



**HAL**  
open science

# Les huiles essentielles antibactériennes : exemple du thym (thymus)

Alexandra Martins

► **To cite this version:**

Alexandra Martins. Les huiles essentielles antibactériennes : exemple du thym (thymus). Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03230057

**HAL Id: dumas-03230057**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03230057>**

Submitted on 19 May 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE UFR DE PHARMACIE**

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 18 novembre 2020**

**par Alexandra MARTINS**

**Les huiles essentielles antibactériennes,  
exemple du thym (*thymus*)**

**JURY**

**Président : Théodora POPOVICI, Professeur**

**Maitre de thèse : Roland MOLINIE, Maitre de conférences**

**Membre : Carole VIGROUX, Docteur en pharmacie**

**Thèse n° 53**

## Remerciements

À mes parents, c'est grâce à vous que j'ai eu le force et l'envie d'arriver à tout ça.

À mon petit frère, parce que je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui sans toi, sans cette enfance avec toi, je suis fière de notre complicité.

À ma mamie, mon modèle, je suis fière de toi, de la femme que tu es et j'espère qu'aujourd'hui tu seras fière de moi, merci d'avoir toujours été là, dans les meilleurs comme les pires moments, pour tes sages paroles, tes conseils.

À mon petit cœur, Christelle, avec qui cette aventure a commencé en P1 et je l'a fini avec toi à mes côtés, merci d'être toi, de m'accompagner chaque jour, de toujours croire en moi, tu es ma force, ma personne.

À João, Amour, mon évidence, merci pour tous ces moments partagés, ce bonheur de tous les jours, et pour tous les projets à venir, ce n'est que le début. Toujours, toujours.

À ma famille, désolée d'avoir été parfois absente à cause de mes études, et merci pour votre soutien et votre confiance en moi.

À mes amis, pour tous ces souvenirs passés, présents, et à venir, tous ces moments partagés, les rires, la complicité.

À mes danseurs, qui ont fait partie de ma passion, avec qui j'ai pu échanger des danses.

À ceux partis trop tôt qui croyaient en moi, c'est aussi pour vous.

À la pharmacie de Beauchamps, où tout a commencé et que j'ai acquis mes premières connaissances.

À la pharmacie du Vimeu Vert, toute l'équipe avec qui j'ai beaucoup appris, ça a été très enrichissant travailler avec vous.

À la pharmacie de Sartrouville, nouvelle aventure qui a commencé depuis peu avec vous, mais pas mal de rigolades déjà.

À Mr. Roland MOLINIE, pour avoir accepté de diriger cette thèse, merci pour votre disponibilité et vos conseils.

À Mme Théodora POPOVICI, pour m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse,

À Carole, merci pour tes conseils, ta bienveillance lorsqu'on travaillait ensemble, et merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury, cela m'a beaucoup touché.

## Sommaire

Introduction .....	9
1. Bactéries et Antibiotiques .....	10
1.1 Bactéries .....	10
1.1.1 Définition .....	10
1.1.2 Structure .....	12
1.1.3 Principales bactéries.....	14
1.2 Antibiotiques .....	15
1.2.1 Définition .....	15
1.2.2 Historique.....	15
1.2.3 Classification et mode d'action des antibiotiques.....	16
1.2.4 Méthode d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro.....	17
1.2.5 Résistance .....	18
2. Huiles essentielles et Thym.....	22
2.1 Huiles essentielles.....	22
2.1.1 Définition .....	22
2.1.2 Historique.....	24
2.1.3 Rôle des huiles essentielles .....	25
2.1.4 Familles.....	25
2.1.5 Obtention.....	27
2.1.6 Principe d'extraction des molécules aromatiques .....	30
2.2 Thym.....	31
2.2.1 Historique.....	31
2.2.2 Généralités .....	31
2.2.3 Les différents chémotypes et espèces .....	32
2.2.4 Composition chimique de l'huile de thym.....	34
2.2.5 Propriétés et utilisations .....	36
2.2.6 Voies d'administration.....	37
2.2.7 Sécurité .....	39
2.2.8 Toxicité et risques à l'emploi.....	40
3. Action antibactérienne.....	42
3.1 Évaluer l'activité antimicrobienne des HE .....	42
3.1.1 Diffusion en milieu solide.....	42
3.1.2 Milieu liquide : méthodes de dilution .....	44

3.1.3 Milieu gazeux.....	45
3.1.4 Autres tests.....	45
3.2 Huiles essentielles antibactériennes.....	47
3.3 Mode d'action des huiles essentielles.....	49
3.4 Relation structurelles entre les composants et l'activité antibactérienne .....	53
3.5 Sensibilité des bactéries.....	55
3.6 Résistance bactérienne aux huiles essentielles .....	55
3.7 Synergie antibiotique - huile essentielle.....	56
4 Action du thym sur les bactéries : études.....	58
4.1 Action des molécules seules de l'huile essentielle de thym .....	58
4.2 Action de l'huile de thym .....	72
4.3 Conclusion des études .....	92
5. Thym en application à l'officine .....	97
5.1. Thym à Thymol ( <i>Thymus vulgaris thymoliferum</i> ).....	97
5.2. Thym à linalol ( <i>Thymus vulgaris linaloliferum</i> ).....	99
Conclusion.....	102
Bibliographie.....	105

## Liste des abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	N-acylhomosérine lactone
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
cFDA	Diacétate de carboxyfluorescéine
CMB	Concentration bactéricide minimale
CMI	Concentration inhibitrice minimale
DMAP	Diméthylally pyrophosphate
FIC	Concentration fractionnelle inhibitrice
GPP	Géranyl pyrophosphate
HE	Huile essentielle
IPP	Diphosphate d'isopentényle
LPS	Lipopolysaccharide
OMS	Organisation mondiale de la santé
PEP	Phosphoénolpyruvate
pH	Potentiel hydrogène
PI	Iodure de propidium
QS	Quorum sensing
<i>SARM</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
UFC	Unité formant colonie
ZI	Zone d'inhibition

## Liste des tableaux et figures

Figure 1: Structure d'une bactérie (4).....	11
Figure 2: Structure de la paroi bactérienne (7).....	12
Figure 3: Biosynthèse des molécules aromatiques (36).....	28
Figure 4: Biosynthèse générale des terpénoïdes (36).....	29
Figure 5: <i>Thymus vulgaris</i> L. ....	32
Figure 6: Structure chimique des principales substances présentes dans les huiles essentielles des plantes <i>Thymus</i> .....	34
Figure 7: Mécanisme d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne .....	52
Figure 8 : Études de courbes temporelles.....	62
Figure 9: Microscopie électronique à balayage d'E. Coli non traités (A) et d'E. Coli traités avec 4 x CMI de carveol (B), 4 x CMI de citronellol (C) et 4 x CMI de géraniol (D) .....	63
Figure 10 :Microscopie électronique à balayage de <i>S. Typhimurium</i> non traités (A) et <i>S. Typhimurium</i> traités avec 4x CMI d'eugénol (B) et <i>S. Typhimurium</i> traités avec 4x CMI de terpinéol (C) .....	64
Figure 11 : Effet du thymol sur la surface cellulaire de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 par microscopie électronique à balayage.....	66
Figure 12: Analyse GC-MS de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .....	70
Figure 13: Zones d'inhibition de 10 huiles essentielles sur <i>P. acnes</i> .....	79
Figure 14 : Courbes temporelles de l'action de 10 huiles essentielles sur <i>P. acnes</i> en 2h .....	80
Figure 15: moyenne de la zone inhibitrice pour chaque HE analysée .....	82
Figure 16: Zones d'inhibition du thym sur 6 bactéries et 1 champignon .....	85
Figure 17: Positions des points expérimentaux pour la conception augmentée Simplex-centroïde .....	90
Tableau 1: Tableau des principales bactéries (7,8) .....	13
Tableau 2: Antibiotiques et leurs cibles moléculaires (11,14) .....	17
Tableau 3: 6 chémotypes du thym (41,65).....	33
Tableau 4 : Exemple d'indice aromatique de certaines huiles essentielles .....	44
Tableau 5: Criblage antibactérien des composés .....	60
Tableau 6: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) (mg / ml) des composés.....	60
Tableau 7: Concentrations bactéricides minimales (CMB) (mg / ml) des composés .....	61
Tableau 8: Activité antibactérienne de l'eugénol, du carvacrol, du thymol, du p-cymène et du $\gamma$ -terpinène contre les pathogènes oraux .....	66
Tableau 9: Zones d'inhibition de croissance (mm) montrant une activité antibactérienne pour un nombre d'HE sélectionnées.....	68
Tableau 10 : Zones d'inhibition de croissance (mm) montrant une activité antibactérienne pour un certain nombre de composants d'huile volatile végétale sélectionnés.....	69
Tableau 11: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .....	70
Tableau 12 : CMI (mg/ml) de l'HE de <i>Thymus vulgaris</i> et de ses principaux constituants lorsqu'elle est testée contre un panel d'agents pathogènes .....	71

Tableau 13: Zones d'inhibition (mm) de l'huile de <i>Thymus vulgaris</i> sur certains pathogènes oraux.....	73
Tableau 14: CMI (mg/ml) de l'huile de <i>Thymus vulgaris</i> et de 2 antibiotiques.....	73
Tableau 15: Nombre d'isolats et pourcentages d' <i>Escherichia coli</i> et d' <i>Enterococcus</i> spp. sensibles, intermédiaires ou résistants aux antibiotiques .....	75
Tableau 16: CMI (mg/ml) des HE contre les souches d' <i>E.Coli</i> et <i>Enterococcus</i> .....	75
Tableau 17 : CMI en phase liquide .....	76
Tableau 18: Activité antibactérienne des antibiotiques, CMI (mg/ml) .....	76
Tableau 19: CMI en phase vapeur.....	77
Tableau 20: Activité antibactérienne des huiles essentielles testées exprimée par la concentration minimale inhibitrice (CMI en $\mu\text{l}$ / ml) et les zones d'inhibition de diamètre (IZ en mm).....	78
Tableau 21: CMI (%) de 10 huiles essentielles envers <i>P. acnes</i> . .....	79
Tableau 22: Activité antimicrobienne des HE de <i>Thymus vulgaris</i> et d' <i>Eucalyptus globulus</i> , exprimées en CMI (mg/ml) et ZI (mm) .....	81
Tableau 23: Zone d'inhibition de 14 huiles essentielles contre quatre bactéries Gram-positives .....	83
Tableau 24: Zone d'inhibition de 14 huiles essentielles contre six bactéries à Gram négatif .	84
Tableau 25: Zones d'inhibition pour différentes quantités d'huile de thym .....	85
Tableau 26: CMI de 7 espèces de thym .....	86
Tableau 27: Zone d'inhibition (mm) incluant le diamètre du disque en papier, mm par test de diffusion sur gélose .....	87
Tableau 28: CMI des huiles essentielles ( $\mu\text{L}$ HE / mL) et de la gentamicine ( $\mu\text{g}$ Gent / mL) par test de microdilution en bouillon.....	88
Tableau 29 : Zones d'inhibition par méthode de diffusion discale pour les différentes concentrations d'HE de <i>T. vulgaris</i> L., <i>M. communis</i> L. et <i>R. officinalis</i> L. contre <i>S. typhimurium</i> .....	90
Tableau 30: Différentes combinaisons générées par la conception du mélange choisi et la réponse enregistrée pour chaque expérience .....	91



## Introduction

Les huiles essentielles sont plus que jamais dans l'ère du temps, avec la recherche de plus en plus présente de produits naturels. Souvent utilisées pour leurs propriétés olfactives, celles-ci ont d'innombrables autres utilisations.

Les huiles essentielles ont des activités très intéressantes pour le conseil face au manque d'alternatives face à certaines pathologies. Beaucoup de demandes au comptoir concernant des pathologies bactériennes, des infections, sont sans réponse face au manque de produits adaptés. Les antibiotiques sont sur ordonnance donc souvent nous avons des médicaments soit peu efficaces ou des médicaments à visée symptomatiques. Certaines huiles essentielles possédant des activités antibactériennes dont le thym pourraient être une alternative intéressante lors de pathologies infectieuses.

Bien sûr celles-ci ne sont pas sans risques. Disponibles en vente libre à l'officine il convient de les utiliser avec précautions, et sous les conseils de professionnels.

Dans cette thèse j'ai choisi de parler du thym, utilisé depuis des siècles pour ses propriétés immunostimulantes et antibactériennes. Nous décrirons l'huile essentielle et ses composants, et nous justifierons son activité antibactérienne et sa présence indispensable en conseil à l'officine. La première partie de la thèse consiste en des rappels concernant les bactéries, et les antibiotiques, molécules utilisées aujourd'hui contre les infections.

Dans un second temps sera développé la partie huile essentielle en général et plus particulièrement ensuite l'huile de thym, ses composants, ses propriétés et utilisations... Ensuite, nous parlerons du mode d'action antibactérien des huiles essentielles, la sensibilité des bactéries et leur résistance aux huiles essentielles, et comment peuvent être évalués les effets antibactériens des huiles. Et comment par l'exemple de quelques études on peut démontrer son effet sur différents pathogènes, en comparaison avec d'autres huiles essentielles, en association ou non, en différentes quantités ou différentes espèces.

Et pour finir quelques exemples d'applications en officine des 2 principales huiles que l'on trouve, l'huile essentielle de thym à thymol et thym à linalol, seul ou en association.

Il sera ainsi possible d'affirmer la légitimité du thym en application à l'officine, pour diverses utilisations et pathologies.

Enfin, dans une vision future, nous verrons pourquoi les huiles essentielles pourraient être un adjuvant pour aider à la résistance aux antibiotiques qui menace de plus en plus ou à la diminution des effets indésirables ou à l'utilisation dans la conservation de denrées alimentaires. De nombreuses applications dans différents domaines sont envisageables.

# 1. Bactéries et Antibiotiques

## 1.1 Bactéries

### 1.1.1 Définition

Les bactéries sont des micro-organismes vivants. Ce sont des organismes unicellulaires procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, mais un ADN chromosomique circulaire situé dans le cytoplasme constitué d'un seul chromosome, support de l'information génétique. De nombreuses bactéries contiennent une autre structure d'ADN extra-chromosomique, appelée plasmides qui ne sont pas indispensables à la bactérie. Elles mesurent entre 0,5 et 10-15 µm (1).

Elles sont entourées d'une paroi de structure rigide, qui assure l'intégrité de la bactérie. Cette paroi est composée de polymères, qui diffèrent selon les bactéries, mais il y a une substance de base toujours présente : le peptidoglycane. Elle joue un rôle déterminant dans la coloration de Gram, et dans la spécificité antigénique des bactéries.

Le cytoplasme ne contient pas de mitochondries, il est riche en ARN, cible d'action de nombreux antibiotiques.

Les enzymes transporteurs d'électrons sont localisés dans la membrane cytoplasmique.

La capsule est présente chez certaines bactéries. Elle joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de certaines espèces bactériennes par son rôle protecteur contre la phagocytose. La nature des constituants de la capsule détermine la spécificité antigénique d'une souche bactérienne, désignée par son sérotype.

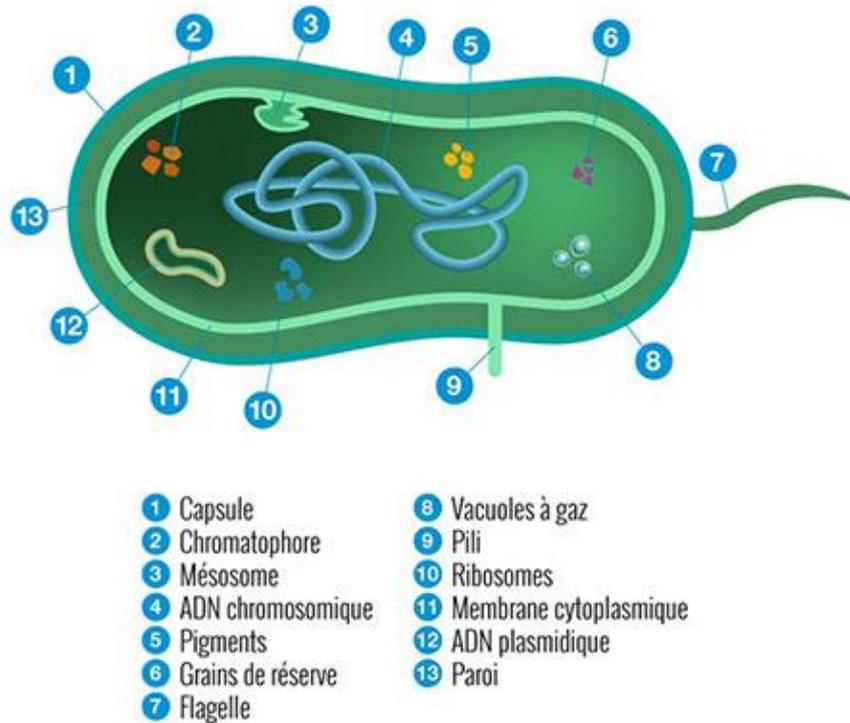
Les cils ou flagelles sont des appendices filamenteux, composés de protéines, antigéniques. Ils sont attachés dans le cytoplasme bactérien par une structure complexe et constituent les organes de locomotion pour les bactéries qui en possèdent. Ils provoquent la formation d'anticorps.

Les pili ou fimbriae, surtout présents chez les bactéries à Gram négatif, sont plus courts et fins que les flagelles. Ils permettent la fixation de certaines bactéries sur les muqueuses, ce qui conditionne leur pouvoir pathogène ou peuvent jouer un rôle dans l'attachement des bactéries entre elles au cours de la conjugaison, et servent de récepteur de bactériophages spécifiques. Certains genres sont capables de former des endospores, qui dans des conditions favorables peuvent redonner une bactérie.

Le glycocalyx présent à la surface des bactéries favorise l'adhésion de la bactérie aux cellules, aux supports inertes.

La membrane cytoplasmique ou interne est la limitante externe du cytoplasme. Elle est constituée d'une double couche d'unités de phospholipides et de protéines qui lui sont associées. Certaines de ces protéines jouent un rôle dans la synthèse du peptidoglycane et sont appelées protéines de liaison aux pénicillines (PLP). La membrane permet une perméabilité sélective et le transport de substances solubles à l'intérieur de la bactérie, fonction respiratoire, support d'enzymes et de transporteurs de molécules (2,3).

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants (4).



*Figure 1: Structure d'une bactérie (4)*

Les bactéries ont été découvertes à la fin du 17<sup>ème</sup> siècle par Anthoni Van Leeuwenhoek, naturaliste hollandais, qui inventa la microscopie (5).

Elles sont très nombreuses et peuvent être considérées comme des agents pathogènes responsables de maladies plus ou moins graves, ou comme des bactéries inoffensives et bénéfiques à l'organisme. En effet, le corps humain est colonisé par de nombreuses bactéries qui constituent la « flore commensale ». Par exemple, au niveau du système digestif le microbiote intestinal, largement impliqué dans les processus de digestion et de défense de l'organisme, est composé d'environ mille milliards de bactéries (5).

Il existe différents types de classifications des bactéries :

- selon leur réaction au contact de la coloration de Gram : leur capacité de coloration varie selon la composition de leur paroi. Ainsi, les bactéries colorées en violet seront dites à Gram positif et celles en rose à Gram négatif ou non colorables par le Gram
- selon leur morphologie : Cocci, bacilles, forme spiralée
- en fonction de leur comportement vis à vis de l'oxygène : Aérobie, anaérobie, microaérophile
- selon leurs exigences ou non (6)

En ce qui concerne les noms, le premier mot (en italique et commençant par une majuscule) correspond au genre, le deuxième (en minuscule et aussi en italique) correspond à l'espèce (7).

## 1.1.2 Structure

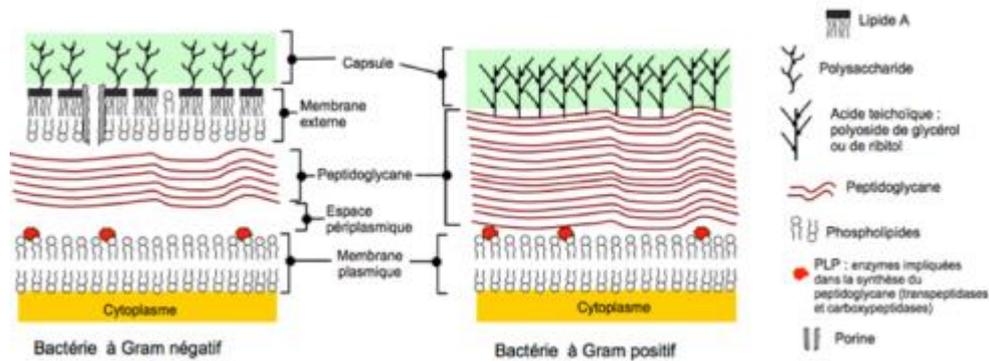


Figure 2: Structure de la paroi bactérienne (7)

Bactéries à Gram positif : le peptidoglycane est la partie la plus externe de la bactérie. Il est plus épais que chez les bactéries à Gram négatif, constitué de nombreuses couches. Il représente jusqu'à 90 % des constituants de la paroi et entoure la membrane cytoplasmique de la bactérie.

Bactéries à Gram négatif : la paroi bactérienne contient un élément supplémentaire, la membrane externe, laquelle entoure le peptidoglycane qui ne représente que 5 à 20 % de la paroi, qui est plus fin que chez les bactéries à Gram positif.

Les porines permettent le passage des petites molécules hydrophiles (antibiotiques par exemple).

La membrane externe est un élément important dans la physiologie des bactéries à Gram négatif constituant une structure de résistance aux facteurs de défense de l'hôte. Son feuillet interne est essentiellement phospholipidique et son feuillet externe est majoritairement formé de lipopolysaccharides.

Le peptidoglycane se situe entre les 2 membranes, plasmique et externe (8).

Bactéries aérobies		
	Gram Positif	Gram Négatif
Cocci	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Staphylococcus</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i> (méti-R et méti-S)</li> <li>• <i>Staphylocoque à coagulase négative</i></li> <li>- Streptococcus</li> <li>• <i>Streptocoque bêta-hémolytique</i></li> <li>▫ <i>Streptococcus pyogenes</i> (groupe A),</li> <li>▫ <i>S. agalactiae</i> (groupe B),</li> <li>▫ <i>S. dysgalactiae</i> (groupe C),</li> <li>• <i>S. pneumoniae</i></li> <li>• Autres streptocoques</li> <li>▫ <i>S. mutans</i>, <i>S. oralis</i>, <i>S. salivarius</i>, <i>S. sanguis</i>...</li> <li>- <i>Enterococcus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Neisseria</i></li> </ul>
Bacilles	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bacillus</i></li> <li>- <i>Corynebacterium</i></li> <li>- <i>Erysipelothrix</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entérobactéries</li> <li>• <i>Citrobacter</i></li> <li>• <i>Enterobacter</i></li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Listeria</i></li> <li>- <i>Nocardia</i></li> <li>- <i>Tropheryma whippelii</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Klebsiella</i></li> <li>• <i>Morganella</i></li> <li>• <i>Proteus</i></li> <li>• <i>Providencia</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> <li>• <i>Serratia</i></li> <li>• <i>Shigella</i></li> <li>• <i>Yersinia</i></li> <li>- Coccobacilles</li> <li>• <i>Bartonella</i></li> <li>• <i>Branhamella</i></li> <li>• <i>Brucella</i></li> <li>• <i>Campylobacter</i></li> <li>• <i>Coxiella</i></li> <li>• <i>Francisella</i></li> <li>• <i>Haemophilus</i></li> <li>• <i>Helicobacter</i></li> <li>• <i>Kingella</i></li> <li>• <i>Legionella</i></li> <li>• <i>Moraxella</i></li> <li>• <i>Rickettsia</i></li> <li>- Autres bacilles à Gram négatif</li> <li>• <i>Acinetobacter</i></li> <li>• <i>Aeromonas</i></li> <li>• <i>Bordetella</i></li> <li>• <i>Burkholderia</i></li> <li>• <i>Pasteurella</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Stenotrophomonas</i></li> <li>• <i>Vibrio</i></li> </ul>
<b>Bactéries anaérobies</b>		
	<b>Gram Positif</b>	<b>Gram Négatif</b>
<b>Cocci</b>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Veillonella</i>
<b>Bacilles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Actinomyces</i></li> <li>- <i>Clostridium</i> : <i>C. botulinum</i>, <i>C. difficile</i>, <i>C. perfringens</i>, <i>C. tetani</i></li> <li>- <i>Peptococcus</i></li> <li>- <i>Propionibacterium acnes</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bacteroides</i></li> <li>- <i>Eubacterium</i></li> <li>- <i>Fusobacterium</i></li> <li>- <i>Porphyromonas</i></li> <li>- <i>Prevotella</i></li> </ul>
<b>Autres bactéries</b>		
<b>Spirochètes</b>	<b>Mycobactéries</b>	<b>Autres</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Borrelia</i></li> <li>- <i>Leptospira</i></li> <li>-</li> <li><i>Treponema</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>M. avium</i></li> <li>- <i>M. leprae</i></li> <li>- <i>M. tuberculosis</i></li> <li>- <i>M. africanum</i></li> <li>- <i>M. kansasii</i></li> <li>- <i>Mycobacteries</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Intracellulaires :</li> <li>• <i>Chlamydia</i></li> <li>• <i>Rickettsia</i></li> <li>- Sans paroi :</li> <li>• <i>Mycoplasma</i>, <i>Ureaplasma</i></li> </ul>

Tableau 1: Tableau des principales bactéries (7,8)

### 1.1.3 Principales bactéries

*Escherichia coli* appartient à la famille des entérobactéries. Celles-ci sont communes dans l'intestin de l'Homme et des animaux sans provoquer de maladie ; en fait, elles sont même utiles et font partie de la flore intestinale normale. Mais *E. coli* présente des souches pathogènes responsables d'infections extra-intestinales telles que les infections des voies urinaires et les maladies associées à l'intoxication alimentaire, des infections intraabdominales, méningites.

*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont liés à une intoxication alimentaire due à l'ingestion d'aliments contenant des entérotoxines.

*S. aureus* fait partie de la flore microbienne de la peau d'environ un tiers de la population, sans provoquer de maladie. Selon sa souche et l'état du système immunitaire de la personne qu'il infecte, il est responsable d'un large éventail de maladies allant des infections cutanées superficielles aux infections systémiques. À l'hôpital, il est la cause la plus fréquente d'infections des plaies chirurgicales.

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (*SARM*) est un staphylocoque doré sur lequel certains antibiotiques ont perdu leur efficacité. Le *SARM* est résistant en particulier aux antibiotiques du type bêta-lactamines, cependant certaines souches de *SARM* sont devenues résistantes à pratiquement tous les antibiotiques.

*B. cereus* intervient également dans les cas de pneumonie, bactériémie et méningite chez les patients immunodéprimés. En outre, en raison de sa capacité à former des spores et une structure résistante aux températures élevées, il présente un risque important pour la sécurité alimentaire, car il survit aux techniques de transformation des aliments.

*Salmonella Typhimurium* est un autre agent responsable de l'infection intestinale associée à l'ingestion d'aliments contaminés, la fièvre typhoïde est la forme la plus agressive de la maladie. Elle se traduit par une fièvre continue accompagnée de maux de tête, d'anorexie, d'abattement et de douleurs abdominales avec diarrhée ou constipation.

*Klebsiella pneumoniae* est aussi une entérobactérie qui colonise normalement le tube digestif de l'Homme et des animaux. C'est pourtant l'une de bactéries qui provoque le plus grand nombre d'infections nosocomiales, et d'infections des voies urinaires ou respiratoires, en particulier de pneumonie grave. Chez les nouveau-nés, *Klebsiella pneumoniae* peut provoquer des septicémies, associées à des taux élevés de mortalité. Cette bactérie a aussi la particularité d'acquies facilement de multiples formes de résistance aux antibiotiques.

*Streptococcus pneumoniae* se trouve habituellement dans le nez et le pharynx de très nombreuses personnes, sans provoquer d'infection. Il peut provoquer cependant de dangereuses infections chez les personnes vulnérables par transmission. Il provoque des infections du sang ou des méninges et surtout des pneumonies. Mais il est également responsable de nombreuses infections, telles que bronchites et otites.

*Yersinia enterocolitica* est responsables de yersiniose, qui se manifestent par des entérites aiguës s'accompagnant de fièvre, diarrhées et douleurs abdominales. Des complications comme une éruption cutanée, des douleurs articulaires, la propagation de bactéries dans la circulation sanguine peut survenir dans un nombre peu élevé de cas.

(9,10)

## 1.2 Antibiotiques

### 1.2.1 Définition

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est à dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres micro-organismes (11).

Un antibiotique, d'après le Dictionnaire de Biologie de Jacques Berthet, est « *une substance ayant la capacité de tuer les bactéries (effet bactéricide) ou d'inhiber leur multiplication (effet bactériostatique).* »

### 1.2.2 Historique

En 1889, Paul Vuillemin introduit le terme « antibiose » pour décrire le principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie.

Ernest Duchesne est le premier en 1897 à mettre en avant l'activité antimicrobienne des moisissures dans sa thèse intitulée « Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes, antagonisme entre les moisissures et les microbes ». Il apparaît comme le précurseur de l'antibiothérapie mais ses recherches ne seront pas poursuivies (12). L'histoire des médicaments d'origine microbienne a réellement commencé avec l'observation fortuite de Fleming en 1929 selon laquelle la croissance bactérienne était empêchée par la croissance de *Penicillium notatum*.

Après un démarrage tardif, cela a conduit à l'isolement, à l'élucidation structurale, à l'évaluation clinique et à la commercialisation des pénicillines en tant que premiers agents antibactériens à large spectre au début des années 40.

Pour leurs efforts dans la découverte et le développement de la pénicilline, Fleming, Florey et Chain ont reçu le prix Nobel en 1945.

Le succès de la pénicilline a mené à des efforts pour découvrir d'autres composés de sources naturelles pour le traitement des infections bactériennes, résultant en presque toutes les nouvelles classes d'antibiotiques d'origine naturelle jusqu'en 1962 (13).

#### **Antibiotiques d'origine naturelle**

La découverte d'antibiotiques à large spectre a commencé avec la découverte de la pénicilline, le premier des  $\beta$ -lactames qui a conduit à « l'âge d'or » (1940-1962) de la découverte d'antibiotiques. De nombreuses classes de nouveaux antibiotiques naturels ont été découvertes, ainsi que le produit dérivé de synthèse, l'acide nalidixique. Ceux-ci comprenaient les phénylpropanoïdes (chloramphénicol), les polycétides (tétracycline), les aminoglycosides (streptomycine, gentamycine), les macrolides (érythromycine), les glycopeptides (vancomycine) et les streptogramines (quinpristine et darfopristine) et les bêta-lactamines de deuxième génération).

Une troisième classe de  $\beta$ -lactames, les carbapénèmes a été découverte au début des années 1970 (13).

#### **Antibiotiques d'origine synthétique**

Les sulfamides synthétiques, découverts dans les années 1930, étaient la première classe d'antibiotiques utilisés en pratique clinique avant la découverte des pénicillines et continuent d'être utilisés aujourd'hui.

La deuxième classe d'antibiotiques synthétiques, qui connaît un grand succès, est celle des quinolones découvertes en 1962 par criblage empirique du sous-produit de la synthèse de la chloroquine. Cela a conduit à la découverte et au développement de l'acide nalidixique comme

premier antibiotique quinolone qui a finalement évolué vers d'autres quinolones. Les oxazolidinones représentent la troisième classe d'antibiotiques dérivés synthétiquement découverte en 1979 qui a conduit au développement clinique et à l'approbation du linézolide en 1999.

Malgré les avancées technologiques majeures, l'approche pour identifier de nouveaux antibiotiques aujourd'hui est très similaire à celle utilisée par Fleming, bien que l'extraction du génome bactérien ouvre de nouvelles voies pour l'identification de cibles bactériennes essentielles pouvant être utilisées pour la découverte d'agents antibactériens. Le processus implique la croissance de souches bactériennes sur des plaques d'agar avec bouillon. Après incubation, la zone de clairance bactérienne a été mesurée. Un bouillon ou un extrait qui présentait une zone de destruction a ensuite été soumis à un fractionnement chromatographique guidé par essai biologique, conduisant à l'isolement du ou des produits naturels actifs, suivi d'une élucidation structurelle du composé actif (13).

Alors que la découverte de nouveaux antibiotiques était le principal objectif de la recherche, peu d'approches innovantes ont été développées, avec pour résultat un succès minimal. Au lieu de cela, des efforts ont été dirigés vers l'amélioration progressive des molécules existantes, l'amélioration de la puissance, de la stabilité, de la pharmacocinétique ou des réactions indésirables par des modifications chimiques.

Cela a conduit au développement de cinq générations de pénicillines, quatre générations de céphalosporines, deux générations de carbapénèmes, d'aminosides, de tétracyclines, de macrolides, des glycopeptides, des quinolones.

Une autre stratégie pour la découverte de médicaments consistait à cibler le mécanisme de résistance pour inverser la diminution de la puissance antibiotique. Cela a conduit au développement d'inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase (ex : l'acide clavulanique, le sulbactam, le tazobactam) qui ont été co-administrés avec un antibiotique  $\beta$ -lactame.

De même, les stratégies pour bloquer l'efflux ont été réussies, conduisant à la tigécycline, dans laquelle des modifications chimiques ont été apportées à la tétracycline de base pour réduire l'efflux et la résistance (13).

De nouveaux produits naturels d'une diversité structurelle et d'une complexité marquée avec des activités biologiques se trouvent dans presque toutes les sources biologiques, y compris les plantes terrestres, les lichens, les macro-organismes marins. Bien que les sources végétales n'aient pas fourni d'antibiotiques cliniquement pertinents, les produits naturels dérivés des plantes ont montré des activités antibactériennes (13).

Avec de nouvelles cibles et des progrès dans les technologies basées sur les produits naturels, le moment est venu de recentrer les efforts sur les produits naturels, pour revitaliser la découverte d'antibiotiques. L'utilisation de données génomiques bactériennes et d'approches innovantes de produits naturels permettra de traiter à la fois la résistance bactérienne et les limites commerciales des approches actuelles.

### **1.2.3 Classification et mode d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques sont définis par :

- leur activité antibactérienne (spectre d'activité),
- leur toxicité sélective (mode d'action),
- leur activité en milieu organique (pharmacocinétique),
- leur bonne absorption et diffusion dans l'organisme (11)

Le mécanisme d'action de tous les antibiotiques actuellement utilisés en clinique a été déterminé après leur découverte.

Inhibition de la synthèse des protéines	Inhibition de la synthèse de la paroi	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Inhibition du métabolisme (synthèse acide folique)	Inhibition de la synthèse d'ARN	Destruction des membranes bactériennes
Aminosides	$\beta$ -Lactamines	Quinolones	Triméthoprim	Rifamycines	Polypeptides cycliques
Tétracyclines	Glycopeptides	Sulfamides			
Macrolides	Fosfomycine	Nitro-imidazolés			
Streptogramines	Daptomycine				
Lincosamides	Isoniazide				
Phénicolés	Ethambutol				
Oxazolidinones					
Acide fusidique					
Mupirocine					

*Tableau 2: Antibiotiques et leurs cibles moléculaires (11,14)*

Bêtalactamines : partagent un élément commun, le cycle bêta-lactame. Selon la nature de l'hétérocycle accolé au cycle bêta-lactame, on peut les classer en 4 groupes : les pénicillines et les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames.

Les inhibiteurs de bêtalactamases n'ont pas d'activité antibactérienne, mais préviennent la dégradation de la bêtalactamine qui leur est associé (7).

## 1.2.4 Méthode d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro

### Antibiogramme

Selon les recommandations internationales, la méthode par dilutions successives en milieu solide par diffusion en milieu gélosé est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Cette méthode est nommée antibiogramme.

Cela consiste à utiliser des disques imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotiques. Ces disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de bactéries. L'antibiotique diffuse de manière concentrique dans la gélose pendant l'incubation à 37°C pendant 18h puis lecture de la zone d'inhibition qui représente l'action antimicrobienne (14).

### CMI et CMB

La concentration inhibitrice minimale (CMI) a été définie comme la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 à 24 heures de culture à 37°C en présence de dilutions en série des composés d'essai. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

Les molécules qui se contentent d'inhiber la multiplication des bactéries : action bactériostatique, donc nécessiteront l'apport du système immunitaire pour éradiquer le micro-organisme.

Les antibiotiques bactériostatiques sont les macrolides, tétracyclines, lincosamides.

La CMB est la concentration bactéricide minimale, plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique.

Ces concentrations ont été déterminées par repiquage sur des plaques d'agar correspondantes après incubation de souches bactériennes.

Les molécules qui tuent le micro-organisme considéré : action bactéricide, ne nécessitent pas l'action du système immunitaire et seront donc privilégiées dans toutes les situations d'immunosuppression.

Les antibiotiques bactéricides sont les bêtalactamines, linézolide, glycopeptides, polymyxines, aminosides, fluoroquinolones, daptomycine.

L'activité bactéricide sera d'autant plus marquée que les concentrations minimales bactéricides (CMB) seront peut-être différentes des CMI.

Certaines souches pourront être tolérantes vis-à-vis d'antibiotiques normalement bactéricides, si les CMB de ces antibiotiques s'éloignent des CMI (>32 fois) (14).

### 1.2.5 Résistance

À l'heure actuelle, de nombreux antibiotiques sont disponibles pour traiter divers agents pathogènes bactériens. Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps. Cependant, le mauvais usage de ces agents antimicrobiens et leur utilisation accrue ont eu pour conséquence la capacité des bactéries à développer une résistance aux médicaments. Selon l'Organisation mondiale de la santé, la menace des bactéries résistantes aux médicaments devient plus aiguë et la perspective d'une ère post-antibiotique, dans laquelle même les infections courantes et les blessures mineures peuvent être mortelles, devient plus réelle.

Lors de son dernier rapport, l'OMS note par exemple que, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ont présenté une résistance aux antibiotiques, qui dépassait 50% dans la plupart des pays qui ont fourni des données sur la résistance aux antimicrobiens sur la surveillance (OMS, 2014) (15).

Les bactéries pathogènes, grâce à leur flexibilité et plasticité génétique, sont capables de mettre en place un programme de résistance spécifique contre un antibiotique particulier. En effet, certaines souches arrivent à rétablir une multirésistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques à la fois donnant lieu à ce qu'on appelle les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (16).

Plusieurs situations sont à distinguer :

- une infection par un micro-organisme d'emblée résistant issu de l'environnement
- une infection par une population microbienne sensible, mais dont l'inoculum élevée, associé à la probabilité de mutations spontanées, a permis l'apparition de mutants résistants au traitement
- une infection par une population microbienne sensible, mais dont certains éléments ont acquis des mutations de résistance par transfert génétique à partir de micro-organismes déjà présents dans l'organisme

Dans ces 2 derniers cas, la concentration de l'anti-infectieux administré peut favoriser la sélection de mutants résistants par rapport au reste de la population microbienne, amplifiant ainsi le phénomène. Ces mutants sont caractérisés par une CMI plus élevée que celles des micro-

organismes sensibles. Leur éradication nécessite donc un niveau de concentration plus élevé (14).

### **Résistance innée et résistance acquise**

- *Résistance naturelle ou innée*

C'est une résistance intrinsèque, commune à une population, due essentiellement à la présence de gènes spécifiques situés dans le chromosome bactérien (17). Elle se caractérise par des modifications structurales et métaboliques. Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique.

La résistance intrinsèque est contrôlée par des gènes naturels situés dans le chromosome bactérien, tels que l'AmpC  $\beta$ -lactamase de bactéries à Gram négatif et de nombreux systèmes d'efflux (18).

- *Résistance acquise*

Elle est due à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles ou acquises. Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent (19).

La résistance acquise implique des mutations dans les gènes ciblés par l'antibiotique et le transfert des déterminants de la résistance mobile via des plasmides, des bactériophages, des transposons et d'autres matériels génétiques mobiles (20).

De nombreuses cibles des fonctions cellulaires sont impliquées dans ces mécanismes (21).

### **Les mécanismes de résistance**

Les sites de résistance sont variables entre les espèces bactériennes, dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents.

- *Inhibition d'antibiotiques*

Certaines bactéries synthétisent des enzymes qui inhibent l'action des antibiotiques en dégradant ou en modifiant ce dernier. La modification des antibiotiques peut se faire de différentes façons selon les réactions chimiques catalysées (l'acétylation, la glycosylation, la nucléotidylation, la substitution, la ribosylation et/ou la phosphorylation). La modification induite, par ces enzymes, peut inactiver certains antibiotiques ou bien diminuer leurs affinités vis-à-vis de leurs cibles (22).

Ex : l'inactivation des  $\beta$ -lactames par la  $\beta$ -lactamase

- *Modification des cibles des antibiotiques*

Dans certaines situations, la bactérie modifie l'affinité de ses protéines de liaison à des antibiotiques spécifiques.

En plus de la modification enzymatique, certaines souches pathogènes mobilisent le positionnement de leurs organites pour échapper à l'action des antibiotiques (23).

- *Empêchement de l'entrée de l'antibiotique*

Certaines souches bactériennes empêchent les antibiotiques de rentrer dans la cellule bactérienne, et cela grâce à un mécanisme de transport particulier dit pompe à efflux qui leur permet d'exporter les antibiotiques hors des cellules (24).

- *surproduction de cible* (par exemple, DHFR);
- *contournement de la voie métabolique pour éliminer l'essentialité du target* (par exemple, peptide déformylase dans *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae*) (25)

### **Bases génétiques de la résistance**

Quelle que soit la nature de la résistance, innée ou acquise, elle s'établit via des allèles spécifiques dans le pool génétique d'une souche bactérienne. L'origine de la diversité génétique est due essentiellement à deux phénomènes globaux : les mutations chromosomiques ou parfois des hypermutations et le transfert horizontal de gènes entre les espèces de nature différente (26).

- *Mutations chromosomiques*

Elles peuvent se produire spontanément lors de la réplication de l'ADN, cette marque génétique donne lieu à des protéines biochimiquement modifiées.

- *Hypermuation*

L'hypermuation est un phénomène génétique qui désigne un état transitoire durant lequel une souche bactérienne subit un taux de mutation très élevé, permettant ainsi l'acquisition de la résistance aux antibiotiques.

- *Transfert des gènes*

Les espèces microbiennes partagent des éléments génétiques entre elles, cet échange est appelé transfert horizontal du matériel génétique. Ce transfert est généralement réalisé grâce à trois phénomènes essentiels : – la transduction : le transfert des gènes via les bactériophages ; – la transformation : l'incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries ; – la conjugaison : le transfert des fragments via des plasmides conjugatifs (27). Via ces mécanismes les éléments transposables portent avec eux des copies des gènes. D'autres éléments responsables du transfert des gènes entre les bactéries sont appelés les intégrons. Ce sont des fragments d'ADN que les bactéries s'intègrent dans certaines régions d'ADN chromosomique via un mécanisme de recombinaison d'une manière site-spécifique. Ces éléments transfèrent des gènes impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques. Les intégrons ne sont pas des éléments mobiles, mais leurs associations avec d'autres facteurs de transfert et d'insertion les rendent mobiles (28).

Le transfert des gènes peut se produire entre des bactéries génétiquement éloignées, essentiellement entre les bactéries à Gram+ et celles à Gram–.

### **Le cas des bactéries à Gram négatif**

Les bactéries à Gram négatif acquièrent souvent leur résistance par l'acquisition d'un gène de résistance à partir d'un pool génétique partagé à l'aide de plasmides, ce qui entraîne le ciblage de la dissémination des plasmides (29).

Une caractéristique notable des bactéries à Gram négatif est la présence d'une membrane externe entourant la cellule bactérienne. Cette barrière complexe représente un contrôle efficace de la perméation (30), capable de nuire à l'absorption des macromolécules et des substances hydrophobes (par exemple les antibiotiques hydrophobes). Ainsi, la membrane externe confère

une protection solide contre les molécules qui peuvent normalement endommager la membrane interne, le peptidoglycane ou les cibles cytoplasmiques et contrôle également l'absorption de divers composés, y compris les nutriments et les antibiotiques hydrophiles via les canaux protéiques situés à l'extérieur de la membrane (31).

La perméabilité membranaire des bactéries à Gram négatif est directement associée à l'assemblage fonctionnel des protéines membranaires et à la structure du lipopolysaccharide (LPS). L'expression de canaux poreux étroits ralentit la pénétration des solutés hydrophiles, tandis que la structure LPS contrôle le taux de diffusion transmembranaire des solutés lipophiles. Il est important de noter que bon nombre des modifications signalées dans la perméabilité de la membrane externe contribuent à la diminution drastique de la sensibilité aux antibiotiques. Par conséquent, la résistance aux antibiotiques innée est susceptible de refléter l'action synergique de la membrane externe agissant comme une barrière de perméabilité et des pompes d'efflux de médicaments diverses et largement distribuées (32).

Certains agents chimiques classés comme perméabilisants membranaires peuvent altérer l'intégrité de la membrane bactérienne en libérant du LPS et d'autres composants, par effet porogène ou par activité intercalaire qui dépoliarise la membrane. Dans ces cas, il y a une modification de la fonction de barrière de perméabilité. Des exemples de ces perméabilisants comprennent l'EDTA, qui chélate les cations divalents qui stabilisent les interactions moléculaires et la libération induite de LPS, les peptides cycliques tels que la polymyxine B, qui perturbent la structure de la membrane cellulaire bactérienne en interagissant avec ses composants, causant des dommages aux membranes, ainsi que des peptides antimicrobiens cationiques qui forment des canaux à travers la membrane ou créent des discontinuités membranaires. Les perméabilisants en tant que tels n'ont pas besoin d'être bactéricides ou bactériostatiques pour les bactéries à Gram négatif, mais agissent principalement en permettant à d'autres composés de pénétrer et d'atteindre leurs cibles finales (33).

### **Antibiotiques critiques**

En réponse à une saisine de la Direction Générale de la Santé (DGS), l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) avait élaboré en 2013 une liste d'antibiotiques critiques compte tenu de considérants scientifiques et d'objectifs de santé publique, identifiant trois catégories : Antibiotiques particulièrement générateurs de résistances bactériennes, Antibiotiques de dernier recours, Antibiotiques dont la prescription et/ou la dispensation doivent être contrôlées par des mesures spécifiques.

Parallèlement à l'élaboration de cette liste, il avait été admis la nécessité de la réviser régulièrement compte tenu notamment d'évolutions d'ordre épidémiologique et des données relatives aux ventes/consommations d'antibiotiques. Il a donc été procédé à l'actualisation de cette liste en 2015, constituant ainsi la première actualisation depuis son élaboration. Dans celle-ci la dernière catégorie a été supprimée, car elle regroupait les 2 catégories et la situation aujourd'hui amène à reconsidérer cette troisième catégorie. Cette troisième catégorie est supprimée de la liste 2015 des antibiotiques critiques de l'ANSM, ce qui va laisser aux Instances concernées, selon leurs prérogatives, le temps de mettre en place les modalités d'encadrement adaptées voire de prioriser les antibiotiques à encadrer en tenant compte notamment des aspects de faisabilité, de moyens et de délais (34).

## 2. Huiles essentielles et Thym

### 2.1 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits dérivés de plantes aromatiques, de composition relativement complexe. Elles contiennent environ 20 à 60 composants à différentes concentrations.

Habituellement, la caractérisation chimique des huiles essentielles révèle la présence de 2 ou 3 composants principaux à une concentration assez élevée (20–70%) par rapport aux autres composants présents en traces (35).

Il existe environ 3000 espèces de plantes contenant des huiles essentielles, dont 10% sont commercialement importantes et utilisées dans les parfums, les cosmétiques, les médicaments, comme conservateurs alimentaires et médicamenteux et agents aromatisants (36).

#### 2.1.1 Définition

Une huile essentielle est un extrait de plante fabriquée selon un procédé défini par la pharmacopée européenne et l'AFNOR (Norme ISO 9235) : « Une huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé mécanique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (37).

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales selon la pharmacopée française (édition 2012) : « les huiles essentielles médicinales sont des huiles essentielles au sens de la Pharmacopée européenne (2018), possédant des propriétés médicamenteuses. Des huiles essentielles ayant des propriétés médicamenteuses peuvent avoir d'autres usages, notamment alimentaires, cosmétiques, biocides... » (source ANSM)

Les huiles essentielles sont des substances volatiles, du fait de leur masse moléculaire relativement faible ce qui est à la base de leurs propriétés olfactives. Elles sont contenues dans certaines espèces végétales botaniquement définies (5), liquides, limpides et rarement colorés, hydrophobes, liposolubles et miscibles uniquement dans l'alcool et les huiles végétales ou minérales. Elles sont inflammables, et ne contiennent aucun corps gras.

Les composés des huiles essentielles peuvent être synthétisés par tous les organes végétaux, c'est-à-dire les bourgeons, les fleurs, les feuilles, les tiges, les rameaux, les graines, les fruits, les racines, le bois ou l'écorce, et sont stockés dans les cellules sécrétoires, les cavités, les canaux, les cellules épidermiques ou les trichomes glandulaires (38,39).

Les HE sont biométabolisées par les plantes dites aromatiques comme métabolites secondaires. La composition chimique d'une HE est formée essentiellement des terpènes et de leurs dérivés oxygénés (40).

L'aromathérapie est l'utilisation à but de traitement médical d'extraits de plantes aromatiques.

#### Critères de qualité des HE

La mention HEBBD qui signifie Huile Essentielle Botanique et Biochimiquement Définie est un des premiers labels de qualité créé pour les huiles essentielles.

Proposée par l'institut de normalisation scientifique d'aromatologie, cette mention certifie plusieurs critères qualitatifs définissant une HE :

- l'espèce botanique exacte, en latin, comportant le genre, l'espèce, la sous-espèce éventuelle, parfois la variété, le chémotype.
- l'organe producteur des essences, point important quand les plantes aromatiques comportent plusieurs organes producteurs d'HE de composition différente
- le pays d'origine de la plante
- la récolte : le mode de culture de la plante : sauvage, culture bio... choix des plantes, mode de cueillette, provenance, stade végétatif, période de la journée (ex: thym de préférence l'après-midi)
- l'analyse de l'huile essentielle obtenue par les méthodes de référence
- le mode de fabrication : distillation ou pression à froid et que l'HE est brute, vierge, intacte et non modifiée (38,41).

Certaines études rapportent des différences qualitatives et quantitatives dans les constituants volatils entre les différents stades de croissance et de floraison des plantes (42,43).

Le niveau le plus élevé de production d'HE se produit généralement pendant la période de floraison de la plante (44).

### **Exemple de la récolte du thym**

Dans une étude, les variations saisonnières de la composition de l'huile essentielle de thym ont été analysées. Une huile essentielle de *T. vulgaris* où les principaux composants étaient le 1,8-cinéole, suivi par l'acétate de terpényle, le bornéol, le linalol; et pour le *T. hyemalis*, le thymol, qui définit le type chimique et la qualité de l'huile essentielle, et ses précurseurs  $\gamma$ -terpinène et p-cymène.

En ce qui concerne le rendement en huile essentielle et les composants qui définissent la qualité de l'huile, chez *Thymus hyemalis*, la pleine floraison jusqu'au début de la maturation du fruit est la période la plus adéquate pour sa récolte, car le rendement et les composants phénoliques ont atteint leurs concentrations les plus élevées à cette étape phénologique. Dans le même temps, entre la pleine floraison et l'étape de transition pleine floraison / début de la maturation des fruits pourrait être la période au-delà de laquelle la séquence des précurseurs et leur composant final  $\gamma$ -terpinène  $\rightarrow$  p-cymène  $\rightarrow$  thymol commence.

Pour le rendement et la composition de l'huile essentielle de *T. vulgaris* en Espagne, c'est au stade phénologique de la végétation que l'huile a présentée son rendement et sa concentration les plus élevés en 1,8-cinéol, ainsi que des composants de faible poids moléculaire. Cependant, d'autres composants également associés à l'arôme frais de cette huile essentielle, l'acétate de terpényle et le linalol, comme les plus abondants, ont augmenté leur concentration de la pleine floraison à la maturation des fruits.

Ainsi les concentrations des différents composés ont varié pendant tout le cycle végétatif. Pour cette espèce et en respectant le profil aromatique, la période de récolte ne peut être définie que par les nécessités de l'industrie selon son application (42).

**Les produits d'extraction** peuvent varier qualitativement et quantitativement dans leur composition.

De plus, les propriétés stéréochimiques des huiles essentielles peuvent varier et dépendre de la méthode d'extraction (45).

Seul le respect de l'ensemble des critères de qualité garantira l'authenticité des HE, leur relative innocuité et leur pleine efficacité thérapeutique.

**Les contrôles de qualité** du produit final se font sur :

- les caractéristiques organoleptiques (odeur, couleur, saveur)
- les mesures physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire)
- les analyses chimiques (chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse) (36,38)

### **La notion de chémotype**

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier considérablement selon plusieurs facteurs : l'ensoleillement, le climat, la composition du sol, l'altitude, la partie de la plante, la saison de récolte et l'origine géographique, l'époque de la culture et de la récolte, l'organe végétal, l'âge et le stade du cycle végétatif la méthode d'extraction, entre autres (42,46,47).

Ces variations de composition sont appelées chémotypes, elles ont été découvertes dans les années 1970 par le professeur Passer de Montpellier.

La plante la plus représentative est le thym commun (*Thymus vulgaris*) avec 6 chémotypes. Par exemple, un thym vulgaire possède une fragrance plus douce en hiver, car le géraniol est remplacé en bonne partie par son ester, l'acétate de géranyle (4 fois moins anti-infectieux).

La plupart des huiles essentielles commercialisées sont chémotypées par chromatographie en phase gazeuse et analyse par spectrométrie de masse. Des monographies analytiques ont été publiées (pharmacopée européenne, ISO, OMS, Conseil de l'Europe) pour garantir la bonne qualité des huiles essentielles.

Les molécules majoritaires diffèrent selon les espèces d'une plante, l'HE d'une même espèce peut présenter une composition de molécules chimiques variable selon les individus. Ce phénomène s'explique par la biodiversité, car certaines molécules d'une espèce donnée seront plus ou moins sensibles à la climatologie et aux grands frimas. Par ailleurs il peut exister des réponses adaptatives suite à la libération des molécules d'une espèce dans le sol.

Ces ensembles très complexes que sont les HE sont soumis à des facteurs de variabilité de 2 types ; intrinsèques et extrinsèques. La nature fait apparaître des essences uniques, il est impossible d'avoir une reproductivité parfaite de la composition des HE naturelles (38).

## **2.1.2 Historique**

Le terme « huile essentielle » proviendrait du nom inventé au XVI<sup>e</sup> siècle par le réformateur suisse de médecine, Paracelsus von Hohenheim; il a nommé le composant efficace d'un médicament Quinta essentia (48).

Le chimiste français Gattefossé est considéré comme le père fondateur de l'aromathérapie, il consigna ses observations cliniques dans un livre qu'il publia en 1937 Aromathérapie, les huiles essentielles, hormones végétales et créa le terme d'*aromathérapie*. Il fut le premier à montrer les relations structure/activités des composants aromatiques et à codifier les grandes propriétés des arômes naturels (49).

Le docteur Valnet poursuivit les travaux de Gattefossé, et publia des ouvrages de référence. En déficit d'antiseptiques en chirurgie militaire, il avait expérimenté l'efficacité des HE chez l'homme, suivant ainsi l'observation de Sévelinge, un pharmacien lyonnais, qui en 1929, étudiant ces essences en médecine vétérinaire en avait démontré le pouvoir antibactérien.

Le premier congrès d'aromathérapie médicale a eu lieu à Paris en 1960, sous la présidence du docteur Valnet. Il se concentre en particulier sur l'étude des propriétés anti-infectieuses des huiles essentielles. En 1973 il crée le terme d'aromatogramme (50).

Par la suite, Pierre Franchomme, avec la notion de chémotype contribua à améliorer l'identification des principes actifs dans les extraits utilisés (51).

L'utilisation de la chromatographie a permis de faire avancer les analyses des molécules constituant des HE, et de caractériser par la suite leur mode d'action.

### **2.1.3 Rôle des huiles essentielles**

Le rôle essentiel des HE au sein d'une plante n'est pas encore bien éclairci. Les études qui ont été réalisées dans ce sens suggèrent que ces essences constituent un moyen de défense contre les prédateurs en modulant les comportements de ceux-ci vis-à-vis des plantes. Elles peuvent aussi jouer un rôle important comme des modérateurs des réactions d'oxydation intramoléculaires protégeant la plante contre les agents atmosphériques (52).

Les plantes aromatiques utilisent les HE également pour inhiber la germination et le développement d'autres espèces végétales dans leur voisinage (effet allélopathique) (53).

D'autres effets des HE sont liés à l'attraction des insectes pollinisateurs, à la dispersion des graines et à la répulsion des herbivores (54). De point de vue physiologique, les plantes aromatiques synthétisent les HE dans des structures végétales très spécifiques. Ces structures sont de nature différente en fonction de la plante aromatique. En général, on trouve les trichomes glandulaires, les cavités sécrétrices et les canaux sécréteurs.

Ces trois structures peuvent être présentes chez certaines espèces dans tous les organes végétaux (fleurs, feuilles et écorces) (40).

### **2.1.4 Familles**

Les huiles essentielles sont des mélanges variables et complexes de terpénoïdes principalement, en particulier des monoterpènes (C10) et des sesquiterpènes (C15) et des phénylpropanoïdes. A partir de ces molécules, le végétal élabore par des réactions successives des composés tels que des phénols, des acides, des oxydes, des alcools, des aldéhydes, des cétones, des esters, des éthers ou des lactones et des composés mineurs tel que les azotés, soufrés et coumarines.

Les terpènes font partie des produits chimiques responsables des utilisations médicinales, culinaires et parfumées des plantes aromatiques et médicinales. La plupart des terpènes dérivent de la condensation d'unités d'isoprène ramifié à cinq carbones et sont classées en fonction du nombre de ces unités présentes dans le squelette carboné. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq atomes de carbone, l'isopenténylpyrophosphate (55).

Les composés phénoliques (phénylpropanoïdes) sont biométabolisés à partir de deux précurseurs essentiels (acides aminés aromatiques). Ces composés phénoliques sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (56).

### **Familles biochimiques (36)**

Les composants aromatiques de toute huile essentielle sont des molécules connues et biochimiquement définies. Ce sont ces éléments chimiques aromatiques qui leur confèrent leurs propriétés spécifiques.

<b>Famille biochimique</b>	<b>Phénols</b>	<b>Monoterpénols</b>	<b>Aldéhydes aromatiques</b>	<b>Cétones</b>	<b>Oxydes</b>
<b>Propriétés</b>	Anti-infectieux puissants à large spectre d'action Stimulant général	Anti-infectieux puissants à large spectre d'action Immunomodulants Neurotoniques	Anti-infectieux puissants à large spectre d'action Immunostimulant Tonique général	Antiparasitaires, antiviraux, fluidifiant, cicatrisant, antispasmodique	Antiviraux, antibactériens modeste Expectorantes, mucolytiques Immunomodulants
<b>Spécificité biochimique</b>	Thymol, carvacrol, eugénol, gaïacol	Borneol, citronellol, linalol, menthol, terpineol, thujanol, nerol, géraniol (-ol)	Cinnamaldéhyde, cuminaldéhyde	Menthone, carvone, camphor, thuyone, jasmone, borneone (-one)	1,8 cinéole, linaloxyde
<b>Exemples d'huiles essentielles</b>	Thym à thymol, origan, sarriette des montagnes, girofle	Thym à linalol, à thujanol ou géraniol, thym à feuilles de sarriette, tea tree, palmarosa, néroli, menthe poivrée, bois de rose	Litsée, cannelle de ceylan,	Curcuma, menthe poivrée	Eucalyptus globuleux, romarin 1,8 cinéole, myrte, niaouli, ravintsara, saro, laurier noble
<b>Esters</b>	<b>Monoterpènes</b>	<b>Ethers</b>	<b>Lactones</b>	<b>Phtalides</b>	<b>Aldéhydes terpéniques</b>
Calmant, antispasmodique, anti-inflammatoire, antifongique	Stimulant général, antiseptique, antiviraux, antalgiques, expectorants	Antispasmodique, antiviraux	Anti-infectieux, fluidifiant,	Antibactériens et antifongiques variables et occasionnels	Anti-inflammatoire, antibactérien, antiviraux, antifongiques non systématiques à spectre étroit, antiseptique
Benzyl acetate, methyl salicylate, linalyl acetate, eugenyl acetate	Camphene, myrcene, limonene, terpinene, $\alpha$ et $\beta$ pinene, phellandrene (-ene)	Estragole, anéthole	Alantolactone, costunolide, santalolactone	Sédanolide, ligustilide (-lide)	Néral, géraniol, citronellal, myrténal, citral (-al)
Sauge sclarée, petit grain bigaradier, gaulthérie,	Pin sylvestre, pamplemousse, orange, encens, cyprès, citron jaune	Fenouil, estragon, anis étoilé, laurier, basilic tropical	Inule, céleri	Livèche	Lemongrass, eucalyptus citronné
<b>Sesquiterpénols</b>	<b>Esters terpéniques</b>	<b>Sesquiterpènes</b>	<b>Coumarines</b>	<b>Composés azotés</b>	<b>Composés soufrés</b>
Décongestionnant veineux, tonique, hypotenseur	Antispasmodique, anti-inflammatoire, calmante,	Anti-inflammatoire, décongestionnant veineux, antiseptiques, antalgiques	Antispasmodique, équilibrant du système nerveux, sédatif, anticoagulantes	Rares et à l'état de traces Pas d'activité	Rares et à l'état de traces Pas d'activité
Farnesol, bisabolol, pachoulol, ledol, cedrol	Salicylate de méthyle, acétate de néryle, benzoate de benzyle	$\beta$ -caryophyllene, bisabolene, cedrene, curcumene, germacrene	Herniarine, scopolétine	Damascénone, alcaloïdes terpéniques	Mintsulfide
Carotte	Gaulthérie, hélichryse	Ylang-ylang, myrrhe amère, gingembre	Angélique, bergamote, camomille romaine, mélisse, pamplemousse	Rose de damas, patchouli	Ail, menthe poivrée

### 2.1.5 Obtention

Il existe 3 types de structures sécrétrices dans les plantes : (3)

- les poils glandulaires épidermiques, ils produisent les essences dites superficielles
- les poches sphériques schizogènes présentes dans les cannelures, émettant les sécrétions d'HE odorantes
- les canaux glandulaires lysigènes, formant des grappes de poches sécrétrices sous la surface du tissu végétal (57)

### Biosynthèse des molécules aromatiques (36)

Les cellules sécrétrices des feuilles sont les organes responsables de la production d'essence, mais également de la photosynthèse. A l'intérieur de la chlorophylle se construisent les trioses (sucres à 3 atomes de carbone) puis les hexoses (fructose, sucre à 6 atomes de carbone).

Cette première élaboration exige des matériaux et de l'énergie fournie par le rayonnement solaire qui permet l'évolution des ADP (adénosine diphosphate) et ATP (adénosine triphosphate). L'énergie solaire absorbée par la chlorophylle, est stockée dans les liaisons phosphores enrichies de ce fait en énergie. L'énergie en surplus sert à la dislocation des molécules d'eau.

Au cours de cette réaction, l'oxygène est libéré puis éliminé. Seul subsiste le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). L'intégration de H<sup>+</sup> (proton) dans la molécule de dioxyde de carbone consomme une énergie importante livrée par les ATP. L'association de plusieurs molécules de CHO avec l'aide d'enzymes et de la même énergie donne naissance aux trioses puis aux hexoses. L'hexose « fructose » sort du grain de chlorophylle et arrive dans le cytosol puis dans une mitochondrie où il créera de nouvelles synthèses moléculaires.

La voie des terpénoïdes et la voie des phénylpropanoïdes sont les 2 voies principales de production des essences de plantes aromatiques.

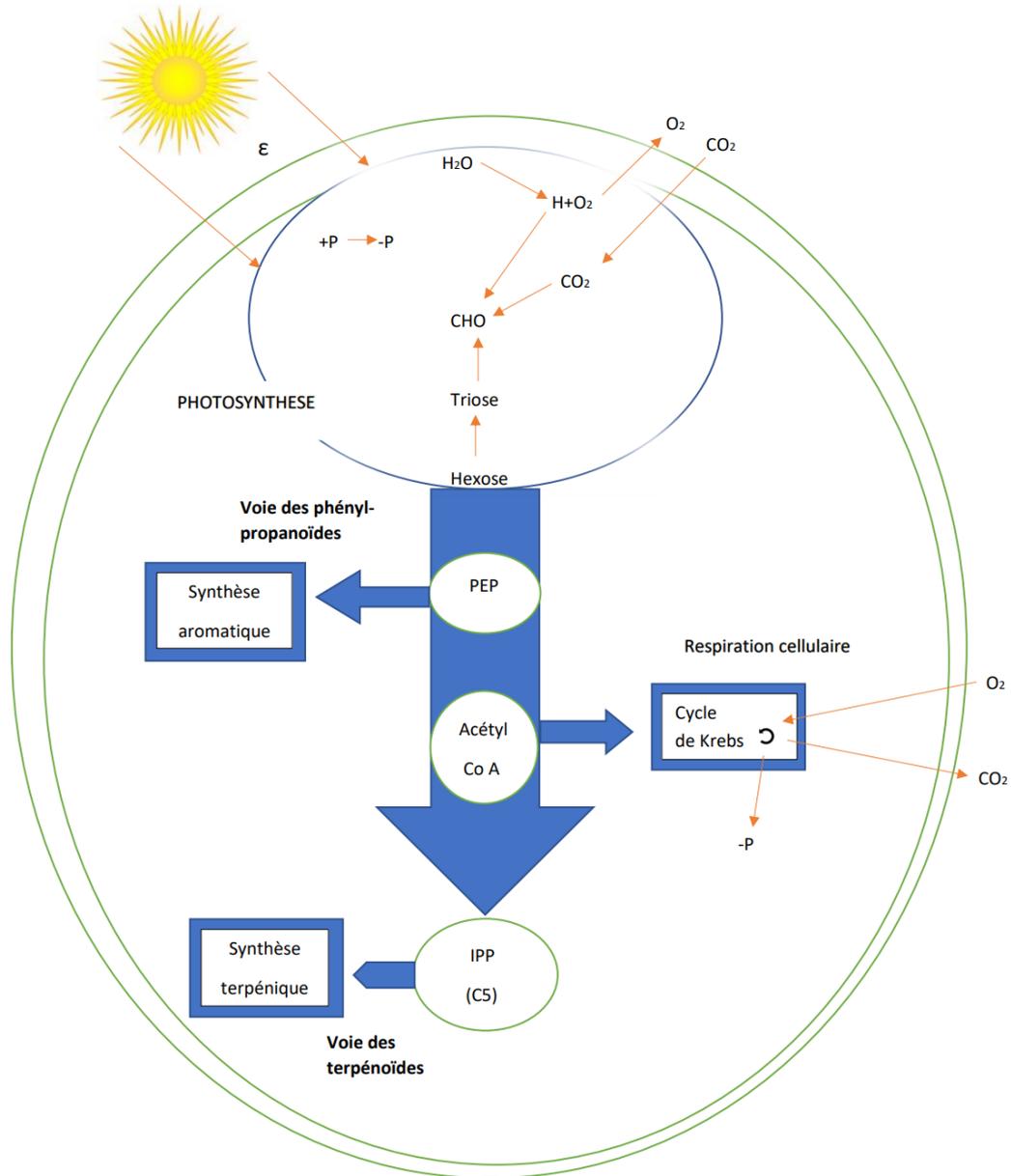


Figure 3: Biosynthèse des molécules aromatiques (36)

Le fructose produit du PEP (phosphoenolpyruvate) qui engendre de l'Acétyl CoA. Ce dernier produit une molécule à 5 atomes de carbone, l'IPP (Diphosphate d'isopentényle). Cet IPP est le matériau de base pour la synthèse terpénique.

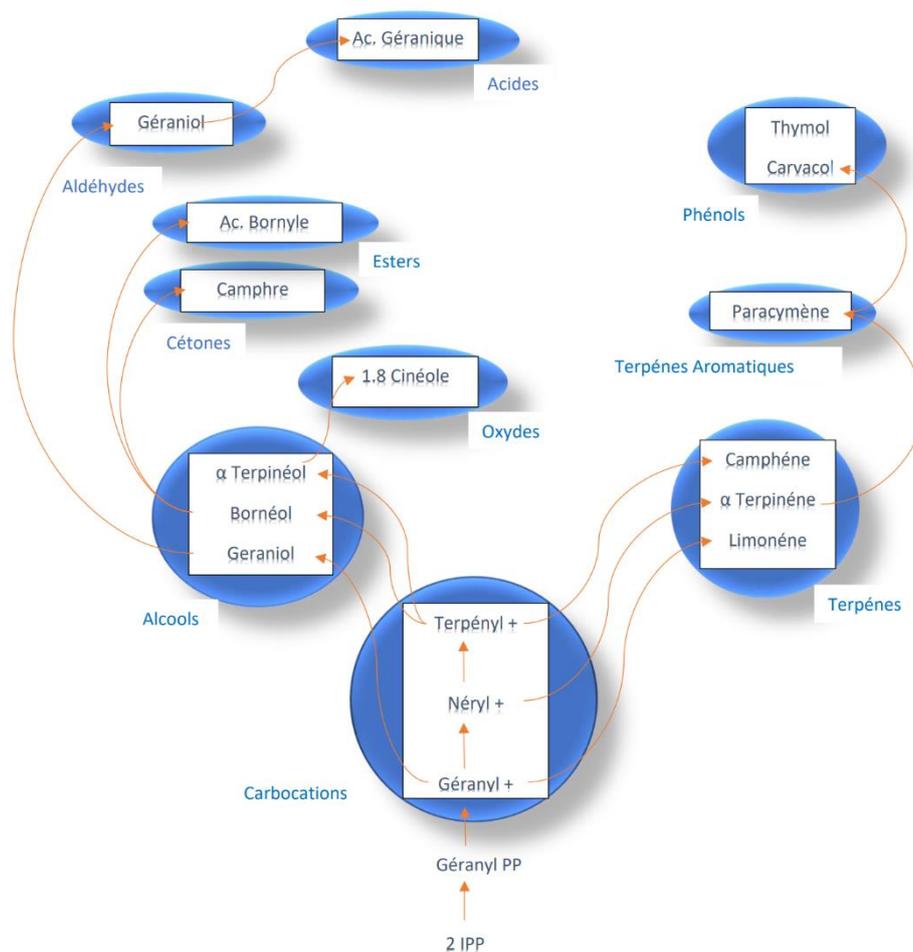


Figure 4: Biosynthèse générale des terpénoïdes (36)

Les terpènes ou terpénoïdes sont synthétisés dans le cytoplasme de la cellule par la voie de l'acide mévalonique à partir de l'acétyl CoA (58).

Les terpènes sont des hydrocarbures, composés d'unités d'isoprène et sont généralement représentés par la formule chimique  $(C_5H_8)_n$ . Les divers squelettes terpéniques sont classés par le nombre de chaînons isopréniques qui les composent : monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ), les sesquiterpènes ( $C_{15}H_{24}$ ), les diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ) et les triterpènes ( $C_{30}H_{40}$ ). Les terpénoïdes sont des terpènes comportant une ou plusieurs fonctions plus ou moins oxydées (alcools, aldéhydes, cétones, acides...)

La synthèse de la molécule d'IPP consiste en la condensation de 2 molécules d'acétyl CoA pour former l'acétoacétyl CoA.

Le méthylbutadiène est à la base du concept de la règle isoprénique, et c'est à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP) que se fait la biosynthèse des composés terpéniques. L'isomérisation de l'IPP va donner le diméthylallyl pyrophosphate (DMAP). La condensation entre une unité d'IPP et une unité de DMAP donne le géranyl pyrophosphate (GPP). Ce dernier composé pourra subir des cyclisations, des réactions fonctionnelles pour amener à la biosynthèse des terpènes cycliques et acycliques.

Les huiles essentielles de thymus sont principalement composées d'hydrocarbures monoterpéniques, qui sont les précurseurs biogénétiques des phénols comme le  $\gamma$ -terpinène et le p-cymène. Carvacrol, thymol et p-cymène, sont généralement les composés les plus trouvés chez les espèces de Thymus et avec l'activité la plus notable.

## **Synthèse phénylpropènes**

Les phénylpropènes sont nommés ainsi car ils contiennent un groupe phénol aromatique à six carbones et une queue propène à trois carbones à partir d'acide cinnamique, qui est produit au cours de la première étape de la biosynthèse des phénylpropanoïdes. Ces composés représentent une partie relativement petite des HE. L'eugénol, l'isoeugénol, la vanilline, le safrole et le cinnamaldéhyde sont les phénylpropènes les plus étudiés (58).

### **2.1.6 Principe d'extraction des molécules aromatiques**

#### **L'expression mécanique à froid**

Cette technique sans chauffage est réservée à l'extraction des zestes des agrumes, méthode la plus simple mais la plus limitée, elle consiste à briser mécaniquement les poches à essence des zestes d'agrumes pour en recueillir l'essence.

On parle plutôt d'essence et non huile essentielle car aucune modification liée à des solvants ou à la vapeur d'eau n'a lieu. L'HE est libérée par un courant d'eau, puis décantée (38).

#### **La distillation par entraînement à la vapeur d'eau**

Le procédé consiste soit à faire traverser une cuve remplie de plantes aromatiques par la vapeur d'eau, soit la matière végétale est immergée dans un bain d'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. Une distillation à basse ou haute pression utilisant de l'eau bouillante ou de la vapeur chaude.

La montée de la chaleur permet l'éclatement des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Un mélange se forme entre la vapeur d'eau et les substances aromatiques. La vapeur d'eau enrichie d'huile essentielle traverse un serpentin où elle se condense, à la sortie un essencier recueille l'eau et l'huile essentielle, la différence de densité entre les 2 permet leur séparation (l'huile essentielle est plus légère).

Les molécules aromatiques subissent diverses modifications (oxydations, hydrolyses, restructurations).

L'extraction des HE non superficielles demande plus de vapeur et plus de temps, car la vapeur d'eau condensée doit d'abord imprégner le cœur du végétal avant de permettre aux molécules de diffuser dans le courant de vapeur (36,38).

Il existe d'autres procédés d'extraction tel que : enflourage, extraction par solvants organiques, extraction par ultra-sons, extraction par fluide subcritique ou supercritique, extraction assistée par micro-ondes, mais qui ne répondent pas au cahier des charges, et ne répondent pas à la définition d'HE (36,38).

L'extraction des huiles ne doit pas entraîner de changement significatif dans leurs compositions moléculaires. Cependant, la méthode d'extraction peut influencer le type et la quantité de molécules extraites.

Pour obtenir une HE de première qualité, les critères suivants doivent être respectés lors de l'extraction :

- alambic en acier inoxydable

- la distillation doit se faire à basse pression (ex : la couleur de l'HE de thym vulgaire en pleine floraison varie du rouge clair au rouge brun en élevant la pression)
- la durée de la distillation doit être prolongée pour permettre de recueillir le « totum » des molécules aromatiques, c'est à dire l'ensemble des fractions dites de « tête », de « cœur » ou de « queue ». Par exemple les 3/4 de l'HE de thym vulgaire sont extraits durant les 30 premières minutes, mais il faut de 60 à 80 min supplémentaires pour extraire le solde restant. En distillant à haute pression et en cessant la distillation après 30min cela donne des HE de moins bonne qualité, avec les composés les plus volatiles.
- l'eau sera de source, peu ou non calcaire
- après distillation, les HE doivent être filtrés, puis stockées dans des cuves hermétiques, et conservées ensuite dans des flacons en verre opaque pour assurer leur conservation à l'abri de la lumière et de l'oxygène (36).

## 2.2 Thym

### 2.2.1 Historique

Le mot *Thymus* a deux dérivations possibles : du mot grec *thyo* qui signifie parfumer, nettoyer ou fumer, ou du mot thymon pour courage. Le thym était un symbole de grâce et élégance pour les Grecs.

Il y a beaucoup de traditions liées au caractère tonique de ces plantes. Les Egyptiens l'utilisaient pour l'embaumement. Les soldats romains l'utilisaient pour prendre un bain dans l'eau avec du thym pour leur redonner vigueur. On pensait que les brins offraient une protection contre la peste, et étaient également brûlés à l'intérieur pour purifier l'air.

L'huile de thym était utilisée comme un antiseptique pendant la Première Guerre mondiale. Encore aujourd'hui, le thym est utilisé dans les liquides d'embaumement, protège le papier de la moisissure et est utilisé pour préserver les spécimens d'anatomie et de botanique (59).

### 2.2.2 Généralités

Le genre *Thymus*, composé de plus de 300 espèces appartient à la famille des Lamiacées. *Thymus vulgaris L.* est une plante herbacée vivace indigène en Europe centrale et méridionale, en Afrique et en Asie.

Le thym se développe comme un arbuste avec une tige trapue et surélevée, sur laquelle brillent par paires de petites feuilles longitudinales et des fleurs rose-violet, violet-clair ou blanches à deux lobes. Les cannelures oblongues et brunes sont des obstructions. Cette plante a une hauteur de 10–40 cm.

L'huile essentielle se trouve dans les poils glandulaires des feuilles et des fleurs. L'huile essentielle de thym est obtenue par distillation à la vapeur de parties aériennes fraîches de *T. vulgaris L.*

Les plantes de ce type sont utilisées en médecine populaire depuis des milliers d'années, notamment dans les pays de la région méditerranéenne (60).



Figure 5: *Thymus vulgaris* L.

L'espèce la plus connue est le thym à Thymol (*Thymus vulgaris*), couramment utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales (61).

Les principaux composants de l'huile essentielle de *Thymus* comprennent les dérivés monoterpéniques de type phénol : le thymol, carvacrol. Malgré la diversité chimique considérable de ce genre, le thymol et le carvacrol sont présents dans toutes les espèces, mais en quantités variables (62).

Ce genre a souvent été étudié pour son activité antimicrobienne. L'activité antimicrobienne semble être fortement liée aux terpènes phénoliques (63).

En particulier, *T. vulgaris* et *T. zygis* (thym espagnol, thym blanc) ont une grande importance économique en raison de leurs quantités élevées de thymol. Par conséquent, ces espèces sont mentionnées dans de nombreuses monographies internationales (Basch, Ulbricht, Hammerness, Bevins et Sollars, 2004; Agence européenne des médicaments, 2016; Organisation mondiale de la santé, 1999) et des rapports d'évaluation (Agence européenne des médicaments, 2013).

### 2.2.3 Les différents chémotypes et espèces

Le polymorphisme intraspécifique élevé de *T. vulgaris* L. dans la production de terpènes est remarquable, puisque 6 chémotypes (63) de cette espèce ont été identifiés entre 1971 et 1986, par Passet, Granget et Vernet. Certains sont plus rares, comme le thym à thujanol.

Les 2 chémotypes les plus connues et utilisées en pharmacie sont le thym à thymol et le thym à linalol. Les 4 autres chémotypes de *Thym vulgaris* L. sont le thym à thujanol, le thym à géraniol, le thym à carvacrol et le thym à paracymène (64).

	Thym à linalol	Thym à thymol	Thym à thujanol	Thym à géraniol	Thym à carvacrol	Thym à paracymène
<b>Famille biochimique</b>	Monoterpénol	Phénol	Monoterpénol	Monoterpénol/es ters	Phénols / Monoterpènes	Monoterpènes

<b>Spécificité biochimique</b>	Linalol, acétate de linalyle, thuyanol	Thymol, paracymène	Thujanol, terpinèn-4-ol	Géraniol, acétate de géranyle	Carvacrol, thymol, $\gamma$ -terpinène	$\gamma$ -terpinène, paracymène
<b>Propriétés</b>	Antibactérien à large spectre d'action, antifongique, antivirale, antiparasitaire Tonique général Immunostimulant	Antibactérien à large spectre d'action, antifongique, antivirale, antiparasitaire Stimulant immunitaire, digestive, Expectorant	Antibactérien, antifongique, antivirale Stimulant du foie, tonique circulatoire, Anti-inflammatoire, neurotonique	Antibactérien à large spectre d'action, antifongique, antivirale Tonique utérin, cardiotonique, neurotonique,	Antibactérien à large spectre d'action, antifongique, antivirale Tonique générale Immunostimulant	Anti-infectieux Antalgique Anti-inflammatoire
<b>Utilisations</b>	Affections ORL, candidoses, inflammations intestinales, infections urinaires, fatigue nerveuse, dermatoses	Infections ORL, intestinales, gynécologiques et urinaires, buccales, rhumatismes	Infections ORL, affections bucco-dentaires, infections virales, mycoses, rhumatismes	Mycoses, infections gynécologiques, ORL, urinaires, affections cutanées	Infections respiratoires, intestinales, urinaires, gynécologiques, buccales	Douleurs articulaires et musculaires
<b>Voies d'administration</b>	Voie orale, cutanée, en diffusion	Voie orale	Voie orale, cutanée	Voie orale, cutanée, diffusion	Voie orale, cutanée	Voie cutanée
<b>Précautions</b>		VO à faibles doses et de manière limitée dans le temps  CI : Insuffisance hépatique	VO 7j max  Voie cutanée : Diluer à 20 % dans une huile végétale		VO 7j max  Voie cutanée : Diluer à 10 %	Voie cutanée : Diluer à 20 % dans une huile végétale

*Tableau 3: 6 chémotypes du thym (41,65)*

D'autres espèces de thym existent, ces huiles essentielles de thymus, sont majoritairement anti-infectieuses, mais pourvues chacune de particularités :

**HE de Marjolaine sylvestre, *Thymus mastichina*** : seule huile essentielle de thym contenant du 1, 8 cinéole, molécule mucolytique et expectorante. Elle est indiquée dans les infections ORL et bronchiques.

**HE de Thym saturoïde, *Thymus saturoides*** : antalgique, anti-infectieuse, immunomodulatrice, tonique et stimulante. Intéressante dans le suivi ou la prévention de terrain des pathologies auto-immunes, pour toutes les douleurs de type rhumatismale et arthrosique, dans les états d'asthénies et les bouleversements hormonaux et métaboliques.

**HE de Serpolet, *Thymus serpyllum*** : riche en phénols, proche de l'huile essentielle de Thym à thymol, réservée à des états infectieux aigus. A utiliser uniquement sur avis d'un aromathérapeute

**HE de Thym rouge d'Espagne, *Thymus zygis*** : anti-infectieuse extrêmement puissante,

immunostimulante, utilisée parfois en cas d'infections à répétition, mais avec précaution car elle est dermocaustique et hépatotoxique. A utiliser uniquement sur avis d'un aromathérapeute (66).

## 2.2.4 Composition chimique de l'huile de thym

Le thymol est la molécule principale, Neuman a été le premier à l'isoler en 1719. Le composé est caractérisé par de fortes propriétés bactéricides, fongiques et antiparasitaires, avec une toxicité relativement faible pour l'homme et les animaux.

Le pourcentage des autres composés est généralement compris dans les plages suivantes :  $\gamma$ -terpinène (5–10%), linalol (4–6,5%), carvacrol (1–4%),  $\beta$ -myrcène (1–3%), terpin-4-ol (0,2–4,0%).

En outre, il existe également des hydrocarbures monoterpéniques, tels que  $\alpha$ -tujanol,  $\alpha$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène, camphre myrcène, ainsi que des dérivés oxygénés des monoterpènes : 1,8-cinéol, linalol, terpin-4-ol et  $\gamma$ -terpinol, camphre et bornéol. Des hydrocarbures sesquiterpéniques ont également été identifiés, parmi lesquels l' $\alpha$ -humulène, l' $\alpha$ -kopène, le kubeben, l' $\alpha$ -gurjunen, le germacren D, l' $\alpha$  et le  $\gamma$ -muurolen et le  $\gamma$  et le  $\delta$ -cadinène (67).

Dans la plupart des études rapportées, il existe une relation linéaire entre la concentration de thymol et de carvacrol, c'est-à-dire que lorsque le thymol est élevé dans une HE, la quantité de carvacrol est faible et inversement (43). Les composants  $\gamma$ -terpinène et de p-cymène sont des précurseurs phénoliques.

Des études phytochimiques de l'HE du genre *Thymus* ont signalé la présence d'un certain nombre de composés bioactifs, dont le carvacrol, le thymol, le p-cymène et le  $\gamma$ -terpinène, qui auraient de nombreuses activités biologiques (55,68).

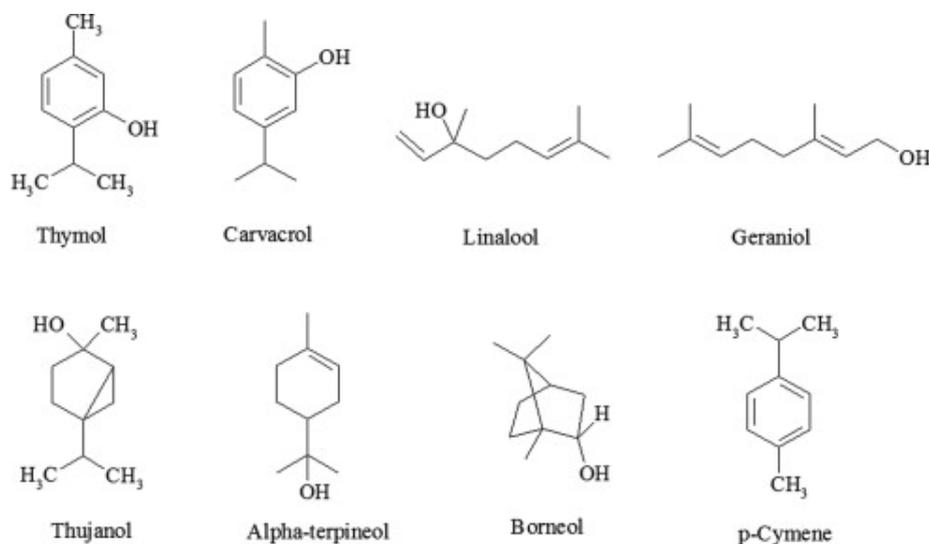


Figure 6: Structure chimique des principales substances présentes dans les huiles essentielles des plantes *Thymus*

Il a été établi que la production de composés phénoliques est favorisée dans les zones climatiques plus chaudes et plus sèches, tandis que les autres composés non phénoliques s'accumulent généralement en plus grandes quantités dans les zones plus froides et plus humides (69).

Selon la Pharmacopée européenne 5.0 (Ph. Eur. 5.0) (37), la teneur minimale en HE de *T. vulgaris* est de 12 mL / kg. La pharmacopée fait référence au chémotype du thymol.

Les huiles essentielles de type « thymol » avec du thymol comme composé prédominant sont conformes à la définition de la Pharmacopée européenne (37).

En ce sens, les préparations à base de plantes de thym sont indiquées pour le traitement des catarrhes des voies respiratoires supérieures, la bronchite aiguë, la toux sèche, les voies respiratoires supérieures aiguës, les maux de gorge, comme mucolytique et expectorant dans la toux associée au rhume, etc., selon l'Agence européenne des médicaments (2013).

### **Thymol**

Le thymol est un monoterpène naturel dérivé phénolique de cymène et un isomère de carvacrol. Le thymol (10–64%) est l'un des principaux constituants des huiles essentielles de thym.

Il est couramment utilisé dans les préparations dentaires pour réduire les bactéries productrices de mauvaises odeurs (70). Il a également été rapporté que le thymol réduit la résistance bactérienne à certains antibiotiques tels que pénicilline (71). En outre, le thymol possède différentes propriétés biologiques et pharmacologiques, des propriétés telles que antimutagène, antitumoral, antioxydant, anti-inflammatoire (72).

*T. vulgaris* est utilisé pour traiter la dyspepsie et d'autres troubles gastro-intestinaux, en raison de son effet carminatif et de son activité spasmolytique, qui semble être dû au thymol et aux flavones (73).

Des études sur l'action antibactérienne du thymol ont montré qu'il peut provoquer une perturbation de la membrane cytoplasmique, perturbant la force motrice du proton, le flux d'électrons et la coagulation du contenu cellulaire. Le thymol a également altéré la voie métabolique du citrate et affecté les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ATP (74). Lors de l'étude sur la *Salmonella*, il a été mis en évidence l'effet sur les protéines impliquées dans la division cellulaire et des altérations dans les compositions des acides gras sur *E. coli* (75).

Sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*: augmentation de la perméabilité cellulaire aux colorants nucléaires, dissipation du gradient pH, fuite des ions inorganiques (76).

### **Carvacrol**

Le carvacrol est un phénol monoterpénoïde, principalement présent dans certaines espèces de plantes telles que thym, origan, bergamote sauvage.

À l'heure actuelle, le carvacrol est utilisé en faibles concentrations comme ingrédient aromatisant alimentaire et conservateur, en raison de son odeur agréable et de son activité antimicrobienne, pour la prévention de la croissance et contamination (77), ainsi que d'un ingrédient de parfum dans des formulations cosmétiques.

Les résultats d'études montrent que carvacrol possède une variété de propriétés biologiques et pharmacologiques, y compris antioxydant, antimicrobiennes, anticancéreuses, hépatoprotecteur, spasmolytique et vasorelaxante (78) ainsi que des effets anti-inflammatoires attribués à l'inhibition de l'œdème inflammatoire et migration des leucocytes (79).

Il est particulièrement efficace contre les agents pathogènes d'origine alimentaire, notamment *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Bacillus cereus*.

Le carvacrol a une activité antioxydante élevée et a été utilisé avec succès, principalement associé au thymol, comme phytoadditif alimentaire pour améliorer le statut antioxydant.

Le site principal de l'action antimicrobienne du carvacrol se situe au niveau de la membrane, où ce phénol monoterpénoïde hydrophobe interagit avec les chaînes d'acides gras de la bicouche

lipidique provoquant la désintégration de la membrane. À l'intérieur du cytoplasme bactérien, le site secondaire, l'efficacité de ce composé conduit à la désintégration de la force proton-motrice et épuisement du pool ATP (80,81).

Un autre effet des huiles essentielles sur les membranes cellulaires est l'inhibition de la sécrétion de toxines (82). Ainsi, la sécrétion de toxines peut être empêchée par des modifications de la membrane bactérienne en raison de l'influence des composés d'huiles essentielles sur le processus de transport transmembranaire dans la membrane plasmique, ce qui limite la libération de toxines dans l'environnement extérieur (83).

Le carvacrol peut également inhiber la synthèse de la flagelline, une protéine microbienne nécessaire à la motilité bactérienne (81,84).

Et entrainer une déviation du cycle de Krebs vers la fermentation et fuite de potassium sur *Escherichia coli* (85).

### **p-Cymene**

Le p-cymène est le précurseur biologique du carvacrol et thymol. C'est un hydrocarbure aromatique naturel à substitution alkyle.

Le p-cymène apparaît généralement comme ayant un faible effet antibactérien, cependant il agit en synergie avec le thymol et carvacrol, ayant une plus grande affinité pour les membranes cellulaires bactériennes il peut donc perturber l'intégrité de la membrane (81).

Le p-cymène, est supposé comme une impureté de substitution dans la membrane provoquant des dilatations membranaires en diminuant les températures d'enthalpie et de fusion des membranes sans perturber la perméabilité. Cette expansion des membranes par le p-cymène peut potentialiser l'activité d'autres molécules pour perturber les membranes et pénétrer dans la cellule pour interagir avec les cibles intracellulaires du médicament conduisant à la mort cellulaire. Le p-cymène s'est également révélé être un dénominateur commun dans les interactions synergiques lorsqu'il était combiné avec le linalol, le  $\gamma$ -terpinène et le bornéol (86).

### **$\gamma$ -terpinene**

Les terpinènes sont des hydrocarbures isomères qui présentent des différences dans la localisation de leurs doubles liaisons carbone-carbone dans leurs squelettes chimiques (87).

$\gamma$ -terpinène est un produit naturel bien connu, utilisé dans les parfums et les arômes, et est largement répandu dans différentes plantes médicinales et aromatiques (88).

En fait, le  $\gamma$ -terpinène est l'un des composants chimiques majeurs de l'HE de thym, possédant des activités biologiques puissantes, notamment des propriétés antioxydantes et antibactériennes (89).

Le  $\gamma$ -terpinène et l' $\alpha$ -terpinène sont des monoterpènes cycliques connus pour perturber les bicouches lipidiques de la membrane, ce qui entraîne des fuites lipidiques (90), ce qui pourrait favoriser le passage d'autres molécules dans la cellule, ce qui accroît leur efficacité antimicrobienne.

Il a été confirmé que les terpinènes agissent comme des véhicules qui améliorent l'afflux d'autres composés pour atteindre leurs cibles médicamenteuses intracellulaires. Les terpinènes lorsqu'ils sont combinés avec des terpénoïdes augmentent le nombre et la taille des pores conduisant à des interactions synergiques entre les deux classes de molécules (86).

## **2.2.5 Propriétés et utilisations**

L'une des propriétés les mieux établies des huiles essentielles et des extraits obtenus à partir de plantes du genre *Thymus* est représentée par son activité antibactérienne. En fait, le premier

article montrant des preuves de cette propriété antimicrobienne a été publié dans les années 60 (91). Depuis lors, et surtout au cours des 20 dernières années, un grand nombre d'huiles essentielles de *Thymus*, d'extraits et de leurs composés isolés ont été étudiés pour l'activité antimicrobienne. Ces produits présentent un intérêt particulier, car aucune résistance ou adaptation bactérienne n'a été décrite, et des effets secondaires faibles ou insignifiants ont été constatés à la fois pour les huiles essentielles et les extraits entiers (92).

Les huiles essentielles et les extraits de plantes de *Thymus* présentent différents propriétés telles que antioxydant, antibactérien, antivirale, antifongique, antiparasitaires, anti-inflammatoires et expectorantes, activité tonique, carminatives, digestives, antispasmodiques... (93–95)

Les thés de plusieurs espèces de thym sont un remède traditionnel pour les troubles gastro-intestinaux et les huiles étaient autrefois pris pour expulser les parasites intestinaux.

Le thym a également des propriétés antispasmodiques, qui en font un remède efficace pour les maux de gorge, la toux irritable et bronchite. Les bains de bouche au thym sont également utilisés contre les infections. En externe, il est appliqué pour nettoyer la peau contre acné. En plus des applications végétales, les huiles de thym sont également utilisées dans les industries des arômes et des aliments, principalement dans la fabrication de parfums et de cosmétiques, ou pour aromatiser aliments, boissons et confiseries, dentifrices, bains de bouche et médicaments contre la toux (96).

Les produits commerciaux à base de thym comprennent herbe fraîche ou séchée, différents extraits de plantes (huiles essentielles et oléorésines) et les plantes paysagères.

Tout au long de l'histoire, les parties aériennes et les constituants volatils des espèces de *Thymus* ont été couramment utilisés comme tisanes, condiments et épices, ainsi qu'à diverses fins médicinales (94,97).

En raison de ses propriétés antiseptiques et antimicrobiennes, l'huile essentielle de *Thymus* a également été utilisée à des fins de conservation (98).

Dans ce contexte, cette HE gagne un large intérêt dans l'industrie alimentaire pour son potentiel antiseptique, ainsi que pour être reconnu comme sûr (GRAS) (94).

Les huiles essentielles peuvent être exploités comme additifs antimicrobiens dans les aliments, en raison de leur pouvoir bactéricide ou une activité bactériostatique contre les agents pathogènes d'origine alimentaire (par exemple, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*). Les huiles essentielles sont généralement utilisées pour conserver la viande et les produits à base de viande car leur arôme n'altère pas les propriétés organoleptiques de ces types d'aliments (84,99).

L'huile de thym figure parmi les dix premiers HE mondiaux en ce qui concerne son utilisation comme conservateur alimentaire. Les propriétés aromatiques et médicinales de l'espèce *Thymus* en ont fait l'une des herbes les plus populaires. (95).

## 2.2.6 Voies d'administration

Les voies d'administration autorisées dépendront de l'espèce ou du chémotype utilisé.

### Voie orale

Les HE agissent à différents étages de la muqueuse digestive, sur la flore résidente puis à la suite de leur passage à travers les villosités de l'intestin grêle elles se retrouvent dans la circulation générale et diffusent alors dans tout l'organisme permettant une action profonde et

étendue.

Facile d'utilisation et généralement bien acceptée par le patient, l'usage de certaines d'entre elles n'est possible que par cette voie.

Par voie orale classique, les huiles essentielles auront une action systémique. En prise sublinguale elle permettra d'atteindre la circulation générale en évitant l'effet de premier passage hépatique et une action plus rapide, la biodisponibilité sera plus importante. Les huiles essentielles peuvent être administrées par voie orale sous différentes formes, mais il faudra utiliser des supports tels que des comprimés neutres de lactose, de la mie de pain, un carré de sucre ou du miel. On peut également les trouver sous forme de solutions, sirops, gélules, capsules...

La voie orale est adaptée aux adultes et enfants de plus de 6 ans, elle est déconseillée de 30 mois à 6 ans et proscrite avant l'âge de 30 mois

### **Posologies :**

Les posologies dépendront du type de thym utilisés

- Quantité d'HE par prise maximum
- Adultes à partir de 15 ans : 2 gouttes 3 à 4 fois par jour
- Dès 7 ans : 1 goutte 3 à 4 fois par jour (41)

Les HE sous cette forme d'administration seront à éviter chez toute personne présentant des troubles gastriques.

### **Voie cutanée**

L'usage externe est le mode d'administration idéal des huiles essentielles. Il permet d'appliquer une grande quantité d'huile essentielle, avec une grande rapidité d'action thérapeutique, une bonne tolérance, peu de toxicité et une durée d'action prolongée.

La voie percutanée est une excellente voie pour une activité topique, locale, semi-profonde et même générale. La pénétration des huiles essentielles par cette voie est très rapide (environ 10 minutes), du fait du faible poids moléculaire des molécules aromatiques et de leur affinité pour le stratum corneum.

En plus de l'action thérapeutique qu'il peut procurer, il possède une potentielle influence psychosensorielle grâce à la transmission d'une information via les molécules aromatiques volatiles qui seront inhalées pendant le massage. L'application d'une huile essentielle sur la peau doit se faire en étant diluée dans une huile végétale.

### **Posologies**

En dehors de l'âge de l'individu, les posologies et le nombre d'applications varient en fonction de la nature et de la sévérité des symptômes, de l'étendue de la zone à traiter ainsi qu'en fonction de l'HE. Elles peuvent atteindre au maximum : (23)

- Adultes à partir de 15 ans : 1 à 10 gouttes, 3 à 4 fois par jour
- Dès 7 ans : 1 à 5 gouttes, 3 à 4 fois par jour
- Dès 30 mois : 1 à 2 gouttes, 3 à 4 fois par jour

Elles seront toujours diluées dans 1 à 2 pressions d'huile végétale par goutte d'HE.

Le choix de l'huile végétale utilisée pour diluer l'huile essentielle est conditionné par les propres propriétés de celle-ci et par son coefficient de pénétration dans les couches cutanées en fonction de l'action recherchée

## Voie respiratoire

L'utilisation des huiles essentielles par inhalation peut avoir une action sur la sphère respiratoire ou sur le système nerveux.

Elle met à profit les propriétés volatiles des HE et à l'avantage de posséder une action rapide pour traiter les pathologies affectant les voies aériennes supérieures et inférieures.

### **Posologies**

Plusieurs méthodes d'inhalation existent :

- humide : dans un inhalateur ou un bol avec de l'eau chaude non bouillant et le patient respire la vapeur émise.

- sèche : sur un mouchoir et inspirer profondément

- diffusion atmosphérique : pour un effet antiseptique, une atmosphère tonique ou relaxante, une action psycho-émotionnelle

Dés 30 mois : 1 à 2 gouttes par diffusion, 3 à 4 fois par jour

Dés 7 ans : 1 à 5 gouttes par diffusion, 3 à 4 fois par jour

Dés 15 ans : 1 à 10 gouttes par diffusion, 3 à 4 fois par jour

Il ne faut pas diffuser l'huile essentielle pure, elle doit être diluée entre 5 et 10% dans d'autres huiles essentielles.

- Pulvérisation atmosphérique ou sur des surfaces : sous forme de sprays à visée assainissant (36).

Remarque : l'application sur les poignets, zone très vascularisée, permet de conjuguer la voie respiratoire à la voie générale puisque les HE pénétreront rapidement dans la circulation sanguine

## Voie rectale

Cette voie d'administration est utilisée tant pour assurer une action locale que pour une action systémique. Elle est intéressante pour traiter les affections broncho-pulmonaires et ORL. Cela permet d'éviter l'effet de premier passage hépatique, cette voie permet aussi l'administration d'huiles essentielles ayant une mauvaise tolérance gastrique ainsi qu'en pédiatrie. Ainsi les suppositoires sont recommandés chez le nourrisson et les enfants surtout lors des affections pulmonaires aiguës.

Elle est contre-indiquée en cas de pathologie hémorroïdaire, de rectocolite hémorragique, de maladie de Crohn.

### **Posologies**

- Doses d'HE maximum par suppositoire recommandées : (48)

- Adultes : 150 à 300 mg ;

- Enfants : 75 à 125 mg,

- Nourrissons : 50mg

(100)

## **2.2.7 Sécurité**

La plupart des HE sont sûrs et sans effets secondaires indésirables lorsqu'elles sont utilisées correctement (101).

Le facteur de sécurité le plus important pour les HE est leur dosage. Il est nécessaire de les utiliser selon les voies d'administration préconisées, selon le dosage en fonction de l'âge, être attentif aux différentes contre-indications essentielles.

De nombreuses HE ont une toxicité relativement faible pour les mammifères et se dégradent rapidement, ce qui les rend sûrs (102).

Les huiles essentielles ont montré une activité antitumorale in vitro et in vivo et une faible toxicité (103). Cependant, il a également été démontré que des concentrations élevées de certaines HE ont contribué à des changements nocifs dans le corps, des effets mutagènes et génotoxiques lorsqu'ils ont été administrés à de fortes doses à des rats (104).

Les données de la littérature sur la disponibilité et la pharmacocinétique du carvacrol et du thymol, et sur les effets aigus et à court terme in vivo, suggèrent qu'ils ne peuvent pas poser de risque pour santé humaine et animale (105).

De manière générale elles sont déconseillées pour les femmes enceintes et allaitantes, les personnes épileptiques, les personnes hypersensibles ou présentant un cancer hormono-dépendant. Sauf avis médical, ne pas les utiliser chez les enfants de moins de 3 ans.

## **2.2.8 Toxicité et risques à l'emploi**

### **Dermocausticité**

Ces réactions se produisent après l'application d'une huile essentielle contenant des molécules irritantes, lorsque la dilution est insuffisante ou l'application trop étendue.

L'intensité dépend du produit utilisé, de sa concentration et de la sensibilité du sujet.

Elle est caractérisée par l'apparition d'un tiraillement et une rougeur locale, elle peut évoluer en brûlures ou macules érythémato-squameuses. Dans certains cas les lésions peuvent être plus graves, de type nécrosante ou vésicante.

Sont concernées les huiles essentielles riches en phénols, aldéhydes aromatiques.

Il faudra toujours les diluer avec une huile végétale (20% d'huile essentielle maximum pour les phénols et 10 % pour les aldéhydes) et les appliquer sur des surfaces corporelles bien localisées.

Huiles essentielles à phénols : Thym à thymol, thym à carvacrol, Giroflier, Sarriette des montagnes, Origan compact, Origan d'Espagne, Cannelle de Ceylan

Huiles essentielles à aldéhydes : Litsée citronnée, Verveine des Indes, Lemongrass,

Citronnelle de Ceylan, Citronnelle de Java, Cannelle de Ceylan

### **Allergie**

Le plus souvent ce sont des réactions bénignes, des rares cas de réactions asthmatiformes ont été recensées. Le risque varie évidemment avec le terrain du patient.

Toutes les huiles essentielles sont susceptibles de créer des inflammations de la peau ou des réactions allergiques. Elles peuvent entraîner des réactions de dermatites allergiques qui sont l'expression cutanée d'une hypersensibilité retardée. Ces réactions sont généralement observées après une phase de sensibilisation du sujet par la molécule allergisante. Les lésions observées sont de type eczéma aigu érythémateux, surélevé, à surface granitée puis vésiculeuse et suintante. La peau devient ensuite squameuse et reprend son aspect normal rapidement.

En cas de doute, un test de tolérance cutanée permet de vérifier la sensibilité du sujet à l'huile essentielle, celui-ci consiste à déposer 3 gouttes du mélange d'huiles essentielles dans le pli interne du coude et d'attendre environ 15 minutes voire 24 heures afin de vérifier une éventuelle réaction

Les principales molécules concernées sont : cinnamaldéhyde, citrals, citronnellol, eugénol, farnésol, géraniol, limonène, linalol, que l'on retrouve dans les huiles de : Basilic exotique, Bois de rose, Bois de Hô, Cannelles (de Ceylan, Chine, Vietnam, Madagascar), Citronnelles,

Coriandre, Eucalyptus citronné, Gaulthéries, Géranium rosat, Giroflier, Laurier noble, Lavande vraie, Lemongrass, Litsée citronnée, Palmarosa, Thym à géraniol, Thym à linalol, Ylang-ylang.

### **Hépatotoxicité**

Les principales molécules concernées sont les phénols, menthol, que l'on retrouve dans les huiles de Cannelle de Ceylan, clous de Girofle, Menthe poivrée, Origan compact, Sarriette des montagnes, Thym à thymol.

Lorsqu'ils sont utilisés par voie orale à dose élevée sur une durée prolongée ils peuvent être à l'origine de lésions hépatiques.

Il faudra éviter de les utiliser chez les patients avec une sensibilité hépatique, et il conviendra de les associer à des huiles essentielles hépatoprotectrices : carotte, citron jaune et romarin à verbenone, et de limiter les traitements à fortes doses à des périodes n'excédant pas 4-5 jours. Lors de traitements au long cours, privilégier des HE moins toxiques comme celles à monoterpénols, ou utiliser celles à phénols à des doses modérées sur un schéma posologique de préférence entrecoupé de fenêtres thérapeutiques de 7 jours toutes les 3 semaines de traitements (36,97).

## 3. Action antibactérienne

### 3.1 Évaluer l'activité antimicrobienne des HE

Diverses méthodes de laboratoire peuvent être utilisées pour évaluer ou cribler l'activité antimicrobienne in vitro d'un extrait ou d'un composé pur. Les méthodes les plus connues sont les méthodes de diffusion sur disque et de dilution en bouillon ou sur gélose. Ces méthodes sont basées sur la même méthode que l'antibiogramme, utilisé pour évaluer l'activité des antibiotiques.

Pour approfondir l'étude de l'effet antimicrobien d'un agent, il est recommandé de recourir à des méthodes de test temporel et de cytofluorométrie en flux, qui fournissent des informations sur la nature de l'effet inhibiteur (bactéricide ou bactériostatique), en fonction du temps ou de la concentration et des dommages infligés au micro-organisme testé.

#### 3.1.1 Diffusion en milieu solide

La diffusion en milieu solide va permettre de déterminer la zone d'inhibition. Deux méthodes sont utilisées : diffusion de disque et diffusion de puits d'agar.

##### Méthode de diffusion de disque

Le test de diffusion sur disque de gélose est la méthode officielle utilisée dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens de routine.

Un essai de diffusion sur disque est utilisé pour déterminer l'inhibition de la croissance des bactéries par les huiles essentielles.

Dans cette procédure, les plaques de gélose sont inoculées avec des colonies du micro-organisme d'essai. Ensuite, des disques de papier filtre (d'environ 6 mm de diamètre), imprégnés d'HE à la concentration souhaitée, sont placés sur la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. L'HE diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du micro-organisme d'essai, puis les diamètres des zones de croissance d'inhibition sont mesurés.

Cette zone claire autour des disques est proportionnelle à l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.

Il fournit des résultats qualitatifs en classant les bactéries comme sensibles, intermédiaires ou résistantes. Ces résultats peuvent guider dans la sélection appropriée des traitements pour des patients individuels dans des situations particulières. Ce fait est dû à la bonne corrélation entre les données in vitro et l'évolution in vivo (106).

Cependant, puisque l'inhibition de la croissance bactérienne ne signifie pas la mort bactérienne, cette méthode ne peut pas distinguer les effets bactéricides et bactériostatiques.

##### Méthode de diffusion de puits d'agar

De manière similaire à la procédure utilisée dans la méthode de diffusion sur disque, la surface de la plaque de gélose est inoculée en étalant un volume de l'inoculum microbien sur toute la surface de la gélose. Ensuite, un trou d'un diamètre d'environ 6 mm est perforé de manière aseptique et un volume (20–100 µL) d'agent antimicrobien ou de solution d'extrait à la concentration souhaitée est introduit dans le puit. Ensuite, les plaques de gélose sont incubées

dans des conditions appropriées en fonction du micro-organisme testé. L'agent antimicrobien diffuse dans le milieu gélose et inhibe la croissance de la souche microbienne testée.

La méthode de diffusion sur disque est limitée par la nature hydrophobe des huiles essentielles, ce qui empêche leur diffusion uniforme à travers le milieu gélose. Par conséquent, la plupart des chercheurs préfèrent les méthodes sur milieu liquide.

### **Indice aromatique**

L'indice aromatique est le rapport entre le diamètre du halo d'inhibition obtenu par un aromatoگرامme pour une huile essentielle et celui d'une huile essentielle idéale fictive dont l'action germicide serait maximale dans 100% des cas.

0 : Résistant

Sensible : halo d'inhibition de 1 à 2mm +

Assez sensible : halo d'inhibition de 2 à 3 mm ++

Très sensible : halo d'inhibition >3 mm +++

Pour cela, il faut d'abord calculer l'indice de croix (IC) de l'HE testée qui correspond à l'addition du nombre de croix obtenu dans chaque cas. Ainsi celui de l'HE idéale est égal au produit du nombre de cas par le chiffre 3.

Pour obtenir l'indice aromatique d'une huile essentielle donnée, il suffira d'effectuer le rapport Indice de croix de l'HE / Indice de croix HE idéale.

Le résultat est compris entre 0 et 1. Plus une huile essentielle a un indice élevé, plus son pouvoir antibactérien est puissant. Pour une HE, on peut également déterminer l'indice aromatique (IA) moyen qui correspond à la moyenne des IA sur plusieurs germes, cela permet d'avoir une idée de l'activité anti infectieuse générale d'une HE.

La réalisation d'aromatoگرامmes sur une centaine d'huiles essentielles pour déterminer leur pouvoir antibactérien a permis à Belaiche de classer les HE en trois groupes : majeures, médiums et de terrain. Cependant cette classification n'est plus très utilisée et permet surtout au thérapeute de débiter un traitement d'aromathérapie en attendant les résultats de l'aromatoگرامme, en ayant plus de chance de choisir l'huile essentielle adaptée.

**Les huiles essentielles majeures** : agissent aussi bien sur les bacilles gram + que ceux à gram -. Elles ont une action bactéricide, constante et forte. Leur indice aromatique se situe entre 0,45 et 1. Elles sont utiles en début de traitement et sont remplacées par la suite par les huiles essentielles dites de terrain dont l'action est durable et définitive.

**Les huiles essentielles médium** : sont moyennement antiseptiques et ont une contribution efficace en cas de thérapie de relais entre une huile essentielle majeure et une huile essentielle de terrain. Leur indice aromatique se situe entre 0,45 et 0,10.

**Les huiles essentielles de terrain** : leur indice aromatique est inférieur à 0,1. Seul l'aromatoگرامme peut révéler leur pouvoir bactéricide et bactériostatique. Elles sont différentes d'un individu à l'autre. Une huile essentielle majeure peut également agir comme une huile essentielle de terrain. Certaines huiles agissent spécifiquement sur certains germes (107).

<b>IA moyen compris entre 0,45 et 1 : HE germicides majeures</b>		<b>IA moyen entre 0,1 et 0,45 : HE germicides médiums</b>		<b>IA &lt;0,1 : HE germicides de terrain</b>	
Origan d'Espagne	0,873	Eucalyptus globuleux	0,312	Sauge	0,036
Thym à thymol	0,711	Lavande officinale	0,296	Romarin	0,075

Cannelle de Ceylan	0,687	Petit grain bigaradier	0,171	Basilic	0,012
Girofle	0,517	Niaouli	0,100	Gingembre	0,014
Sariette des jardins	0,457	Estragon	0,140	Citron	0,085

*Tableau 4 : Exemple d'indice aromatique de certaines huiles essentielles*

### **3.1.2 Milieu liquide : méthodes de dilution**

Les méthodes de dilution en milieu liquide vont permettre la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

#### **Méthode de dilution du bouillon**

La procédure consiste à préparer des dilutions des suspensions bactériennes dans un milieu de croissance liquide qui sont distribuées dans une plaque de microtitration à 96 puits (microdilution). Les huiles essentielles sont ajoutées pour produire une plage de concentration. Après un bon mélange, la plaque de microtitration à 96 puits est incubée dans des conditions appropriées en fonction du micro-organisme testé, généralement à 37°C pendant 24h. Des colorants sont utilisés pour déterminer la croissance dans les puits et déterminé la CMI, par changement de couleur.

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien (HE) qui inhibe la croissance visible de l'organisme testé dans des conditions d'incubation appropriées, généralement exprimée en µg / ml ou mg / l (108).

Les valeurs de CMI pour les huiles essentielles inférieures à 0,50 mg / ml représentent « une activité élevée contre micro-organismes ».

La détermination de la concentration bactéricide minimale (CMB) permet d'estimer l'activité bactéricide. La CMB est définie comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien nécessaire pour tuer 99,9% des micro-organismes incubés. Elle est confirmée après réinoculation du milieu de culture provenant des microplaques ne contenant aucune croissance, sur la gélose puis incubation pendant 24 h.

La taille de l'inoculum, le type de milieu de croissance, le temps d'incubation et la méthode de préparation de l'inoculum peuvent influencer les valeurs de CMI. Par conséquent, il existe de nombreuses lignes directrices pour les tests fournies par le CLSI et le Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST), permettant une procédure uniforme pour les tests.

#### **Méthode de dilution sur gélose**

La méthode de dilution d'agar implique l'incorporation de différentes concentrations souhaitées de l'agent antimicrobien dans un milieu d'agar, en utilisant des dilutions en série, suivies de l'inoculation d'un inoculum microbien défini sur la surface de la plaque d'agar. Si plusieurs isolats sont testés contre un seul composé, ou si le composé testé masque la détection de la croissance microbienne dans le milieu liquide avec sa coloration, la méthode de dilution sur gélose est souvent préférée à la dilution en bouillon pour la détermination de la CMI. La dilution sur gélose est souvent recommandée comme méthode normalisée pour les organismes exigeants tels que les anaérobies et les espèces *Helicobacter* (108).

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de CMI. Elles peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne in vitro contre les bactéries.

### **3.1.3 Milieu gazeux**

Elle est peu utilisée mais utile pour l'étude des HE utilisées en diffusion atmosphérique. Elle permet d'analyser l'activité antibactérienne des composants volatiles des HE, comme pour celle en milieu solide. Après ensemencement d'une gélose disposée dans une boîte de Pétri, un disque imprégné d'HE sera placé cette fois au centre du couvercle de la boîte sans contact avec la gélose. Celle-ci hermétiquement fermée, couvercle en bas sera placée 24 heures dans une étuve à 37°C. Après cet intervalle de temps, si le germe est sensible, on pourra observer une zone translucide circulaire dans la gélose correspondant à l'inhibition des colonies microbiennes situées sur l'aire d'évaporation de l'HE.

### **3.1.4 Autres tests**

#### **1. Test de temporisation (courbe de temporisation)**

Le test temporel est la méthode la plus appropriée pour déterminer l'effet bactéricide, pour obtenir des informations sur l'interaction dynamique entre l'agent antimicrobien et la souche microbienne. Le test time-kill révèle un effet antimicrobien dépendant du temps ou de la concentration.

Pour les bactéries, ce test est réalisé en milieu de culture en bouillon à l'aide de trois tubes contenant une suspension bactérienne. Les premier et deuxième tube contiennent la molécule ou l'extrait testé généralement à des concentrations finales de  $0,25 \times \text{MIC}$  et  $1 \times \text{MIC}$ , et le troisième est considéré comme le contrôle de la croissance. L'incubation se fait dans des conditions appropriées pour des intervalles de temps variés. Ensuite, le pourcentage de cellules mortes est calculé par rapport au contrôle de croissance en déterminant le nombre de cellules vivantes (CFU / mL) de chaque tube en utilisant la méthode de comptage sur plaque d'agar. En outre, cette méthode peut être utilisée pour déterminer la synergie ou l'antagonisme entre les médicaments (deux ou plus) dans des combinaisons (109).

#### **2. Test de bioluminescence ATP**

Ce test est basé sur la capacité de mesurer l'adénosine triphosphate (ATP) produite par des bactéries. L'ATP étant la forme chimique de l'énergie de toutes les cellules vivantes, elle est présente à peu près en quantité constante dans une cellule. Par conséquent, sa quantification est utilisée pour estimer la population microbienne dans un échantillon. La D-luciférine en présence de l'ATP subit une conversion par la luciférase en oxyluciférine qui génère de la lumière. La quantité de lumière émise est mesurée par un luminomètre et exprimée en unité de lumière relative (RLU) qui peut être convertie en RLU / mole d'ATP. Ainsi, il existe une relation linéaire entre la viabilité cellulaire et la luminescence mesurée (110).

Le test de bioluminescence a une large gamme d'applications, telles que le test de cytotoxicité, l'évaluation de l'impact des biofilms. De plus, il a été utilisé par plusieurs auteurs pour des tests antibactériens.

#### **3. Méthode de cytofluorométrie en flux**

La détection rapide des cellules endommagées par cette approche dépend de l'utilisation de colorants appropriés pour la coloration [96]. Par conséquent, l'iodure de propidium (PI), un agent fluorescent et intercalant, est largement utilisé comme colorant pour l'ADN. Plusieurs études ont été rapportées sur l'efficacité du cytomètre en flux comme outil de test antibactérien des huiles essentielles contre *Listeria monocytogenes*, utilisant la coloration combinée avec PI pour l'évaluation des dommages membranaires et le diacétate de carboxyfluorescéine (cFDA) pour la détection de l'activité de l'estérase. Par conséquent, en plus des cellules lysées, trois sous-populations (cellules mortes, viables et blessées) peuvent être clairement discriminées par cette méthode. La méthode de cytofluorométrie en flux permet la détection de la résistance aux antimicrobiens et estime l'impact de la molécule testée sur la viabilité et les dommages cellulaires du micro-organisme testé (110).

#### 4. Test de synergie

La technique *in vitro* la plus courante pour tester la synergie entre les substances antimicrobiennes est la technique du damier, ainsi appelée parce que les concentrations d'une substance sont disposées horizontalement et l'autre verticalement dans une plaque à micropuits. Des dilutions de la phase de croissance logarithmique de la culture bactérienne sont réparties dans des plateaux de microtitrage contenant des combinaisons de concentrations variables, l'inoculum est ensuite ajouté dans tous les puits. La plaque à 96 est scellée et incubée à 37 ° C pendant 24 h.

Les dilutions testées sont basées sur la CMI des substances, allant généralement de quelques étapes en dessous de la CMI attendue, à des concentrations deux fois la CMI. Les résultats du test en damier sont interprétés en traçant un isobologramme ou en calculant l'indice de concentration fractionnelle inhibitrice (FIC) pour les deux antimicrobiens.

À des fins quantitatives, le concept de concentrations fractionnaires inhibitrices (FIC) est fréquemment utilisé. Afin d'évaluer les activités de combinaisons de 2 huiles essentielles, ou de l'interaction huile essentielle-antibiotiques.

Les lignes directrices du CLSI ont été utilisées pour garantir le respect de techniques de dosage et de transfert microbiologiques précises.

La synergie est détectée par une diminution de la CMI de l'association d'au moins deux dilutions par rapport à celle de l'antibactérien le plus actif testé seul. Ensuite, après incubation, l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FICI) peut être calculé en utilisant la formule suivante :

$$\sum FICI = FIC (A) - FIC (B)$$

$$\text{où } FIC (A) = \frac{\text{CMI (A) en combinaison}}{\text{CMI (A) seul}} \quad \text{et } FIC (B) = \frac{\text{CMI (B) en combinaison}}{\text{CMI (B) seul}}$$

La synergie a été définie par  $FICI \leq 0,5$  et l'antagonisme par  $FICI > 4$ . Le FICI entre 0,5 et 1 a été interprété comme addition et entre 1 et 4 comme indifférence (111).

Les interactions entre ces composants peuvent entraîner des effets antagonistes, additifs ou synergiques. Un effet additif est observé lorsque l'effet combiné est égal à la somme des effets individuels. L'antagonisme est observé lorsque l'effet d'un ou des deux composés est moindre lorsqu'ils sont appliqués ensemble que lorsqu'ils sont appliqués individuellement. La synergie est observée lorsque l'effet des substances combinées est supérieur à la somme des effets individuels alors que l'absence d'interaction est définie comme l'indifférence (110).

## 5. Analyse de la composition chimique de l'HE

L'HE est analysée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse équipé d'une colonne polaire.

L'identification des composés volatils repose tout d'abord sur la mesure des hauteurs de chaque pic indiquant leur concentration relative.

Les compositions en pourcentage des échantillons ont été calculées en fonction de l'aire des pics chromatographiques.

Après cela, l'analyse par spectromètre de masse identifie la nature et la structure de chaque composé en comparant les temps de rétention, les indices de rétention linéaires et les spectres de masse enregistrés avec les données de la bibliothèque informatique NIST, la bibliothèque des spectres de masse (Wiley) et la «Bibliothèque Başer des constituants d'huiles essentielles» construite en interne par des composés authentiques et des composants d'huiles connues (110).

### 3.2 Huiles essentielles antibactériennes

Il est bien connu que la composition chimique des HE peut expliquer leur activité antibactérienne.

La réactivité des huiles essentielles dépend de la nature de leurs groupes fonctionnels et de leur orientation (112).

Un grand nombre de molécules aromatiques sont antibactériennes mais celles possédant le plus grand intérêt par leur degré d'efficacité et leur spectre d'action large sont par ordre : **Les Phénols** > **Les Aldéhydes aromatiques** > **Les Alcools monoterpéniques** (56)

Le lien entre le type de constituant le plus abondant et l'activité antimicrobienne est quelque peu variable.

Une huile essentielle peut posséder plusieurs molécules aromatiques appartenant à différentes familles chimiques, on les retrouvera en quantités variables.

#### Les phénols :

- Propriétés :
  - Anti-infectieux puissant à large spectre d'action : antibactériens, antiviraux, antifongiques, antiparasitaires
  - Toniques et stimulants généraux
  - Antioxydants
  - Immunostimulants
  - Anti-inflammatoires
  - Hyperthermisants
- Composants : Carvacrol : origan compact, thym à feuilles de sarriette  
Thymol : thym à thymol  
Eugenol : ex : cannelle de ceylan, girofle
- Précautions d'emploi : elles sont dermocaustiques, la voie cutanée est par conséquent généralement contre indiquée. Cependant elles pourront être utilisées si leur usage cutané est localisé et elles devront être diluées à 20 % maximum.

Elles sont hépatotoxiques par voie orale, il conviendra de les utiliser sur des courtes périodes et de les associer à une huile hépatoprotectrice (citron, carotte, romarin 1,8 cinéole...), ou de laisser une fenêtre thérapeutique si traitement plus long, évidemment elles seront contre-indiquées chez les patients insuffisants hépatiques.

### Les aldéhydes aromatiques

- Propriétés :
  - Anti-infectieux puissant à large spectre d'action : antibactériens, antiviraux, antifongiques, antiparasitaires
  - Immunostimulant
  - Tonique général
- Composants : Cinnamaldéhyde : cannelle de ceylan  
Cuminaldéhyde : cumin officinal
- Précautions d'emploi : voie orale : le traitement doit être court et à doses faibles, dermocaustiques, leur usage cutané sera localisé et elles devront être diluées à 10-maximum  
Allergisant, le cinnamaldéhyde est l'une des molécules les plus sensibilisante.  
Contre indiquée chez la femme enceinte et allaitante et les enfants de – 7 ans.

### Les monoterpénols

Anti-infectieuses remarquables, les HE à monoterpénols constituent une alternative aux HE à phénols plus difficiles à manipuler, voire un relais lorsqu'un traitement au long cours est nécessaire. A long terme, les monoterpénols sembleraient plus efficaces que les phénols.

- Propriétés :
  - Anti-infectieux puissant à large spectre d'action : antibactériens, antiviraux, antifongiques, antiparasitaires
  - Immunomodulants
  - Neurotoniques
- Composants : Linalol : thym à linalol, bois de rose  
Géranol : palmarosa  
Terpinen-4-ol : arbre à thé  
Bornéol : thym à feuilles de sarriette  
Thujanol : thym à thujanol  
Menthol : menthe poivrée
- Précautions d'emploi : généralement bien tolérées, seul un risque allergique peut être constaté.  
Attention avec le menthol, contre indiqué chez l'enfant de – 7 ans et la femme enceinte

(113–115)

### 3.3 Mode d'action des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des huiles et extraits végétaux volatils est reconnue depuis de nombreuses années (113).

En raison du grand nombre de constituants, les huiles essentielles semblent n'avoir aucune cible cellulaire spécifique (114).

Les HE présentent une diversité de molécules pouvant agir chacune sur une cible différente.

Les composants bioactifs des HE ont des actions antibactériennes spécifiques, ils peuvent inhiber ou ralentir la croissance des microorganismes. Ils agissent en particulier au niveau de la membrane et du cytoplasme, et dans certains cas, modifient complètement la morphologie des cellules (40).

Différents mécanismes d'activité antibactérienne des huiles essentielles ont été proposés. Les huiles essentielles déstabilisent principalement l'architecture cellulaire, entraînant la dégradation de l'intégrité de la membrane et une perméabilité accrue, ce qui perturbe de nombreuses activités cellulaires, notamment la production d'énergie, le transport membranaire et d'autres fonctions de régulation métabolique, et entraînant une fuite de composants cellulaires et une perte d'ions (116,117).

Elles vont perturber divers processus vitaux tels que les processus de conversion d'énergie, le traitement des nutriments, la synthèse des macromolécules structurelles et la sécrétion de régulateurs de croissance (118).

De plus, des études récentes ont démontré que certains composés végétaux peuvent inhiber efficacement les pompes à efflux impliquées dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques (116).

Tous ces événements peuvent être responsables de la coagulation des composants cellulaires internes du cytoplasme et de la rupture des liaisons entre les couches lipidiques et protéiques (84).

#### 1. Action sur la membrane cellulaire bactérienne

Beaucoup de mécanismes d'action sont attribués à l'interaction de composants des HE avec les constituants de la membrane cellulaire (119). En effet, le caractère lipophile des molécules constituant les HE les rend capables de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane cellulaire et de s'accumuler, entraînant des changements de conformation et éventuellement un manque de régulation de la membrane cellulaire, ce qui perturbe ainsi le transport membranaire des substances nutritives. Le transport membranaire peut aussi dysréguler via la dépolarisation des membranes mitochondriales en diminuant le potentiel membranaire, affecter le cycle ionique du  $Ca^{++}$  (120) et d'autres canaux ioniques et réduire le gradient de pH, affectant la pompe à protons et le pool d'ATP. Cependant, certaines souches bactériennes ont pu développer des mécanismes lui permettant de contrebalancer cet effet grâce à l'utilisation de la pompe ionique (121)

Il a été démontré que la sensibilité des bactéries aux huiles essentielles dépend du pH du traitement. Un pH plus bas ajoute non seulement du stress aux cellules bactériennes, mais augmente également le transfert d'huiles essentielles aux membranes bactériennes, augmentant son effet observé (117).

Les HE modifient la fluidité des membranes, qui deviennent anormalement perméables entraînant des fuites de matériaux intracellulaires : radicaux, cytochrome C, ions calcium,

protéines... La perméabilisation des membranes mitochondriales externes et internes entraîne la mort cellulaire par apoptose et nécrose (122). Il semble que les réactions en chaîne de la paroi cellulaire ou de la membrane cellulaire externe envahissent la cellule entière, à travers les membranes de différents organites comme les mitochondries et les peroxysomes.

L'autre action des huiles essentielles sur la membrane cellulaire est l'inhibition de la sécrétion de toxines. Une étude a signalé que l'exposition de *B. cereus* au carvacrol avait entraîné l'inhibition de la production de toxines diarrhéiques et l'utilisation de l'origan supprime complètement la production d'entérotoxines de *S. aureus* (82). La sécrétion de toxines peut être évitée par des modifications de la membrane bactérienne en raison de la fixation de l'huile essentielle qui pourrait contrôler les processus de transport à travers la membrane plasmique et limiter la libération de toxines dans l'environnement extérieur (83).

En tant que substances lipophiles typiques, les huiles essentielles sont capables de traverser la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, ayant un effet différent sur les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Les extrémités lipophiles de l'acide lipotéichoïque dans la paroi cellulaire Gram-positif facilitent la pénétration des composés hydrophobes tels que les huiles essentielles dans ces bactéries. Cependant, les bactéries à Gram négatif présentent une résistance plus élevée à l'action des huiles essentielles, associée à la présence de la membrane externe. Cette résistance plus élevée pourrait être attribuée aux protéines de la membrane externe ou au lipopolysaccharide (LPS), ce qui pourrait limiter le taux de diffusion de ces composés hydrophobes (123).

## **2. Action sur la morphologie cellulaire**

L'activité des HE et/ou de leurs composants diffère en fonction de la forme des bactéries étudiées, et les bacilles seraient plus sensibles aux HE que les cocci.

*S. typhimurium* et *E. coli* ont une forme de bacilles avec une surface lisse, tandis que *M. luteus* et *S. aureus* ont une forme coccoïde normale. Après 24 h de traitement avec l'HE de menthe, des dommages cellulaires ont été observés sur les bactéries bacilles (124), alors que les dégâts étaient moins évidents chez les bactéries coccoïdes. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que l'exopolysaccharide des cellules s'est détaché et libéré ou que le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique ont été perturbés.

En raison de leur caractère lipophile, les monoterpènes cycliques sont préférentiellement répartis dans la phase aqueuse des structures membranaires (125). Il en résulte une expansion de la membrane, une fluidité accrue de la membrane et l'inhibition d'une enzyme intégrée à la membrane. La microscopie électronique des cellules d'*E. Coli* après exposition à l'huile d'arbre à thé a révélé une perte de matériel cellulaire dense aux électrons et a montré une coagulation du contenu cytoplasmique, cependant, ces effets étaient des événements secondaires survenus après la mort cellulaire.

Dans une autre étude a été testé l'effet du cinnamaldéhyde sur la morphologie de *B. cereus* et sans traitement, les bactéries se présentaient comme des bâtonnets bien séparés. Cependant, les cellules bactériennes traitées au cinnamaldéhyde sont apparues comme des structures filamenteuses allongées dans lesquelles les cellules ne semblaient pas être séparées les unes des autres (126).

*S. typhimurium* : les cellules traitées au carvacrol et thymol ont présenté un gonflement, suggérant que ces composés ont pénétré l'enveloppe cellulaire et modifié sa structure.

Les observations faites par microscopie électronique ont montré que le traitement d'*E. Coli* avec de l'HE d'origan, riche en thymol et carvacrol, entraînait l'effondrement des cellules après la

perte de leur contenu, les cellules d'*E. Coli* avaient des trous ou des taches blanches sur la paroi cellulaire.

Les changements morphologiques de certaines souches après contact avec le carvacrol étaient comparables à ceux décrits après traitement avec d'autres agents antimicrobiens, tels que les peptides antimicrobiens. La présence de cloisons de division dans les cellules traitées peut être due à l'effet du carvacrol sur les protéines impliquées dans la division cellulaire. Cela a été confirmé par des approches protéomiques dans des cellules de *Salmonella* traitées au thymol.

### **3. Action sur les acides gras membranaires**

Le métabolisme lipidique chez les bactéries constitue une voie importante pour le développement de nouveaux antimicrobiens (127).

En raison de leur nature hydrophobe, les HE affectent la biosynthèse des lipides, y compris les acides gras insaturés, et modifient ainsi la structure de la membrane cellulaire. En effet, la présence des HE dans la cellule bactérienne, même à des concentrations inférieures à la CMI, diminue le taux des acides gras insaturés qui sont généralement responsables de la fluidité membranaire. Cela cause légèrement des perturbations au niveau de l'enveloppe externe de la cellule, traduisant ainsi des modifications structurales de la membrane. Le profil lipidique des cellules au repos montre une réorganisation après traitement avec des HE.

Par exemple, le thymol, le carvacrol et l'eugénol peuvent augmenter la quantité d'acide gras saturé en C16 et en C18 et diminuer la quantité d'acides gras insaturés en C18, les HE peuvent également affecter des enzymes responsables de la biosynthèse de ces derniers. Les HE en agissant sur la membrane externe et en augmentant sa perméabilité, il en résulte la dispersion des enzymes désaturases qui leur permet d'agir sur les acides gras membranaires. Inversement, les HE n'activent pas d'autres systèmes enzymatiques, tels que l'isomérase cis-trans qui régule la conversion des acides gras cis en leurs isomères trans. Cette enzyme est généralement active lors de l'adaptation des cellules aux stress environnementaux. Dans l'ensemble, l'activité des composants des HE est très probablement liée à des effets simultanés sur un pool d'enzymes d'acides gras qui conduisent à une augmentation des isomères cis, à une réduction de la longueur de la chaîne et à une diminution générale de l'abondance des acides gras insaturés. Une augmentation de la quantité d'acides gras saturés dans la bicouche lipidique de la membrane entraîne une perte de fluidité de la membrane et une augmentation conséquente de la rigidité de la membrane. Dans certains cas, les cellules défectueuses peuvent continuer à croître et à synthétiser des phospholipides, mais elles finissent par perdre des métabolites et ensuite à se lyser (75).

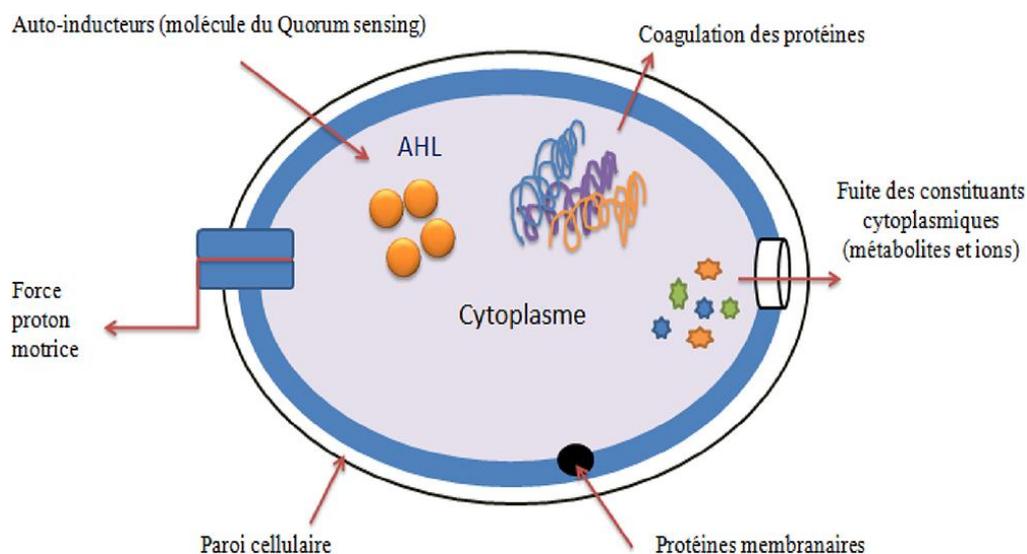


Figure 7: Mécanisme d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne

Il existe plusieurs cibles des huiles essentielles pour inhiber les bactéries. Elles peuvent induire la coagulation, agir sur la paroi, induire la fuite des ions à travers la membrane, agir sur des protéines et les acides gras membranaires, et agir sur les médiateurs du quorum sensing. Ces mécanismes peuvent être appliqués en même temps, générant ainsi une action amplificatrice

#### 4. Action sur les protéines

Les différents composants des HE peuvent agir sur les protéines présentes dans les bactéries et peuvent affecter la division cellulaire.

La division cellulaire bactérienne est régulée par FtsZ, FtsZ s'assemble en un anneau en Z au niveau du site de la division cellulaire, les HE peuvent diminuer la réaction d'assemblage in vitro et le regroupement de FtsZ.

*S. enterica* cultivé en présence d'une concentration sub létale de thymol a montré un profil protéomique différent de celui du témoin. L'analyse a montré que de nombreuses protéines peuvent être régulées à la hausse ou à la baisse par la présence de thymol.

Par exemple, la thiorédoxine-1 n'a pas été exprimée en présence de thymol, celle-ci joue un rôle dans la division cellulaire d'*E. Coli* en raison de sa localisation subcellulaire. Différentes protéines chaperons peuvent être simultanément régulées à la hausse ou nouvellement synthétisées, le thymol augmente l'expression de celles-ci. Ce processus commence dans la phase de latence, mais les chaperons continuent de travailler dans les phases suivantes de la croissance bactérienne pour aider *Salmonella* à s'adapter aux conditions environnementales défavorables. Le traitement au thymol provoque la régulation à la hausse de certaines protéines et peut déclencher un stress d'enveloppe bactérienne en raison de l'accumulation de protéines membranaires mal repliées. Une autre protéine influencée par la présence d'HE est la protéine impliquée dans le système de la phosphotransférase qui est diminuée de plus de la moitié de sa concentration habituelle. Le thymol régule à la hausse la protéine du canal membranaire TolC qui est impliquée dans la formation d'un système d'efflux qui représente un mécanisme important de résistance *Salmonella*.

#### 5. Action contre l'ATP

La production d'ATP chez les procaryotes se produit à la fois dans la paroi cellulaire au niveau de la membrane, par la chaîne respiratoire, et dans le cytosol par la glycolyse. La modification dans la membrane cellulaire affecte légèrement le processus du couplage énergétique conduisant à une perturbation entre l'équilibre du pool d'ATP intra- et extracellulaire (128). Cette altération de l'organisation cellulaire peut provoquer un effet de cascade, ce qui peut affecter d'autres organites cellulaires.

Le traitement de certains agents pathogènes, tels que *E. coli* et *L. monocytogenes*, par l'eugénol, le cinnamaldéhyde et le carvacrol a inhibé la génération d'ATP à partir du dextrose et perturbé la membrane cellulaire. Il a été émis l'hypothèse que l'inhibition de l'ATPase pourrait représenter un facteur secondaire plutôt qu'une cause principale de mort cellulaire. Cependant, ils ont également suggéré que l'inhibition de l'ATPase pourrait jouer un rôle important dans la réduction du taux de croissance à des concentrations sublétales. L'inhibition non spécifique des enzymes liées à la membrane ou incorporées peut être causée par de petites molécules hydrophobes à la suite de changements dans la conformation des protéines. Ce mécanisme peut provoquer l'inhibition de l'activité de l'ATPase, ainsi que l'inhibition d'autres enzymes et une croissance bactérienne altérée (129).

## **6. Action contre le quorum sensing**

Le quorum sensing (QS) est l'ensemble des molécules qu'utilisent les bactéries pour coordonner et assurer la communication entre elles. Cette communication régule un certain nombre de fonctions cellulaires telles que l'expression des facteurs de virulence, la bioluminescence, l'accouplement, la sporulation et la formation de biofilms (130).

L'expression de ces molécules n'aura lieu que lorsqu'une population bactérienne atteint un seuil de densité cellulaire significative, entraînant ainsi l'activation ou la répression des gènes et, par conséquent, la population bactérienne capable d'exprimer ces autoinducteurs est appelée quorum (131).

Les bactéries à Gram- synthétisent ces auto-inducteurs à partir d'un précurseur cytoplasmique appelé N-acylhomosérine lactone (AHL), alors que les bactéries à Gram + utilisent une signalisation fondée sur les oligopeptides intracellulaires. Aujourd'hui, il est bien clair que le QS est fortement associé au développement de la résistance aux antibiotiques via l'induction de la formation des biofilms d'où la nécessité de cribler des molécules qui pourraient avoir un effet anti-QS.

Certaines huiles essentielles peuvent inhiber le réseau de détection du quorum de communication cellule-cellule médiée par diverses molécules de signal bactériennes (132).

### **3.4 Relation structurelles entre les composants et l'activité antibactérienne**

L'activité des huiles devrait être liée à la composition respective des huiles végétales volatiles, à la configuration structurelle des composants constitutifs des huiles volatiles et de leurs groupes fonctionnels et aux éventuelles interactions synergiques entre les composants.

L'activité antimicrobienne des terpénoïdes est liée à leurs groupes fonctionnels. Plus précisément, dans les terpénoïdes phénoliques, les groupes hydroxyles ainsi que la présence d'électrons délocalisés remplissent une fonction importante contre les micro-organismes (133). L'importance du groupe hydroxyle dans la structure phénolique a été confirmée en termes d'activité lorsque le carvacrol a été comparé à son éther méthylique.

En fait, si le groupe hydroxyle carvacrol est remplacé par un groupe éther méthylique, un changement affectant son hydrophobicité, cela affecte également son activité antimicrobienne car il modifie la façon dont cette molécule interagit avec la membrane des cellules

microbiennes. La raison en est que le groupe hydroxyle fonctionne comme un porteur de cations monovalent à travers les membranes, transportant H<sup>+</sup> dans le cytoplasme cellulaire et transportant K<sup>+</sup> dans l'autre sens (134).

De plus, la position relative du groupe hydroxyle exerce une influence sur l'efficacité des composants, comme en témoigne la différence d'activité entre le carvacrol et le thymol contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives. L'importance du cycle phénolique a été démontrée par le manque d'activité de l'hydrocarbure cyclique monoterpène p-cymène. La forte activité des composants phénoliques peut être expliquée davantage en termes de substitution alkyle dans le noyau phénol, qui est connu pour augmenter l'activité antimicrobienne des phénols (135), celle-ci modifie le rapport de distribution entre les phases aqueuse et non aqueuse en réduisant la tension superficielle ou en modifiant la sélectivité des espèces. Les composés phénoliques à substitution alkyle forment des radicaux phénoxy qui interagissent avec les substituants alkyle isomères (136). Cela ne se produit pas avec les molécules isomères étherifiées / estérifiées, ce qui pourrait expliquer leur relatif manque d'activité.

La présence d'un fragment acétate dans la structure semble augmenter l'activité du composé d'origine. Dans le cas du géraniol, l'acétate de géranyle a montré une augmentation de l'activité contre les micro-organismes testés. Une tendance similaire a été identifiée dans le cas du bornéol et de l'acétate de bornyle (135).

Les alcools sont connus pour posséder une activité bactéricide plutôt que bactériostatique contre les cellules végétatives. Les terpénoïdes d'alcool ont montré une activité contre les micro-organismes testés, agissant potentiellement comme des agents dénaturants des protéines, des solvants ou des agents déshydratants (135).

Les aldéhydes, notamment le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, sont connus pour posséder une puissante activité antimicrobienne. Il a été proposé qu'un groupe aldéhyde conjugué à une double liaison carbone-carbone soit un arrangement hautement électronégatif, ce qui pourrait expliquer leur activité (137), suggérant qu'une augmentation de l'électronégativité augmente l'activité antibactérienne (138). Ces composés électronégatifs peuvent interférer dans les processus biologiques impliquant le transfert d'électrons et réagir avec les composants vitaux de l'azote, par ex. protéines et acides nucléiques et inhibent donc la croissance des micro-organismes.

Concernant les cétones, la présence d'une fonction oxygène dans la charpente augmente les propriétés antimicrobiennes des terpénoïdes (139). L'action bactériostatique des terpénoïdes a été augmentée lorsqu'ils étaient carbonylés.

Une augmentation de l'activité dépendant du type de substituant alkyle incorporé dans une structure cyclique non phénolique semble se produire. L'inclusion d'une double liaison a entraîné une augmentation de l'activité antibactérienne du limonène, par rapport à un substituant alkyle comme dans le p-cymène. De plus, les organismes sensibles étaient principalement à Gram négatif, ce qui suggère que l'alkylation influence la sensibilité à la réaction de Gram des bactéries (135).

La stéréochimie a eu une influence sur la bioactivité, il a été observé que les isomères  $\alpha$  sont inactifs par rapport aux isomères  $\beta$ , (par ex.  $\alpha$ -pinène); les isomères cis sont inactifs contrairement aux isomères trans, (par ex. géraniol et nérol); les composés à noyaux méthyl - isopropyl cyclohexane sont les plus actifs; ou l'insaturation du cycle cyclohexane augmente encore l'activité antibactérienne, par ex. terpinolène, terpinéol et terpinéolène (140).

### 3.5 Sensibilité des bactéries

En règle générale, les huiles essentielles sont plus efficaces vis-à-vis des bactéries gram-positives que gram-négatives (58).

Ainsi, la structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif permet aux molécules hydrophobes de pénétrer facilement dans les cellules et d'agir à la fois sur la paroi cellulaire et à l'intérieur du cytoplasme (141) contrairement aux bactéries à Gram - où la présence de lipopolysaccharides englobant la couche bactérienne de peptidoglycane limite la diffusion des composés hydrophobes dans le cytoplasme (142).

La structure et la composition de la cellule bactérienne diffèrent considérablement entre les bactéries. Sur l'enveloppe externe, les cellules peuvent avoir des capsules de polysaccharides ou des couches de protéines qui protègent les bactéries dans des conditions défavorables et affectent leur adhérence (143).

Cependant, toutes les études sur les huiles essentielles n'ont pas conclu que les gram-positifs sont plus sensibles.

Zaika (144) a proposé que les bactéries à Gram positif soient plus résistantes que les bactéries à Gram négatif aux propriétés antibactériennes des huiles volatiles végétales, ce qui contraste avec l'hypothèse proposée par Deans selon laquelle la sensibilité des bactéries aux huiles végétales volatiles et la réaction de Gram apparaissent avoir peu d'influence sur l'inhibition de la croissance (145).

### 3.6 Résistance bactérienne aux huiles essentielles

La question est de savoir si la tolérance bactérienne aux composants des huiles essentielles serait induite lorsque ces composés sont utilisés cliniquement à grande échelle.

Jusqu'à présent, en raison de leur mode d'action affectant plusieurs cibles à la fois, généralement aucune résistance ou adaptation particulière aux huiles essentielles n'a été décrite (146), car de nombreuses cibles devraient s'adapter pour entraver les effets des huiles essentielles, de même la nature multi-composants des huiles essentielles avec une activité antibactérienne peut entraver l'induction d'une résistance.

De plus, si les effets de perméabilisation des membranes sont l'un des modes d'action de l'huile essentielle, il est peu probable que la résistance se développe spontanément, l'évolution des structures et/ou de la composition des membranes arrête instantanément la viabilité des bactéries (146).

Des chercheurs ont également suggéré un faible potentiel de développement de résistance sur les agents membranaires en raison des systèmes de modification du LPS (147). Des problèmes de résistance potentielle subsistent si les huiles essentielles pénètrent dans les applications cliniques, en particulier contre les micro-organismes multirésistants.

Une résistance au carvacrol de *Bacillus cereus* a été observée après croissance en présence d'une concentration sublétales de carvacrol (148).

Une souche de *S. aureus* exposée à des concentrations sublétales de l'huile de romarin ou le 1,8-cinéole pendant 18 h dans un bouillon de viande a présenté une diminution de la sensibilité à ces antimicrobiens (149).

Dans une étude d'induction de résistance in vitro, une sous-population résistante de *SARM* a été détectée lorsque le *S. aureus* a été exposé à plusieurs reprises à l'huile d'arbre à thé pendant plusieurs générations (150). Inversement, dans deux autres études utilisant des paramètres différents pour étudier les changements de sensibilité des bactéries phénotypiques à résistance multiple aux antibiotiques, peu de preuves ont été fournies pour suggérer l'apparition d'une résistance à l'huile d'arbre à thé (146,147).

Dans une étude, les mutants résistants à l'huile d'arbre à thé étaient indétectables à 2 x CMI pour tous les isolats de *S. aureus* (151).

L'exposition de *Salmonella typhimurium* à des passages répétés de concentrations sublétales d'huile d'*O. vulgare* ou de carvacrol n'a entraîné aucun effet global significatif sur l'acquisition d'une tolérance directe (152).

Dans l'ensemble, les études fournissent des preuves limitées suggérant la survenue spontanée d'une résistance aux huiles essentielles, cependant plus d'études en utilisant différents HE et dans des conditions différentes sont nécessaire pour confirmer de manière convaincante ces observations.

### 3.7 Synergie antibiotique - huile essentielle

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est aujourd'hui bien démontrée au-delà de leur utilisation depuis des siècles, l'exemple du thym le montre notamment, ce qui montre toute sa légitimité en tant que molécule ayant des propriétés antibactériennes. Il convient cependant de souligner que bien que l'activité antimicrobienne soit bien établie, l'effet réel est plus faible par rapport aux composés synthétiques (y compris les antibiotiques).

Au-delà de ces applications directes, les huiles essentielles obtenues à partir de plantes du genre *Thymus* pourraient être utilisées comme stratégie multi-cible thérapeutique pour le traitement des maladies infectieuses, en particulier les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques, soit seules soit en synergie avec ces derniers.

Vu son utilisation déjà connue sur les infections ORL, la combinaison des HE et des antibiotiques peut être bénéfique dans le traitement alternatif des maladies des voies respiratoires par exemple.

Pour surmonter l'émergence de souches multirésistantes, de nombreux chercheurs se sont concentrés sur l'identification des substances naturelles qui améliorent la sensibilité aux médicaments antibactériens.

En 2011, les universitaires et l'industrie ont collaboré à une liste prioritaire des approches pour résoudre la crise de la résistance aux antimicrobiens. Parmi les stratégies potentielles proposées, le développement d'alternatives aux antibiotiques et la découverte/développement d'adjuvants (153).

Les huiles essentielles peuvent ainsi représenter des adjuvants prometteurs pour les antibiotiques (154).

Les mécanismes pouvant conduire à une synergie pharmacologique sont :

- effet multi-cible dans lequel les composés ciblent différents sites dans la cellule bactérienne
- effets pharmacocinétiques ou physico-chimiques (par ex. amélioration de la solubilité ou de la biodisponibilité) ou protection de la substance active
- ciblant un mécanisme de résistance spécifique des bactéries (111).

Pour améliorer l'efficacité des antibiotiques, il est nécessaire de trouver des méthodes pour améliorer la diffusion des antibiotiques à travers les membranes bactériennes et / ou pour entraver les pompes à efflux qui sont un mécanisme général de résistance chez les bactéries à Gram négatif.

Avec l'augmentation des bactéries résistantes aux antibiotiques et l'absence de nouveaux antibiotiques étant mis sur le marché, les stratégies alternatives doivent être trouvées pour faire face aux infections résultant de bactéries résistantes aux médicaments.

Les germes sont tellement nombreux à avoir développé une résistance que l'OMS annonce la mort de l'antibiothérapie en 2030 car, insuffisamment efficace, elle en perdrait le statut de médicament.

Une solution peut être de combiner des antibiotiques existants avec des HE pour potentialiser l'activité des antibiotiques (146).

De nombreux tests rapportés montrent une additivité ou une synergie. La combinaison d'huiles essentielles avec des médicaments conventionnels conduit à une dose efficace réduite d'antibiotiques lors du traitement des infections, ce qui signifie une diminution des effets indésirables des antibiotiques et une meilleure tolérance (155).

Il n'y a aucune interaction entre aromathérapie et antibiotique. Les huiles essentielles déstructurant et fragilisant les biofilms développés par les bactéries, créeront des brèches par lesquelles les antibiotiques s'engouffreront pour exercer leur activité microbicide, en plus de l'activité antibactérienne de l'HE.

Il faut cependant plus de travail pour comprendre les associations HE-antibiotique avant de pouvoir être développés dans de nouvelles formulations antibactériennes.

## 4 Action du thym sur les bactéries : études

### 4.1 Action des molécules seules de l'huile essentielle de thym

#### Activité antibactérienne des terpènes et terpénoïdes présents dans les huiles essentielles (156)

L'objectif était d'étudier l'activité antibactérienne de 32 terpènes couramment trouvés dans les HE et d'évaluer la structure bactérienne pour vérifier les dommages possibles à la membrane cellulaire et aider à comprendre l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

L'activité antimicrobienne a d'abord été évaluée en criblant initialement les composés à une concentration de 0,25 mg / mL pour exclure les composés sans activité de l'étude. Sur les 32 composés évalués, seuls 16 ont présentés une activité antimicrobienne (tableau 5).

L'eugénol a montré une action bactéricide rapide contre le sérovar *Typhimurium* de *Salmonella enterica* (2 h). Le terpinéol a montré une excellente activité bactéricide contre les souches de *S. aureus*. Le carveol, le citronellol et le géraniol ont présenté un effet bactéricide rapide contre *E. coli*.

L'activité antimicrobienne plus élevée était liée à la présence de groupes hydroxyle (composés phénoliques et alcooliques), tandis que les hydrocarbures entraînaient une activité moindre.

<b>Composés</b>	<b><i>B. cereus</i></b>	<b><i>S. typhimurium</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>
<i>Monoterpènes</i>				
<b>Camphene</b>	–	–	–	–
<b><i>m</i>-Cymene</b>	+	+	+	+
<b><i>p</i>-Cymene</b>	–	–	–	–
<b>R-(+)-Limonene</b>	+	+	+	+
<b>β -Myrcene</b>	–	–	–	–
<b>Ocimene</b>	–	–	–	–
<b>α-Phellandrene</b>	–	–	–	–
<b>(+)-α-Pinene</b>	–	–	–	–
<b>(+)-β-Pinene</b>	–	–	–	–
<b>Sabinene</b>	–	–	–	–
<b>γ-Terpinene</b>	–	–	–	–
<b>Terpinolene</b>	–	–	–	–
<i>Monoterpénols</i>				
<b>(–)-α-Bisabolol</b>	–	–	–	–
<b>(–)-Borneol</b>	+	+	+	+
<b>(+)-Borneol</b>	+	+	+	+
<b>(±)-Camphor</b>	+	+	+	+
<b>L-Carveol</b>	+	+	+	+
<b>(+)-Carvone</b>	–	–	–	–
<b>L-Carvone</b>	+	+	+	+
<b>Citral</b>	+	+	+	+
<b>(±)-Citronellal</b>	+	+	+	+
<b>β-Citronellol</b>	+	+	+	+
<b>Eucalyptol</b>	–	–	–	–
<b><i>trans</i>-Geraniol</b>	+	+	+	+
<b>(±)-Linalool</b>	+	+	+	+
<b>Terpineol</b>	+	+	+	+
<i>Phénols</i>				
<b>Carvacrol</b>	+	+	+	+
<b>Eugenol</b>	+	+	+	+
<b>Thymol</b>	+	+	+	+

<i>Sesquiterpènes</i>				
<b>β-Caryophyllène</b>	–	–	–	–
<b>α-Humulène</b>	–	–	–	–
<b>(+)-Valencène</b>	–	–	–	–

Tableau 5: Criblage antibactérien des composés

Les résultats de la détermination de la CMI sont présentés dans le tableau 6. Le contrôle négatif envisageait l'absence de médicament, ce qui montrait la viabilité des souches et pour le contrôle positif, on utilisait du sulfanilamide.

Composés	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
(-)-Borneol	0.12	0.12	0.25	0.03
(+)-Borneol	0.25	800	0.25	0.25
(±)-Camphor	0.25	0.25	0.25	0.015
<b>Carvacrol</b>	<b>0.03</b>	<b>0.015</b>	<b>0.03</b>	<b>0.015</b>
L-Carveol	0.12	0.03	0.06	0.015
L-Carvone	0.25	0.12	0.06	0.03
<i>m</i> -Cymène	0.25	0.25	0.25	0.25
Citral	0.06	0.07	0.06	0.06
Citronellal	0.12	0.12	0.25	0.25
β-Citronellol	0.12	0.12	0.25	0.03
Eugénol	0.07	0.07	0.03	0.003
<i>trans</i> -Geraniol	0.07	0.03	0.06	0.03
R-(+)-Limonène	0.25	0.06	0.25	0.25
Linalool	0.25	0.25	0.25	0.25
Terpineol	0.12	0.12	0.06	0.03
<b>Thymol</b>	<b>0.007</b>	<b>0.003</b>	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>
Sulfanilamide	R	0.06	0.03	0.06

Tableau 6: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) (mg / ml) des composés

Les résultats de la présente étude montrent que sur les seize composés à activité antibactérienne, le thymol, le carvacrol et l'eugénol présentaient une forte action antimicrobienne contre les quatre souches évaluées encore plus que le sulfanilamide. En revanche, les composés *m*-cymène, (±)-linalool, camphre, (+)-bornéol et R-(+)-limonène ont démontré la moindre action contre ces souches évaluées.

Seuls six des seize composés qui ont montré une activité antimicrobienne ont montré une activité bactéricide (tableau 7). Aucun des composés évalués n'avait d'activité bactéricide (absence de croissance) contre *B. cereus*. Pour *S. aureus*, seuls le thymol et le terpinéol ont montré une activité bactéricide à la concentration de 0,12 mg / mL. L'eugénol présentait la valeur de CMB la plus faible contre *S. typhimurium* (0,06 mg / ml). Le thymol était le composé qui présentait les valeurs de CMI les plus faibles par rapport aux souches évaluées ; cependant, le thymol n'avait pas d'activité bactéricide à des concentrations de CMI, 2 x CMI et 4 x CMI, mais l'activité bactéricide du thymol a été vérifiée à 0,12 mg / ml, comme le montre le tableau.

Composés	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>L-Carveol</b>	-	-	0.25	-
<b>β-Citronellol</b>	-	-	0.25	-
<b>Eugenol</b>	-	0.06	-	-
<b>trans-Geraniol</b>	-	-	0.25	-
<b>Terpineol</b>	-	0.25	-	0.12
<b>Thymol</b>	-	0.12	0.12	0.12

*Tableau 7: Concentrations bactéricides minimales (CMB) (mg / ml) des composés*

L'analyse de la courbe temps-Kill a été utilisée pour caractériser l'action bactéricide, seuls les composés qui ont montré une activité bactéricide minimale ont été évalués. La figure 8 montre les résultats de cinq composés tuant les souches bactériennes *S. typhimurium*, *S. aureus* et *E. coli* en fonction du temps. Les résultats ont montré que la cinétique des composés tuant les trois souches bactériennes dépendait de la concentration, des concentrations plus élevées entraînant une mort bactérienne plus rapide, révélant un effet dose-dépendant.

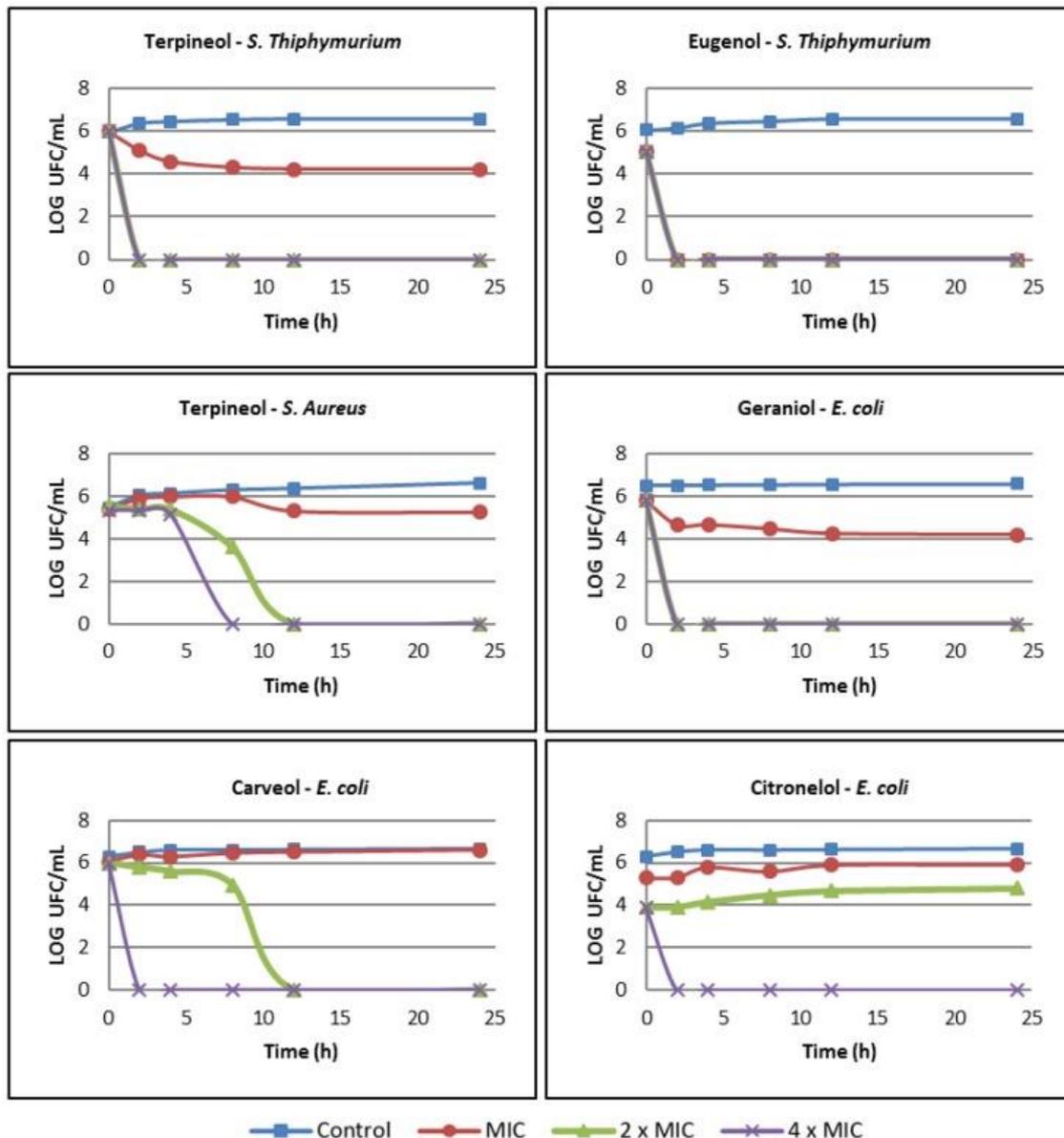


Figure 8 : Études de courbes temporelles

Le terpinéol et l'eugénoï ont présenté une action bactéricide contre *S. typhimurium*, où l'eugénoï a causé la mort de la bactérie à toutes les concentrations évaluées en seulement 2 h. En revanche, la CMI du terpinéol a réduit le nombre d'UFC de seulement 2 log<sub>10</sub> en 24 h, et le terpinéol n'était pas considéré comme bactéricide à cette concentration ; cependant, à 2 × MIC et 4 × MIC, le nombre d'UFC a été réduit de 6 log<sub>10</sub> en seulement 2 h. *S. aureus* n'a été que faiblement influencé par le terpinéol à sa CMI car le nombre de cellules était proche du nombre de contrôle. En revanche, à 2 × MIC et 4 × MIC, le temps de mise à mort a été significativement réduit (12 h et 8 h, respectivement). Le l-carveol, le β-citronelloï et le trans-géraniol n'étaient pas efficaces pour tuer *E. coli* à la CMI. D'un autre côté, ces trois composés ont rapidement tué des bactéries à 4 × MIC ; le carveol et le géraniol ont diminué le nombre d'UFC de 6 log<sub>10</sub> en 2 h, et le citronelloï les a diminué de 4 log<sub>10</sub>.

Les changements morphologiques résultant du traitement avec le l-carveol, le  $\beta$ -citronellol et le trans-géranol ont été observés chez *E. coli* et *S. typhimurium* par microscopie électronique à balayage. Les cellules témoins d'*E. Coli* (figure 9) avaient des formes bacillaires et des surfaces lisses, tandis que les bactéries traitées étaient de taille irrégulière avec la présence de débris, probablement en perturbant la division cellulaire ou le dysfonctionnement de la membrane cellulaire.

Les bactéries traitées au citronellol et au géranol étaient plus petites, avaient des surfaces sensiblement rugueuses et adhéraient les unes aux autres.

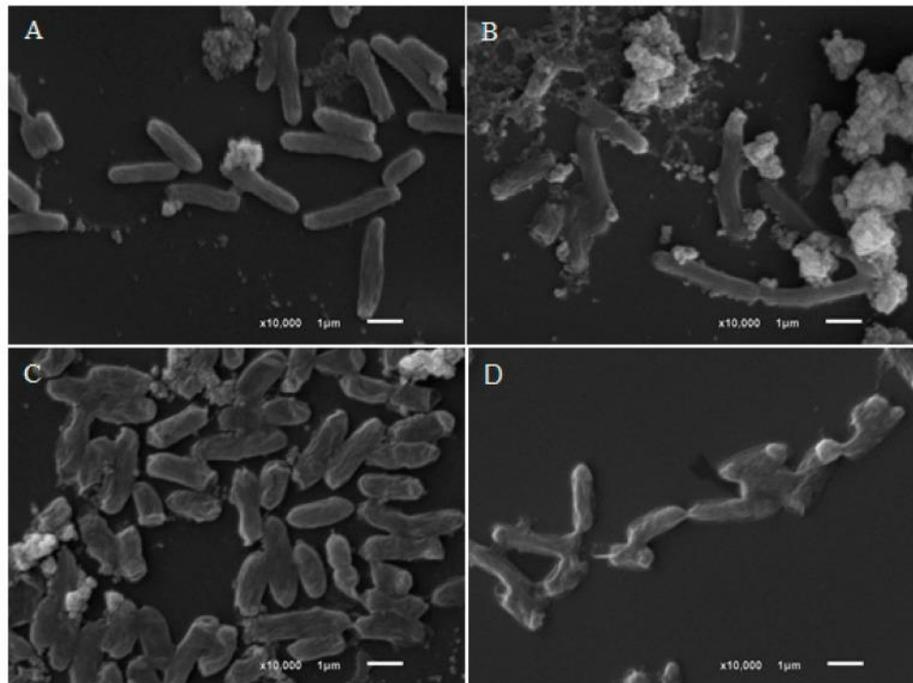
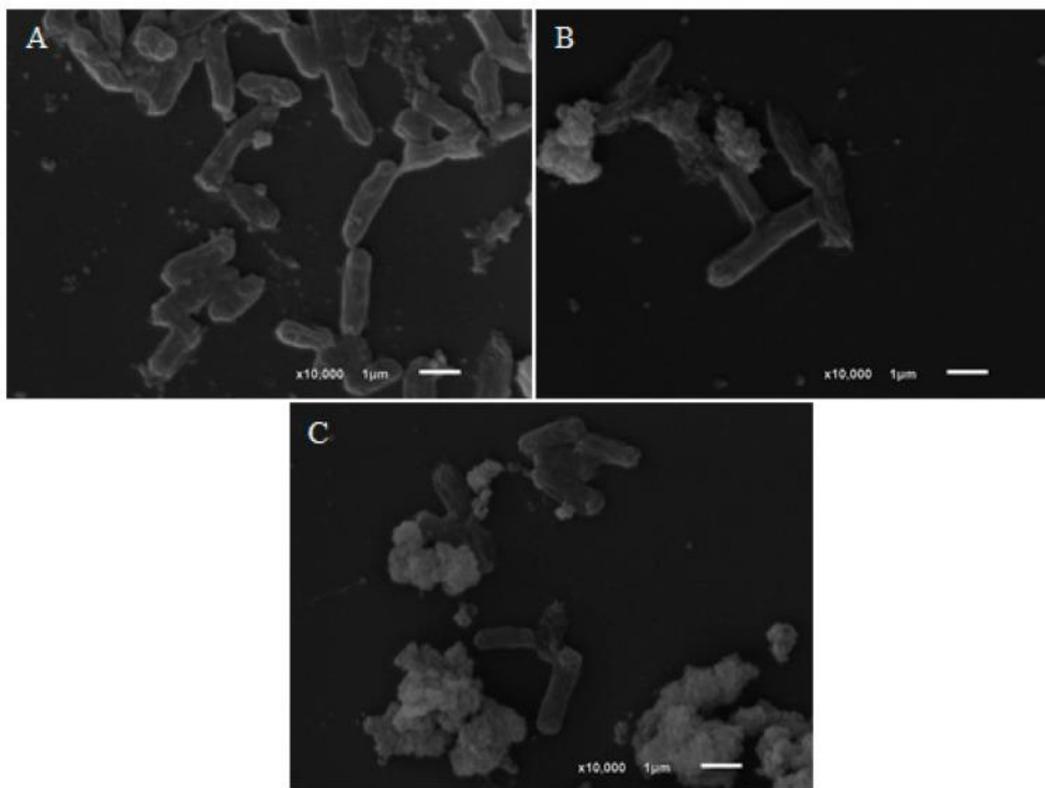


Figure 9: Microscopie électronique à balayage d'*E. Coli* non traités (A) et d'*E. Coli* traités avec 4 x CMI de carveol (B), 4 x CMI de citronellol (C) et 4 x CMI de géranol (D)

Le traitement de *S. typhimurium* (figure 10) avec de l'eugénol et du terpinéol indique que le mécanisme de la mort est dû à la perte de l'intégrité ou de la fonction de la membrane cellulaire, où la membrane cellulaire a été complètement détruite, avec la présence de débris cellulaires.



*Figure 10 :Microscopie électronique à balayage de S. Typhimurium non traités (A) et S. Typhimurium traités avec 4x CMI d'eugénol (B) et S. Typhimurium traités avec 4x CMI de terpinéol (C)*

Les résultats de la présente étude concluent que les terpènes oxygénés (terpénoïdes) tels que les composés terpéniques présentent une meilleure activité antimicrobienne que les hydrocarbures tels que R - (-) - limonène, terpinène, camphène et (+) -  $\alpha$ -pinène. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures (145,157).

Les groupes hydroxyles, tels que ceux trouvés dans le thymol, l'eugénol, le terpinéol et le carvacrol, sont très réactifs et forment des liaisons hydrogène avec les sites actifs des enzymes cibles, les inactivant, et par conséquent, un dysfonctionnement ou une rupture de la membrane cellulaire (158,159).

Friedman et al. ont mentionné que les huiles essentielles et leurs composés peuvent être divisés en deux groupes: les composés à action lente et les composés à action rapide. Selon les résultats présentés sur la figure 8, il a été observé que le terpinéol, l'eugénol, le géraniol, le carveol et le citronellolol étaient considérés comme des composés à action rapide, car ils inactivaient des organismes tels que *E. coli* et *S. typhimurium* en peu de temps (2 h). Il a été signalé que certains antimicrobiens considérés comme des composés à action rapide sont le carvacrol, le cinnamaldéhyde et le géraniol, car ils inactivent des organismes comme *E. coli* et *S. typhimurium* en cinq minutes, tandis que les composés qui agissent lentement nécessitent 30 à 60 minutes pour montrer une activité antimicrobienne efficace (160).

Parmi les 32 composés évalués, la majorité n'a présenté qu'une activité bactériostatique. Les terpènes oxygénés ont montré une forte activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées, en particulier les bactéries à Gram négatif.

Dans le présent travail, les composés qui ont montré la meilleure activité à la fois en CMI et en cinétique temporelle ont de faibles poids moléculaires et des groupes fonctionnels polaires. Ces caractéristiques peuvent augmenter la capacité antimicrobienne en facilitant la pénétration à

travers la membrane cellulaire externe. Cette hypothèse a été vérifiée par l'action de l'eugénol, un composé phénolique de faible poids moléculaire qui présentait une cinétique de destruction rapide, qui a conduit à la mort de *S. typhimurium* à toutes les concentrations en seulement deux heures.

Effet synergique de composants du thym sur l'inhibition de la résistance aux médicaments et la formation de biofilm des bactéries orales (161)

Dans cette étude, l'activité antibactérienne sur 12 souches a été testée avec 5 composés des huiles essentielles (eugenol, carvacrol, thymol, p-cymène,  $\gamma$ -terpinène) seuls ou en combinaison avec de la tétracycline. De plus, leur effet sur le biofilm, cultivé sur des surfaces en polystyrène et en émail dentaire, a été examiné.

Les résultats ont révélé une bonne activité antibactérienne de ces HE avec des valeurs de CMI variant de 0,032 à 0,512 mg/ mL pour l'eugénol, 0,032–0,256 mg/mL pour le carvacrol et thymol. Cependant, le terpinène semblait moins actif contre les souches testées avec des valeurs de CMI allant de 0,128 à 1,024 mg/mL.

Les souches *S. aureus* ATCC 25923 ont été considérées comme sensibles à l'eugénol avec des valeurs de CMI de 0,256 et 0,512 mg/mL respectivement. En outre, quatre souches cliniques (*S. aureus* B147, *S. aureus* B456, *E. feacium* P1 et *E. feacalis* P7) ont montré une sensibilité au carvacrol, avec des valeurs de CMI de 0,256 mg/mL. En revanche, les souches les plus sensibles au thymol étaient *S. mutans* B200 et *S. mutans* B509, qui avaient une CMI d'environ 0,032 mg/mL. Cependant, nous avons noté que la majorité des souches testées présentaient des valeurs de CMI élevées contre le cymène et terpinène.

La tétracycline a été évaluée en association avec 1/2 CMI de chaque composé, concernant l'effet synergique de la tétracycline et du thymol et carvacrol il y a une réduction de 2 à 8 fois des CMI selon les souches, de même pour l'eugénol.

Une potentialisation double de l'activité tétracycline a été observée avec le thymol contre six souches et une potentialisation quadruple de tétracycline avec l'ajout de thymol a été enregistrée contre quatre souches isolées de la cavité buccale.

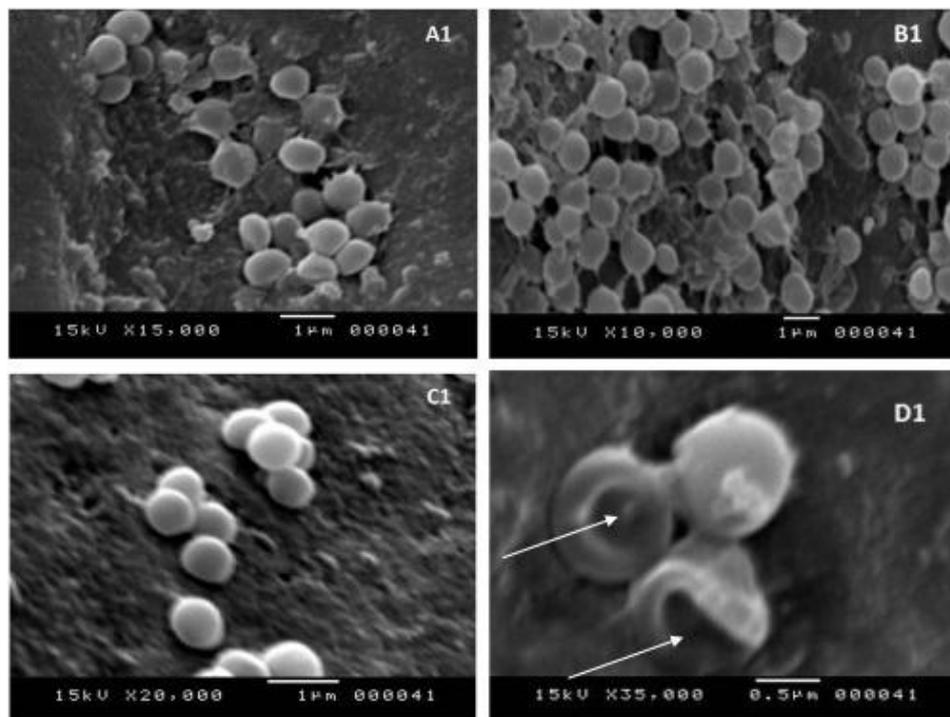
Les effets antibactériens de la tétracycline avec ou sans supplémentation en HE étaient significativement différents.

La concentration minimale d'éradication du biofilm BEC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) a été définie comme la plus faible concentration de médicaments présentant 50% d'éradication du biofilm.

	Eradication du biofilm (BEC <sub>50</sub> %)										
	TET	EUG	CAR	THY	CYM	TER	TET +1/2 MIC EUG	TET +1/2 MIC CAR	TET +1/2 MIC THY	TET +1/2 MIC CYM	TET +1/2 MIC TER
<b>Souche de référence</b>											
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	11	320	140	221	268	398	6	7	5	4	5
<b>Souches orales</b>											
<i>S. aureus</i> B234	85	300	191	183	321	347	23	63	51	37	79

<i>S. aureus</i> B398	83	240	74	191	210	251	44	62	45	63	54
<i>S. aureus</i> B147	25	630	298	279	278	611	11	13	20	16	19
<i>S. aureus</i> B193	12	250	79	85	197	228	6	6	9	7	8
<i>S. aureus</i> B295	145	280	56	45	189	348	81	102	99	79	76
<i>S. aureus</i> B285	11	300	247	260	764	325	4	8	7	8	4
<i>S. aureus</i> B456	89	310	301	388	275	311	63	64	65	69	62
<i>S. mutans</i> B200	36	188	86	143	169	379	9	14	24	25	26
<i>S. mutans</i> B509	71	341	63	139	384	394	21	45	53	41	43
<i>S. constelatus</i> B629	79	250	98	201	168	394	34	51	47	39	58
<i>E. faecium</i> P1	180	259	322	156	387	498	84	113	95	108	99
<i>E. faecalis</i> P7	89	734	309	186	636	418	51	73	25	68	46

*Tableau 8: Activité antibactérienne de l'eugénol, du carvacrol, du thymol, du p-cymène et du γ-terpinène contre les pathogènes oraux*



*Figure 11 : Effet du thymol sur la surface cellulaire de Staphylococcus aureus ATCC 25923 par microscopie électronique à balayage*

(A1) contrôle ; (B1) tétracycline ; (C1) 1/2 CMI thymol ; (D1) tétracycline avec 1/2 CMI thymol.

La combinaison de tétracycline et thymol à 1/2 MIC a réduit la quantité de cellules attachées à la surface de l'émail et la membrane bactérienne a été perturbée et une perte complète de l'intégrité de la membrane a été notée (Fig. 11D1).

La résistance aux tétracyclines et aux macrolides chez *S. aureus* peut se produire via des systèmes de pompes à efflux impliqués dans l'exportation de molécules en dehors des cellules (162). Il a été démontré que plusieurs extraits de plantes et leurs phytoconstituants possèdent une activité d'inhibition des pompes à efflux contre les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (*SARM*) et réduisent la résistance de la tétracycline en bloquant les protéines des pompes à efflux (163).

Les résultats démontrent une propriété antibiofilm des HE explorés contre les bactéries orales testées. Comme présenté dans le tableau 8, les valeurs de BEC50 étaient supérieures à la concentration requise pour inhiber la croissance bactérienne en suspension (valeurs de CMI). Un effet synergique a été démontré entre tétracycline et HE contre le biofilm de *S. aureus*. La BEC50 de la tétracycline variait de 0,011 à 0,180 mg/mL, l'activité anti-biofilm de la tétracycline sur le polystyrène et la surface dentaire était augmentée lorsque le milieu était supplémenté avec divers HE et que le BEC50 variait de 0,004 à 0,113 mg/mL.

Par conséquent, eugénol, carvacrol, thymol, p-cymène et  $\gamma$ -terpinène seuls ou en combinaison avec la tétracycline, pourraient diffuser à travers la matrice polysaccharidique du biofilm et le déstabiliser en raison de leurs propriétés antimicrobiennes intrinsèques.

Dans une autre étude, l'efficacité de thymol et carvacrol pour éradiquer les biofilms préformés de *S. aureus* et *S. epidermidis* a également été démontrée (80).

#### Activité antibactérienne du thym et des terpénoïdes (145)

Les huiles essentielles de poivre noir (*Piper nigrum*), de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), géranium (*Pelargonium graveolens*), muscade (*Myristica fragrans*), origan (*Origanum vulgare*) et le thym (*Thymus vulgaris*), ainsi que 21 terpénoïdes et l'eugénol (phénylpropanoïde), que l'on trouve couramment dans les HE, ont été testés pour leur activité.

Souche bactérienne	<i>Myristica fragrans</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	<i>Piper nigrum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
<i>Acinetobacter calcoacetica</i>	12.7	52.2	13.0	12.3	10.3	<b>30.7</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	7.0	20.5	11.4	9.5	21.1	<b>23.4</b>
<i>Clostridium sporogenes</i>	NE	>90.0	7.8	8.7	13.4	<b>&gt;90.0</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	18.5	17.9	19.8	8.8	15.5	<b>41.8</b>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NE	14.6	NE	NE	7.8	<b>15.2</b>
<i>Escherichia coli</i>	10.4	29.5	NE	7.3	13.6	<b>32.4</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16.9	19.0	13.8	NE	9.1	<b>31.8</b>
<i>Moraxella sp.</i>	6.4	31.4	NE	5.4	15.8	<b>29.0</b>
<i>Proteus vulgaris</i>	10.0	44.6	NE	7.1	9.1	<b>&gt;90.0</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NE	>90.0	19.4	7.7	14.0	<b>33.5</b>
<i>Salmonella pullorum</i>	8.4	46.0	6.9	7.1	14.0	<b>&gt;90.0</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	24.6	17.6	13.6	14.5	14.9	<b>&gt;90.0</b>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	7.3	33.9	NE	11.7	13.7	<b>25.5</b>

Tableau 9: Zones d'inhibition de croissance (mm) montrant une activité antibactérienne pour un nombre d'HE sélectionnées

Souche bactérienne	Borneol	δ-3-carene	carvacrol	carvacrol methyl ester	cis/trans citral	eugenol	geraniol
<i>Acinetobacter calcoacetica</i>	7.0	10.0	<b>45.3</b>	NE	7.9	15.4	6.1
<i>Bacillus subtilis</i>	10.4	9.5	<b>39.5</b>	NE	5.9	21.8	6.4
<i>Clostridium sporogenes</i>	NE	16.6	<b>20.3</b>	8.9	12.6	9.7	12.9
<i>Enterococcus faecalis</i>	NE	11.3	<b>21.2</b>	NE	21.6	10.0	12.9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NE	12.0	<b>18.5</b>	NE	6.2	9.9	6.4
<i>Escherichia coli</i>	6.7	13.5	<b>29.2</b>	5.9	11.0	13.3	9.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NE	11.7	<b>23.6</b>	7.1	8.8	10.9	NE
<i>Moraxella sp.</i>	NE	12.3	<b>21.6</b>	NE	6.5	10.1	6.1
<i>Proteus vulgaris</i>	NE	11.1	<b>26.5</b>	6.2	6.9	8.3	5.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NE	10.6	<b>26.0</b>	NE	6.6	15.5	5.7
<i>Salmonella pullorum</i>	NE	13.8	<b>27.1</b>	5.0	12.0	12.9	6.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.9	11.3	<b>20.2</b>	NE	4.9	11.5	5.2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NE	15.4	<b>22.4</b>	NE	9.0	11.6	8.0

Souche bactérienne	acétate de géranyle	cis - hex - 3 - en - 1 - ol	R (+) - limonène	linalool	menthone	nérol	a-pinene
<i>Acinetobacter calcoacetica</i>	10.3	8.1	NE	9.3	9.7	11.4	NE
<i>Bacillus subtilis</i>	10.8	6.4	NE	14.0	7.1	12.4	NE
<i>Clostridium sporogenes</i>	20.4	7.8	10.3	20.3	10.7	NE	5.7
<i>Enterococcus faecalis</i>	7.5	8.9	NE	16.7	NE	NE	9.2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	7.6	6.5	7.1	9.7	6.3	7.2	NE
<i>Escherichia coli</i>	11.0	12.0	11.2	13.8	6.6	7.6	8.9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.8	10.7	7.0	12.6	5.9	NE	8.1
<i>Moraxella sp.</i>	9.0	6.7	7.9	10.3	6.9	NE	6.2
<i>Proteus vulgaris</i>	9.8	8.2	7.4	12.2	6.2	NE	7.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.5	8.4	NE	NE	NE	13.6	NE

<i>Salmonella pullorum</i>	8.7	12.0	11.2	7.5	6.2	NE	7.9
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.6	8.2	NE	9.0	10.2	9.4	8.3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	8.2	11.5	7.1	9.5	8.0	7.1	6.6

Souche bactérienne	$\beta$ -pinene	(+)-sabinene	$\alpha$ -terpinene	terpinen-4-ol	$\alpha$ -terpineole	(-)-thujone	thymol
<i>Acinetobacter calcoacetica</i>	11.2	7.8	NE	14.5	18.7	8.7	<b>29.8</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	NE	7.4	NE	13.1	28.8	12.6	<b>39,2</b>
<i>Clostridium sporogenes</i>	7.5	NE	8.8	9.7	NE	18.1	<b>NE</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	7.8	NE	NE	10.7	13.4	13.3	<b>26.3</b>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NE	7.3	NE	17.3	21.6	10.7	<b>30.5</b>
<i>Escherichia coli</i>	7.8	NE	6.1	14.4	16.3	12.2	<b>34.3</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.9	7.4	7.9	10.7	19.1	11.1	<b>40.0</b>
<i>Moraxella sp.</i>	4.8	NE	5.5	11.4	18.2	10.0	<b>39.1</b>
<i>Proteus vulgaris</i>	6.6	NE	5.6	9.7	20.2	12.6	<b>33.5</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.5	NE	6.3	17.0	8.9	9.3	<b>13.4</b>
<i>Salmonella pullorum</i>	6.0	NE	16.5	14.9	19.2	11.5	<b>31.5</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.4	NE	NE	13.7	18.2	9.4	<b>31.6</b>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5.8	NE	NE	8.6	20.4	9.0	<b>27.7</b>

Tableau 10 : Zones d'inhibition de croissance (mm) montrant une activité antibactérienne pour un certain nombre de composants d'huile volatile végétale sélectionnés

Toutes les souches bactériennes ont démontré un certain degré de sensibilité aux huiles volatiles végétales testées, bien que la croissance d'un certain nombre de bactéries n'ait pas été inhibée par certaines d'entre elles.

Les huiles volatiles de *P. graveolens* et de *T. vulgaris* semblaient exercer une plus grande activité inhibitrice contre les organismes Gram positifs.

Le tableau 9 résume l'activité antibactérienne des huiles volatiles. De ce fait, l'huile ayant le spectre d'activité le plus large s'est révélée être *T. vulgaris*, suivie par *O. vulgare*, *S. aromaticum*, *M. fragrans*, *P. nigrum*, *P. graveolens*, dans cet ordre.

Le tableau 10 résume l'activité antibactérienne des composants individuels de l'huile. De là, le composant ayant le spectre d'activité le plus large s'est avéré être le **thymol** suivi du **carvacrol**, de l' **$\alpha$ -terpinéol**, du **terpinène - 4 - ol**, de l'eugénol, du ( $\pm$ ) **-linalool**, (-) - de la **thuyone**, du  $\delta$  - 3 - carène, cis - hex - 3 - an - 1 - ol, acétate de géranyle, (cis + trans) citral, nérol, géraniol, menthone,  $\beta$  - pinène, R (+) - limonène,  $\alpha$  - pinène,  $\alpha$  - terpinène, bornéol, (+) -Sabinène,  $\gamma$  - terpinène, citrell terpinolène onellal, 1,8 - cinéole, acétate de bornyle, carvacrol méthyl éther, myrcène,  $\beta$  - caryophyllène,  $\alpha$  - bisabolol,  $\alpha$  - phellandrene,  $\alpha$  - humulene,  $\beta$  - ocimene, aromadendrene, p - cymene, dans cet ordre.

Les composants ayant le spectre d'activité le plus large dans cette étude sont les composants que l'on retrouve dans les différentes espèces de thym.

## Synergie entre les composés de l'huile de thym (164)

Dans cette étude, l'huile de *Thymus vulgaris* ainsi que ses principaux composants (thymol, p-cymène,  $\gamma$ -terpinène, linalool, carvacrol, bornéol et  $\alpha$ -terpinène) ont été testés pour leur contribution spécifique à l'activité antimicrobienne de l'huile.

L'huile essentielle de thym vulgaire utilisée dans la présente étude représente le chémotype du thymol où les deux principaux composants comprennent le thymol (60,18%) et le p-cymène (15,44%) (tableau 11).

Composants	% dans l'huile
thymol	60,18
p-cymène	15,44
$\gamma$ -terpinène	6,39
linalool	4,22
carvacrol	2,88
bornéol	1,76
$\alpha$ -terpinène	1,01

Tableau 11: Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

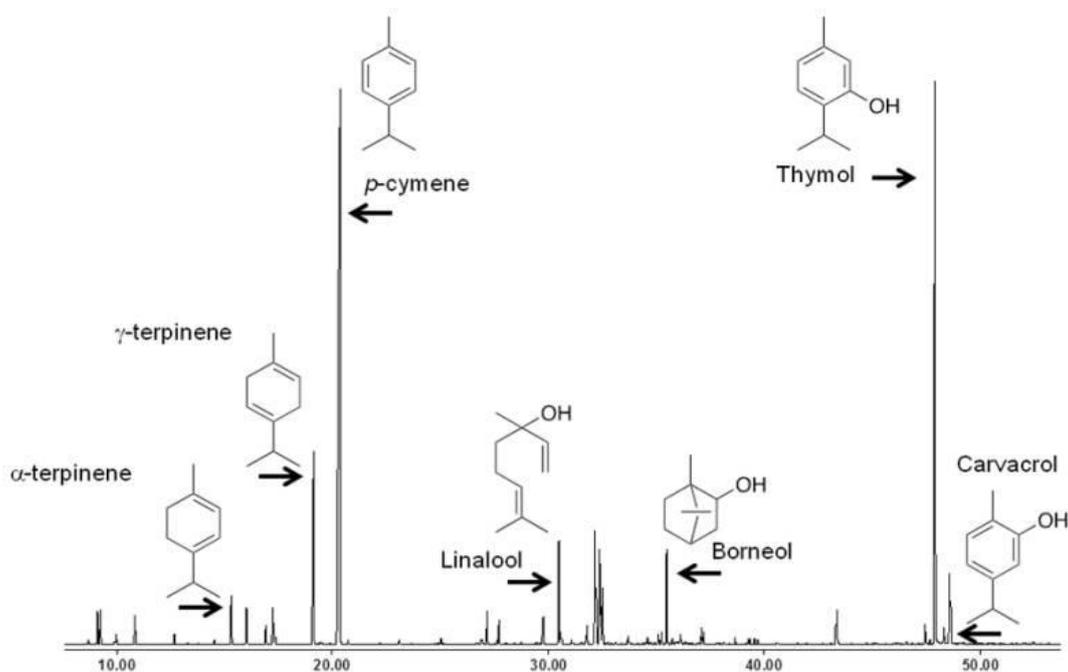


Figure 12: Analyse GC-MS de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Pathogènes	CMI (mg / mL)								
	HE T.vulgaris	Thymol	Carvacrol	Linalool	p-Cymene	Borneol	$\alpha$ -Terpinene	$\gamma$ -Terpinene	Ciprofloxacine
<i>Escherichia coli</i>	0.500	1	1	4	>8	>8	8	>8	0.0005
<i>Morexella catarhalis</i>	0.500	1	1	2	>8	8	8	>8	0.001
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.500	1	0.500	2	>8	8	4	8	0.0005

<i>Enterococcus faecalis</i>	0.125	0.500	0.500	1	>8	4	8	>8	0.001
<i>Bacillus cereus</i>	0.125	0.500	0.250	2	>8	8	4	8	0.0002

*Tableau 12 : CMI (mg/ml) de l'HE de Thymus vulgaris et de ses principaux constituants lorsqu'elle est testée contre un panel d'agents pathogènes*

L'évaluation des valeurs de CMI par essai de microdilution en bouillon a montré que l'HE et les molécules sélectionnées étaient actives in vitro contre les pathogènes à Gram positif et Gram négatif (tableau 12). L'HE possédait une efficacité antimicrobienne élevée contre tous les agents pathogènes testés avec des valeurs de CMI allant de 0,062 à 0,500 mg/mL.

Sur la base de ces valeurs de CMI, les composés à tester ont été classés en trois groupes : fortement actifs (CMI  $\leq$  2 mg / mL), modérément actifs (CMI 2–4 mg / mL) et composés faiblement actifs (CMI  $\geq$  4 mg / mL).

Comme prévu, les phénols monoterpéniques, le thymol et le carvacrol, se sont révélés être les constituants les plus actifs, tandis que le linalol s'est généralement révélé avoir une activité modérée et le p-cymène, le bornéol, l' $\alpha$ -terpinène et le  $\gamma$ -terpinène ont montré une faible activité antimicrobienne.

Le profil chromatographique de l'huile a confirmé la présence de deux groupes importants, à savoir les hydrocarbures monoterpéniques et les monoterpènes oxygénés (alcools, phénols, cétones, aldéhydes, éthers-oxydes...). Le premier n'a pas de véritable activité antibactérienne, le second est connu pour posséder des activités antimicrobiennes élevées.

Par conséquent, les terpénoïdes comme le thymol et le carvacrol sont les principaux contributeurs à l'activité antimicrobienne de l'HE de thym. Cependant, il est évident que l'huile essentielle présente une activité antimicrobienne plus élevée que les principaux constituants individuels suggérant l'implication d'autres composants dans l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle.

L'activité antimicrobienne de tous les principaux composés seuls et en combinaisons a été déterminée pour étudier les interactions synergiques potentielles entre les divers constituants contribuant à l'efficacité globale de l'HE.

Pour déterminer les interactions combinatoires possibles des molécules sélectionnées, les indices de concentration inhibitrice fractionnelle (FICI) ont été calculés en utilisant la méthode du damier. Sur les 147 combinaisons étudiées, seules deux interactions antagonistes ont été observées, à savoir la combinaison du thymol et du bornéol contre *M. cattarhalis*, et la combinaison du  $\gamma$ -terpinène et du carvacrol contre *S. aureus*. Le FICI des molécules testées contre tous les agents pathogènes testés variait de 0,133 à 5 000. Les interactions synergiques ont été principalement observées avec les micro-organismes Gram positifs (28%), en particulier *S. aureus* et *B. cereus*, démontrant pour chacun huit interactions synergiques. Les souches Gram négatives ont suivi, montrant respectivement 14% d'interactions synergiques. Pour toutes les combinaisons testées, 21% se sont révélées synergiques, 42% additives, 36% indifférentes et 1% antagonistes. L'interaction synergique la plus prononcée a été observée entre le p-cymène faiblement actif (un monoterpène) et le carvacrol fortement actif (un phénol) contre *M. cattarhalis* (FICI = 0,133). Une interaction synergique prononcée a également été observée entre le p-cymène et le linalol (FICI = 0,141) et la combinaison p-cymène et carvacrol (FICI = 0,157) contre *C. tropicalis* et *E. coli*, respectivement.

La plupart de ces interactions synergiques importantes se produisent entre les composés qui ont montré une activité antimicrobienne forte et faible lorsqu'ils sont testés individuellement, parmi

toutes les interactions synergiques, 48% se situe entre les composés ayant une activité antimicrobienne faible et forte lorsqu'ils sont testés seuls.

Lorsque des composés présentant des CMI faibles ont été combinés dans un rapport 1 : 1, 26% des combinaisons testées ont montré une synergie. Un bon exemple est la combinaison du thymol (antimicrobien plus fort) avec le p-cymène plus faible où des interactions synergiques ont été notées contre quatre agents pathogènes. De même, l'association carvacrol et p-cymène a montré une synergie contre cinq des sept agents pathogènes étudiés. On suppose souvent que seuls les composés fortement actifs contribuent à l'activité globale de l'huile entière. Ces résultats démontrent que des composés hautement actifs avec des composés ayant une activité plus faible ont un effet additif et même synergique.

Pour vingt-huit des combinaisons synergiques observées dans la combinaison 1 : 1, d'autres études approfondies ont été menées à travers la construction d'isobogrammes.

D'après la méthode des isobogrammes, quel que soit le rapport, la plupart des combinaisons présentent des interactions synergiques. Lorsqu'aucune synergie n'a été observée, l'additivité était apparente et, fait intéressant, aucun antagonisme ni aucune non-activité n'a été observé pour aucun des ratios. Cela indique clairement comment tous ces composés interagissent, ce qui pourrait expliquer l'efficacité dans d'autres huiles ayant des molécules similaires. Les combinaisons de p-cymène et de carvacrol contre *E. coli* et *M. cattarhalis* ont montré des interactions synergiques pour les neuf rapports étudiés. Quand la même combinaison a été testée contre *B. cereus* et *E. faecalis* sept rapports sur neuf ont montré une synergie, tandis que deux des rapports présentaient des effets additifs. Les terpinènes tels que le p-cymène, l' $\alpha$ -terpinène et le  $\gamma$ -terpinène, lorsqu'ils ont été testés seuls, se sont révélés faiblement actifs contre les agents pathogènes bactériens. Cependant, lorsque le p-cymène est associé au carvacrol ou au thymol, 64% des combinaisons étaient synergiques.

Les composés ont différents modes d'action et lorsqu'ils sont utilisés en combinaison, des interactions complexes contribuent à l'activité d'une huile essentielle par leur effet synergique. Cette étude présente quelques exemples d'interactions des principaux constituants dans l'huile de thym, il est impossible d'explorer toutes les combinaisons cependant cela permet d'avoir un aperçu sur l'effet synergique donnant l'activité globale de l'huile.

## 4.2 Action de l'huile de thym

### Activité sur différents pathogènes

#### Activité antimicrobienne de l'HE de *Thymus vulgaris* contre les principaux pathogènes oraux (165)

Dans la présente étude, nous signalons une activité inhibitrice in vitro de l'huile de *Thymus vulgaris* sur certains isolats cliniques d'agents pathogènes oraux, y compris *Streptococcus pyogenes* (Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques Groupe A), *Streptococcus mutans* des dents cariées.

Aux concentrations de 0,0032 à 0,256 mg / mL, tous (100%) les isolats microbiens se sont révélés sensibles et ont produit des zones d'inhibition variant de 11,7 à 42 mm de diamètre. *S. pyogenes* était l'isolat le plus sensible puisque les isolats cliniques ont produit les zones d'inhibition les plus larges contre toutes les concentrations d'huile de *Thymus vulgaris* (0,004-0,256 mg / mL). Aucun des isolats cliniques de cette étude n'a montré de zones d'inhibition contre 0,002 mg / mL ou une concentration inférieure d'huile de *Thymus vulgaris*.

La concentration minimale inhibitrice de l'huile de *Thymus vulgaris* sur les souches standard de *S. mutans* est de 0,0032 mg / mL et 0,0016 mg/ml pour *S. pyogenes*.

<i>HE de Thymus vulgaris</i> (mg/mL)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (n = 30)	<i>Streptococcus mutans</i> (n = 30)
<b>0,256</b>	42 (100%)	38.1 (100%)
<b>0,128</b>	29.4 (100%)	29.2 (100%)
<b>0,064</b>	21.1 (100%)	18.9 (100%)
<b>0,032</b>	12.7 (100%)	11.7 (100%)
<b>0,016</b>	9.6 (100%)	9.1 (76.6%)
<b>0,008</b>	8.8 (80%)	8 (50%)
<b>0,004</b>	8.1 (26.6%)	0 (0%)
<b>0,002</b>	R	R
<b>Vancomycine</b>	21.5	21.2
<b>Amikacine</b>	R	R

Tableau 13: Zones d'inhibition (mm) de l'huile de *Thymus vulgaris* sur certains pathogènes oraux

Les valeurs entre parenthèses sont des pourcentages de sensibilité.

Antimicrobiens	<i>Streptococcus pyogenes</i> (n = 30)	<i>Streptococcus mutans</i> (n = 30)
<b>HE de <i>Thymus vulgaris</i></b>	0,0036	0,0019
<b>Vancomycine</b>	0.00095	0.00066
<b>Amikacine</b>	R	R

Tableau 14: CMI (mg/ml) de l'huile de *Thymus vulgaris* et de 2 antibiotiques

Les données présentées dans cette étude ont révélé une forte activité inhibitrice de l'huile de *Thymus vulgaris* sur les 2 pathogènes oraux.

Dans une autre étude utilisant les mêmes techniques, ils ont trouvé des *S. pyogenes* très sensibles à l'huile de *Thymus vulgaris* avec une zone d'inhibition de croissance de 38 mm et une concentration inhibitrice minimale aussi faible que 0,00087 mg / mL (166).

Dans une autre étude il a été rapporté que l'incubation de *S. mutans*, le principal agent étiologique des caries dentaires, avec 20% d'huile de *Thymus vulgaris* a entraîné une inhibition de la croissance de 96% de cette bactérie après 48 heures. De plus, une réduction significative de l'adhésion de *S. mutans* aux cellules épithéliales buccales après un lavage de bouche avec 20% d'huile de *Thymus vulgaris* a été observée (167).

Compte tenu de la forte activité inhibitrice de l'huile de *Thymus vulgaris* contre *S. pyogenes* et *S. mutans* telle que présentée dans cette étude et d'autres, il semble raisonnable d'utiliser cette huile essentielle dans l'aromathérapie, en particulier chez les patients présentant des infections des voies respiratoires causées par des *S. pyogenes* tels que l'amygdalite, la pharyngite, la

sinusite et la bronchite ou dans les bains de bouche, les dentifrices ou l'aromathérapie pour la prévention et traitement des infections buccales apparentées.

#### Activité contre les bactéries responsables des infections des voies urinaires (168)

Le but de la présente étude était d'étudier l'activité antimicrobienne des HE obtenues à partir d'anis étoilé (*Illicium verum*), de basilic (*Ocimum basilicum*), d'origan (*Origanum vulgare*), de sauge sclarée (*Salvia sclarea*) et le thym (*Thymus vulgaris*) contre les souches multirésistantes d'*E. coli* et *Enterococcus spp.*

Les cinq huiles étaient riches en monoterpènes, les principaux terpènes identifiés dans les HE de *O. vulgare* et *T. vulgaris* étaient le carvacrol (65,9%) et le thymol (52,6%), respectivement, suivis du p-cymène (9,3 et 15,3%).

Les principaux composés de *S. sclarea* et *O. basilicum* étaient l'acétate de linalyle (54,7%) et le linalool (46,0%), respectivement. *I. verum* était principalement composé d'anethol phénylpropanoïde (89,8%).

Antibiotiques	<i>Escherichia coli</i>			<i>Enterococcus spp.</i>		
	Sensible (%)	Intermédiaire (%)	Résistant (%)	Sensible (%)	Intermédiaire (%)	Résistant (%)
<b>Aztreonam</b>	1 (14.3)	1 (14.3)	5 (71.4)	0	0	8 (100)
<b>Amikacine</b>	4 (57.1)	1 (14.3)	2 (28.6)	1 (12.5)	1 (12.5)	6 (75)
<b>Amox / Ac. clavulanique</b>	0	3 (42.9)	4 (57.1)	8 (100)	0	0
<b>Ampicilline</b>	0	0	7 (100)	0	4 (50)	4 (50)
<b>Céphalotine</b>	0	0	7 (100)	2 (25)	2 (25)	4 (50)
<b>Céfotaxime</b>	2 (28.6)	2 (28.6)	3 (42.8)	0	2 (25)	6 (75)
<b>Ceftazidime</b>	1 (14.3)	0	6 (85.7)	0	0	8 (100)
<b>Ciprofloxacine</b>	0	1 (14.3)	6 (85.7)	1 (12.5)	0	7 (87.5)
<b>Doxycycline</b>	2 (28.6)	0	5 (71.4)	3 (37.5)	1 (12.5)	4 (50)
<b>Erythromycine</b>	0	0	7 (100)	1 (12.5)	3 (37.5)	4 (50)
<b>Gentamicine</b>	4 (57.1)	0	3 (42.9)	2 (25)	2 (25)	4 (50)
<b>Néomycine</b>	0	4 (57.1)	3 (42.9)	0	2 (25)	6 (75)
<b>Pipéracilline</b>	0	0	7 (100)	0	5 (62.5)	3 (37.5)
<b>Rifampicine</b>	0	3 (42.9)	4 (57.1)	3 (37.5)	2 (25)	3 (37.5)
<b>Streptomycine</b>	0	4 (57.1)	3 (42.9)	0	1 (12.5)	7 (87.5)
<b>Sulfaméthoxazole-triméthoprime</b>	2 (28.6)	0	5 (71.4)	6 (75)	0	2 (25)
<b>Tétracycline</b>	2 (28.6)	0	5 (71.4)	1 (12.5)	0	7 (87.5)
<b>Tobramycine</b>	0	2 (28.6)	5 (71.4)	2 (25)	0	6 (75)

Tableau 15: Nombre d'isolats et pourcentages d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus spp.* sensibles, intermédiaires ou résistants aux antibiotiques

Souche bactérienne	<i>Illicium verum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
	Ether	Ether	Phénol	Ester	Phénol
<i>E. coli</i> 1069	0.611	0.571	0.293	0.279	0.585
<i>E. coli</i> 1002	0.611	2.287	1.183	2.232	0.585
<i>E. coli</i> 994	0.152	0.285	0.293	0.279	0.146
<i>E. coli</i> 986	2.445	NE	0.587	2.232	0.585
<i>E. coli</i> 977	2.445	2.287	0.587	2.232	0.292
<i>E. coli</i> 876	0.152	1.143	0.293	0.139	0.146
<i>E. coli</i> 835	0.611	1.143	0.587	0.558	0.146
<i>Enterococcus</i> 1091	NE	18.3	1.183	NE	2.342
<i>Enterococcus</i> 1079	NE	4.575	1.183	NE	2.342
<i>Enterococcus</i> 1034	NE	9.15	1.183	NE	1.171
<i>Enterococcus</i> 835	NE	9.15	1.183	NE	2.342
<i>Enterococcus</i> 793	NE	2.287	1.183	NE	2.342
<i>Enterococcus</i> 654	NE	2.287	1.183	NE	2.342
<i>Enterococcus</i> 618	NE	4.575	1.183	NE	2.342
<i>Enterococcus</i> 568	NE	9.15	1.183	NE	1.171

Tableau 16: CMI (mg/ml) des HE contre les souches d'*E. Coli* et *Enterococcus*

Légende : NE : pas efficace

Les souches d'*E. coli* et *Enterococcus spp.* se sont révélés résistants et intermédiaires à plusieurs antibiotiques. En détail, un isolat d'*E. Coli* n'était sensible à aucun antibiotique testé et certaines souches n'étaient sensibles qu'à un ou deux des vingt et un antibiotiques testés (tableau 15).

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HE sélectionnés a montré des résultats prometteurs, en particulier avec *O. vulgare* et *T. vulgaris*. Ces HE se sont en effet révélés efficaces contre tous les isolats testés présentant des valeurs de CMI allant de 0,293 mg / ml à 1,183 mg / ml pour *O. vulgare*, et de 0,146 mg / ml à 2,334 mg / ml pour *T. vulgaris*. *I. verum* et *S. sclarea* se sont révélés moyennement efficaces contre les souches d'*E. Coli*, alors qu'aucune activité n'a été observée lorsqu'ils ont été testés contre *Enterococcus spp.*

Même si certaines des huiles testées ne montraient pas une très forte activité antimicrobienne, la comparaison avec les médicaments standards pouvait être significative dans certains cas particuliers. Par exemple, les résultats globaux obtenus avec la souche d'*E. Coli* n.876 sont intéressants, car cet isolat n'était pas sensible à tous les antibiotiques testés, mais sensible à toutes les HE, avec de faibles valeurs de CMI.

Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de corrélation entre la sensibilité aux médicaments antibactériens conventionnels et aux HE. Ces produits naturels pourraient être une alternative lors du traitement de certains cas cliniques.

#### Action des HE sur des pathogènes des voies respiratoires en phase vapeur et phase liquide (169)

Le but de la présente étude était l'évaluation antibactérienne du clou de girofle, de l'écorce de cannelle, de l'eucalyptus, du thym, du pin sylvestre, de la menthe poivrée et de la citronnelle contre les agents pathogènes des voies respiratoires tels que *Streptococcus pneumoniae*, *S. mutans*, *S. pyogenes* à Gram + et *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae* et *Moraxella catarrhalis* à Gram -. L'effet antibactérien de ces HE a été comparé dans deux systèmes de test

différents, avec un test en phase vapeur (VPT) in vitro et un test de macrodilution en bouillon (BDT).

Les huiles essentielles, en raison de leur volatilité, peuvent facilement atteindre les parties supérieures et inférieures des voies respiratoires par inhalation.

### Action antibactérienne en milieu liquide

Parmi les HE, le thym était le plus efficace contre *S. mutans* (CMI : 0,04 mg / ml) et *M. catarrhalis* (CMI : 0,09 mg / mL).

L'écorce de cannelle, le clou de girofle et le thym présentaient l'inhibition la plus puissante contre les agents pathogènes à Gram négatif et à Gram positif. La souche la moins sensible à la cannelle et au thym était *S. pyogenes* (CMI : 0,41-0,43 mg / ml), tandis que le clou de girofle a produit la valeur de CMI la plus faible contre ce pathogène (CMI : 0,1 mg / ml).

Dans le cas de *Haemophilus* spp., l'écorce de cannelle était l'huile la plus efficace (CMI : 0,06 mg / ml), suivie du thym, de la menthe poivrée et du clou de girofle.

En général, il a été observé que l'eucalyptus ne montrait d'activité qu'à des concentrations plus élevées. L'huile de pin sylvestre était principalement active dans le cas des souches à Gram négatif.

L'huile de thym a présenté la meilleure CMI pour *S. mutans*, et *M. catarrhalis*, 2ème pour *S. pneumoniae*, *H. influenzae* et *parainfluenzae*, elle était un peu moins efficace sur *S. pyogenes*.

HE		<i>S. Pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. mutans</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>M. catarrhalis</i>
<b>CMI</b>							
<b>Cannelle</b>	Aldéhyde aromatique	0.41	0.06	0.20	0.06	0.06	0.10
<b>Thym</b>	<b>Phénol</b>	<b>0.43</b>	<b>0.11</b>	<b>0.04</b>	<b>0.11</b>	<b>0.11</b>	<b>0.09</b>
<b>Clou de girofle</b>	Phénol	0.10	0.25	0.41	0.25	0.25	0.25
<b>Menthe poivrée</b>	Monoterpénol	0.35	0.35	0.70	0.21	0.21	0.35
<b>Eucalyptus</b>	Oxyde	2.82	1.41	0.70	1.41	0.70	2.81
<b>Pin sylvestre</b>	Monoterpène	1.35	0.68	1.35	1.35	0.34	0.34

Tableau 17 : CMI en phase liquide

Antibiotiques	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. mutans</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>M. catarrhalis</i>
<b>CMI</b>						
<b>Amoxicilline / Ac. clavulanique</b>	–	–	0.8	–	–	0.2
<b>Imipeneme</b>	0.25	0.8	3.1	–	–	0.2
<b>Amikacine</b>	–	–	–	3.1	1.6	–

Tableau 18: Activité antibactérienne des antibiotiques, CMI (mg/ml)

### Activité antibactérienne en phase vapeur (VP)

En raison de l'absence de contact direct entre l'agent pathogène et l'HE, cette méthode permet de détecter exclusivement la puissance antimicrobienne des composants volatils. En conséquence, les valeurs CMI ont été déterminées en tenant compte de la quantité d'HE et de l'espace aérien libre (L) dans la boîte de Pétri.

Parmi les HE, la cannelle était la plus efficace contre tous les agents pathogènes étudiés avec des valeurs de CMI comprises entre 15,62 et 90 µL / L. Au-dessus de 90 µL / L, l'huile de thym a efficacement inhibé la croissance bactérienne des agents pathogènes à Gram positif. En outre,

les volatils de thym ont également montré une puissante inhibition contre *Haemophilus spp.* et *M. catarrhalis*. Dans le cas des huiles de menthe poivrée des activités modérées ont été détectées contre les souches à Gram négatif (CMI : 31,25–75 µL / L).

L'huile de clou de girofle n'était active qu'au-dessus de 90 µL / L. L'HE du pin sylvestre n'a montré aucune inhibition, sauf dans le cas de *H. influenzae*. Par conséquent, nous supposons que le pin sylvestre a un effet bactériostatique, et sa CMI est probablement supérieure à 1500µL/L.

La vapeur d'huile d'eucalyptus a inhibé efficacement la croissance de *Haemophilus spp.* et *M. catarrhalis* à des concentrations plus élevées (CMI: 125–225 µL / L). Dans le cas de *M. catarrhalis*, l'huiles d'écorce de cannelle était active, suivies par la menthe poivrée, le thym et le clou de girofle. Parmi les agents pathogènes testés, *S. mutans* était le moins sensible aux HE volatils, à plus faible concentration, seule l'écorce de cannelle a effectué une puissante inhibition (CMI : 90 µL / L) contre ce pathogène.

Contre les bactéries Gram-négatives, l'huile de clou de girofle et d'eucalyptus n'a effectué une inhibition qu'à des concentrations relativement élevées (CMI : 90–200 µL / L).

HE	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. mutans</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>M. catarrhalis</i>
	CMI (µL/L)					
<b>Cannelle</b>	75	75	90	15.62	15.62	25
<b>Thym</b>	<b>125</b>	<b>90</b>	<b>250</b>	<b>25</b>	<b>31.25</b>	<b>50</b>
<b>Clou de girofle</b>	225	150	500	90	150	125
<b>Menthe poivrée</b>	250	90	375	50	75	31.25
<b>Eucalyptus</b>	> 1500	1200	> 1500	125	200	225
<b>Pin sylvestre</b>	> 1500	> 1500	> 1500	500	> 1500	> 1500

*Tableau 19: CMI en phase vapeur*

Selon le résultat des tests microbiologiques, les huiles d'écorce de cannelle, de clou de girofle, de thym, de menthe poivrée ont montré l'activité la plus puissante dans les systèmes à vapeur et liquide.

Dans les 2 milieux, les agents pathogènes à Gram négatif étaient plus sensibles au traitement à l'HE que les bactéries à Gram positif.

L'HE du thym, du clou de girofle et de l'écorce de cannelle peuvent fournir une activité antibactérienne prometteuse contre les agents pathogènes des voies respiratoires, soit en milieu liquide, soit en phase vapeur. Cependant, leur effet est inférieur à celui des antibiotiques de référence.

Dans l'ensemble, nous devons souligner que nos HE étaient des inhibiteurs plus puissants sous forme liquide, ce qui est probablement dû au contact direct avec l'agent pathogène.

En conclusion, nous devons mettre en évidence l'écorce de cannelle comme l'HE la plus active dans les deux systèmes in vitro. En outre, l'huile et la vapeur de thym, de citronnelle et de menthe poivrée ont également un fort effet antibactérien. À des concentrations plus faibles, l'huile de clou de girofle était un inhibiteur plus puissant en phase liquide ; sous forme de vapeur, il a montré une activité contre *H. influenzae* uniquement. L'huile d'eucalyptus et ses vapeurs n'étaient actives qu'à des concentrations plus élevées.

Il convient de prendre en considération que les HE ont des caractères différents sous forme liquide ou en vapeur, ce qui entraîne une activité biologique diversifiée.

## Activité antibactérienne des HE sur des pathogènes des plaies (170)

Les cocci aérobies à Gram positif et les bacilles à Gram négatif sont souvent isolés des infections des plaies, avec parfois des anaérobies. Parmi ceux isolés avec un degré significatif de résistance aux antimicrobiens, on trouve les isolats suivants, testés dans cette étude : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *Acinetobacter baumannii*.

Les huiles essentielles testées sont : cannelle, clou de girofle, thym, basilic, sauge sclarée, lavande, géranium et romarin.

L'huile essentielle de thym, de clou de girofle et de cannelle a démontré la plus grande activité antibactérienne contre les bactéries Gram positif et Gram négatif testées, avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice allant de 0,75 µl / ml à 1,5 µl / ml et des zones d'inhibition de 20 à 30 mm. Les huiles essentielles de lavande et de géranium ont démontré une activité inhibitrice légèrement meilleure contre la croissance bactérienne, avec des zones d'inhibition allant de 10 à 20 mm et ont été inhibées par des concentrations de 2,75 à 5,5 µl / ml. Les huiles essentielles de sauge sclarée, de basilic et de romarin ont démontré des valeurs CMI élevées. Les huiles de sauge sclarée et de basilic ont donné des plages de CMI similaires : la première étant de 3,5 à 8,5 µl / ml et la dernière de 5,5 à 9,0 µl / ml. L'huile essentielle de romarin a donné la pire activité inhibitrice, avec une plage de CMI de 13,0–19,0 µl / ml et des zones d'inhibition de 0 à 12 mm (tableau 20).

Souche bactérienne	Concentration minimale inhibitrice (µl / ml), d'huiles essentielles, Zones d'inhibition (mm)															
	Cannelle		Clou de girofle		Thym		Basilic		Sauge sclarée		Lavande		Geranium		Romarin	
	Aldéhyde		Phénol				Ether		Ester		Monoterpénol				Oxyde	
	CMI	IZ	CMI	IZ	CMI	IZ	CMI	IZ	CMI	IZ	CMI	IZ	CMI	IZ	CMI	IZ
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25	24	0.5	20	<b>0.75</b>	<b>24</b>	6.5	12	3.75	10	3.0	18	3.0	14	15.5	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.0	26	0.5	28	<b>0.75</b>	<b>30</b>	5.5	8	3.5	6	2.75	12	2.75	10	13.0	0
<i>Escherichia coli</i>	1.5	22	1.0	22	<b>1.0</b>	<b>23</b>	8.5	14	7.0	12	3.5	18	3.75	12	18.0	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.5	24	1.0	22	<b>1.0</b>	<b>22</b>	8.5	12	7.0	14	4.0	20	3.75	12	18.5	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	1.5	22	1.0	24	<b>1.0</b>	<b>26</b>	9.0	15	7.5	14	4.0	22	4.5	14	18.5	12
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.5	20	1.5	23	<b>1.25</b>	<b>22</b>	9.0	10	8.5	10.7	4.5	5.25	5.5	10	19.0	8

Tableau 20: Activité antibactérienne des huiles essentielles testées exprimée par la concentration minimale inhibitrice (CMI en µl / ml) et les zones d'inhibition de diamètre (IZ en mm)

Comme prévu, l'activité antibactérienne la plus forte a été mise en évidence par les huiles essentielles de thym, clou de girofle et cannelle. L'huile de lavande et de géranium ont démontré une capacité légèrement plus faible à inhiber la croissance.

### Activité sur *Propionibacterium acnes* (171)

*Propionibacterium acnes* est un micro-organisme anaérobie à Gram positif, qui a été reconnu comme un facteur clé dans le développement de l'acné.

Par conséquent, des approches phytothérapeutiques avec une activité antibactérienne élevée et sans effets secondaires ont été largement étudiées comme alternative.

Dans la présente étude, les activités antibactériennes d'un panel de 10 huiles essentielles vis-à-vis de *P. acnes*, à savoir la menthe (*Mentha spicata*), le gingembre (*Zingiber officinale*), le citron (*Citrus limon*), le pamplemousse (*Citrus paradisi*), le jasmin (*Jasminum grandiflora*), lavande (*Lavandula officinalis*), camomille (*Matricaria chamomilla*), thym (*Thymus vulgaris*), rose (*Rosa damascena*) et cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) ont été testées.

Les données obtenues par la méthode de diffusion du disque ont indiqué que l'huile essentielle de thym présentait les activités inhibitrices les plus fortes. Le diamètre de la zone d'inhibition mesuré était de 40,0 mm. L'huile essentielle de cannelle possédait également une activité antibactérienne considérable et le diamètre d'inhibition déterminé était de 33,5 mm. L'huile essentielle de jasmin a présenté l'activité inhibitrice la plus faible. Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont révélé que les huiles essentielles de thym, de cannelle et de rose présentaient les meilleures activités antibactériennes envers *P. acnes*. Les valeurs de MIC étaient de 0,016% (v / v), 0,016% (v / v) et 0,031% (v / v), respectivement. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de jasmin était inférieure à celle des autres huiles essentielles.

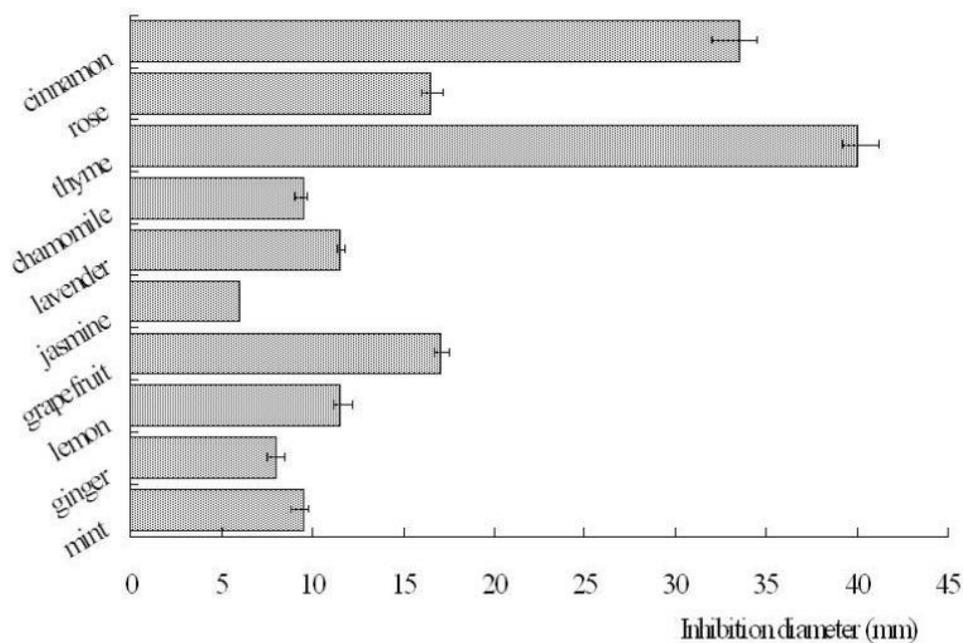


Figure 13: Zones d'inhibition de 10 huiles essentielles sur *P. acnes*

	Cannelle	Rose	Thym	Camomille	Gingembre	Lavande	Jasmin	Pamplemousse	Citron	Menthe
<b>CMI</b>	0.016	0.031	<b>0.016</b>	0.125	0.250	0.125	0.500	0.250	0.250	0.250
<b>CMB</b>	0.016	0.031	0.016	0.125	0.250	0.125	0.500	0.250	0.250	0.250

Tableau 21: CMI (%) de 10 huiles essentielles envers *P. acnes*.

Les courbes temporelles des 10 huiles essentielles sont illustrées à la figure 14. Les huiles essentielles de rose, de cannelle, de thym et de lavande ont présenté les activités bactéricides

les plus fortes à une concentration de 0,25% ; les bactéries ont été complètement tuées en 5 min. Les activités bactéricides des autres huiles essentielles ont diminué dans l'ordre : camomille>pamplemousse/citron>gingembre>menthe>jasmin. Les bactéries ont été complètement tuées après 20 min par l'huile essentielle de camomille, 30 min par les huiles essentielles de pamplemousse et de citron, et 45 min par l'huile essentielle de gingembre. Cependant, l'huile essentielle de menthe n'a pas tué les bactéries même après 120 min. L'huile essentielle de jasmin présentait l'activité bactéricide la plus faible et le nombre de *P. acnes* conservait toujours 105 CFU / mL après 120 min.

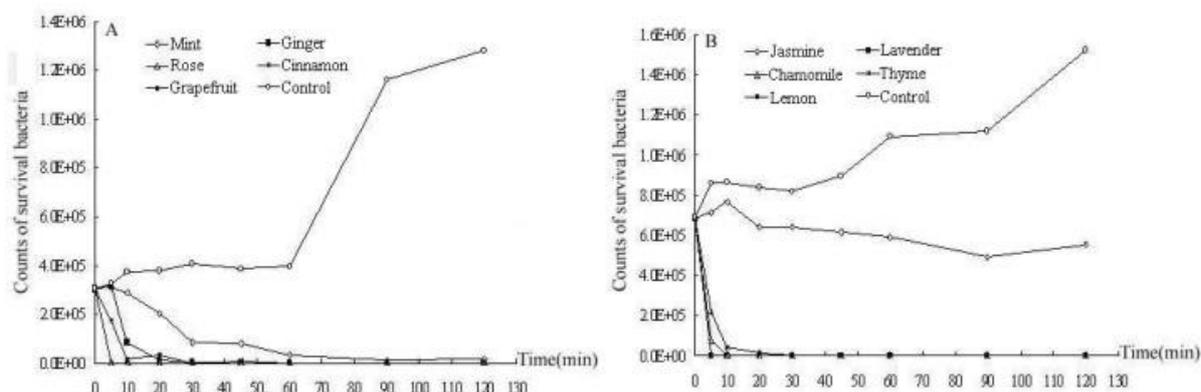


Figure 14 : Courbes temporelles de l'action de 10 huiles essentielles sur *P. acnes* en 2h

(A): huiles essentielles de menthe, de gingembre, de rose, de cannelle et de pamplemousse; (B): huiles essentielles de jasmin, lavande, camomille, thym et citron.

Comme prévu ce sont les huiles appartenant aux familles des phénols, aldéhydes aromatiques et monoterpénols qui ont la meilleure activité antibactérienne.

Parmi les 10 huiles essentielles étudiées dans la présente étude, les huiles essentielles de thym et de cannelle ont présenté les activités antibactériennes les plus fortes envers *P. acnes*. Les principaux composants de l'huile essentielle de thym sont le thymol, le principal composant de la cannelle est l'eugénol, qui possède des effets antibactériens et anti-oxydants notables.

En plus de leur utilisation pour l'alimentation et les cosmétiques, le potentiel des huiles essentielles pour le traitement de l'acné mérite d'être approfondi à l'avenir.

#### Effet antibactérien des huiles essentielles de *T.vulgaris* et *E.globulus* contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (*SARM*) (155)

Dans cette étude, l'effet antibactérien des HE de *T. vulgaris* et *E. globulus* a été étudié contre des isolats cliniques de *SARM*, *Staphylococcus aureus* est considéré comme le principal pathogène responsable des infections nosocomiales.

*T. vulgaris* et *E. globulus* ont été testés pour leur activité antibactérienne contre 14 isolats cliniques de *SARM* et 4 bactéries.

L'huile de thym avait les plus grandes zones d'inhibition pour toutes les bactéries testées, suivie de l'HE d'eucalyptus. Les résultats ont été confirmés par les valeurs de CMI, dans lesquelles l'huile de thym a révélé des CMI plus faibles que l'huile essentielle d'eucalyptus. Toutes les bactéries étaient sensibles aux HE, mais à des degrés variables.

Les activités antibactériennes de ces HE pourraient être associées à la présence de Thymol (48,1%) dans *T. vulgaris* et d'Eucalyptol (47,2%) dans *E. globulus* en tant que composants les plus caractéristiques des HE.

Souche bactérienne	<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>		Antibiotiques
	Phénol		Oxyde		
	Zone d'inhibition (mm)	CMI (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)	CMI (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	16	0,037	11	0,0856	38 imipénème, 25 ciprofloxacine, 25 tétracycline
<i>Escherchia coli</i>	15	0,00925	7	0,0513	23 cotrimoxazole, 22 gentamicine, 28 norfloxacine
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	0,0555	8	0,068	19 gentamicine, 28 ciprofloxacine, 19 triméthoprime-sulfaméthoxazole
SARM	12	0,0185	8	0,0856	15 vancomycine, 0 gentamicine, 0 cotrimoxazole
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	0,0185	17	0,0513	40 imipénème, 16 vancomycine

Tableau 22: Activité antimicrobienne des HE de *Thymus vulgaris* et d'*Eucalyptus globulus*, exprimées en CMI (mg/ml) et ZI (mm)

### Comparaison avec d'autres huiles essentielles

#### Comparaison de l'activité antibactérienne de 6 huiles essentielles et leur zone d'inhibition (172)

Le but de cette étude était de déterminer les propriétés antimicrobiennes de six HE (*O. vulgare*, *T. vulgaris*, *S. sclarea*, *L. angustifolia*, *E. caryophyllata* et *Thuja plicata*) contre les agents pathogènes bactériens cliniques et d'origine alimentaire ainsi que plusieurs souches bactériennes environnementales.

Les HE d'*Origanum vulgare* (OR) et de *Thymus vulgaris* (TY) étaient extrêmement efficaces sur toutes les bactéries testées, avec des zones d'inhibition allant de 26 à 54 mm. Fait intéressant, OR et TY ont produit des halos d'inhibition beaucoup plus grands que ceux du chloramphénicol, ce qui suggère qu'ils sont plus actifs que cet antibiotique. *Eugenia caryophyllata* (clou de girofle; CL) et *Thuja plicata* (arborvitae; AR) ont montré un degré plus faible d'inhibition de la croissance bactérienne que OR et TY, tandis que la plus grande inhibition observée a été causée par AR contre *Yersinia enterocolitica*.

Les souches bactériennes environnementales étaient beaucoup plus sensibles au chloramphénicol que les souches cliniques, aucune différence significative de sensibilité n'a été trouvée entre les bactéries Gram négatif et Gram positif. Les HE de LA et de *Salvia sclarea* (SA) étaient tous deux moins actifs contre toutes les bactéries, avec des zones d'inhibition allant de 8 à 14 mm.

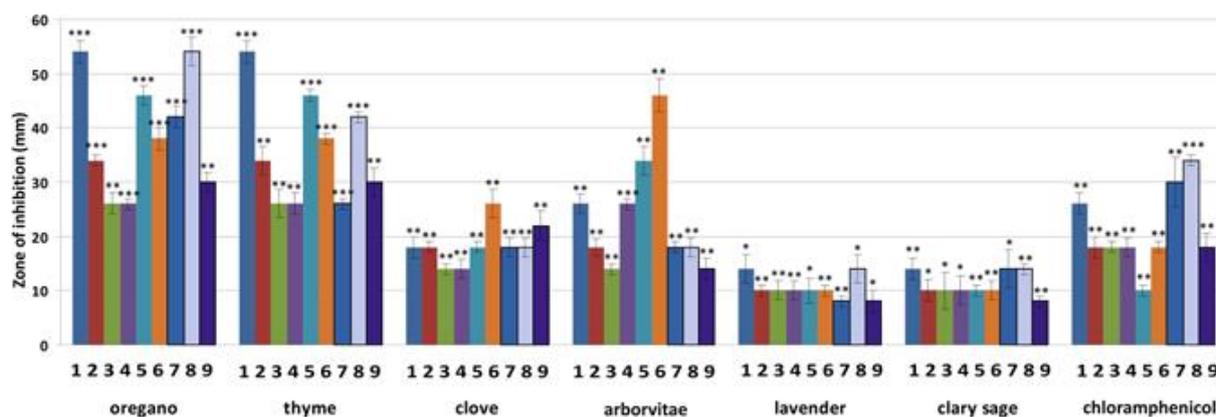


Figure 15: moyenne de la zone inhibitrice pour chaque HE analysée

(1) *Staphylococcus aureus*, (2) *Listeria monocytogenes*, (3) *Enterococcus fecalis*, (4) *Escherichia coli*, (5) *Salmonella typhimurium*, (6) *Yersinia enterocolitica*, (7) *Bacillus cereus*, (8) *Arthrobacter protophormiae*, (9) *Pseudomonas fragi*.

Le chloramphénicol (30 µg / disque) a été utilisé comme contrôle positif.

Un dépistage préliminaire a révélé que les HE d'origan, thym, clou de girofle et thuya géant étaient les plus efficaces contre toutes les bactéries testées ; par conséquent, des analyses supplémentaires de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont été effectuées avec ces quatre HE.

Ces tests antibactériens ont révélé que OR a une très forte activité (CMI 0,025%) suivi du thym (CMI 0,025-0,125%) tandis que les HE de clou de girofle et thuya géant avaient une activité antibactérienne moindre (CMI 0,05–0,125%). Les quatre HE ont inhibé cependant la croissance de toutes les bactéries.

L'origan, le thym et le clou de girofle sont des HE connues pour une haute teneur en phénols, LA et Sa pour une teneur en phénol inférieure, et le AR ne contient pas de phénols. La faible activité antibactérienne des HE LA et SA peut être due à la teneur relativement faible en phénol de ces HE : leurs principaux composants sont respectivement les alcools et les esters.

#### Comparaison de l'activité antibactérienne de 14 huiles essentielles et leur zone d'inhibition (172)

Par rapport aux autres espèces végétales, l'huile essentielle d'origan d'Izmir a conduit à l'inhibition maximale de *L. innocua*, *Staphylocoques à coagulase négative* et *S. aureus*, tandis que celle du thym a entraîné l'inhibition maximale de *B. subtilis*. À l'exception du clou de girofle, l'effet inhibiteur maximal de chaque huile essentielle a changé en fonction du type de bactérie. Les huiles essentielles d'anis, de laurier, de cannelle, d'écorce d'orange et de sauge ont exercé l'effet le plus inhibiteur sur *S. aureus* ; ceux du fenouil, de l'origan d'Izmir, de la menthe, du myrtus et de l'origan turc sur le *Staphylocoques à coagulase négative* ; ceux de houblon et d'origan d'Istanbul sur *L. innocua*; et uniquement de l'huile essentielle de thym sur *B. subtilis*.

HE		<i>L. innocua</i>	<i>Staphylocoques à coagulase négative</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
Anis	Ether	9.0	15.7	23.3	9.2
Laurier	Ether	6.0	7.5	10.8	6.0
Cannelle	Aldéhyde aromatique	21.3	21.2	52.2	27.9

<b>Clou de girofle</b>	Phénol	14.8	13.1	11.0	12.0
<b>Fenouil</b>	Ether	8.3	10.2	8.3	6.6
<b>Houblon</b>	Ester	29.7	6.0	24.4	7.9
<b>Oregan d'Istanbul</b>	Phénol	<b>55.6</b>	<b>27.7</b>	<b>50.0</b>	<b>67.5</b>
<b>Oregan d'Izmir</b>	Phénol	<b>69.0</b>	<b>76.9</b>	<b>71.7</b>	<b>53.0</b>
<b>Menthe</b>	Monoterpénol	8.0	21.5	11.7	9.2
<b>Myrte</b>	Oxyde	7.3	16.4	15.8	6.0
<b>Orange</b>	Monoterpène	8.2	7.3	8.5	6.0
<b>Sauge</b>	Ester	10.6	10.3	14.1	13.3
<b>Thym</b>	Phénol	<b>63.7</b>	<b>49.9</b>	<b>43.7</b>	<b>90.0</b>
<b>Oregan Turque</b>	Phénol	54.0	70.3	44.5	42.3

Tableau 23: Zone d'inhibition de 14 huiles essentielles contre quatre bactéries Gram-positives

Les trois huiles essentielles ont montré des niveaux élevés d'activité antibactérienne contre huit souches de bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Parmi les principaux composants des trois huiles, le carvacrol et le thymol présentaient les niveaux les plus élevés d'activité antibactérienne, tandis que leurs précurseurs biosynthétiques  $\gamma$ -terpinène et p-cymène étaient inactifs.

L'inhibition moyenne des bactéries à Gram négatif (tableau 24) variait de 6 mm pour *Y. enterocolitica* par le fenouil, la menthe, le zeste d'orange et la sauge, pour *S. typhimurium* par le fenouil, pour *P. mirabilis* par le houblon, pour *E. coli* à la menthe et myrte et pour *K. oxytoca* au houblon et écorce d'orange à 90 mm pour *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis* et *E. coli* par Izmir organ.

*Y. enterocolitica* a été le plus inhibé par les feuilles de laurier, le houblon et l'origan d'Izmir ; *S. Enteritidis* le plus souvent par le clou de girofle et le fenouil ; *S. typhimurium* principalement par la menthe, le myrte, la peau d'orange et la sauge ; *P. mirabilis* principalement par l'oregan d'Istanbul et l'oregan d'Izmir; *E. coli* principalement par les oregans turque et d'Izmir, la cannelle et le thym; et *K. oxytoca* principalement par le thym uniquement.

HE	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. oxytoca</i>
<b>Anis</b>	8.7	10.6	9.3	7.7	10.3	9.9
<b>Feuilles de laurier</b>	11.7	9.5	8.9	7.2	8.0	7.7
<b>Cannelle</b>	17.9	13.0	20.5	12.3	27.5	22.5
<b>Clou de girofle</b>	9.7	15.6	8.8	14.8	10.7	12.1
<b>Fenouil</b>	6.0	20.3	6.0	7.6	11.5	7.8
<b>Houblon</b>	37.1	11.6	10.9	6.0	8.7	6.0
<b>Oregan d'Istanbul</b>	58.3	79.7	35.9	82.5	77.1	39.3
<b>Oregan d'Izmir</b>	90.0	69.3	69.6	90.0	90.0	39.5

<b>Menthe</b>	6.0	8.2	8.8	7.2	6.0	7.2
<b>Myrte</b>	10.7	11.0	11.8	9.0	6.0	8.3
<b>Orange</b>	6.0	8.9	9.0	7.6	6.3	6.0
<b>Sauge</b>	6.0	8.6	15.3	8.5	6.8	6.3
<b>Thym</b>	<b>64.9</b>	<b>66.0</b>	<b>49.5</b>	<b>57.7</b>	<b>79.0</b>	<b>42.7</b>
<b>Oregan Turque</b>	50.0	55.2	28.1	54.0	59.8	26.1

*Tableau 24: Zone d'inhibition de 14 huiles essentielles contre six bactéries à Gram négatif*

Quelles que soient les bactéries Gram négatives et positives, les huiles essentielles des oregans turc, d'Istanbul et d'Izmir, de la cannelle et du thym avaient des effets inhibiteurs constamment plus élevés. Lorsque tous les modèles d'inhibition des bactéries Gram négatives et positives ont été considérés, l'inhibition moyenne maximale ( $61 \pm 16$  mm) et minimale ( $-3,9 \pm 4,5$  mm) par rapport au niveau de référence de l'anis s'est produite avec les huiles essentielles d'origan et d'écorce d'orange, respectivement. La variabilité la plus élevée d'inhibition par rapport à l'huile essentielle d'anis a été observée pour les bactéries Gram-positives par le thym ( $SD = 26$  mm).

Les huiles essentielles d'origan et de thym semblaient être les plus efficaces pour inhiber toutes les bactéries, qui peuvent être attribués à des constituants tels que le thymol dans l'origan d'Izmir et le thym, et le carvacrol dans l'oregan d'Istanbul. L'oregan turque malgré sa forte teneur en carvacrol 76,4 %, apparaît comme moins efficace que les autres, surtout en comparaison avec l'oregan d'Istanbul avec qui il a une composition semblable, cela pourrait s'expliquer par le fait que l'oregan d'Istanbul a du p-cymène contrairement au turque, celui-ci est connu pour agir en synergie avec les composés majeurs même s'il a une activité antibactérienne plus faible tout seul.

### **Différences de quantités et d'espèces de thym**

#### Zones d'inhibition de différentes quantités d'HE de thym (173)

Dans cette étude, les principaux composants de l'huile de *Thymus vulgaris* testée étaient le thymol (47,59%), le  $\gamma$ -terpinène (30,90%) et le p-cymène (8,41%), ce qui suggère que l'HE analysé appartient au chémotype du thymol.

*K. pneumoniae* a la zone d'inhibition la plus élevée dans l'ensemble quel que soit la quantité d'HE, mais pour une quantité de 20 $\mu$ L *E. coli* et *S. typhimurium* ont des valeurs plus élevées. *Enterococcus faecalis* est la souche la moins sensible au départ mais sa sensibilité augmente avec la quantité d'huile essentielle, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* maintient sa sensibilité quel que soit la quantité d'huile essentielle.

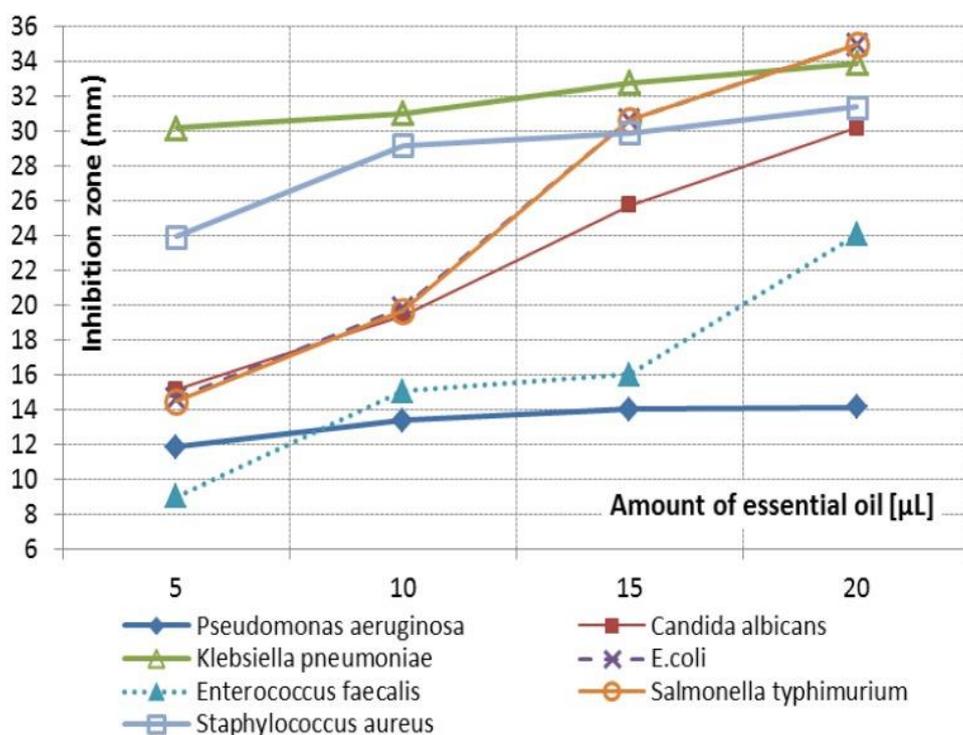


Figure 16: Zones d'inhibition du thym sur 6 bactéries et 1 champignon

Microorganisme testé	Quantité d'huile essentielle [µL]			
	5	10	15	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.93	29.2	29.9	31.4
<i>Salmonella typhimurium</i>	14.49	19.71	30.68	34.94
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.82	13.34	14	14.13
<i>E. coli</i>	14.63	19.82	30.67	34.99
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30.21	31.02	32.79	33.93
<i>Enterococcus faecalis</i>	8.99	15.06	15.99	24.06

Tableau 25: Zones d'inhibition pour différentes quantités d'huile de thym

### Effets inhibiteurs de 7 HE de thym sur la croissance de quatre bactéries pathogènes (77)

Dans cette étude sept genres de *Thymus* ont été testés, tous avaient des niveaux différents de sensibilité aux mêmes bactéries testées.

Espèce de plante	Nom commun	Principaux composants (%)	(CMI (vol/vol))			
			<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Thymus mastichina</i>	Thym espagnol	1,8-cineole (47), linalool (24), limonene (7)	>0.8	>0.8	0.8	>0.8

<i>Thymus satureoides</i>	Thym à Borneol/carvacrol	Borneol (26), camphene (9), carvacrol (7)	0.2	0.2	0.05	0.4
<i>Thymus serpyllum</i>	Thym serpolet	Carvacrol (23), <i>p</i> -cymene (20), $\gamma$ -terpinene (18)	0.1	0.1	0.05	0.2
<i>Thymus vulgaris carvacroliferum</i>	Thym à carvacrol	Carvacrol (33), <i>p</i> -cymene (24), thymol (12)	0.05	0.05	0.025	0.1
<i>Thymus vulgaris linaloliferum</i>	Thym à linalol	Linalool (60), linalyl acetate (10)	>0.8	0.2	0.1	>0.8
<i>Thymus vulgaris thuyanoliferum</i>	Thym à thuyanol	Trans-thujanol-4 (44), mycene 8-ol (13)	0.8	0.4	0.4	>0.8
<i>Thymus vulgaris thymoliferum</i>	Thym à thymol	Thymol (38), <i>p</i> -cymene (19), $\gamma$ -terpinene (17)	0.05	0.1	0.025	0.2

*Tableau 26: CMI de 7 espèces de thym*

*T. vulgaris carvacroliferum* est composé essentiellement de carvacrol (33%) et *T. vulgaris thymoliferum* est composé essentiellement de thymol (38%) (tableau 26). *T. vulgaris carvacroliferum* était deux fois plus actif contre *S. typhimurium* et *L. monocytogenes* que *T. vulgaris thymoliferum*, alors qu'ils avaient le même niveau de sensibilité contre *E. coli* et *S. aureus*, *T. serpyllum* avec 23 % de cavacrol avait la même efficacité contre *L. monocytogenes* et *S. typhimurium*. Cependant, *E. coli* et *S. aureus* étaient deux fois plus sensibles à *T. vulgaris thymoliferum* par rapport à *T. serpyllum*. De plus, *S. aureus* était le plus sensible et *L. monocytogenes* était le plus résistant à *T. satureoides* qui est essentiellement composé de bornéol (26%).

*T. mastichina* avec 47% de 1,8-cinéole avait une activité antimicrobienne significativement inférieure à *T. vulgaris linaloliferum* avec 60% de linalol et *T. vulgaris thuyanoliferum* avec 44% de trans-thujanol-4. *L. monocytogenes* était résistant à la présence des deux huiles. *S. typhimurium* et *S. aureus* étaient plus sensibles à la présence d'huile riche en linalol que l'huile essentielle riche en trans-thujanol-4. Au contraire, *E. coli* était plus sensible aux huiles contenant du trans-thujanol-4 par rapport aux huiles contenant du linalol.

Les huiles les plus actives restent les huiles de thymus riches en thymol et carvacrol. Plusieurs HE sont composées d'hydrocarbures monoterpéniques, qui sont les précurseurs biogénétiques des phénols comme le  $\gamma$ -terpinène et le *p*-cymène. Carvacrol, thymol et *p*-cymène, sont généralement les composés les plus antimicrobiens trouvés chez les espèces de Thymus.

### HE de Thym seule ou en association ?

#### Comparaison de l'HE de thym seule ou en association (174)

Les HE peuvent être utilisées dans des formulations d'emballage alimentaire actives à des fins de conservation.

À cet égard, les propriétés antibactériennes de deux espèces de Lamiaceae (*Ocimum basilicum* et *Thymus vulgaris*) et de deux Apiaceae (*Petroselinum crispum* et *Levisticum officinale*) ont

été étudiées contre certaines bactéries à Gram positif (*B. cereus* et *S. aureus*) et à Gram négatif (*P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. typhimurium*) dans la présente recherche. Quatre HE (extraits de persil, livèche, basilic et feuilles séchées de thym) ont été évalués individuellement pour leurs activités antibactériennes puis en combinaison en utilisant cinq modèles in vitro différents.

Comme les résultats de ce test l'indiquent, l'activité antibactérienne des combinaisons d'HE est plus faible que celle de l'HE de thym (tableau 27).

HE seules et mélanges	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
HE de persil	9.46	10.07	NE	9.60	9.77
HE de livèche	9.53	10.38	9.44	9.85	10.29
HE de basilic	13.58	9.91	11.12	14.85	11.58
HE de thym	<b>24.81</b>	<b>12.16</b>	<b>14.15</b>	<b>36.41</b>	<b>27.44</b>
HE Persil / livèche	9.49	9.43	9.20	9.95	9.74
HE Persil / basilic	10.05	9.54	9.39	12.19	10.46
HE Persil / thym	13.89	11.07	10.32	23.03	24.90
HE Livèche / basilic	10.26	10.49	9.41	11.95	10.21
HE Livèche / thym	13.13	10.54	9.84	20.25	14.61
HE Basilic / thym	16.54	11.64	11.38	25.76	27.27

Tableau 27: Zone d'inhibition (mm) incluant le diamètre du disque en papier, mm par test de diffusion sur gélose

NE = pas d'inhibition

L'échelle de mesure était la suivante (diamètre du disque inclus): fort effet inhibiteur → zone d'inhibition  $\geq 28$  mm, effet inhibiteur modéré →  $16 \leq$  zone d'inhibition  $< 28$  mm, léger effet inhibiteur →  $12 \leq$  zone d'inhibition  $< 16$  mm, et pas d'effet inhibiteur → zone d'inhibition  $< 12$  mm.

L'HE de thym présente la meilleure activité inhibitrice contre toutes les bactéries (plage de 12,16 à 36,41 mm), suivie par les HE de basilic, de livèche et de persil. Sa zone d'inhibition est plus grande (pour *E. coli* et *S. typhimurium*) ou similaire (pour *B. cereus*) à la taille de la zone de gentamicine (l'antibiotique utilisé comme témoin positif). Parmi les micro-organismes testés, il produit la plus grande zone d'inhibition contre *E. coli* (fort effet inhibiteur), suivi de *S. typhimurium* (effet inhibiteur modéré), *B. cereus* (effet inhibiteur modéré), *P. aeruginosa* (effet inhibiteur léger) et *S. aureus* (léger effet inhibiteur).

Les zones d'inhibition de l'HE du basilic contre les bactéries testées varient entre 9,91 et 14,85 mm. Il montre la meilleure activité antibactérienne contre *E. coli* (léger effet inhibiteur), suivi de *B. cereus* (léger effet inhibiteur), *S. typhimurium* (pas d'effet inhibiteur), *P. aeruginosa* (pas d'effet inhibiteur) et *S. aureus* (aucun effet inhibiteur). Les HE de la livèche et du persil n'exercent aucun effet inhibiteur contre les cinq souches bactériennes.

Entre les deux méthodes d'essai, une corrélation inverse a été généralement observée, ce qui est évident, les HE avec une grande zone d'inhibition présentent une faible concentration inhibitrice minimale.

Souche bactérienne	HE de persil	HE de livèche	HE de Basilic	HE de Thym	Gentamicine
<i>Bacillus cereus</i>	22.68	47.62	10.80	<b>0.56</b>	0.05
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.80	2.45	2.45	<b>0.06</b>	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47.62	22.68	22.68	<b>0.56</b>	0.50
<i>Escherichia coli</i>	10.80	10.80	10.80	<b>0.27</b>	0.24
<i>Salmonella typhimurium</i>	47.62	47.62	22.68	<b>0.56</b>	0.50

Tableau 28: CMI des huiles essentielles ( $\mu\text{L HE} / \text{mL}$ ) et de la gentamicine ( $\mu\text{g Gent} / \text{mL}$ ) par test de microdilution en bouillon

Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes à l'HE du thym. Les résultats obtenus sur le tableau 28 montrent que le thym est le plus efficace contre *S. aureus*, suivi par *E. coli* puis par *B. cereus*, *P. aeruginosa* et *S. typhimurium*.

L'HE du basilic révèle la CMI la plus faible contre *S. aureus*, suivie également de *B. cereus* et *E. coli*, puis de *P. aeruginosa* et *S. typhimurium*.

Les HE de persil et de livèche ont les CMI les plus élevés.

Les deux résultats des tests confirment que l'activité antibactérienne de l'HE du thym est forte, celle de l'HE du basilic est modérée et celle de l'HE du persil et de la livèche est faible.

Dans des études antérieures et généralement, la sensibilité des bactéries a été testée avec des HE provenant de fruits de livèche, de parties aériennes de basilic et des parties aériennes fleuries de thym, ici il s'agit de la première étude concernant les HE extraits de feuilles séchées de persil, de livèche, de basilic et de thym.

### ***B. cereus***

Les mélanges d'HE persil / thym, livèche / thym et basilic / thym produisent des zones d'inhibition accrues avec l'HE de thym. La zone d'inhibition du mélange HE persil / livèche ne diffère pas significativement de ses HE individuels. Le mélange HE persil / basilic présente une zone d'inhibition significativement plus petite que l'HE basilic.

### ***S. aureus***

Les mélanges de persil / thym, livèche / thym et basilic / thym présentent des activités antibactériennes significativement plus faibles que l'HE de thym, qui dénotent des effets antagonistes.

### ***P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* est le plus sensible à toutes les HE et à leurs combinaisons. Trois combinaisons montrent des effets antagonistes contre *P. aeruginosa* (persil / thym, livèche / thym et basilic / thym), et les trois autres combinaisons ont des effets indifférents (persil / livèche, persil / basilic et livèche / basilic). Le thym contribue de manière significative à l'activité antibactérienne des mélanges persil / thym et livèche / thym mais n'influence pas significativement l'activité antibactérienne du mélange basilic / thym.

### ***E. coli***

Quatre combinaisons présentent des effets antagonistes contre *E. coli* (HE de persil / thym, livèche / basilic, livèche / thym et basilic / thym), et les deux autres combinaisons montrent des effets indifférents (HE de persil / livèche et persil / basilic).

### ***S. typhimurium***

Les combinaisons de livèche / thym et de basilic / thym présentent des effets antagonistes contre *S. typhimurium*. L'activité antibactérienne des mélanges d'HE persil / livèche, persil / basilic et livèche / basilic ne s'écarte pas significativement de celles des HE individuels. Le thym contribue de manière significative à l'activité antibactérienne du mélange persil / thym.

Le mélange persil / thym révèle des effets modérés (contre *E. coli* et *S. typhimurium*), légers (contre *B. cereus*) ou aucun effet inhibiteur (contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*). Au lieu de cela, le mélange HE basilic / thym montre des effets inhibiteurs modérés contre *E. coli*, *S. typhimurium* et *B. cereus* mais aucun effet inhibiteur contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Le mélange livèche / thym provoque des effets modérés (contre *E. coli*), légers (contre *B. cereus* et *S. typhimurium*), ou aucun effet inhibiteur (contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*).

En résumé, toutes les combinaisons par paires présentent des activités antibactériennes inférieures à celles du thym contre les cinq bactéries. Étant donné que l'HE de thym a le rendement en pourcentage et le potentiel antibactérien les plus élevés de toutes les formulations testées, il est donc recommandé de l'utiliser seul comme agent antimicrobien.

### Traitement combiné des HE : Optimisation de l'activité antibactérienne par la méthodologie de conception des mélanges (175)

Dans cet article, des formulations à partir des trois HE ont été étudiées afin d'augmenter la sensibilité de *S. typhimurium*. Pour cela, une conception expérimentale (Mixture designs) a été testée dans la méthode de diffusion de disque pour mettre en évidence la synergie entre les HE et la méthode en damier pour confirmer cette synergie. L'utilisation de la conception des mélanges a permis de trouver la zone de combinaison conduisant à l'augmentation de la sensibilité à *S. typhimurium*.

Ici, la tâche d'optimisation antibactérienne était de trouver les constituants de formulation donnant la meilleure combinaison possible d'HE conduisant à une activité antibactérienne plus élevée.

Une conception augmentée Simplex-centroïde a été choisie pour être utilisée dans cette optimisation (Fig. 17). Ce plan consiste en dix expériences réparties comme suit : les trois HE dilués dans les sommets du triangle (expériences 1, 2 et 3), les mélanges binaires 0,5 / 0,5 (expériences 4, 5 et 6), le mélange proportionnel égal des trois constituants (expériences 7) et points de contrôle (expériences 8, 9 et 10).

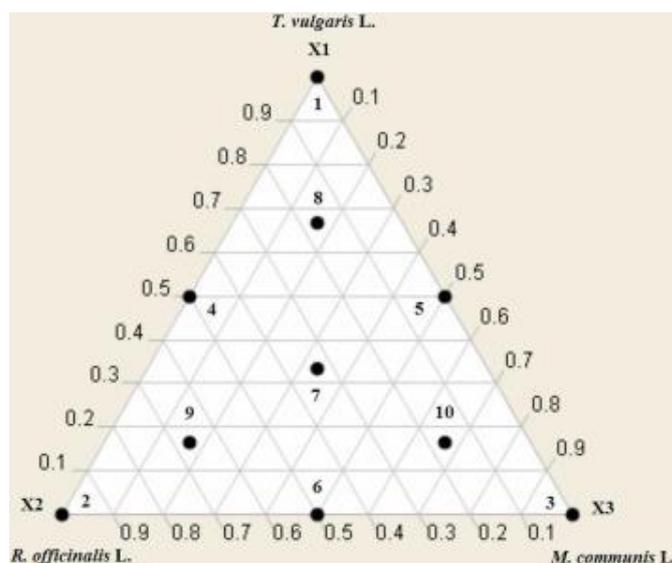


Figure 17: Positions des points expérimentaux pour la conception augmentée Simplex-centroïde

L'HE de *T. vulgaris* a donné les valeurs les plus élevées de diamètre de la zone d'inhibition dans toutes les concentrations étudiées. L'HE de *M. communis* était au deuxième rang avec une importante activité antibactérienne. L'HE de *R. officinalis* a montré les valeurs de diamètre de zone d'inhibition les plus faibles (tableau 29). En comparant les activités d'HE avec les antibiotiques témoins Amoxicilline et Cefotaxime, nous pouvons conclure que les objets étudiés ont une forte activité antibactérienne contre *S. typhimurium*.

Dilution d'HE	<i>T. vulgaris</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>M. communis</i>	Amoxicilline	Cefotaxime
	Phénol	Monoterpène	Monoterpénol		
<b>HE pure</b>	25.5	15.5	21	23	15
<b>1/10</b>	16	12.5	15.5		
<b>1/20</b>	13	11.5	12.5		
<b>1/50</b>	8.8	7	8		
<b>1/100</b>	7.5	–	7		
<b>1/200</b>	6.5	–	–		

Tableau 29 : Zones d'inhibition par méthode de diffusion discale pour les différentes concentrations d'HE de *T. vulgaris* L., *M. communis* L. et *R. officinalis* L. contre *S. typhimurium*

Selon les résultats de la CMI, l'HE du thym s'est avéré être l'HE la plus actif contre *S. typhimurium* avec une valeur de CMI de 0,25% (v / v) suivi par l'HE du myrte avec une valeur de CMI de 0,5% (v / v) et à dernière position, nous trouvons le romarin avec une valeur CMI de 2% (v / v). Par conséquent, l'huile essentielle de *T. vulgaris* a présenté un effet antibactérien plus élevé avec des valeurs de CMI 2 fois et 8 fois moins que les huiles de *M. communis* et *R. officinalis*, respectivement.

Les 2 méthodes sont corrélées montrant une forte activité antibactérienne pour l'HE de *T. vulgaris* suivie d'une activité antibactérienne importante pour *M. communis* et d'une activité antibactérienne modérée pour *R. officinalis*.

L'activité de *M. communis* était principalement due à la présence de monoterpénols ayant une activité antibactérienne importante tels que le bornéol, le 1,8-cinéole et à l' $\alpha$ -pinène appartenant respectivement aux oxydes et monoterpènes, sont modérément actifs. Ces derniers étaient des composés majeurs du romarin, ce qui explique sa faible activité antibactérienne par rapport à ceux observés pour *T. vulgaris* et *M. communis*

Le schéma des mélanges comprenant différentes combinaisons des trois HE étudiés et la réponse observée de chaque expérience sur *S. typhimurium* sont énumérés dans le tableau 30. Les combinaisons binaires entre les HE ont montré un diamètre d'inhibition plus élevé que ceux trouvés pour les HE séparément. De plus, la combinaison entre *T. vulgaris* et *M. communis* a permis d'obtenir le diamètre de zone d'inhibition souhaité (15,2 mm).

Expériences	Thym	Romarin	Myrte	ZI (mm)
1	1	0	0	13.5
2	0	1	0	11.5
3	0	0	1	12.3
4	0.5	0.5	0	13.9
5	0.5	0	0.5	15.2
6	0	0.5	0.5	13.1
7	0.33	0.33	0.33	14.3
8	0.33	0.33	0.33	14.1
9	0.33	0.33	0.33	14.2
10	0.67	0.17	0.17	14.8
11	0.17	0.67	0.17	12.7
12	0.17	0.17	0.67	14.5

Tableau 30: Différentes combinaisons générées par la conception du mélange choisi et la réponse enregistrée pour chaque expérience

L'optimisation de la formulation a été réalisée afin d'obtenir une réponse de déformation « sensible » (diamètre de la zone d'inhibition = 15mm), à partir des trois concentrations d'HE étudiées.

Le diamètre d'inhibition maximum qui peut être atteint est égal à 15,4 mm. Cette valeur peut être obtenue en réalisant un mélange composé respectivement de 55% de *T. vulgaris* et 45% de *M. communis*. Ces résultats suggèrent l'existence d'un éventuel effet synergique entre ces deux HE.

Cela pourrait être dû au fait que la combinaison de monoterpénol (bornéol en tant que composé majeur de *M. communis*) et phénoliques (thymol en tant que composé majeur de *T. vulgaris*) produisent un effet synergique remarquable sur plusieurs micro-organismes.

Pour confirmer l'hypothèse d'une synergie entre *T. vulgaris* et *M. communis* contre *S. typhimurium*, la technique du damier a été utilisée. En référence au calcul FICI, les combinaisons testées ont montré une synergie pour *S. typhimurium* pour la combinaison *T. vulgaris*-*M. communis* (FICI = 0,498). Ces résultats confirment l'hypothèse de la synergie dans la combinaison binaire entre *T. vulgaris* et *M. communis*. Cette synergie a permis d'obtenir la réponse souhaitée.

Sur la base des résultats présentés dans ce travail, la combinaison entre le thym et le myrte peut être considérée comme une alternative potentielle pour le contrôle de la sécurité sanitaire des aliments contre *S. typhimurium*. L'application d'un traitement antimicrobien naturel combiné contenant des phénols et des monoterpénols représentera une étape dans la conservation des aliments en garantissant une moindre perte des caractéristiques nutritives et organoleptiques de certains types de produits alimentaires.

### 4.3 Conclusion des études

Afin d'avoir le contenu nécessaire pour établir des conclusions, un ensemble d'études a été pris en compte, permettant d'analyser l'activité de l'huile de thym et de ses différents composants séparément, les activités sur différents pathogènes, sur différentes sphères (orale, génitale...), en comparaison avec d'autres HE. Il a également été étudié l'activité selon différentes concentrations, selon différentes espèces de thym entre elles. Et enfin comparer l'effet de l'huile de thym seule ou en association.

Nous avons pu voir que l'HE de thym peut agir sur différents types de bactéries. En comparant avec d'autres HE elle apparaît comme une de celles ayant le meilleur spectre d'action et le plus large.

Nous avons pu également constater des différences d'actions selon la concentration de l'huile de thym utilisée ou selon l'espèce utilisée.

Les principales bactéries qui ressortent des études sont énumérées ci-dessous avec les CMI correspondantes. Les différentes études démontrent une valeur de CMI basse et homogène, qui permet de légitimer l'action de l'huile essentielle de thym sur ces bactéries.

Bactéries	CMI mg / mL
<b>Gram +</b>	
<i>Streptococcus mutans</i>	0,019-0,04
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,0097-0,125
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,025-0,75
<i>Bacillus cereus</i>	0,007-0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,018-0,75
<i>Staphylococcus aureus SARM</i>	0,018
<b>Gram -</b>	
<i>Escherichia coli</i>	0,009-0,25
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,015-0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,055
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,05

L'action des HE s'effectue sur un large panel de bactéries, ces dernières peuvent être présentes dans différents types d'infections, ORL, broncho-pulmonaires, cutanées, uro-génitales et même

neuro-méningées. Les huiles pourraient donc agir sur tous ces types d'infections en application clinique. Bien sûr celles-ci nécessitent d'autres recherches pour ce type d'applications.

Nous avons constaté que l'activité antibactérienne de l'HE dépend de sa concentration et de la souche bactérienne testée.

Une concentration plus importante semble entraîner une mort bactérienne plus rapide révélant un effet dose-dépendant.

Dans les études citées l'huile de thym semble avoir un effet semblable sur les bactéries à Gram + et -, il n'y a pas de différence significative. Elle agit différemment sur toutes les bactéries quel que soient ses caractéristiques.

Quant aux combinaisons, les résultats semblent mitigés, certaines études préfèrent l'utilisation du thym tout seul, d'autres en synergie, sachant que dans les 2 cas l'huile de thym garde toute son efficacité et les autres huiles ont peu d'effet antagoniste, d'où l'application possible des 2 façons.

Même entre les différentes espèces de thym entre elles il existe une différence dû à leur composition en composants majeurs qui diffère.

L'activité antibactérienne dépend d'un ensemble de paramètres.

Il n'y pas de corrélation entre la sensibilité aux médicaments antibiotiques et aux huiles essentielles, une bactérie pourra être résistante à l'un et sensible à l'autre.

Dans son utilisation pharmaceutique les 2 huiles essentielles les plus connues et conseillées sont le thym à thymol et le thym à linalol. Le thym à thymol est connu pour son pouvoir anti-infectieux puissant notamment dans les infections ORL : sinusites, rhinopharyngites, otites, angines, laryngite, congestion des voies supérieures, bronchites...Mais également en cas de maladies des gencives, rhumatismes, arthrite... Il peut également être pris en complément d'un traitement antibiotique. Le thym à linalol sera indiqué pour son application cutanée possible contrairement au thym à thymol, pour les furoncles, aphtes, gingivites, acné, désinfection des plaies, mycoses, angines, maux de gorge...

Nous avons traité l'aspect antibactérien de l'huile mais celle-ci est antimicrobienne en générale donc est indiquée aussi comme antifongique pour les mycoses, antiviral dans les angines, rhinopharyngites...

Ces résultats soutiennent l'application médicale de ces huiles pour la prévention et / ou le traitement de certaines infections et maladies.

Comme démontré dans les différentes études, lorsque plusieurs HE sont comparées entre elles, les HE riches en phénols apparaissent comme les HE les plus efficaces dans l'activité antibactérienne et avec le spectre d'activité le plus large, notamment les différentes espèces de *Thymus*. Ces études viennent confirmer les différentes applications du thym et donner de nouvelles possibilités pour élargir son utilisation dans des domaines tel que la conservation des aliments.

Les huiles essentielles contenant de l'aldéhyde aromatique ou du phénol comme constituant majeur étaient les plus actives, suivies de celles contenant des composants alcooliques. En revanche, les huiles essentielles contenant de la cétone ou de l'éther, et notamment des hydrocarbures, comme constituant majeur, étaient relativement faibles.

Généralement, les activités antimicrobiennes des HE sont difficiles à corréler avec un composé spécifique en raison de leur complexité et de leur variabilité ; néanmoins, certains chercheurs ont signalé qu'il existe une relation entre la composition chimique des composants les plus abondants de l'HE et l'activité antimicrobienne.

L'activité antimicrobienne du thym est corrélée à la présence de composés phénoliques tels que thymol, carvacrol et d'hydrocarbures terpéniques ( $\gamma$ -terpinène) (62)(145).

Le p-cymène, troisième élément majeur en pourcentage, ne présente pas d'efficacité antibactérienne lorsqu'il est utilisé seul, des effets synergiques lui étant toutefois attribués respectivement par rapport au thymol et au  $\gamma$ -terpinène (171,79) ce qui pourrait représenter une autre cause de l'activité antimicrobienne enregistrée. D'autre part, un certain nombre d'études ont montré que les huiles essentielles présentent une activité antimicrobienne plus forte que celle de leurs principaux constituants ou de leurs mélanges, respectivement, ce qui suggère des effets synergiques des composants mineurs, mais aussi l'importance de tous les composants en relation avec l'activité biologique des HE.

Il apparaît que la différence des activités antibactériennes peut être liée à la concentration et à la nature du contenu, à la composition respective, aux groupes fonctionnels, à la configuration structurale des composants et à leur éventuelle interaction synergique. Ces différences constatées entre les huiles essentielles sont dues à des facteurs d'origines et de croissance des plantes (176). Ces facteurs peuvent entraîner des différences de concentration des principaux actifs responsables de l'inhibition de ce micro-organisme, modifiant par conséquent son action antimicrobienne.

Lorsque nous examinons les articles publiés sur l'effet antimicrobien de ces produits naturels, la comparaison entre les résultats est souvent difficile, en raison de l'utilisation de différentes approches de techniques de préparation d'inoculum, de la taille de l'inoculum, du milieu de croissance, des conditions d'incubation et de la détermination des points finaux. C'est pour cela qu'il faut garder un esprit critique, même si les différentes études vont dans le même sens.

On peut cependant tirer la conclusion que les huiles essentielles obtenues à partir de plantes du genre *Thymus*, pourraient avoir un rôle bénéfique contre différents types d'infections bactériennes. Ainsi, l'application d'huiles essentielles dans le traitement des infections humaines, suggérée par la médecine traditionnelle, peut être une alternative intéressante aux médicaments synthétiques qui présentent de nombreux effets secondaires.

Etant donné que les plantes *Thymus* peuvent servir de source alternative d'agents antimicrobiens potentiels, en particulier les extraits ayant une activité antimicrobienne à des concentrations inférieures à 0,1 mg / ml, davantage d'analyses *in vivo* et d'études cliniques sont nécessaires pour étayer ces résultats *in vitro*.

Malgré les résultats prometteurs fournis par les études pharmacologiques *in vitro* jusqu'à présent, des études cliniques sur le rôle antibactérien des plantes du genre *Thymus* et de leurs composants actifs contre les infections bactériennes chez l'homme sont nécessaires pour calculer la dose efficace d'HE chez les patients et déterminer leurs effets secondaires et leur toxicité possibles. Il reste des problèmes à résoudre tels que la stabilité, la sélectivité et la biodisponibilité de ces produits naturels dans le corps humain et toute éventuelle interaction ou effet indésirable.

De plus, le rapport optimal et les schémas posologiques doivent être explorés pour une efficacité plus élevée et une toxicité réduite. Ces paramètres critiques doivent être établis afin de fournir des preuves suffisantes pour des applications cliniques.

Des études de toxicité sont nécessaires car, en cas de surdosage, les huiles essentielles peuvent être toxiques et peuvent avoir des effets néfastes sur les cellules humaines. En fait, un certain nombre de rapports ont montré une cytotoxicité dans les cellules eucaryotes (177) (178).

La consommation de fleurs et de feuilles de *Thymus vulgaris* est sûre ; cependant, la prudence est de mise lors de l'utilisation d'huile de thym. Les effets secondaires de l'huile de thym par voie orale peuvent inclure des maux de tête, des étourdissements, une pression artérielle basse, une irritation gastro-intestinale, des nausées, des vomissements et de la diarrhée (79).

Sur la base des études, des travaux futurs devraient être axés sur des études de sécurité, d'identification des constituants antibactériens les plus actifs des huiles, leurs mécanismes d'action exactes et leurs interactions, et des essais cliniques in vivo pour évaluer l'efficacité et déterminer la posologie sûre et efficace, ainsi que les différentes indications possibles outre celles déjà connues étant donné leur efficacité et leur possible application dans la conservation des aliments et en synergie avec les antibiotiques pour contrer la résistance, entre autres.

En raison de leur grande volatilité, le temps d'action effectif est limité et des fonctionnalités telles que l'encapsulation peuvent être modifiées. D'un autre côté, leur faible niveau de toxicité ainsi que leur origine naturelle en font une alternative intéressante tant dans l'industrie alimentaire que cosmétique. Plusieurs applications pratiques pourraient être mises en œuvre dans ces industries. En résumé, il convient de souligner que l'utilisation de l'HE dans la stabilisation microbienne est possible, mais tous les cas doivent être examinés individuellement.

Les HE et autres extraits de plantes ont été considérés comme des alternatives au traitement des maladies et des agents infectieux et à la conservation des aliments. En outre, il est possible d'améliorer la conservation des aliments et de trouver un équilibre entre l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antimicrobienne en ajoutant de petites quantités de conservateurs naturels tels que les HE (179).

Les HE pourraient être utilisées pour la prévention des rechutes. Une évaluation in vitro de la sensibilité des agents pathogènes isolés aux différentes HE devrait être effectuée pour sélectionner l'huile adaptée pour le traitement de l'infection concernée chez un patient donné. Comme indiqué dans différentes études, *T. vulgaris* a montré une forte activité antimicrobienne contre *E. coli*, *Enterococcus spp.*, des bactéries impliquées par exemple dans les infections urinaires, sur *Propionibacterium acnes* pour l'acné, sur des pathogènes des voies respiratoires...

L'avantage des HE est le faible niveau apparent d'induction de la résistance des bactéries vers les HE qui pourrait être dû au fait que les HE n'attaquent pas une cible unique mais peut avoir plusieurs modes d'action antibactériens et la présence de plusieurs composants avec une activité antibactérienne.

Enfin, si la membrane est la cible déstabilisatrice des HE, il peut être simplement difficile de développer un mécanisme de résistance tel qu'un changement dans la structure et / ou la composition des membranes qui ne seraient probablement pas bénéfiques pour la viabilité des bactéries. Cependant, l'exemple de la tolérance liée à la pompe à efflux envers les HE montrent qu'une défense efficace contre les HE est possible. Bien que les premières observations indiquent que l'induction de la résistance aux HE est faible, plus d'études en utilisant différentes HE et dans des conditions différentes sont nécessaires pour confirmer de manière convaincante ces observations.

Le spectre des cibles bactériennes affectées par les HE reflète le potentiel de ces composés mais il est probable que ces effets soient en fait le résultat de l'action initiale qui est la déstabilisation de la membrane bactérienne.

La complexité entrave également une compréhension approfondie du mécanisme exact de l'action antibactérienne du HE, car toutes les interactions entre des composants séparés devraient être pris en compte (111).

De nombreux rapports décrivent les effets sur un nombre très limité de souches bactériennes. Afin de vraiment appliquer ces composés à des fins thérapeutiques ou conservateur alimentaire,

en particulier lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres composés basés sur une action synergique, ils doivent être testés contre un plus grand nombre de souches pour déterminer l'utilité de ces composés.

## 5. Thym en application à l'officine

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a donc été démontrée à travers différentes études, dont celles évoquées dans la partie précédente.

Les huiles de thymus sont fréquemment et généralement utilisées en interne pour le traitement de soutien des infections des voies respiratoires ainsi que par voie topique pour le traitement des infections cutanées.

Les 2 huiles essentielles les plus généralement retrouvées et utilisées en pharmacie sont le thym à thymol et thym à linalol. Ce sont celles-ci qu'on décrira ensuite pour des applications. La différence entre les 2 sera la dilution pour l'application par voie cutanée, et la durée limitée pour l'huile de thym à thymol. L'huile de thym à linalol présente une excellente tolérance.

Elles auront approximativement les mêmes applications, cependant l'huile à thymol sera plutôt indiquée pour les pathologies ORL, en prise orale, et l'huile à linalol sera plutôt indiquée par voie cutanée pour son côté anti-infectieux et en même temps anesthésique.

### 5.1. Thym à Thymol (*Thymus vulgaris thymoliferum*)

L'huile essentielle de thym à thymol est un anti-infectieux majeur, antivirale et antibactérien en particulier contre les infections respiratoires (bronchites, angines, sinusite, rhume...), urinaires et gynécologiques (cystites...), intestinales (parasitose, gastro-entérite...). Elle est tonique et immunostimulante.

L'huile essentielle de Thym à thymol est très puissante, on réserve son utilisation pour des pathologies chroniques, lorsque d'autres HE n'ont pas été efficaces.

<b>Utilisateurs</b>	<b>Adultes</b>	<b>Enfants – 6 ans</b>	<b>Femmes enceintes et allaitantes</b>	<b>Nourrissons – 3 mois</b>
<b>Voies d'administration</b>	<b>Voie orale</b>	<b>Voie cutanée</b>	<b>Diffusion</b>	<b>Inhalation</b>

### Bronchite

#### **Adulte et l'adolescent.**

*Par voie orale*, prendre 1 goutte de Thym à Thymol, 3 fois par jour pendant 5 jours maximum.

*Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Thymol dans 20 gouttes d'huile végétale à appliquer sur la plante des pieds, le bas du dos ou le long de la colonne vertébrale, 2 à 3 fois par jour pendant 5 jours.

#### **Utilisation en synergie :**

*Par voie orale*. Prendre le mélange suivant 4 fois par jour en cas de bronchite à répétition.

1 goutte d'huile essentielle de Cyprès de Provence

1 goutte d'huile essentielle de Thym à Thymol

### Asthénie, Fatigue

#### **Adulte et l'adolescent.**

*Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Thymol dans 20 gouttes d'huile végétale à appliquer sur la plante des pieds, le bas du dos ou le long de la colonne vertébrale, 2 à 3 fois par jour pendant 5 jours.

### **Utilisation en synergie**

*Par voie orale*. Prendre le mélange suivant 3 fois par jour en cas de fatigue chronique.

1 goutte d'huile essentielle de Romarin à Cinéole

1 goutte d'huile essentielle de Thym à Thymol

## **Immunité**

### **Adulte et l'adolescent.**

*Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Thymol dans 20 gouttes d'huile végétale à appliquer sur la plante des pieds, le bas du dos ou le long de la colonne vertébrale, 2 à 3 fois par jour pendant 5 jours.

### **Utilisation en synergie**

**Dès 7 ans.** Appliquez en massage 3 gouttes du mélange sur le thorax et 3 gouttes sur le dos. Renouveler l'application 3 fois par jour jusqu'à 3 semaines.

10 gouttes d'huile essentielle de Thym à Thymol

30 gouttes d'huile essentielle de Tea Tree

30 gouttes d'huile essentielle de Citron

100 gouttes d'huile essentielle de Ravintsara

## **Rhinite, Sinusite**

### **Adulte et l'adolescent.**

*Par voie orale*, prendre 1 goutte de Thym à Thymol 3 fois par jour pendant 5 jours maximum.

*Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Thymol dans 20 gouttes d'huile végétale à appliquer sur la plante des pieds, le bas du dos ou le long de la colonne vertébrale, 2 à 3 fois par jour pendant 5 jours.

## **Grippe**

### **Adulte et l'adolescent.**

*Par voie orale*, prendre 1 goutte de Thym à Thymol, 3 fois par jour pendant 5 jours maximum.

*Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Thymol dans 20 gouttes d'huile végétale à appliquer sur la plante des pieds, le bas du dos ou le long de la colonne vertébrale, 2 à 3 fois par jour pendant 5 jours.

## **Vers intestinaux**

**Adulte et l'adolescent.**

*Par voie orale*, prendre 1 goutte de Thym à Thymol, 3 fois par jour pendant 5 jours maximum.

**Utilisation en synergie**

*Par voie orale*, prendre 5 gouttes 4 fois par jour pendant 10 jours du mélange suivant :

- 4 mL d'huile végétale de Noyaux d'Abricot
- 2 mL d'huile essentielle d'Eucalyptus Mentholé
- 2 mL d'huile essentielle de Thym à Thymol
- 1 mL d'huile essentielle de Clou de Girofle
- 1 mL d'huile essentielle de Bois de Rose

**Candidose****Adulte et l'adolescent.**

*Par voie orale*, prendre 1 goutte de Thym à Thymol, 3 fois par jour pendant 5 jours maximum.

*Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Thymol dans 20 gouttes d'huile végétale à appliquer sur la zone concernée 2 à 3 fois par jour pendant 15 jours. Ne pas appliquer sur les parties ano-génitales.

**Anthrax, Furoncles****Adulte et l'adolescent.**

*Par voie cutanée*, appliquer en massage local sur les zones concernées un peu du mélange suivant :

- 20 gouttes d'HE de Thym à thymol
- 40 gouttes d'HE de Carotte sauvage
- 40 gouttes d'HE de Laurier noble
- 200 ml d'huile végétale

! Lors des prises par voie orale, il conviendra d'associer une huile essentielle hépatoprotectrice.

1 ml = 30 gouttes

**5.2. Thym à linalol (*Thymus vulgaris linaloliferum*)**

<b>Utilisateurs</b>	<b>Adultes</b>	<b>Enfants – 6 ans</b>	<b>Femmes enceintes et allaitantes</b>	<b>Nourrissons – 3 mois</b>
<b>Voies d'administration</b>	<b>Voie orale</b>	<b>Voie cutanée</b>	<b>Diffusion</b>	<b>Inhalation</b>

**Angine, mal de gorge**

**Dès 6 ans.** *Par voie orale*, prendre 2 gouttes de Thym à Linalol, jusqu'à 4 fois par jour.

**Dès 3 mois.** *Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Linalol dans 9 gouttes d'une huile végétale puis appliquez sur le cou 3 fois par jour, pendant 4 à 5 jours.

### **Utilisation en synergie**

**Dès 6 ans.** Massez la gorge ou pulvérisez dans la gorge 4 gouttes du mélange ci-dessous, jusqu'à 5 fois par jour ou jusqu'à amélioration des symptômes, pendant 5 jours maximum. Pour une pulvérisation orale, introduisez le mélange dans un spray adapté aux HV.

30 gouttes d'huile essentielle de Thym à Linalol

30 gouttes d'huile essentielle de Laurier Noble

15 gouttes d'huile essentielle de Menthe Poivrée

15 gouttes d'huile essentielle de Cyprès (antiviral) ou Clou de Girofle (antibactérien)

qsp 10 mL d'huile végétale de Noyaux d'Abricot ou d'huile d'Olive si pulvérisation.

### **Bronchite**

**Dès 3 mois.** *Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Linalol dans 9 gouttes d'huile végétale à appliquer sur le thorax 4 fois par jour pendant 5 à 7 jours.

### **Rhinopharyngite, rhume**

**Dès 3 mois.** *Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Linalol dans 9 gouttes d'huile végétale à appliquer sur le thorax 4 fois par jour pendant 5 à 7 jours.

### **Utilisation en synergie**

**Dès 3 mois.** Répartir 5 gouttes du mélange sur le thorax et le haut du dos matin et soir pendant 5 jours.

5 gouttes d'huile essentielle d'Eucalyptus Radiata

5 gouttes d'huile essentielle de Tea Tree

5 gouttes d'huile essentielle de Thym à Linalol

70 gouttes d'huile végétale

### **Cystite, infection urinaire**

**Dès 3 ans.** *Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Linalol dans 4 gouttes d'huile végétale à appliquer sur le bas du ventre 2 à 3 fois par jour.

### **Utilisation en synergie**

**Dès 7 ans.** Appliquer en massage 8 gouttes de la synergie sur le bas-ventre, 3 fois par jour pendant 7 à 10 jours.

105 gouttes d'huile essentielle de Palmarosa

105 gouttes d'huile essentielle de Thym à Linalol

30 gouttes d'huile essentielle de Sarriette des Montagnes

60 gouttes d'huile essentielle de Saro

### **Asthénie, fatigue**

**Dès 3 mois.** *Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Linalol dans 9 gouttes d'huile végétale à appliquer sur le bas du dos 3 fois par jour.

### **Utilisation en synergie**

#### **Dès 7 ans.**

*Par voie orale*, prendre 3 à 4 gouttes matin et midi pendant 3 semaines + *par voie cutanée* 6 gouttes sur le bas du dos, matin et midi, pendant 3 semaines du mélange suivant :

- 1 mL d'huile essentielle d'Épinette Noire
- 1 mL d'huile essentielle de Laurier Noble
- 1 mL d'huile essentielle de Gingembre
- 3 mL d'huile essentielle de Thym à Linalol
- 4 mL d'huile végétale

### **Aphte, abcès dentaire**

#### **Adultes.**

*Par voie cutanée.* Appliquez 1 à 2 gouttes en application pure à l'aide d'un coton-tige, 3 fois par jour.

### **Ulcère variqueux**

#### **Utilisation en synergie**

*Par voie cutanée.* Appliquez le mélange 1 à 2 fois par jour, à chaque changement de pansement, après la toilette et la désinfection de la plaie.

- 2 gouttes d'huile essentielle de thym à linalol
- 2 gouttes d'huile essentielle de Lavande Fine
- 4 à 8 pressions d'huile végétale d'Amande douce

### **Candidose**

**Dès 3 mois.** *Par voie cutanée*, diluez 1 goutte de Thym à Linalol dans 9 gouttes d'huile végétale à appliquer sur la zone concernée 2 à 3 fois par jour. Faites une pause d'une semaine au bout de 3 semaines d'utilisation.

1 ml = 30 gouttes

(36,180–182)

## Conclusion

Aujourd'hui encore beaucoup de personnes restent sceptiques face aux huiles essentielles. Cependant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est aujourd'hui bien établie. L'exemple du thym le montre notamment, ce qui démontre que les huiles essentielles peuvent être un conseil légitime en officine pour nous pharmaciens.

Pour comprendre leur utilisation aujourd'hui et l'usage traditionnel qui est fait du thym il était nécessaire de le démontrer avec diverses études.

Les huiles essentielles et l'huile essentielle de thym en particulier a l'avantage de pouvoir avoir plusieurs indications, de pouvoir être utilisée par différentes voies d'administration, sans présenter d'effets indésirables, ou être associée à d'autres médicaments, et ne déstabilise pas la flore. Elle est naturelle et respecte certaines conditions afin d'être de qualité et de pouvoir être présente en officine. Cet ensemble de facteurs en fait un produit rassurant.

Etant donné leur présence en officine, il est nécessaire que celles-ci soient réglementées au vu de leurs contre-indications et la nécessité de leur utilisation bien conforme aux indications et posologies strictes afin d'éviter tout accident, comme les médicaments. Le pharmacien est indispensable au niveau de la bonne délivrance, du bon conseil, et se doit d'avoir des connaissances dans ce domaine. Il pourra, si faute d'alternative, conseiller ce genre d'huile essentielle s'il estime que c'est une bonne chose et pourquoi pas développer le conseil aromathérapeutique souvent oublié ou proposer cela si l'antibiothérapie n'est pas indispensable; d'autant plus aujourd'hui face à l'augmentation de la résistance due à l'utilisation inappropriée des antibiotiques et la recherche d'alternatives pour contrer la fin de certains antibiotiques. Bien que l'on ne puisse pas parler exactement de synergie, l'utilisation des huiles essentielles comme adjuvants avec les antibiotiques est une piste de recherche dans le domaine pharmaceutique, notamment pour faire face à la résistance antibiotique qui ne cesse de s'accroître ou à la diminution des effets indésirables. Et pourquoi pas ouvrir la voie à d'autres recherches et études permettant leur application encore plus large et dans d'autres domaines.

Cette thèse suite à un travail de recherche et de rassemblement d'informations a permis de mettre en avant leur mode d'action, leur activité bactérienne, leur absence de résistance bactérienne, ce qui font de très bons points; mais il faut rester conscient de leurs limites, et du fait qu'elles ne peuvent être conseillées dans toutes pathologies, toute situation, tout âge, etc.

Lors des études nous avons constaté que l'activité antibactérienne de l'HE dépend de sa concentration et de la souche bactérienne testée. Dans les études citées l'huile de thym semble avoir un effet semblable sur les bactéries à Gram + et –, il n'y a pas de différence significative. Elle agit différemment sur toutes les bactéries quel que soit ses caractéristiques.

Quant aux combinaisons, les résultats semblent mitigés, certaines études préfèrent l'utilisation du thym tout seul, d'autres en synergie, sachant que dans les deux cas l'huile de thym garde toute son efficacité et les autres huiles ont peu d'effet antagoniste, d'où l'application possible des deux façons.

Même entre les différentes espèces de thym entre elles il existe une différence dû à leur composition en composants majeurs qui diffère.

L'activité antibactérienne dépend d'un ensemble de paramètres mais reste cependant présente dans toutes les études et contre toutes les bactéries testées.

Il n'y a pas de corrélation entre la sensibilité aux médicaments antibiotiques et aux huiles essentielles, une bactérie pourra être résistante à l'un et sensible à l'autre.

Les études font référence à une possible application clinique dans certaines infections, cependant en se référant aux bactéries testées et sensibles nous pouvons mettre en application l'huile essentielle de thym dans certaines affections couramment rencontrées en officine.

Face à des études parfois un peu discordantes, au manque de moyen de méthodes homogènes face aux huiles essentielles, il faut se montrer prudent face aux résultats, puisqu'il reste encore à étudier différents éléments, à continuer les études de plus en plus déjà présentes sur ce domaine qu'est l'aromathérapie et un encadrement de ces recherches.

## Résumé

Mots clés : Huiles essentielles, thym, antibactérien, thymus, bactéries, études, CMI, phénols

Les huiles essentielles sont des produits dérivés de plantes aromatiques, de composition complexe. Ce sont des substances volatiles, hydrophobes et liposolubles.

L'aromathérapie est l'utilisation à but de traitement médical d'extraits de plantes aromatiques.

L'huile essentielle de thym possède de nombreuses propriétés, notamment contre les bactéries.

Le thymol, molécule principale de l'huile de thym, est caractérisé par de fortes propriétés bactéricides, fongiques et antiparasitaires.

Les bactéries sont nombreuses, inoffensives et bénéfiques à l'organisme, ou pathogènes responsables de maladies plus ou moins graves, nécessitant parfois l'intervention de médicaments.

Les antibiotiques, substances antibactériennes, vont intervenir selon différents modes d'action, sur différentes cibles, ils sont capables d'inhiber la multiplication ou de détruire les bactéries.

Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps. Cependant, le mauvais usage de ces agents antimicrobiens et leur utilisation accrue ont eu pour conséquence la capacité des bactéries à développer une résistance aux médicaments.

Les méthodes d'évaluation de l'activité des huiles essentielles sont les mêmes que celles utilisées pour les antibiotiques, et permettent de définir une concentration inhibitrice minimale CMI et une concentration bactéricide minimale CMB, ainsi que des zones d'inhibition paramètres utiles pour comparer différentes substances et exploités lors des différentes études.

Ces études ont été sélectionnées pour pouvoir comparer l'activité de l'huile de thym selon de multiples critères : activité des composants ensemble ou séparément, sur différents pathogènes, différentes sphères, par rapport à d'autres HE, différentes concentrations, différentes espèces...

Cela permet d'affirmer l'action antibactérienne de l'huile de thym sur différents types de bactéries, avec le spectre d'action le plus large pour une possible application clinique et dans des domaines tel que l'alimentaire ou synergie avec des médicaments conventionnels.

L'objectif de cette thèse est de démontrer que les huiles essentielles ont toute leur place à l'officine pour leurs activités antibactériennes, dans le conseil ou l'accompagnement d'autres traitements. Elle démontre tout l'intérêt particulier de l'huile essentielle de thym au quotidien, en expliquant d'où viennent ses propriétés et des exemples d'applications, à travers différentes études qui démontrent une valeur de CMI basse et homogène pour différentes bactéries.

## Bibliographie

1. Qu'est ce qu'une bactérie ? [Internet]. Disponible sur: <https://www.antibio-responsable.fr/bacteries/classification>
2. FMPMC-PS - Bactériologie - Niveau DCEM1 [Internet]. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.1.2.html>
3. MORPHOLOGIE [Internet]. Disponible sur: <http://www.microbes-edu.org/etudiant/anatomie.html>
4. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.* avr 2014;78(2):110-6.
5. Hart T, Shears P. Atlas de poche de microbiologie. Lavoisier. 1997.
6. Les différents types de bactéries [Internet]. Les Antibiotiques. Disponible sur: <http://www.antibiotique.eu/les-types-de-bacteacuteries.html>
7. Flandrois J-P. Bactériologie médicale. Puf. 1997. (Azay).
8. Bouskraoui M. Guide pratique des bactéries pathogènes. 2007;
9. OFSP O fédéral de la santé publique. Quelles sont les principales maladies bactériennes? [Internet]. Disponible sur: <https://www.bag.admin.ch/bag/fr/home/krankheiten/infektionskrankheiten-bekaempfen/antibiotikaresistenzen/welche-bakteriellen-krankheiten-gibt-es-.html>
10. Nos fiches maladies | Institut Pasteur [Internet]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies>
11. Yala D, Merad AS, Mohamedi D, Korich MNO. Classification et mode d'action des antibiotiques. 2001;8.
12. Shama G. La Moisissure et la Bactérie: Deconstructing the fable of the discovery of penicillin by Ernest Duchesne. *Endeavour.* 1 sept 2016;40(3):188-200.
13. Overbye KM, Barrett JF. Antibiotics: Where did we go wrong? *Drug Discovery Today.* 1 janv 2005;10(1):45-52.
14. Pharmacologie des anti-infectieux. Elsevier Masson; 2018.
15. OMS | Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale [Internet]. World Health Organization; Disponible sur: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/>
16. Turina A del V, Nolan MV, Zygadlo JA, Perillo MA. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry.* 20 juill 2006;122(2):101-13.
17. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* avr 2010;8(4):251-9.
18. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology.* 1 août 2013;303(6):287-92.

19. Springman AC, Lacher DW, Wu G, Milton N, Whittam TS, Davies HD, et al. Selection, Recombination, and Virulence Gene Diversity among Group B Streptococcal Genotypes. *J Bacteriol.* sept 2009;191(17):5419-27.
20. van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.* 2011;2:203.
21. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 2011;47(3):137-46.
22. Dzidic S, Suskovic J, Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. 2008.
23. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* mars 2006;70(2):140-50.
24. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update [Internet]. [cité 9 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847397/>
25. Andersson DI, Hughes D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist Updat.* juin 2012;15(3):162-72.
26. White EDG, Alekshun MN, McDermot PF. *Frontiers in Antibacterial Resistance: A Tribute to Stuart B. Levy.* :3.
27. Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science.* 28 août 2009;325(5944):1128-31.
28. Holmes AJ, Gillings MR, Nield BS, Mabbutt BC, Nevalainen KMH, Stokes HW. The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environmental Microbiology.* 2003;5(5):383-94.
29. Garcillán-Barcia MP, Alvarado A, de la Cruz F. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev.* sept 2011;35(5):936-56.
30. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1 déc 2003;67(4):593-656.
31. Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* déc 2008;6(12):893-903.
32. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 1 mai 2009;1794(5):808-16.
33. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev.* sept 1992;56(3):395-411.
34. ANSM. Liste des antibiotiques critiques. 2016.
35. Pandey AK, Singh P, Tripathi NN. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 1 sept 2014;4(9):682-94.

36. Baudoux D. Aromathérapie. Dunod; 2017.
37. European pharmacopoeia. In: 5<sup>e</sup> éd. 2004. p. 217-8.
38. Bonnafous C. Traité scientifique Aromathérapie, aromatologie & aromachologie. Dangls. 2013.
39. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. févr 2008;46(2):446-75.
40. Bouyahya A, Bakri Y, Et-Touys A, Talbaoui A, Khouchlaa A, Charfi S, et al. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. Phytothérapie [Internet]. 15 mars 2017 [cité 2 juill 2020]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s10298-017-1118-z>
41. Pesoni D. Huiles essentielles le mag'. Terres d'essences; 2018.
42. Jordán MJ, Martínez RM, Goodner KL, Baldwin EA, Sotomayor JA. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. Industrial Crops and Products. 1 nov 2006;24(3):253-63.
43. Nezhadali A, Nabavi M, Rajabian M, Akbarpour M, Pourali P, Amini F. Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 1 juin 2014;3(2):87-92.
44. Golmakani M-T, Rezaei K. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss. European Journal of Lipid Science and Technology. 2008;110(5):448-54.
45. Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers | Journal of Agricultural and Food Chemistry [Internet]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0603329>
46. Viljoen AM, Subramoney S, Vuuren SF van, Başer KHC, Demirci B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. Journal of Ethnopharmacology. 4 janv 2005;96(1):271-7.
47. Müller-Riebau FJ, Berger BM, Yegen O, Cakir C. Seasonal Variations in the Chemical Compositions of Essential Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Turkey. J Agric Food Chem. 1 déc 1997;45(12):4821-5.
48. The essential oils. By Ernest Guenther. Vol. I. D. Van Nostrand Company, Inc., New York, 1948. xvi + 427 pp. 55 illustrations. 15 × 23.5cm. Price, \$6. Journal of the American Pharmaceutical Association. 1948;37(5):214-214.
49. Gattefossé RM. Aromathérapie : Les Huiles essentielles hormones végétales. Girardot & Cie; 1937.
50. Valnet J, Duraffourd C, Lapraz J-C. Une Médecine nouvelle, phytothérapie et aromathérapie. Presses de la Renaissance; 1978.

51. Franchomme P. L'Aromathérapie : Thérapeutique de pointe en médecine naturelle. Amyris; 1999.
52. Rauha J-P, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 25 mai 2000;56(1):3-12.
53. De Feo V, De Simone F, Senatore F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*. 1 nov 2002;61(5):573-8.
54. Ciccarelli D, Garbari F, Pagni AM. The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae): Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 15 janv 2008;203(1):85-93.
55. Dubey VS, Bhalla R, Luthra R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J Biosci*. sept 2003;28(5):637-46.
56. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. mai 2003;10(10):813-29.
57. Garneau FX. *Le matériel végétal et les huiles essentielles*. Chicoutimi; 2005.
58. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*. déc 2013;6(12):1451-74.
59. Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Salgueiro L, Miguel MG, Faleiro ML. Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Curr Pharm Des*. 2008;14(29):3120-40.
60. Casiglia S, Bruno M, Scandolera E, Senatore F, Senatore F. Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. *Arabian Journal of Chemistry*. 1 déc 2019;12(8):2704-12.
61. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras M del M, Segura-Carretero A, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*. 2018;32(9):1688-706.
62. Jaafari A, Mouse HA, Rakib EM, M' barek LA, Tilaoui M, Benbakhta C, et al. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. déc 2007;17(4):477-91.
63. Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 1 juill 2008;19(7):681-7.
64. Huiles essentielles Archives [Internet]. Doctonat. [cité 9 juill 2020]. Disponible sur: <https://doctonat.com/remedes-naturels/huiles-essentielles/>
65. Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi R. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry*. 1 mai 2005;90(4):609-11.
66. Les huiles essentielles de Thym [Internet]. AMSOAM par Aude Maillard. 2019. Disponible sur: <https://www.aude-maillard.fr/les-huiles-essentielles-de-thym/>

67. Góra J, Lis A, Gibka J, Wołoszyn A. Najcenniejsze olejki eteryczne [Internet]. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika; 2005 [cité 28 juill 2020]. Disponible sur: <http://repozytorium.p.lodz.pl/handle/11652/1898>
68. Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*. 1 janv 2007;105(1):146-55.
69. Loziene K, Sakalyte J, Paskevicius A, Venskutonis PR. Anti-Candida activity of *Thymus pulegioides* [Lamiaceae] essential oils depends on the plant chemotype. *Herba Polonica*. 2008;54(4):79-92.
70. Botelho MA, Nogueira N a. P, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA, et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. mars 2007;40(3):349-56.
71. Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygodlo J, et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*. 2009;24(6):348-54.
72. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(15):3643-53.
73. Keyhanmanesh R, Boskabady MH. Relaxant effects of different fractions from *Tymus vulgaris* on guinea-pig tracheal chains. *Biological Research*. 2012;45(1):67-73.
74. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Front Microbiol* [Internet]. 25 janv 2012 [cité 21 juill 2020];3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265747/>
75. Di Pasqua R, Mamone G, Ferranti P, Ercolini D, Mauriello G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*. 2010;NA-NA.
76. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. 12 sept 2001;91(3):453-62.
77. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 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*. 1 mai 2007;18(5):414-20.
78. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 23 févr 2015;55(3):304-18.
79. Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevão-Silva CF, Carvalho MD de B, Cunha JM, Grespan R, et al. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evid Based Complement Alternat Med*

[Internet]. 2012 [cité 5 oct 2020];2012. Disponible sur:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418667/>

80. Nostro A, Marino A, Blanco AR, Cellini L, Di Giulio M, Pizzimenti F, et al. In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *Journal of Medical Microbiology*. juin 2009;58(Pt 6):791-7.
81. Rudramurthy GR, Swamy MK, Sinniah UR, Ghasemzadeh A. Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules*. juill 2016;21(7):836.
82. Ultee A, Smid EJ. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 20 mars 2001;64(3):373-8.
83. de Souza EL, de Barros JC, de Oliveira CEV, da Conceição ML. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 28 févr 2010;137(2):308-11.
84. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 1 août 2004;94(3):223-53.
85. Cox, Gustafson, Mann, Markham, Liew, Hartland, et al. Tea tree oil causes K<sup>+</sup> leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 1998;26(5):355-8.
86. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, et al. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *J Agric Food Chem*. 1 juill 2007;55(15):6300-8.
87. Clarke S. Chapter 7 - Composition of essential oils and other materials. In: Clarke S, éditeur. *Essential Chemistry for Aromatherapy (Second Edition)* [Internet]. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2008 [cité 12 oct 2020]. p. 123-229. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780443104039000078>
88. Foti MC, Ingold KU. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by gamma-terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 23 avr 2003;51(9):2758-65.
89. Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chemistry*. 1 oct 2009;116(3):714-21.
90. Oyedemi SO, Okoh AI, Mabinya LV, Pirochenva G, Afolayan AJ. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, &#8733;-terpineol and g-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* [Internet]. 2009 [cité 5 oct 2020];8(7). Disponible sur: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/60106>
91. Li CP, Prescott B, Chi LL, Martino EC. Antiviral and Antibacterial Activity of Thymus Extracts. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1 nov 1963;114(2):504-9.

92. Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*. avr 2015;173:339-47.
93. Sharifi A, Mohammadzadeh A, Salehi TZ, Mahmoodi P. Antibacterial, antibiofilm and quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Applied Microbiology*. 2018;124(2):379-88.
94. Lucera A, Costa C, Conte A, Del Nobile MA. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:287.
95. Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira ICFR, Calhelha RC, Fernandes Â, Marković T, et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*. 1 janv 2014;52:183-90.
96. Cosentino S, Tuberoso CI, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. août 1999;29(2):130-5.
97. Faucon M. *Traité d'Aromathérapie scientifique et médicale, fondements et aide à la prescription*. Sang de la terre; 2015.
98. Panizzi L, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. août 1993;39(3):167-70.
99. Barbosa LN, Rall VLM, Fernandes AAH, Ushimaru PI, da Silva Probst I, Fernandes A. Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat. *Foodborne Pathogens and Disease*. 1 juill 2009;6(6):725-8.
100. Piolé N. *Se soigner grace aux huiles essentielles*. City éditions; 2010.
101. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*. avr 2007;21(4):308-23.
102. Husain F. Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical & Therapeutic Sciences*. 5 nov 2014;1:65-71.
103. Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T. Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Towards Human Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 1 janv 2011;31(1):81-7.
104. Maistro EL [UNESP, Mota SF, Lima EB, Bernardes BM, Goulart FC [UNESP]. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells in vivo. *Genetics and Molecular Research*. 1 janv 2010;21:13-22.
105. Stamatii A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi H-L, von Wright A. Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assays. *Food and Chemical Toxicology*. 1 août 1999;37(8):813-23.

106. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 1998;26(4):973-80.
107. Belaiche P. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, tome 1. L'aromatogramme*. Maloine; 1996.
108. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines [Internet]. Disponible sur: <https://clsi.org/>
109. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 août 1996;40(8):1914-8.
110. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 1 avr 2016;6(2):71-9.
111. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. avr 2012;17(4):3989-4006.
112. Elaïssi A, Rouis Z, Mabrouk S, Salah KBH, Aouni M, Khouja ML, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen Eucalyptus species growing in the Korbous and Jbel Abderrahman arboreta (North East Tunisia). *Molecules (Basel, Switzerland)*. 12 mars 2012;17(3):3044-57.
113. Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J Agric Food Chem*. 1 sept 1998;46(9):3590-5.
114. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2002;46(6):1914-20.
115. Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components: Essential oils and their bioactive components. *Flavour Fragr J*. sept 2013;28(5):269-79.
116. Fadli M, Chevalier J, Bolla J-M, Mezrioui N-E, Hassani L, Pages J-M. *Thymus maroccanus* essential oil, a membranotropic compound active on Gram-negative bacteria and resistant isolates. *Journal of Applied Microbiology*. 2012;113(5):1120-9.
117. Skandamis PN, Nychas G-JE. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J Appl Microbiol*. déc 2001;91(6):1011-22.
118. Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 1 mai 2006;69(5):1046-55.
119. Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA, et al. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 2008;1-4(145):209-28.

120. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The Role of Reactive Oxygen Species in Mitochondrial Permeability Transition. *Biosci Rep.* 1 févr 1997;17(1):43-52.
121. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* sept 2001;91(3):492-7.
122. Armstrong NJ, Painter KJ, Sherratt JA. A continuum approach to modelling cell–cell adhesion. *Journal of Theoretical Biology.* 7 nov 2006;243(1):98-113.
123. Tongnuanchan P, Benjakul S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science.* 2014;79(7):R1231-49.
124. Hajlaoui H, Mighri H, Noumi E, Snoussi M, Trabelsi N, Ksouri R, et al. Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. *Food and Chemical Toxicology.* 1 août 2010;48(8):2186-92.
125. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* juin 1995;59(2):201-22.
126. Kwon S-J, Chang Y, Han J. Oregano essential oil-based natural antimicrobial packaging film to inactivate *Salmonella enterica* and yeasts/molds in the atmosphere surrounding cherry tomatoes. *Food Microbiology.* août 2017;65:114-21.
127. Heath RJ, Rock CO. Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. *Curr Opin Investig Drugs.* févr 2004;5(2):146-53.
128. Turgis M, Han J, Caillet S, Lacroix M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control.* déc 2009;20(12):1073-9.
129. Imelouane B, Elbachiri A, Ankit M, Benzeid H, Khedid K. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco,”. *International Journal of Agriculture and Biology.* 2009;205–208.
130. Trosko JE. Evolution of Microbial Quorum Sensing to Human Global Quorum Sensing: An Insight into How Gap Junctional Intercellular Communication Might Be Linked to the Global Metabolic Disease Crisis. *Biology (Basel).* 15 juin 2016;5(2).
131. Xu G-M. Relationships between the Regulatory Systems of Quorum Sensing and Multidrug Resistance. *Front Microbiol.* 2016;7:958.
132. Szabó MÁ, Varga GZ, Hohmann J, Schelz Z, Szegedi E, Amaral L, et al. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research.* 2010;24(5):782-6.
133. *Frontiers | Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components | Microbiology [Internet].* Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00012/full>
134. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 1 avr 2002;68(4):1561-8.

135. Pelczar, Michael Joseph, Chan, Eddie Chin Sun, Krieg. Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. New York: McGraw-Hill International.; 1988. (Microbiology).
136. Pauli A, Knobloch K. Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*. juill 1987;185(1):10-3.
137. Moleyar V, Narasimham P. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*. 1 août 1992;16(4):337-42.
138. Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y. Antifungal Activity of Components of Essential Oils. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1 avr 1981;45(4):945-52.
139. Naignre R, Kalck P, Roques C, Roux I, Michel G. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Medica*. juin 1996;62(3):275-7.
140. Hinou JB, Harvala CE, Hinou EB. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie*. 1989;44(4):302-3.
141. Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen PJ. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem*. 22 juill 2009;57(14):5987-6000.
142. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2005;49(6):2474-8.
143. Alakomi H-L. Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane - A tool for increasing microbiological safety. 1 janv 2007;
144. Zaika LL. Spices and Herbs: Their Antimicrobial Activity and Its Determination I. *Journal of Food Safety*. 1988;9(2):97-118.
145. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000;88(2):308-16.
146. Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*. févr 2014;40(1):76-94.
147. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, Lee RE. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nat Rev Microbiol*. janv 2011;9(1):62-75.
148. Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol*. 1 oct 2000;174(4):233-8.
149. Gomes Neto NJ, da Silva Luz I, Honório VG, da Conceição ML, de Souza EL. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and 1,8-cineole acquire no direct and cross protection in a meat-based broth. *Food Research International*. 1 nov 2012;49(1):143-6.

150. Cho Y-S, Oh JJ, Oh K-H. Synergistic anti-bacterial and proteomic effects of epigallocatechin gallate on clinical isolates of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine*. 15 août 2011;18(11):941-6.
151. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 août 2008;32(2):170-3.
152. Luz I da S, Neto NJG, Tavares AG, Magnani M, de Souza EL. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. *Food Research International*. 1 oct 2012;48(2):667-72.
153. Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, et al. Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 02 2011;9(12):894-6.
154. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases - PubMed [Internet]. 2008 [cité 9 oct 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18599280/>
155. Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*. 1 févr 2010;17(2):142-5.
156. Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MCC, Endringer DC, Fronza M, et al. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules* [Internet]. 5 juill 2019 [cité 23 févr 2020];24(13). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651100/>
157. Guarda A, Rubilar JF, Miltz J, Galotto MJ. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*. 30 mars 2011;146(2):144-50.
158. Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJ-P, Bégin A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 22 juill 1997;37(2):155-62.
159. Kim J, Marshall MR, Wei CI. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry (USA)* [Internet]. 1995 [cité 5 oct 2020]; Disponible sur: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US1997061447>
160. Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. *J Agric Food Chem*. 1 sept 2004;52(19):6042-8.
161. Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Bakhrouf A, Chaabouni Y, et al. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and  $\gamma$ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 1 nov 2017;112:156-63.

162. Marshall NJ, Piddock LJ. Antibacterial efflux systems. *Microbiologia*. sept 1997;13(3):285-300.
163. Randhawa HK, Hundal KK, Ahirrao PN, Jachak SM, Nandanwar HS. Efflux pump inhibitory activity of flavonoids isolated from *Alpinia calcarata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biologia*. 1 mai 2016;71(5):484-93.
164. Ahmad A, van Vuuren S, Viljoen A. Unravelling the Complex Antimicrobial Interactions of Essential Oils — The Case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules*. 6 mars 2014;19(3):2896-910.
165. Fani M, Kohanteb J. In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *J Evid Based Complementary Altern Med*. oct 2017;22(4):660-6.
166. Sfeir J, Lefrançois C, Baudoux D, Derbré S, Licznar P. In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes* [Internet]. Vol. 2013, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi; 2013 [cité 31 oct 2020]. p. e269161. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/269161/>
167. Hammad M, Sallal A-K, Darmani H. Inhibition of *Streptococcus mutans* adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Dental Hygiene*. 2007;5(4):232-5.
168. Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F. Antimicrobial Activity of Five Essential Oils against Bacteria and Fungi Responsible for Urinary Tract Infections. *Molecules* [Internet]. 9 juill 2018 [cité 11 déc 2019];23(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6100505/>
169. Ács K, Balázs VL, Kocsis B, Bencsik T, Böszörményi A, Horváth G. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 27 juill 2018 [cité 3 déc 2019];18. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6064118/>
170. Sienkiewicz M, Łysakowska M, Kowalczyk E, Szymañska G, Kochan E, Krukowska J, et al. The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *Burns*. 1 mars 2017;43(2):310-7.
171. Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. Activities of Ten Essential Oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells. *Molecules*. 30 avr 2010;15(5):3200-10.
172. Puškárová A, Bučková M, Kraková L, Pangallo D, Kozics K. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Sci Rep* [Internet]. 15 août 2017 [cité 26 oct 2020];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5557807/>
173. Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia A, Horhat F. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J Med Life*. 2014;7(Spec Iss 3):56-60.

174. Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017;25(2):403-8.
175. Fadil M, Fikri-Benbrahim K, Rachiq S, Ihssane B, Lebrazi S, Chraibi M, et al. Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1 mai 2018;126:211-20.
176. Chang S-T, Chen P-F, Chang S-C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1 sept 2001;77(1):123-7.
177. Akrouit A, Gonzalez LA, El Jani H, Madrid PC. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*. 1 févr 2011;49(2):342-7.
178. Nathalie D, Yannick G, Caroline B, Sandrine D, Claude F, Corinne C, et al. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicology in Vitro*. 1 juin 2006;20(4):480-9.
179. Dimitrijević SI, Mihajlovski KR, Antonović DG, Milanović-Stevanović MR, Mijin DŽ. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chemistry*. 1 janv 2007;104(2):774-82.
180. Zahalka J-P. *Dictionnaire complet d'aromathérapie*. Dauphin; 2014.
181. Festy D. *Ma bible des huiles essentielles*. Leduc s; 2008.
182. Couic Marinier F, Touboul A. *Le guide Terre Vivante des huiles essentielles*. Terre vivante éditions; 2017.