nd	/	/
	HE <sub>2</sub>	6.25	Nd	/	/
<i>M. morgani</i> (185/U)	HE <sub>1</sub>	0.78	0.78	1	C
	HE <sub>2</sub>	0.39	3.12	8	S
<i>E. coli</i> (142/U)	HE <sub>1</sub>	1.56	Nd	/	/
	HE <sub>2</sub>	3.12	Nd	/	/
<i>P. mirabilis</i> (807/D)	HE <sub>1</sub>	0.39	1.56	4	S
	HE <sub>2</sub>	0.39	6.25	16	S
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	HE <sub>1</sub>	1.56	Nd	/	/
	HE <sub>2</sub>	3.12	Nd	/	/
<i>A. baumannii</i> (720/P)	HE <sub>1</sub>	0.097	0.195	2	C
	HE <sub>2</sub>	0.097	0.097	1	C
<i>S. maltophilia</i>	HE <sub>1</sub>	0.097	0.097	1	C
	HE <sub>2</sub>	0.097	0.097	1	C
<i>P. aeruginosa</i> (49/D)	HE <sub>1</sub>	3.12	Nd	/	/
	HE <sub>2</sub>	1.56	Nd	/	/
<i>P. aeruginosa</i> (890/D)	HE <sub>1</sub>	6.25	Nd	/	/
	HE <sub>2</sub>	1.56	Nd	/	/

**Nd** : les **CMB** correspond au **CMI** ne seront pas déterminés (pour les souches ayant des CMI supérieurs ou égales à 1.6 mg/ml), **C** : effet bactéricide et **S** : effet bactériostatique.

**Tableau 17.** Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide des principaux constituants de l'huile essentielle de la nigelle.

Agents	Paramètres				
	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétations	
<b>Bactéries à Gram<sup>+</sup></b>					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Thymoquinone	0.047	0.047	1	C
	Thymol	0.047	0.047	1	C
	Carvacrol	0.047	0.047	1	C
<i>S. aureus</i> (917/D)	Thymoquinone	0.097	0.195	2	C
	Thymol	0.39	0.39	1	C
	Carvacrol	0.78	1.56	2	C
<i>S. haemolyticus</i> (329/U)	Thymoquinone	0.047	0.047	1	C
	Thymol	0.097	0.097	1	C
	Carvacrol	0.047	0.047	1	C
<b>Bactéries à Gram<sup>-</sup></b>					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Thymoquinone	0.097	0.195	2	C
	Thymol	0.047	0.047	1	C
	Carvacrol	0.047	0.047	1	C
<i>K. pneumoniae</i> (13/D <sub>2</sub> )	Thymoquinone	0.39	0.39	1	C
	Thymol	0.047	0.097	2	C
	Carvacrol	0.047	0.097	2	C
<i>S. marcescens</i> (13/D <sub>2</sub> )	Thymoquinone	0.39	0.78	2	C
	Thymol	0.097	0.097	1	C
	Carvacrol	0.097	0.097	1	C
<i>E. coli</i> (975/D)	Thymoquinone	0.39	0.39	1	C
	Thymol	0.097	0.097	1	C
	Carvacrol	0.097	0.097	1	C
<i>M. morgani</i> (185/U)	Thymoquinone	0.097	0.195	2	C
	Thymol	0.097	0.097	1	C
	Carvacrol	0.047	0.047	1	C
<i>E. coli</i> (142/U)	Thymoquinone	0.195	0.195	1	C
	Thymol	0.047	0.047	1	C
	Carvacrol	0.047	0.047	1	C
<i>P. mirabilis</i> (807/D)	Thymoquinone	0.39	6.25	16	S
	Thymol	0.097	3.12	32	S
	Carvacrol	0.097	6.25	64	S
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Thymoquinone	0.39	12.5	32	S
	Thymol	0.097	0.097	1	C
	Carvacrol	0.097	6.25	64	S
<i>A. baumannii</i> (720/P)	Thymoquinone	0.097	0.097	1	C
	Thymol	0.047	0.047	1	C
	Carvacrol	0.047	0.047	1	C
<i>S. maltophilia</i>	Thymoquinone	0.097	0.097	1	C
	Thymol	0.097	0.097	1	C
	Carvacrol	0.097	0.097	1	C
<i>P. aeruginosa</i> (49/D)	Thymoquinone	6.25	Nd	/	/
	Thymol	1.56	Nd	/	/
	Carvacrol	1.56	Nd	/	/
<i>P. aeruginosa</i> (890/D)	Thymoquinone	6.25	Nd	/	/
	Thymol	0.39	6.25	16	S
	Carvacrol	0.39	3.12	8	S

Les résultats de l'activité antibactérienne assise par les différentes méthodes révèlent que les valeurs de CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition et les résultats de micro-atmosphère et que les souches ayant apparues résistantes par la méthode de diffusion se sont avérées aussi insensibles dans la méthode de dilution en milieu liquide. Par conséquent, il est indispensable de compléter les tests en milieu solide par ceux effectués en milieu liquide. Enfin, les valeurs des CMI, des CMB et des diamètres d'inhibition des tests de comparaison montrent que les deux souches cliniques d'*A. baumannii* et de *S. maltophiliae* sont les plus sensibles aux huiles essentielles de la nigelle et aux principaux constituants testés. Ces souches sont connues pour leur pouvoir pathogène, leur antibiorésistance et comme agents causatifs de nombreuses infections nosocomiales et communautaires (Tableau 1). Cette bio-activité permet ainsi d'envisager l'utilisation traditionnelles des huiles et les graines de la nigelle macérée dans l'huile d'olive ou dans le miel dans le traitement de diverses maladies infectieuses telles que les infections urinaires, les dermatoses et les lésions suppuratives. Cette forme d'huiles essentielles dont les principes actifs (thymoquinone, thymol, carvacrol) peuvent être employés dans plusieurs domaines tels que le domaine pharmaceutique comme puissant agents antibactériens vis-à-vis des souches résistants aux  $\beta$ -lactamines, dans le domaine cosmétiques, mais aussi dans le domaine agro-alimentaire comme agents conservateurs de certains aliments tels que les jus et les yaourts sur de plus longues périodes afin de réduire les risques de contamination alimentaires. Néanmoins, il doit prendre en compte l'impact organoleptique que pourraient amener les propriétés aromatiques marquées de ces composés sur le produit final.

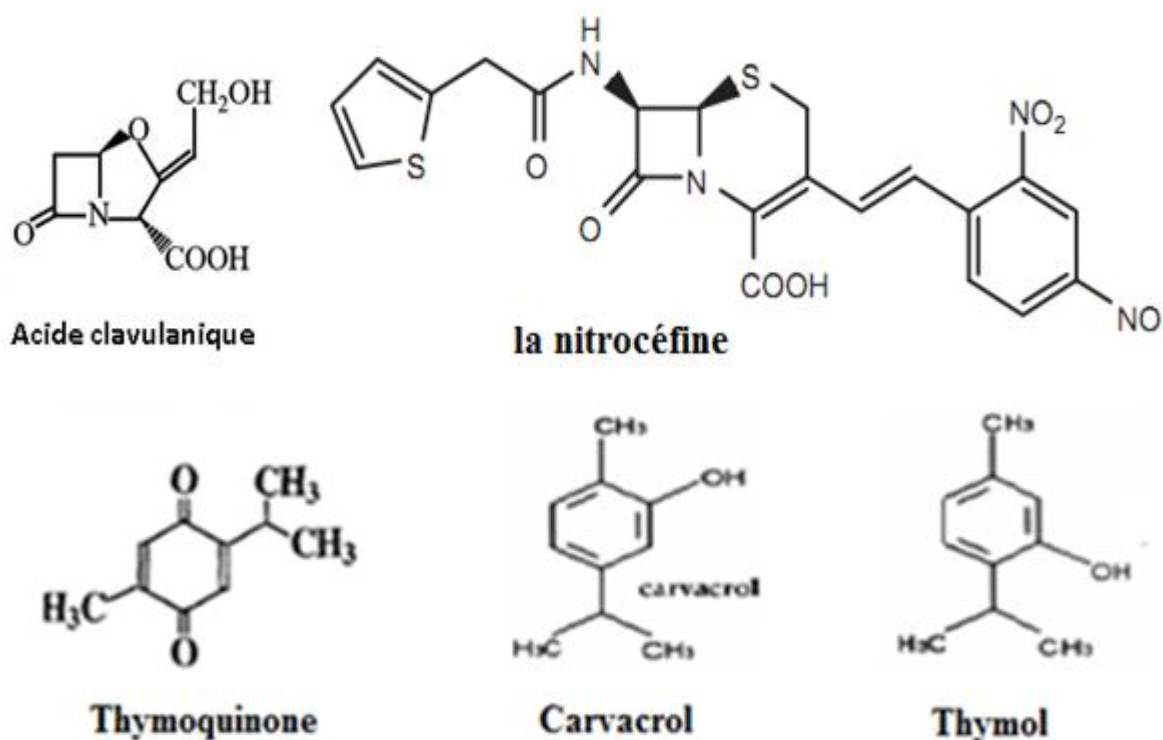
## **V. Effet des huiles essentielles sur l'activité de la pénicillinase**

La pénicillinase est une  $\beta$ -lactamase de classe A d'Ambler qui a pour substrat spécifique la nitrocéfine. Pour évaluer l'effet des huiles essentielles sur cette enzyme, nous avons établie au préalable les paramètres cinétiques de la réaction de la catalyse enzymatique. La vitesse maximale ( $V_{max}$ ) et la constante de Michaelis et Menten ( $K_M$ ) ont été déterminé en utilisant la représentation de Lineweaver et Burk. Des résultats obtenus, il ressort que  $V_{max}$  est de  $3.63 \times 10^{-4}$   $\mu$ mole/min et  $K_M$  est de 1mM.

L'étude de l'effet inhibiteur des huiles essentielles et des principaux constituants a été déterminée en incubant 10 $\mu$ l de ces solutions préparées dans le DMSO, à une concentration de 2.5mg/ml, avec 10 $\mu$ l de solution enzymatique (1nM) durant 20min à 25<sup>0</sup>C. La nitrocéfine

(10 $\mu$ l) à des concentrations variables, de 1, 0.5, 0.25, 0.12 et 0.06mM, est alors ajoutée au milieu réactionnel et les absorbances sont déterminées au temps zéro et 20 min. Les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique en présence de ces divers agents sont déterminés de la même manière que précédemment.

A la lumière des résultats obtenus, il semble que les huiles essentielles extraites, le thymoquinone, le thymol et le carvacrol ne présentent aucune activité inhibitrice vis-à-vis de la pénicillinase. En effet, les  $V_{max}$  obtenues sont soit nulles dans le cas de l'HE<sub>1</sub>, du thymol et du carvacrol soit supérieures à celle obtenue en absence d'inhibiteurs dans le cas d l'HE<sub>2</sub> et de la thymoquinone. A l'opposé, l'acide clavulanique utilisé ou testé à la concentration de 2.5mg/ml (12.5mM) dans la combinaison amoxicilline/clavulanate commercialisée (augmentin<sup>®</sup>) qui exerce une activité inhibitrice dose-dépendante très marquée. En effet, la vitesse d'hydrolyse de la nitrocéfine en présence de l'acide clavulanique est inchangée en comparaison à celle obtenue en absence de ce composé ( $V_{max}=3.63 \times 10^{-4}$   $\mu$ mole/min). Cependant, le  $K_M$  augmente significativement en présence de l'acide clavulanique ( $K_M=1.66$ mM) ce qui reflète que ce dernier est un inhibiteur compétitif (diminuant l'affinité de l'enzyme pour son substrat) vis-à-vis de cette pénicillinase (Figure 32). A l'inverse de l'acide clavulanique, aucune analogie structurale n'est présente entre les principaux constituants utilisés et la nitrocéfine (Figure 18).



**Figure 18.** Structures chimique de l'a. clavulanique, de la nitrocéfine et des principaux constituants de l'huile essentielle de la nigelle.

Enfin, l'absence de l'effet inhibiteur des huiles essentielles extraites vis-à-vis de la pénicillinase testée explique la résistance des souches cliniques (*M. morginarii* (185/U), *E. coli* (975/D<sub>2</sub>), *K. pneumonie* (13/D), *S. marcescens* (13/D) et *E. coli* (142/U) productrices de certains enzymes de classe A d'Ambler, à l'exception de *P. mirabilis* (807/D) à ces huiles extraites due principalement à la présence de la membrane externe qui entoure la paroi des bactéries à Gram<sup>-</sup> (102, 114, 121, 126, 192) et secondairement à ces enzymes. Par contre le pouvoir inhibiteur des principaux constituants testés vis-à-vis de ces souches peut être dû à d'autres cibles d'action telles que les membranes cellulaires pour le thymol (124, 195), les protéines d'adhésion de surface, les polypeptides de la paroi et les enzymes membranaires (194) pour le thymoquinone, par dissolution des phospholipides de la bicouche lipidique des membranes cellulaires (121, 124, 195, 196) ou par inactivation d'enzymes impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure (118, 121, 124, 127, 129) pour le carvacrol.



## Conclusion générale

L'activité physiologique de *Nigella sativa* appartenant à la famille des Ranunculaceae n'est pas un leurre ne serait ce qu'à cause de certains de ces composants chimiques, comme les huiles essentielles qui sont majoritaires par rapport à d'autres métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines, etc.

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir de deux huiles fixes commerciales de la nigelle ont donné lieu à des rendements de l'ordre de 1.02 % et 4.03 % pour l'huile d'*Abou el Kacem* et de *Miracle* respectivement. La nature des principaux constituants chimiques déterminée par CCM a permis d'identifier le thymoquinone, le thymol et/ou le carvacrol comme des composés majeurs de ces huiles extraites.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites et des principaux constituants (le thymoquinone, le thymol et le carvacrol) évaluée par différentes méthodes (l'aromatogramme, la micro atmosphère et la microdilution) sur les 12 souches bactériennes isolées à partir de divers prélèvements provenant de patients hospitalisés au niveau du centre hospitalo-

universitaire (CHU) de Sétif dont les mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ont été établis au préalable.

Sur l'ensemble des souches à Gram<sup>+</sup> testées, l'huile essentielle d'*Abou el Kacem* a présenté une forte activité antibactérienne supérieure à celle de la pristinamycine avec des effets bactériostatiques vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 et *S. haemolyticus*. Par ailleurs, la souche de *S. aureus* (917/D) résistante à l'oxacilline s'est avérée aussi résistante aux huiles extraites. En revanche, les principaux constituants utilisés ont révélé des activités inhibitrices et bactéricides les plus notables, supérieures à celle de la rifampicine, vis-à-vis de l'ensemble de ces souches.

Concernant les bactéries à Gram<sup>-</sup> testées, les huiles extraites ont présenté une forte activité inhibitrice et bactéricide vis-à-vis de *S. maltophilia* et *A. baumannii* supérieure à celle de la ciprofloxacine et de la combinaison imipénème/EDTA pour les deux souches respectivement. Par ailleurs, l'huile essentielle d'*Abou el Kacem* s'est avérée très active sur *E. coli* ATCC 25922 et *P. mirabilis* avec des effets bactéricides et bactériostatiques respectivement comparativement à l'huile essentielle de *Miracle* qui présente des effets similaires avec une activité modérée. Enfin, les principaux constituants utilisés ont exhibé des activités antibactériennes et bactéricides très significatives contre toutes ces souches, à l'exception des deux souches cliniques de *P. aeruginosa*. Cette activité est supérieure à celle des antibiotiques non  $\beta$ -lactamines testés (gentamycine, amikacine, colistine, ciprofloxacine et au chloramphénicol) vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 et de *P. aeruginosa* ATCC 27853. De façon générale, ces activités varient en fonction de la technique utilisée, de la souche testée et de la concentration appliquée.

Les tests d'inhibition de la pénicillinase par les huiles essentielles et des principaux constituants ont démontré que ces divers agents ne présentent aucune activité inhibitrice vis-à-vis de cette enzyme comparativement à l'acide clavulanique (12.5mM) contenu dans la combinaison amoxicilline/clavulanate commercialisée (augmentin<sup>®</sup>) dont l'activité inhibitrice est de type compétitive.

## Perspectives

Concernant la caractérisation des huiles essentielles de la nigelle extraites, une étude complémentaire doit être réalisée par GPC ou par GPC/SM pour établir leurs compositions fine et précises.

La caractérisation phénotypique des divers mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches isolées reste approximative pour déterminer avec exactitude le type d'enzyme produit par ces souches. Cette étude doit être complétée par une caractérisation moléculaire par la PCR permettant d'identifier le gène codant et/ou éventuellement les mutations (substitutions de résidus d'acides aminés) qui sont à l'origine de ce phénomène.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites ont montré des effets bactériostatique et bactéricide notables vis-à-vis de certaines souches. A l'opposé, les principaux constituants utilisés (le thymoquinone, le thymol et le carvacrol) se sont avérées très actives avec des effets bactéricides sur l'ensemble des souches testées indépendamment de leurs Gram, de leurs morphologies et de leurs sensibilités ou résistances aux antibiotiques.

L'activité antibactérienne de ces huiles ne peut pas être attribuée seulement à leurs constituants majeurs (le thymoquinone, le thymol et le carvacrol) mais à d'autres composés contenus dans ces extraits. Ces produits pourraient trouver une application possible dans le traitement des différentes infections d'origine bactérienne notamment les infections urinaires ou purulentes à titre de substitution ou en combinaison avec des antibiotiques vis-à-vis des souches bio-résistantes. Cette activité pourrait être élargie dans la future à d'autres microorganismes tels que *Salmonella typhie* (typhoïde), *Hélicobacter pylori* (les ulcères), *Listeria monocytogenes* (listérioses), *mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), les levures et les champignons. Pour établir une corrélation avec les résultats obtenus *in-vitro*, ces mêmes activités doivent être déterminés sur des animaux (*in-vivo*) avant tous usages clinique ou vétérinaire. Des essais de toxicité primaire et d'allergie cutanée sont indispensables pour établir leurs innocuités.

Enfin, l'évaluation des huiles essentielles et des principaux constituants comme alternative aux inhibiteurs suicides de  $\beta$ -lactamases de la classe A d'Ambler, type pénicillinase, montre une certaine limite. Ces produits apparus inactifs vis-à-vis de l'enzyme testé semble par

ailleurs actifs (indirectement) sur des métallo-béta-lactamases à la lumière de l'activité antibactérienne observée en présence de l'imipénème (antibiotique inactif sur ces souches productrices de ce type d'enzyme). Par conséquent, des études d'activité inhibitrice de ces huiles extraites et de certains de leurs constituants majeurs vis-à-vis de cette enzyme s'avèrent nécessaires.

# *Références bibliographiques*

1. Altoparlak, U., Aktas, F., Celebi, D., Ozkurt, Z., Mufide, N., Akcay. (2005). Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns*, 31: 707–710.
2. Livermore, D. M., Woodford, N. (2006). The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.*, 14: 413–420.
3. Lavigne, J. P., Gaillard, J. B., Bourg, G., Tichit, C., Lecaillon, E., Sotto A. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains: CTX-M enzymes detection and virulence study. *Pathol. Biol.*, 56: 447–453.
4. Looney, W. J., Narita, M., Mühlemann, K. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect. Dis.*, 9: 312–23.
5. Ho, P. L., Ho, A. Y., Chow, K. H., Lai, E. L., Ching, P., Seto, W. H. (2010). Epidemiology and clonality of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from a health care region in Hong Kong. *J. Hosp. Infect.*, 74: 358–364.
6. Gordon, N. C., Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35: 219–226.
7. Barman, S., Hens, D. K., Koley, H., Niyogi, S. K., Kumar, R. (2008). Chromosomal and plasmid encoded drug resistances of a *Klebsiella pneumoniae* UTI 2 strain isolated from urine of a post-operative patient. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 2693–2697.
8. Mahamat, A., Lavigne, J. P., Bouziges, N., Daurès, J. P., Sotto, A. (2006). Profils de résistance des souches urinaires de *Proteus mirabilis* de 1999 à 2005 au CHU de Nîmes. *Pathol. Biol.*, 54: 456–461.
9. Messai, Y., Iabadene, H., Benhassine, T., Alouache, S., Tazir, M., Gautier, V., Arlet, G., Bakour, R. (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol. Biol.*, 56: 319–325.
10. Mahrouki, S., Ben-Achour, N., Chouchani, C., Ben-Moussa, M., Belhadj, O. (2009). Identification of plasmid-encoded extended spectrum b-lactamases produced by a clinical strain of *Proteus mirabilis*. *Pathol. Biol.*, 57: e55–e59.
11. Tam, V.H., Kimberly, R., Ledesma, Changa K.T., Wanga, T.Y., Quinn, J.P. (2009). Killing of *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactams at different inocula. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 64: 166–171.

12. Makinson, A., Le Moing, V. (2008). New anti-Gram<sup>+</sup> antibiotics: Which role in infective endocarditis?. *Ann. Cardiol. Angeiol.*, 57: 88–92.
13. Maurer, P., Koch, B., Zerfa, I., Krau, J., Linden, M. V., Frère, J. M., Contreras-Marte, C., Hakenbeck, R. (2008). Penicillin-binding-Protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: Three New Mutational Pathways for Remodelling an Essential Enzyme into a Resistance Determinant. *J. Mol. Biol.*, 376: 1403–1416.
14. Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Ben Zakour, N., Chacornac, J. P., Lebert, I., Jamet, E., Desmots, M. H., Coton, E., Pochet, S., Donnio, P. Y., Gautier, M., Talon, R., Le Loir, Y. (2010). Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.*, 139: 87–95.
15. Moulin, F., Quinet, B., Raymond, J., Gillet, Y., Cohen R. (2008). Managing children skin and soft tissue infections. *Arch. Pediatr.*, 15: S62–S67.
16. Martin, N., Mousset, B., Duprez, J. N., Gregoire, F., Hoyoux, linden, Mainil, J. (2007). Profils de résistance aux antibiotiques de souches d'*Enterococcus sp* et d'*Escherichia coli* isolées dans les matières fécales de sangliers et cervidés sauvages. *Ann. Med. Vet.*, 151: 55–60.
17. Islam, S. (2008). Chromosomal antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria gonorrhoeae*. Published by Karolinska institutet. University US-AB, Stockholm, Sweden.
18. Chaabane, A., Aouama, K., Boughattas, N. A., Chakroun, M. (2009). Allergy to beta-lactams: Myth and realities. *Med. Mal. Infect.*, 39: 278–287.
19. Nathwani, D. (2009). New antibiotics for the management of complicated skin and soft tissue infections: are they any better?. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34: S24–S29.
20. Jung, B., Chanques, G., Ghiba, M., Cisse, M., Rossel, N., Perrigault, P. F., Souche, B., Jean-Pierre, H., Jaber, S. (2010). Expérience de l'utilisation de la tigecycline dans le traitement des infections sévères en réanimation : une étude pilote. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, (article in press).
21. Nseir, S., Ader, F., Marquette, C. H., Durocher, A. (2005). Impact de l'utilisation des fluoroquinolones sur l'émergence des bactéries multirésistantes. *Pathol. Biol.*, 53: 470–475.

22. Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Gros Claude, J. D. P., Timinouni, M. (2009). Qnr and aac (6')-Ib-cr types quinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolated in Annaba, Algeria. *Pathol. Biol.*, (article in press).
23. Macheboeuf, P., Lemaire, D., Teller, N., Martins Ados, S., Luxen, A., Dideberg, O., Jamin, M., Dessen, A. (2008). Trapping of an acyl-enzyme intermediate in a penicillin-binding-protein (PBP) catalyzed reaction. *J. Mol. Biol.*, 376: 405–413.
24. Stefanova, M., Bobba, S., William, G., Gutheil. (2010). A microtiter plate-based  $\beta$ -lactam binding assay for inhibitors of high-molecular-mass penicillin-binding proteins. *Anal. Biochem.*, 396: 164–166.
25. Forestier, E., Rémya, V., Mohseni-Zadeha, M., Lesens, O., Jauhlac, B., Christmann, D., Hansmann, Y. (2007). MRSA Bacteremia: recent epidemiological and therapeutical trends. *Rev. Med. Interne*, 28: 746–755.
26. Cattoir. V., Daurel. C. (2009). Update on antimicrobial chemotherapy. *Med. Mal. Infect.*, (article in press).
27. Tewes, F., Brillault, J., Couet, W., Olivier, J. C. (2008). Formulation of rifampicin–cyclodextrin complexes for lung nebulization. *J. Control. Release*, 129: 93–99.
28. Andremont, A. (2005). Comment définir le potentiel de sélection de la résistance bactérienne aux antibiotiques ?. *Med. Mal. Infect. Suppl.*, 35: S207–S211.
29. Tandé, D. (2005). Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques. Elsevier Masson. France, pp: 21–29.
30. Dublanchet, A., Fruciano, E. (2008). Brève histoire de la phagothérapie. *Med. Mal. Infect.*, 38: 415–420.
31. Babic, M. A., Hujer, A. M., Bonomo, R. A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Update*, 9: 142–156.
32. Falagas, M. E., Karageorgopoulos, D. E. (2009). Extended-spectrum beta-lactamase producing organisms. *J. Hosp. Infect.*, 73: 345–354.
33. Xia, Y., Cao, K., Zhou, Y., Alley, M. R. K., Rock, F., Mohan, M., Meewan, M., Stephen, J., Baker, Lux, S., Charles, Z., Ding, Jia, G., Kully, M., Jacob, J., Plattner. (2011). Synthesis and SAR of novel benzoxaboroles as a new class of  $\beta$ -lactamases inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (article in press).
34. Abraham, E. P., Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nat.*, 146: 837.



35. Picot, S., Rakotomalala, R. S., Farny, K., Simac, C., Michault, A. (2010). Évolution de la résistance aux antibiotiques de 1997 à 2005 à la Réunion. *Med. Mal. Infect.*, 40: 617–624.
36. Buehlmann, M., Bruderer, T., Frei, R., Widmer, A. F. (2011). Effectiveness of a new decolonization regimen for eradication of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae. *J. Hosp. Infect.*, 77: 113–117.
37. Holstein, A., Grillon, A., Yzon, L., Morange, V., Baty, G., Lartigue, M. F., Mereghetti, L., Goudeau, A., Lanotte, P. (2010). Prévalence des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumonia* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu de type CTX-M à l'hôpital Bretonneau (CHRU de Tours). *Pathol. Biol.*, 58: 67–69.
38. Ghuysen, J. M. (1991). Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin binding proteins. *Rev. Annu. Microbiol.*, 45: 37–67.
39. Charlier, P., Coyette, J., Dehare, D., Dive, G., Duez, C., Dusart, J., Fonzé, É., Fraipont, C., Frère, J. M., Galleni, M., Goffin, C., Joris, B., Josette, Lamotte-Brasseur, J., Martine, Distèche, N. (1998). Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines. *Med. Sci.*, 14: 544–555.
40. Livermore, D. M. (1998). B-Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41: 25–41.
41. Frère, J. M. (1995).  $\beta$ -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.*, 16: 385–395.
42. Wehrman, T., Kleaveland, B., Her, J. H., Robert, F., Balint, Helen, M. B. (2002). Protein–protein interactions monitored in mammalian cells via complementation of beta-lactamase enzyme fragments. *PNAS*, 99: 3469–3474.
43. Heinz, U., Adolph, H. W. (2004). Metallo-beta-lactamases: two binding sites for one catalytic metal ion?. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61: 2827–2839.
44. Oelschlaeger, P. (2008). Outsmarting metallo-beta-lactamases by mimicking their natural evolution. *J. Inorg. Biochem.*, 102: 2043–2051.
45. Gardonio, D., Siemann, S. (2009). Chelator-facilitated chemical modification of IMP-1 metallo-beta-lactamase and its consequences on metal binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381: 107–111.
46. Richmond, M. H., Sykes, R. B. (1973). The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 9: 31–88.

47. Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 1211–1233.
48. Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.*, 289: 321–331.
49. Thomson, K. S., Moland, E. S. (2000). Version 2000: the new  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbe Infect.*, 2: 1225–1235.
50. Rayamajhi, N., Kang, S. G., Lee, D. Y., Kang, M. L., Lee, S. I., Park, K. Y., Lee, H. S., Yoo, H. S. (2008). Characterization of TEM, SHV and AmpC type  $\beta$ -lactamases from cephalosporin resistant Enterobacteriaceae isolated from swine. *Int. J. Food Microbiol.*, 124: 183–187.
51. Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59:165–174.
52. Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M., Bonomo, R. A. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 7: 459–469.
53. Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14: 11–32.
54. Paterson, D. L., Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18: 657–686.
55. Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14: 144–153.
56. Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P. (2008). Genetic support of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14: 75–81.
57. Ben Achour, N., Mercuri, P.S., Power, P., Belhadj, C., Ben Moussa, M., Galleni, M., Belhadj, O. (2009). First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. *Pathol. Biol.*, 57: 343–348.
58. Leotard, S., Negrin, N. (2010). Epidemiology of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase in GRASSE hospital (2005–2008). *Pathol. Biol.*, 58: 35–38.

59. Carrer, A., Nordmann, P. (2009). CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: A change in the epidemiology of ESBL. *Pathol. Biol.*, (article in press).
60. Daniel, R., Sundin, Ph. (2009). Hidden  $\beta$ -lactamases in the Enterobacteriaceae—Dropping the Extra Disks for Detection, Part II. *Clin. Microbiol. Newsl.*, 31: 47–52.
61. Jean, B., Patel, Ph. D., Rasheed J. K., Brandon Kitchel, M. S. (2009). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology and Laboratory Detection. *Clin. Microbiol. Newsl.*, 31: 55–62.
62. Bennett, J. W., Mende, K., Herrera, M. L., Yu, X., Lewis, J. S. 2nd, Wickes, B. L., Jorgensen, J. H., Murray, C. K. (2010). Mechanisms of carbapenem resistance among a collection of Enterobacteriaceae clinical isolates in a Texas City. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 66: 445–448.
63. Philippon, A., Dusart, J., Joris, B., Frère, J. M. (1998). The diversity, structure and regulation of  $\beta$ -lactamases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54: 341–346.
64. Aggoune-Khinache, N., Bensersa, D., Henniche, F. Z., Daoudi, M., Abdouni, M. A., Chabani, A., Tiouit, D., Naim, M. (2009). Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Med. Mal. Infect.*, 39: 413–414.
65. Zhao, W.H., Hu, Z.Q., Shimamura, T. (2008). Potency of IMP-10 metallo-beta-lactamase in hydrolysing various antipseudomonal  $\beta$ -lactams. *J. Med. Microbiol.*, 57: 974–979.
66. Lepelletier, D., Cady, A., Caroff, N., Marraillac, J., Reynaud, A., Lucet, J. C., Corvec, S. (2010). Imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal carriage among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 66: 1–6.
67. Lincopan, N., Neves, P., Mamizuka, E. M., Levy, C. E. (2010). Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *Int. J. Infect. Dis.*, 14: e344–e347.
68. Weile, J., Knabbe, C. (2010). Authors reply to: Re: A VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in an acute hospital in Germany. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35: 100.
69. Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M., Frère, J. M. (1999). The  $\beta$ -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat. Prod. Reprod.*, 16: 1–19.

70. Wang, Q., Cheng, J., Chen, Y., Ye, Y., Li, J. B., Zhang, X. J. (2008). Characterization of a Novel AmpC-Type Plasmid-Mediated  $\beta$ -Lactamase from an *Escherichia coli* Strain Isolated in China. *Curr. Microbiol.*, 57: 558–563.
71. Gueudet, T., Richter, S., Szulc, M., Jehl, F. (2010). Extension of antimicrobial drugs resistance: Two clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with cephalosporinase. *Med. Mal. Infect.*, 40: 177–179.
72. Doi, Y., Paterson, D. L. (2007). Detection of plasmid-mediated class C  $\beta$ -lactamases. *Int. J. Infect. Dis.*, 11: 191–197.
73. Golemi, D., Maveyraud, L., Vakullenko, B., Mendelson, J. (2000). The first structural and mechanistic insights for class D  $\beta$ -lactamases: Evidence for a novel catalytic process for turnover of  $\beta$ -lactams antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 6132–613.
74. Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P. (2008). Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14: 42–52.
75. Zong, Z., Lü, X., Valenzuela, J. K., Partridge, S. R., Iredell, J. (2008). An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 31: 50–54.
76. Buynak, J. D. (2006). Understanding the longevity of the  $\beta$ -lactam antibiotics and of antibiotic/  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *Biochem. Pharmacol.*, 71: 930–940.
77. Coleman, K. (2006). Extending the life of  $\beta$ -lactam antibiotics: New  $\beta$ -lactamase inhibitors drug discovery today: therapeutic strategies. *Microbiol.*, 3: 183–188.
78. Wright, G. D. (2000). Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. *Chem. Biol.*, 7: R127–R132.
79. Padayatti, P. S., Helfand, M. S., Totir, M. A., Carey, M. P., Carey, P. R., Bonomo, R. A., Van den Akker, F. (2005). High Resolution Crystal Structures of the trans-Enamine Intermediates Formed by Sulbactam and Clavulanic Acid and E166A SHV-1  $\beta$ -lactamase. *J. Biol. Chem.*, 280: 34900–34907.
80. Therrien, C., Levesque, R. C. (2000). Molecular basis of antibiotic resistance and  $\beta$ -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol. Lett.*, 24: 251–262.
81. Bonomo, R. A., Rice, L. B. (1999). Inhibitor resistant class A  $\beta$ -lactamases. *Front Biosci*, 4: 34–41.

82. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2008). «Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS».
83. Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G., Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.*, 10: 867–78.
84. Falagas, M. E., Karageorgopoulos, D. E. (2009). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms. *J. Hosp. Infect.*, 73: 345–354.
85. Buehlmann, M., Bruderer, T., Frei, R., Widmer, A. F. (2011). Effectiveness of a new decolonization regimen for eradication of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae. *J. Hosp. Infect.*, 77: 113–117.
86. Reinthaler, F. F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G., Marth, E. (2010). ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res.*, 44: 1981–1985.
87. Lin, L., Ling, B. D., Li, X. Z. (2009). Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*–*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 33: 27–32.
88. Farra, A., Islam, S., Stralfors, A., Sorberg, M., Wretling, B. (2008). Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 31: 427–433.
89. Hamdad, F., Donda, F., Laurens, G., Canarelli, B., Rousseau, F., Biendo, M., Thomas, D., Eb, F. (2006). Performances des différentes méthodes de détection de la résistance à l'oxacilline de souche atypiques de *Staphylococcus aureus*. *Pathol. Biol.*, 54: 447–452.
90. Nguyen, V. J. C., Kitzis, M. D., Ly, A., Chalfine, A., Carlet, J., Ben Ali, A., Goldstein, F. (2006). Détection de la colonisation nasale de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline: étude prospective comparant l'amplification génique temps réel vs les milieux chromogènes sélectifs. *Pathol. Biol.*, 54: 285–292.
91. Bouchami, O., Achour, W., Ben Hassen, A. (2009). Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* encoding Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated at the Bone Marrow Transplant Centre of Tunisia. *Curr. Microbiol.*, 59: 380–385.

92. Gulmez, D., Woodford, N., Palepou, M. F. I., Mushtaq, S., Metan, G., Yakupogullari, Y., Kocagoz, S., Uzun, O., Hascelik, G., Livermore, D. M. (2008). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 31: 523–526
93. Hammami, S., Ghozzi, R., Burghoffer, B., Arlet, G., Redjeb, S. (2009). Mechanisms of carbapenem resistance in non metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathol. Biol.*, 57: 530–535.
94. Lepelletier, D., Cadya, A., Caroff, N., Marrailla, J., Reynauda, A., Lucet, J. C., Corvec, S. (2010). Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal carriage among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 66: 1–6.
95. Nikaido, H. (2001). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Dev. Biol.*, 12: 215–223.
96. Nikaido, H., Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Acta Biochim. Biophys.*, 1794: 769–781.
97. Tam, V. H., Chang, K.T., Rocco, M. T. L., Schilling, A. N., McCauley, S. K., Poole, K., Garey, K. W. (2007). Prevalence, mechanisms, and risk factors of carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 58: 309–314.
98. De Leon, G. P. (2006). An in vitro screen of bacterial lipopolysaccharide biosynthetic enzymes identifies an inhibitor of ADP-heptose biosynthesis. *Chem. Biol.*, 13: 437–441.
99. Falagas, M. E., Maraki, S., Karageorgopoulos, D. E., Kastoris, A.C., Mavromanolakise, E., Samonis, G. (2010). Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) Enterobacteriaceae isolates to fosfomycin. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35: 240–243.
100. Leclercq R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.*, 15: 482–492.
101. Ferreira, S., Toleman, M., Ramalheira, E., Da Silvad, G.J., Walsh, T., Mendo, S. (2010). First description of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates carrying both qnrA and qnrB genes in Portugal. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35: 584–586.

- 102.** Bourgou, S., Pichette, A., Marzouk, B., Legault, J. (2010). Bioactivities of *black cumin* essential oil and its main terpenes from Tunisia South African. *J. Bot.*, 76: 210–216.
- 103.** Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Techniques et Documentations*. Ed. Lavoisier. Paris, p : 56.
- 104.** Bruneton, J. (2003). Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Ed. Lavoisier. Paris, p: 254.
- 105.** Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Sarker, S. D., Moore, J. E., Rao, J. R., Mazumdar, A. (2010). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT- Food Sci. Technol.*, 44: 1199–1206.
- 106.** Boukhatem, M. N., Hamaidi, M. S., Saidi, F., Hakim, Y. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Rev. Nat. Technol.*, N° 03: 37–45.
- 107.** Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2007). Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flav. Fragr. J.*, 22: 148–153.
- 108.** Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J. M., Bernardini A. F., Costa, J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.*, 106: 132–139.
- 109.** Sandra, B., Glisic, Dusan, R., Misic, Marko, D., Stamenic, Irena, T., Zizovic, Ruzica, M., Asanin, Dejan, U., Skala. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chem*, 105: 346–352.
- 110.** Khan, M. A. (1999). Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* L. *Inflamm. Pharmacol.*, 7: 15–35.
- 111.** Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223–253.
- 112.** Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. A review. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 446–475.

113. Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phyto Med.*, 16: 97–110.
114. Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., Chatzopoulou, P. S. (2010). Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT - Food Sci. Technol.*, 4: 1240–1244.
115. Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depend on seasonal variations. *Food Chem.*, 108: 986–995.
116. Carović-Stanko, K., Orlic, S., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z. (2010). Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. *Food Chem.*, 1: 196–201.
117. Duarte, M. C., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A. A., Figueira, G. M., Sartoratto, A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J. Ethnopharmacol.*, 111: 197–201.
118. De Oliveira, T. L., Soares, D. A. R., Ramos, E. M., Cardoso, D. G. M., Alves, E., Piccoli, R. H. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja Montana* L. essential oil *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *Int. J. Food Microbiol.*, 144: 546-555.
119. Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.*, 130: 107–115.
120. Saad, A., Fadli, M., Bouazizb, M., Benharref, A., Mezrioui, E. N., Hassani, L. (2010). Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phyto Med.*, 17: 1057–1060.
121. De Barros, J. C., Da Conceição, M. L., Neto, N. J. G., Da Costa, A. C. V., Júnior, J. P. S., Junior, I. D. B., De Souza, E. L. (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Food Sci. Technol.*, 42: 1139–1143.



122. Rodrigues, F. F., Costa, J. G., Coutinho, H. D. (2009). Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phyto Med.*, 16: 1052–1055.
123. Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem.*, 112: 77–83.
124. Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., Corbo, M. R. (2009). Combined effects of thymol, carvacrol and temperature on the quality of non conventional poultry patties. *Meat Sci.*, 83: 246–254.
125. De Oliveira, C. E. V., Stamford, T. L. M., Neto, N. J. G., Souza, E. L. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *Int. J. Food Microbiol.*, 137: 312–316.
126. Saei-Dehkordi, S. S., Tajik, H., Moradi, M., Khalighi-Sigaroodi, F. (2010). Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. From different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1562–1567.
127. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414–420.
128. Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R., Nerin, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.*, 116: 982–989.
129. Nedorostova, L., P. Kloucek, Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20: 157–160.
130. Athina, G., Ntzimani, Vasiliki, I., Giatrakou, Ioannis, N., Savvaidis. (2010). Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozym , rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 1: 1187–1196.
131. Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., Mozina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J. Microbiol. Methods*, 81: 121–126.

132. Amin, M., Kalantar, E., Mohammad-Saeid, N., Ahsan, B. (2010). Antibacterial effect and physicochemical properties of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 15: 439–442.
133. Ozkan, G., Sagdic, R. O., Gokturk, S., Unal, O., Albayrak, S. (2010). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pispida*. *LWT- Food Sci. Technol.*, 43: 186–190.
134. Belaiche, P. (1979). *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome 1. Ed. Maloine, p : 280.
135. De Billerbeck, V. G., Roques, C., Vanière, P., Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles. *Hyg.*, 10: 248-250.
136. Maruzzella, J.C. (1962). The germicidal properties of perfume oils perfumery chemicals. *Am. Perfum. Cosmet.*, 77: 67–72.
137. Oussou, K. R., Yolou, S. F., Tue Bi, B., Kanko, C., Boti, J. B., Ahibo, C., Casanova, J. (2010). Etude chimique bio-guidée de l'huile essentielle de *Ocimum Gratissimum* (Lamiaceae). *Eur. J. Sci. Res.*, 40: 50–59.
138. Mahboubi, M., Bidgoli, F.G. (2010). Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phyto Med.*, 17: 548–550.
139. Zhao, J., Li, Y., Liu, Q., Gao, K. (2010). Antimicrobial activities of some thymol derivatives from the roots of *Inula hupehensis*. *Food Chem.*, 120: 512–516.
140. Benouda, A. (1982). Les propriétés antiseptiques des huiles essentielles de trois plantes médicinales marocaines : L'armoise blanche, Le thym et l'eucalyptus. Thèse de doctorat en médecine, faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.
141. Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., bourkhiss, B., Bousta, D., Talbi, M. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bord.*, 146: 85–96.
142. Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & *Reut.* et *Thymus ciliatus* (Desf.) *Benth.* du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14: 141–148.
143. Rasheed, M. U., Thajuddin, N. (2011). Effect of medicinal plants on *Moraxella catarhalis*. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, (article in press).

144. Ghedira, K. (2006). La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytother.*, 4: 1-7.
145. Guignard, J. L. (2001). In : Botanique systématique moléculaire. 12<sup>ème</sup> Edition Masson. Paris, p: 304.
146. Beloued, A. (1998). Plantes médicinales d'Algérie. 2<sup>ème</sup> Ed. Office des Publications Universitaires. Alger, p: 144.
147. Bonnier, G. (1990). La grande flore en couleur. Tome 1. Ed. Berlin. Paris, p: 17.
148. Meddah, B., Ducroc, R., El Abbas Faouzi, M., Eto, B., Mahraoui, L., Benhaddou-Andaloussi, A., Martineau, L. C., Cherrah, Y., Haddad, P. S. (2009). *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucosetolerance in rats, *J. Ethnopharmacol.*, 121: 419–424.
149. Boskabady, M. H., Mohsenpoor, N., Takaloo, L. (2010). Antiasthmatic effect of *Nigella sativa* in airways of asthmatic patients. *Phyto Med.*, 17: 707–713.
150. Antuono, F., Hamaza, K. (2002) Composition of *Nigella sativa* and *Nigella damascene* from Egypt. *Planta Med.*, 27: 142–149.
151. Nair, M. K. M., Vasudevan, P., Venkitanarayanan, K. (2005). Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 16: 395–398.
152. Salem, M. L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *Int. Immunopharmacol.*, 5: 1749–1770.
153. Shahzad, M., Yang, X., Asim, M. B. R., Sun, Q., Han, Y., Zhang, F., Cao, Y., Lu, S. (2009). Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 22: 37–43.
154. Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. (2008). Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oil. *J Food Comp. Anal.*, 21: 162–168.
155. Adamu, H. M., Ekanem, E. O., Bulama, S. (2010). Identification of Essential Oil Components from *Nigella sativa* seed by Gas Chromatography-mass Spectroscopy. *Pak. J. Nutr.*, 9: 966-967.
156. Abu-Zinadah, O. A. (2009). Using *Nigella sativa* oil to treat and heal chemical induced wound of rabbit skin. *JKAU: Sci.*, 21: 335–346.
157. Khader, M., Bresgen, N., Eckl, P.M. (2009). In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food Chem. Toxicol.*, 47: 129–133.

158. Mehta, B. K., Mehta, P., Gupta, M. (2009). A new naturally acetylated triterpene saponin from *Nigella sativa*. *Carbohydr. Res.*, 344: 149–151.
159. Salih, B., Sipahi, T., Oybak Donmez, E. (2009). Ancient nigella seeds from Boyalı Hoyuk in north-central Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, 124: 416–420.
160. Aljabre, S. H. M., Randhawa, M. A., Akhtar, N., Alakloby, O. M., Alqurashi, A. M., Aldossary, A. (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J. Ethnopharmacol.*, 101: 116–119.
161. Hanafi, M. S., Hatem, M. F. (1991). Studies on the anti-microbial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethnopharmacol.*, 34: 275–278.
162. Mahmoud H. M. A. (1993). Inhibitory action of black cumin (*Nigella sativa*) against *listeria monocytogenes*. *Alex. J. Agric. Res.*, 38: 123–134.
163. Agrawal, R., Kharya, M. D., Shrivastava, R. (1979). Antimicrobial anti-helminthic activities of the essential oil of *Nigella sativa* L. *Indian J. Exp. Biol.*, 17: 1264–1265.
164. Zuridah. H., Fairuz. A. R. M., Zakri. A. H. Z., Rahim, M. N. A. (2008). In vitro antibacterial activity of *Nigella sativa* against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. *Asian J. Plant Sci.*, 7: 331–333.
165. Mouhajir, F., Pedersen, J. A., Rejdali, M., Towers, G. H. N. (1999). Antimicrobial thymohydroquinones of Moroccan *Nigella sativa* seeds detected by spin resonance. *Pharmacol. Biol.*, 37: 391–395.
166. Morsi, N. M. (2000). Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics resistant bacteria. *Acta Microbiol. Pol.*, 49: 63–67.
167. Khan, M. A. U., Ashfaq, M. K., Zubeir, H. S., Mahmood, M. S., Gilani, A. H. (2003). The *in vivo* antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytother. Res.*, 17: 183–186.
168. Mashhadian, N. V., Rakhshandeh, H. (2005). Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. *Pak. J. Med. Sci.*, 21: 47–52.
169. El Gazzar, M., El Mezayen, R., Mark, R., Nicolls, John C., Marecki, Stephen, C., Dreskin. (2006). Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Acta Biochim. Biophys.*, 1760: 1088–1095.

170. El Mezayen, R., El Gazzar, M., Mark, R., Nicolls, John, C., Marecki, Stephen, C., Nomiya, D.H. (2006). Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol. Lett.*, 106: 72–81.
171. Houghton, P. J., Zarka, R., Heras, B., Hoult, J. R. S. (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.*, 61: 33–36.
172. Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.*, 14: 323–328.
173. Kanter, M., Meral, I., Yener, Z., Ozbek, H., Demir, H. (2003). Partial regeneration/proliferation of the  $\beta$ -cells in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, 201: 213–219.
174. Altan, M. F., Kanter, M., Donmez, S., Kartal, M. E., Buyukbas S. (2007). Combination therapy of *Nigella sativa* and human parathyroid hormone on bone mass, biomechanical behavior and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Histochem.*, 109: 304–314.
175. Musa, D., Dilsiz, N., Gumushan, H., Ulakoglu, G., Bitiren, M. (2004). Antitumor activity of an ethanol extracts of *Nigella sativa* seeds. *Biol. Bratisl.*, 59: 735–740.
176. Awad, E.M. (2005). In vitro decrease of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil. *Phyto Med.*, 12: 100–107.
177. Alhosin, M., Abusnina, A., Achour, M., Sharif, T., Muller, C., Peluso, J., Chataigneau, T., Lugnier, C., Valerie, B., Schini-Kerth, Bronner, C., Fuhrmann, G. (2010). Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochem. Pharmacol.*, (article in press).
178. Flesar, J., Havlik, J., Kloucek, P., Rada, V., Bednar, D. T. M., Stropnický, M., Kokoska, L. (2010). In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Vet. Microbiol.*, 145: 129–133.
179. El-Alfy, T. S., El-Fatary, H. M., Toama, M. A. (1975). Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Pharm.*, 30: 109–111.

- 180.** Lutterodt, H., Luther, M., Slavin, M., Yin, J. J., Parry, J., Liangli, Gao, J. M., Yu, L. (2010). Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oils. *LWT - Food Sci. Technol.*, 43: 1409–1413.
- 181.** Mastouri, M., Nour, M., Ben Nejma, M., Bouallegue, O., Hammami, M., Khedher, M. (2006). Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline: détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie. *Pathol. Biol.*, 54: 33–36.
- 182.** Daurel, C., Leclercq, R. (2008). L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Franco. Lab.*, N°407: 81–90.
- 183.** Bourouis, A., Dubois, V., Coulange, L., André, C., Bejhadj, C., Ben Moussa, M., Quentin, C., Belhadj, O. (2009). First report of CTX-M-9 in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in a Tunisian hospital. *Pathol. Biol.*, (article in press).
- 184.** Koa, K. S., Lee, M. Y., Song, J. H., Lee, H., Jung, D. S., Jung, S. I., Kim, S. W., Chang, H. H., Yeom, J. S., Kim, Y. S., Ki, H. K., Chung, D. R., Kwonk, K. T., Peck, K. R., Lee, N. Y. (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae isolated in Korean hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 61: 453–459.
- 185.** Belmonte, O., Drouet, D., Alba, J., Moiton, M. P., Kuli, B., Lugagne-Delpon N., Mourlan, C., Jaffar-Bandjee, M. C. (2010). Evolution of enterobacteriaceae resistance to antibiotics in Reunion Island: Emergence of extended spectrum beta-lactamases. *Pathol. Biol.*, 58: 18–24.
- 186.** Wareham, D. W., Wilson, P. (2002). Chloramphenicol in the 21<sup>st</sup> century. *Hosp. Med.*, 63: 157–161.
- 187.** Motoshima, M., Yanagihara, K., Yamamoto, K., Morinaga, Y., Matsuda, J., Sugahara, K., Hirakata, Y., Yamada, Y., Kohno, S., Kamihira, S. (2008). Quantitative detection of metallo-beta-lactamase of blaIMP-cluster-producing *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis for rapid diagnosis and treatment of nosocomial infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 61: 222–226.

- 188.** Nauton, L., Kahn, R., Garau, G., Hernandez, J. F., Dideberg, O. (2008). Structural Insights into the Design of Inhibitors for the L1 Metallo- $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Mol. Biol.*, 375: 257–269.
- 189.** Cullmann, W., Dick, W. (1990). Heterogeneity of beta-lactamase production in *Pseudomonas maltophilia*: a nosocomial pathogen. *Chemother.*, 36: 117–26.
- 190.** Halawani, E. (2009). Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Adv. Biol. Res.*, 3: 148–152.
- 191.** Hemaiswarya, Sh., Kruthiventi, A. K., Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against diseases. *Phyto Med.*, 15: 639–652.
- 192.** Al-Bayati, F. A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J. Ethnopharmacol.*, 116: 403–406.
- 193.** Mann, C. M., Cox, S. D., Markham, J. L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.*, 30: 294–297.
- 194.** Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 564–582.
- 195.** Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. E. (2001). A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 453–462.
- 196.** Ultee, A., Kets, E. P. W., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.*, 174: 233–238.
- 197.** Oussou, K. R., Yolou, S., Boti, J. B., Guessennd, N. K., Kanko, C., Ahibo, C., Casanova, J. (2008). Etude chimique et activité anti diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *Eur. J. Sci. Res.*, 24: 94-103.





# *Annexes*

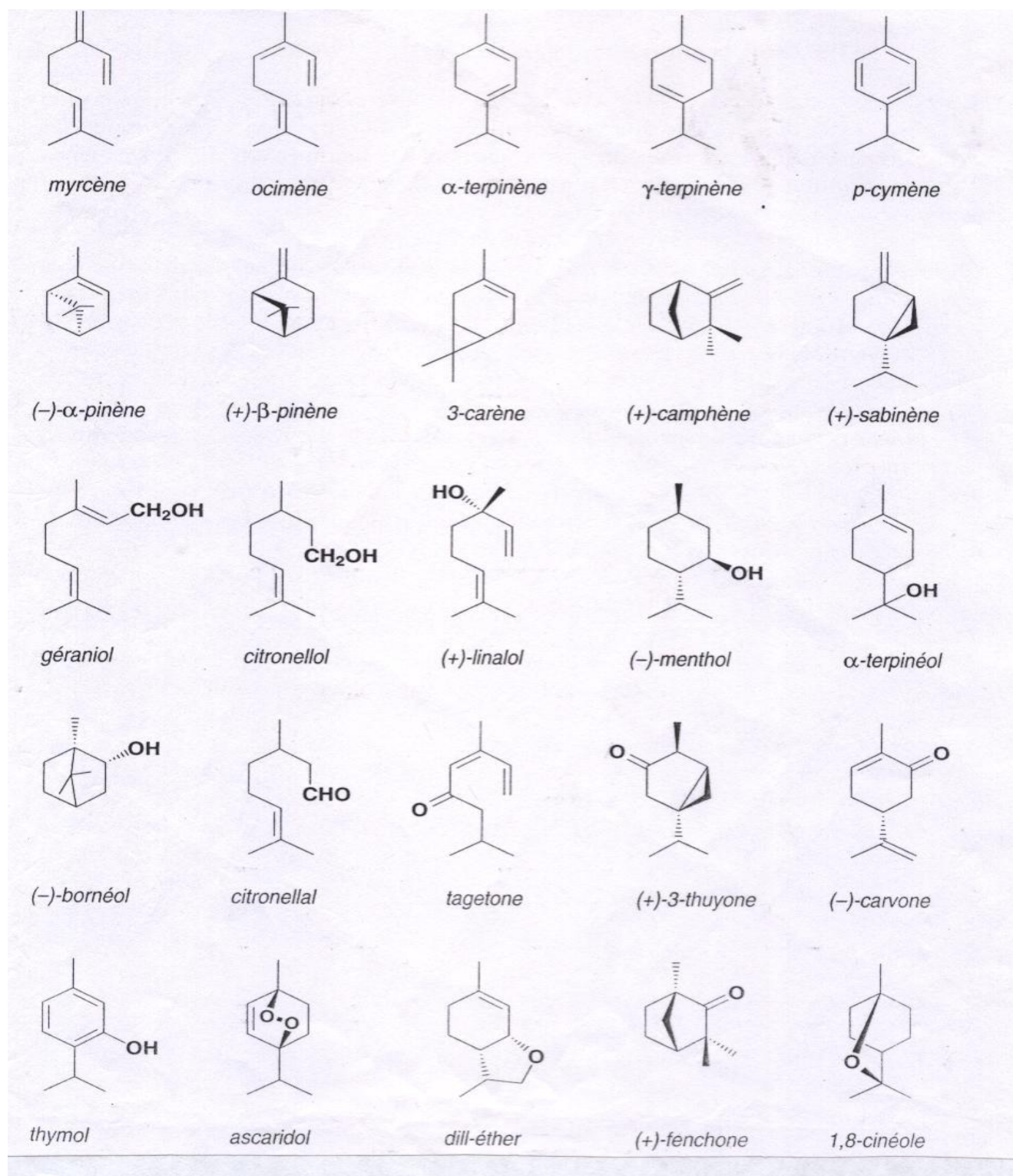
**Annexe 1.** Antibiotiques représentatifs de chaque famille de  $\beta$ -lactamines.

Familles	molécules représentatifs
<b>1. Pénicillines</b>	
Benzyl-pénicillines Isoxazolyl-pénicillines Amino-pénicillines Ureido-pénicillines Carboxy-pénicillines amidino-pénicillines	Benzyl-pénicilline Methicilline, oxacilline, cloxacilline Amoxicilline, pivampicilline, ampicilline Pipéracilline, azlocilline, mézlocilline Carbénicilline, ticarcilline Mécillinam, pivmécillinam
<b>2. Céphalosporines</b>	
Céphalosporines de 1 <sup>ère</sup> génération Céphalosporines de 2 <sup>ème</sup> génération Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération Céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération	céfazoline, céfalotine, céfalexine Céfoxitine, céfamandole, céfotetan, céforuxime Céftriaxone, céftazidime, céfotaxime, céfoperazone Céfprome, céfixime, céfipime
<b>3. Monobactams</b>	Aztreonam
<b>4. Carbapenemes</b>	Imipéneme, ertapéneme, meropéneme
<b>5. Inhibiteurs de <math>\beta</math>-lactamases</b>	Acide clavulanique, sulbactam, tazobactam

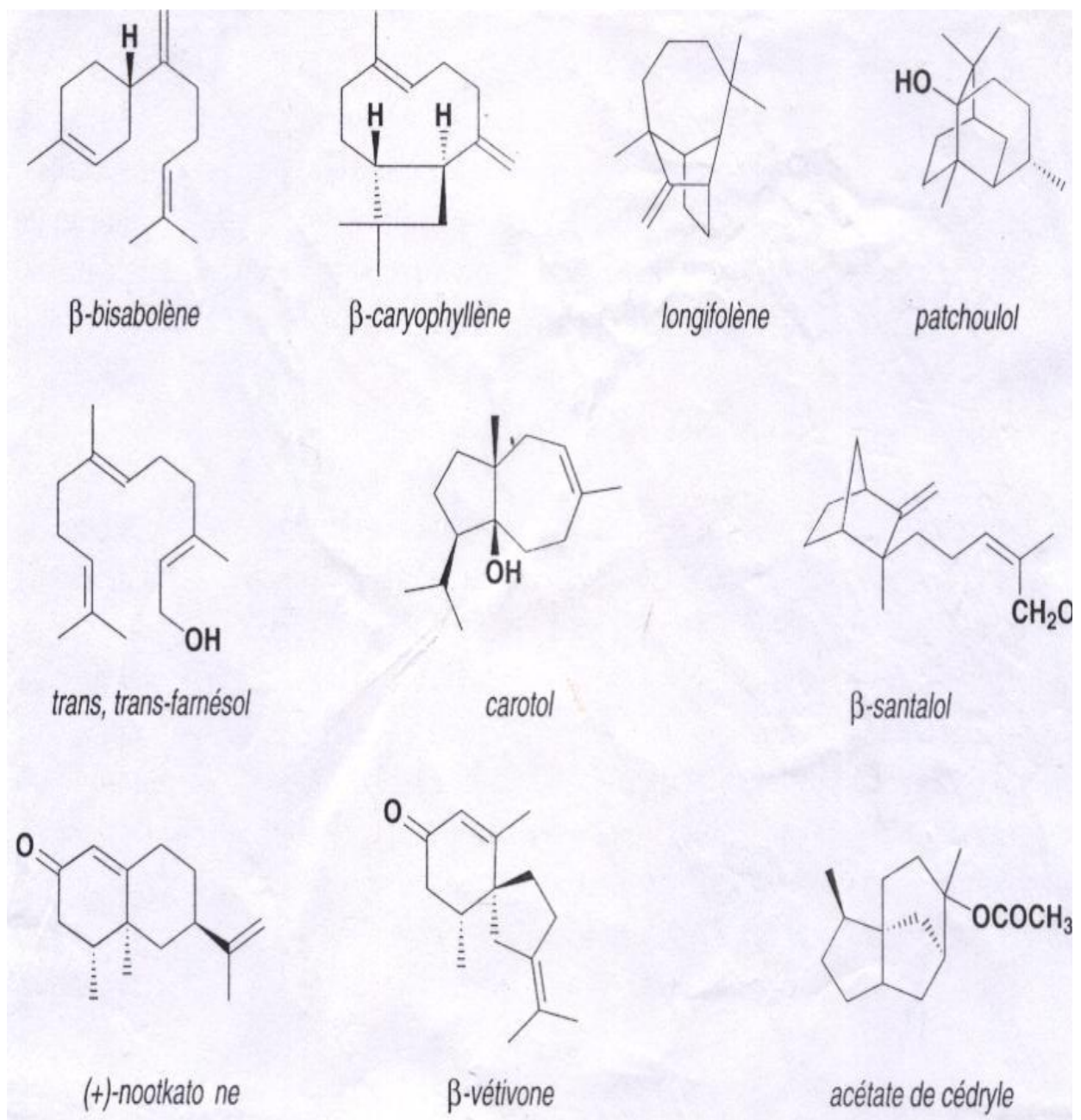
**Annexe 2.** Les antibiotiques non  $\beta$ -lactamines.

classes	molécules représentatifs
<b>Aminosides</b>	Kanamycine, gentamycine, tobramycine, streptomycine, spectinomycine
<b>Phénicoles</b>	Chloramphénicol, thiamphénicol
<b>Tétracyclines</b>	Tigécycline, doxycilline
<b>MLS</b>	Macrolides : erythromycine, clarithromycine, josamycine,...
	Lincosamides : clindamycine, lincomycine
	Streptogramines : pristinamycine,...
<b>Oxazolidones</b>	Linézolide
<b>Polypeptides</b>	Bacitracine, polymixine B, colistine
<b>Sulfamides et association</b>	Sulfamides, triméthoprim, cotrimoxazole
<b>Quinolones</b>	Acide nalidixique, fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine,...)
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine, teicoplanine
<b>Antibiotiques divers</b>	Rifampicine, acide fusidique, fosfomycine

**Annexe 3.** Structures chimiques de quelque composant représentatives de monoterpènes acycliques et cycliques rencontrés dans les huiles essentielles (104).



**Annexe 4.** Structure chimique de quelques sesquiterpènes (104).



**Annexe 5.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les *Entérobactéries* (82). Contrôle de qualité : *E. coli* ATCC 25922.

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b><u>β-lactamines :</u></b>						
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	≤ 8
Amoxicilline + Ac. clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	≤ 8/4
Cefazoline	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefalotine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefotaxime	30µg	≤ 14	15 – 22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
Ceftriaxone	30µg	≤ 13	14 – 20	≥ 21	≥ 64	≤ 8
Imipenem	10µg	≤ 13	14 - 15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
<b><u>Aminosides</u></b>						
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
<b><u>Quinolones</u></b>						
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	≤ 8
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
<b><u>Autres</u></b>						
Chloramphenicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	≤ 32
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	≤ 64
Trimethoprim + sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38

**Annexe 6.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *P. aeruginosa* (82). Contrôle de qualité: *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b><u>β-lactamines :</u></b>						
Ticarilline	75 µg	≤ 14	---	≥ 15	≥ 128	≤ 64
Ticarilline + ac.clavulanique	75/10 µg	≤ 14	---	≥ 15	≥ 128/2	≤ 64/2
Piperacilline	100 µg	≤ 17	---	≥ 18	≥ 128	≤ 64
Ceftazidime	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Aztreonam	30 µg	≤ 15	16 – 21	≥ 22	≥ 32	≤ 8
Imipenem	10 µg	≤ 13	14 - 15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
<b><u>Aminosides</u></b>						
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Netilmicine	30 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 32	≤ 12
Tobramycine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
<b><u>Quinolones</u></b>						
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 - 20	≥21	≥4	≤ 1

**Annexe 7.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Acinetobacter sp.* (82). Contrôle de qualité : *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b><u>β-lactamines :</u></b>						
Ticarcilline	75 µg	≤ 14	15 - 19	≥ 20	≥ 128	≤ 16
Ticarcilline + ac.clavulanique	75/10µg	≤ 14	15 - 19	≥ 20	≥ 128/2	≤ 16/2
Piperacilline	100 µg	≤ 17	18 - 20	≥ 21	≥ 128	≤ 16
Ceftazidime	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Imipenem	10 µg	≤ 13	14 - 15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
<b><u>Aminosides :</u></b>						
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Tobramycine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
<b><u>Quinolones :</u></b>						
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 - 20	≥21	≥4	≤ 1
<b><u>Tetracyclines :</u></b>						
Doxycycline	30µg	≤ 12	13 - 15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
<b><u>Autres :</u></b>						
Trimethoprim + sulfamethoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38

**Annexe 8.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus sp.* (82). Contrôle de qualité : *S. aureus* ATCC 25923.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<b><u>β-lactamines :</u></b>						
Penicilline	10 UI	≤ 28	---	≥29	β-lactamase	≤ 0,12
Oxacilline ** - <i>S.aureus</i>	1 µg	≤ 10	11 - 12	≥13	≥4	≤ 2
- Staphylocoque coagulase négative***		≤ 17	---	≥18	≥0,5	≤ 0,25
Cefoxitine	30µg	≤ 19	---	≥20		
- <i>S. aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i>						
- Staphylocoque à coagulase négative		≤ 24	---	≥25		
<b><u>Aminosides :</u></b>						
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 8	≤4
Amikacine	30µg	≤ 14	15 - 16	≥17	≥32	≤16
Kanamycine	30µg	≤ 13	14 - 17	≥18	≥25	≤6
<b><u>Macrolides :</u></b>						
Erythromycine	15µg	≤ 13	14 - 22	≥23	≥ 8	≤0.5
Clindamycine	2µg	≤ 14	15 - 20	≥21	≥4	≤ 0,5
<b><u>Glycopeptides :</u></b>						
Vancomycine	30 µg	---	---	≥15	---	≤2
Teicoplanine	30 µg	≤ 10	11 - 13	≥14	≥32	≤8
<b><u>Quinolones</u></b>						
Ofloxacine	5µg	≤ 14	15 - 17	≥18	≥4	≤1
<b><u>Autres :</u></b>						
Trimethoprim + sulfamethoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 - 15	≥16	≥ 8/152	≤2/38
Rifampicine	5µg	≤ 16	17 - 19	≥20	≥ 4	≤1
Tetracycline	30µg	≤ 14	15 - 18	≥19	≥16	≤ 4
Chloramphenicol	30µg	≤ 12	13 - 17	≥18	≥32	≤ 8