

Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des Sciences Dhar Mehraz
-Fès-

UFR : Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à
l'environnement et la santé

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du
Doctorat National

Par

Khadija Rhayour

Sujet de thèse

**Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles
essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur
Mycobacterium phlei et *Mycobacterium fortuitum***

Soutenue le : 08 / 07 / 2002 devant la commission d'examen :

Président	: Pr. Abdelrhafour TANTAOUI-ELARAKI,	Sup Agro	-Casablanca-
Rapporteurs	: Pr. Mohamed HOUSSAINI-IRAQUI,	F.S.T	- Fès -
	Pr. Jaouad BERRADA,	I.A.V. Hassan II	- Rabat -
Encadrant	: Pr. Adnane REMMAL ,	Faculté des Sciences Dhar Mehraz	- Fès -
Examineurs	: Pr. ELMEZIANE Abdallah,	Faculté de médecine	-Casablanca-
	Pr. BENJELLOUNE Mohamed Chakib,	Faculté de médecine	- Fès -
	Pr. Mohammed ELHASSOUNI,	Faculté des Sciences Dhar Mehraz	- Fès -

Dédicaces

*À la mémoire de ma petite sœur **Amina** que dieu repose son âme en paix*

À mes parents que dieu protège :

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

*À ma seconde famille : La famille **Ezzerrifi Amrani** pour leur soutien depuis toujours, et en particulier leur mère **Bounou Hasna** que dieu protège.*

*À mon frère **Driss**, à mes sœurs, à mes neveux et à mes nièces .*

À tous mes Amis (es).

À tous les miens.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements en premier lieu et tout particulièrement à mon Professeur **Adnane REMMAL** pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son laboratoire de biotechnologie à la Faculté des Sciences de Fès, et qui a bien voulu diriger ce travail avec beaucoup de compétence et d'efficacité. j'ai eu le privilège de bénéficier de son enseignements, de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.

Je remercie également Monsieur **Jouad BERRADA**, Professeur au laboratoire de microbiologie, d'immunologie et des maladies contagieuses à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II à Rabat, d'avoir accepter de m'accueillir au sein de son laboratoire pour mettre à jour une bonne partie de ce travail. Je le remercie vivement pour sa précieuse collaboration et pour sa présence parmi les jury.

Je remercie Monsieur le Professeur **Abdelrhafour TANTAOU-ELARAKI** directeur pédagogique de l'école supérieure de l'agro-alimentaire “**SUP'AGRO**”, d'avoir accepter de juger ce travail, ses remarques m'ont beaucoup aidé à améliorer la rédaction de ce mémoire, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Que Monsieur **Mohamed HOUSSAINI-IRAQUI** enseignant-chercheur à la Faculté des Sciences Techniques de Fès, qui a accepté d'être rapporteur de cette thèse et de juger ce travail, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je suis très honorée par la présence de Monsieur **ELMEZIANE Abdallah** professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie à Casablanca, qui a bien voulu examiner ce manuscrit et juger ce travail.

Je remercie Monsieur **BENJELLOUNE Mohamed Chakib** Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, qui a bien voulu examiner ce manuscrit et pour sa présence parmi les jury de ce travail.

Je suis très honorée par la présence de Monsieur **Mohammed ELHASSOUNI** professeur chercheur au laboratoire de biotechnologie à la Faculté des Sciences de Fès, qui a bien voulu examiner ce manuscrit et juger ce travail.

Je n'oublierai jamais l'aide précieuse que Mme **Ouafae BENDADDA** m'a offert au sein du laboratoire de microbiologie, d'immunologie et des maladies contagieuses à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II à Rabat, qu'elle trouve ici tous mes vifs remerciements.

J'ai eu le plaisir de connaître, au laboratoire de biotechnologie de Fès la compagnie fraternelle et amicale de tous les membres de notre unité.

J'exprime ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

RESUME

Le mécanisme d'action antimicrobien des huiles essentielles d'origan et de girofle est étudié simultanément chez un germe à Gram négatif (*E.coli*), un germe à Gram positif (*B.subtilis*) et chez les mycobactéries (*Mycobaceérium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*). Cette activité est comparée à celle des composés majoritaires des huiles essentielles de nature phénolique (thymol, eugénol et carvacrol). Par des méthodes biochimiques et par microscopie électronique à balayage, nous avons montré que les huiles essentielles de girofle et d'origan agissent principalement grâce à leurs constituants majoritaires phénoliques (eugénol, thymol et carvacrol) en provoquant des altérations des parois et des membranes des trois types bactériens étudiés.

Ce travail permet aussi d'envisager la valorisation des HE et de leurs composés majoritaires de nature phénolique en tant qu'agent de lyse des différents types cellulaires.

Mots clés : Huiles essentielles, activité antimicrobienne, *E.coli*, *B.subtilis*, origan, girofle, thymol, eugénol, carvacrol, *Mycobacterium*.

ABSTRACT

The mechanism of the antimicrobial action of oregano and clove essential oils (EO) was studied simultaneously with two phenolic components, namely thymol and eugenol. *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) were used as Gram negative and Gram positive bacterial model respectively. The same study was made with *Mycobacterium* (*M.phlei* and *M. fortuitum*).

The EO as well as their major components were capable of inducing cell lysis. Bacteria lysis was shown by the release of substances absorbing at 260 nm. For *E. coli*, the results were similar to those obtained with polymyxin B. Scanning electronic microscope observations revealed that both cell wall and membrane of the treated bacteria were significantly damaged.

Key word index: Clove oil, oregano oil, antibacterial activity, thymol, eugenol, mechanism of action, *Mycobacterium*.

Sommaire

<i>Introduction</i>	1
But du travail	6
<i>Partie bibliographique</i>	8
I- Généralités sur les huiles essentielles	9
I.1-Introduction	
I.2- Définition	
I.3- Composition chimique	
I.4- Répartition botanique	10
I.5- Propriétés physico-chimiques des HE	
II- Domaines d'utilisation	11
II.1- phytothérapie	
II.2- Utilisation en aéro-ionisation	12
II.3- Parfumerie et cosmétologie	
II.4- Industrie alimentaire	
III- Pouvoir antimicrobien des HE	13
IV- Aperçu du mode d'action des HE :	14
V- Aperçu sur les techniques d'études du pouvoir antimicrobien des HE	16
V.1-Techniques en milieu liquide	
V.1.i- Méthode des disques de Sarbach	
V.1.ii- Méthode de Maruzuella	17
V.2-Techniques en milieu solide.	
V 2.i- Méthode de Vincent	
V.2.ii- Méthode de Morel et Rochaix	18
V.2.iii- Méthode de microatmosphère.	
V.3- Détermination des CMI et CMB par dispersion des HE dans le milieu de culture.	
<i>Monographie de certaines plantes utilisées dans l'étude</i>	23

Chapitre I

Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires phénoliques vis-à-vis des bactéries à Gram négatif (*E. coli*) et à Gram positif (*B. subtilis*)

<i>Introduction</i>	25
I- Matériels et méthodes	28
I.1- Les bactéries	
I.2- Les huiles essentielles et leurs constituants	
I.3- Les antibiotiques	29
I.4- les milieux de culture	
I.5- Culture bactérienne et préparation des bactéries lavées	
I.6- Test de fixation des HE sur les bactéries	30

I.7- Détermination des CMI et des CMB des bactéries traitées par les HE ou par leurs constituants majoritaires	
I.8- Traitement des bactéries par les antibiotiques	31
I.9- Mesure de la libération des substances absorbant à 260 nm par les bactéries traitées	
I.10- Dénombrement des bactéries	32
I.11- Traitement statistique	
I.12- Observation des bactéries traitées au microscope électronique à balayage (MEB).	
I.13- Lyse des bactéries par les HE et leurs constituants	33
I.14- Extraction et purification des acides nucléiques	
I.15- Électrophorèse en gel d'agarose de lysat bactérien	34

II- Résultats **35**

II.1- CMI et CMB des antibiotiques, des HE et de leurs constituants	
II.2- Test de fixation des HE sur les bactéries	36
II.3- Vérification de la lyse spontanée et de la viabilité des bactéries en absence d'agent bactéricide	37
II.4- Lyse et mortalité de <i>E.coli</i> sous l'action de la polymyxine B	38
II.5- Lyse et mortalité des bactéries sous l'action du mélange bipenicilline-streptomycine (1/1) et d'ampicilline	40
II.6- Lyse et viabilité des bactéries en fonction de la concentration des HE et de leurs constituants	41
II.7- Lyse bactérienne en fonction de la durée du traitement par les HE et par leurs constituants	
II.8- Microscopie électronique à balayage des bactéries traitées par les HE et leurs constituants	46
II.9- Extraction et purification des acides nucléiques des bactéries traitées par les HE et leurs constituants	49

III- Discussion **53**

III.1- Test de fixation des HE ou de leurs constituants sur les bactéries	
II.2- Lyse spontanée et viabilité des bactéries en absence d'agent bactéricide	
III.3- Lyse et viabilité bactérienne en présence de la polymyxine B	54
III.4- Lyse et viabilité bactérienne en présence d'ampicilline et de bipenicilline-streptomycine	55
III.5- Lyse et viabilité bactérienne en présence des HE ou de leurs constituants	
III.6- Extraction et purification des acides nucléiques des bactéries traitées par les HE et leurs constituants	56
III.7- Extraction et purification des acides nucléiques des bactéries traitées par les HE et leurs constituants	57

Chapitre II

L'étude de l'effet des huiles essentielles et de certains constituants d'huile à l'état pur sur l'acido-alcool-résistance des mycobactéries

Le but du présent chapitre	61
<i>Introduction</i>	62
I- Introduction Bibliographique	63
I.1- La tuberculose	
I.1.a- Historique.	
I.1.b- Etiologie et incidence de la tuberculose	66
I.1.c- Dépistage, diagnostic et traitement	67
I.1.d- Diagnostic classique	
I.1.e- Diagnostic sérologique	68
I.1.f- Diagnostic par PCR (Polymerase Chain reaction)	
I.2- La tuberculose et le SIDA	69
I.3- Traitement de la tuberculose	70
I.4- La résistance du bacille de la tuberculose et ses conséquences	71
I.4-a Résistance à la rifampicine	
I.4-b Résistance à l'isoniazide	
I.4-c Résistance à la streptomycine	72
I.4-d Résistance à la pyrazinamide	
I.4-e Résistance à l'éthambutol	
I.4.f- Résistance aux fluoroquinolones	73
I.5- Prévention	
I.6- classification et nomenclature des mycobactéries	74
I.6.a- Caractères bactériologiques	
I.6.b- Facteurs de virulence chez les mycobactéries (<i>M.tuberculosis</i>)	76
I.7- Les mycobactéries atypiques	
I.8- La lèpre	77
 <i>II- Matériels et méthodes</i>	 80
II.1- Les micro-organismes étudiés	81
II.2- Les huiles essentielles et leurs constituants	
II.3- Formules chimiques	
II.4- Les milieux de culture	85
II.5- Préparation des bactéries	
II.6- Lavage des bactéries	
II.7- Test de fixation des HE sur les mycobactéries	
II.8- Examens optiques	86
II.8.i- Préparation des frottis	
II.8.ii- Technique de coloration de Ziehl Neelsen	
II.8.iii- Coloration à l'Auramine	87
II.9- Détection de l'activité antimicrobienne des HE, de leurs constituants et des ATB	
II.9.i- Les émulsions des huiles essentielles	
II.9.ii- Traitement en milieu solide	88
II.9.iii- Traitement en milieu liquide	
II.9.iii.a- L'inoculum	
II.9.iii.b- Traitement	
II.9.iii.c- Traitement des mycobactéries par les ATB	

II.9.iii.d- Détermination des CMI et des CMB des HE en milieu liquide	
II.9.iii.e- Test de coloration après traitement des germes par HE ou par ATB	89
II.10- Mesure de la lyse bactérienne par la DO ₂₆₀ du milieu d'incubation	90
II.11- Lyse des mycobactéries	
II.11.i- Méthode de lyse classique	
II.11.ii- Méthode de lyse par les HE	92
II.12- Electrophorèse sur gel d'agarose.	
II.13- Effet de l'association des HE et des ATB sur la croissance des mycobactéries	93
II.13.i- Concentrations infra inhibitrices	
II.13.ii- Préparation de la culture mycobactérienne	
II.13.iii- Protocole expérimental en milieu liquide	94
II.13.iv- Protocole expérimental en milieu solide	
 <i>III- Résultats</i>	 95
III.1- Test de fixation des HE sur les mycobactéries	96
III.2- L'inhibition des mycobactéries en milieu gélosé	97
III.3- CMI et CMB des HE, des constituants à l'état pur et des antibiotiques en milieu liquide.	99
III.4- L'effet de l'isoniazide à forte dose sur la libération du matériel absorbant à 260 nm	103
III.5- Lyse bactérienne en fonction de la durée du traitement par les HE	
III.6- Observation des frottis	105
III.7- Extraction et purification des acides nucléiques des mycobactéries traitées par les HE ou par leurs constituants	110
III.8- L'association des huiles essentielles avec les antibiotiques	114
 <i>IV- Discussion</i>	 118
 <i>Conclusion</i>	 127
 <i>Références Bibliographiques</i>	 131
 <i>Annexe</i>	 151
 <i>Publications</i>	 161

Introduction

Avec le temps, l'expression " Microbiologie médicale" est devenue de plus en plus vague. Actuellement, elle regroupe plusieurs disciplines : la bactériologie, l'immunologie, la virologie, la mycologie et la parasitologie qui sont devenues des disciplines totalement séparées mais elles sont englobées dans le même contexte car elles sont toutes à base d'agents infectieux causant des maladies infectieuses chez l'homme [116].

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus [101, 103]. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave [179].

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes au niveau économique. Aux Etats Unis seuls, ces pertes sont d'environ 20 billions de dollars par an. De nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens

d'origine biologique. Ainsi 27 antibiotiques et 12 antifongiques étaient en développement en 1998 contre les infections bactériennes et fongiques [183], ceci illustre l'effort sérieux exercé pour la lutte contre les maladies infectieuses.

Les antibiotiques sont, dans le sens le plus connu de ce terme les médicaments des maladies infectieuses bactériennes ou mycosiques, c'est à dire des agents antimicrobiens non ou relativement peu toxiques pour l'organisme humain ou animal. Ce qui caractérise l'ensemble de ces agents antimicrobiens, c'est leur mécanisme d'action qui est le support de leur toxicité sélective.

Les antibiotiques agissent, au niveau de certaines structures ou dans diverses réactions métaboliques des micro-organismes, à des niveaux précis, dénommés sites d'action ou cibles moléculaires propres à chacun d'eux [76].

Quatre structures ou processus métaboliques des micro-organismes sont intéressés à différents niveaux :

- certains antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- d'autres altèrent la membrane cytoplasmique, provoquant des troubles létaux de perméabilité.
- beaucoup perturbent la synthèse protéique au niveau du ribosome.
- certains, enfin, inhibent la synthèse des acides nucléiques.

Il en résulte que tous les antibiotiques ne sont pas indistinctement actifs sur tous les agents pathogènes. C'est ainsi que, pour tout nouvel antibiotique,

on doit définir le "spectre d'activité", qui correspond à l'ensemble des micro-organismes sur lesquels il exerce efficacement son action.

A côté des antibiotiques connus, différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la synthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE) ou essences connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique [211, 216] et leur activité thérapeutique dans la médecine populaire [41].

La composition chimique des HE est assez complexe [180], les composés terpéniques et aromatiques représentent les principaux constituants. On y trouve également, et en faibles concentrations des acides organiques, des cétones et des coumarines volatiles. La nature du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) joue un rôle principal dans l'efficacité de leurs effets biologiques [83, 40] voire les composés minoritaires. Il a été montré que les huiles essentielles augmentent le niveau d'oxygène et activent le système immunitaire dans les cellules animales [34]. De plus, elles exhibent un effet sur des cellules cancéreuses murines en culture [115].

Les HE ont un très large spectre d'inhibition comprenant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif [200], des champignons [156, 178, 242], aussi bien que des virus à ADN et à ARN [216]. Le mode d'action de ces huiles essentielles n'est que partiellement étudié : plusieurs molécules phénoliques tel que le xylénol, le crésol et le carvacrol exercent une activité bactéricide en

provoquant des altérations des membranes bactériennes et la perte des métabolites intracellulaires [85, 237].

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans la lutte contre les maladies infectieuses. Mais la découverte des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire [209].

Sans aucun doute, les antibiotiques représentent actuellement l'un des groupes de médicaments les plus employés en médecine. Leur utilisation clinique, dès la fin de la première moitié du 20^{ème} siècle, a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne.

Cependant, la recherche de nouvelles molécules s'avère nécessaire car, dès le début de l'ère de l'antibiothérapie, ces substances ont montré un certain nombre d'inconvénients et de limites d'utilisation résumés comme suit :

- effets secondaires et toxicité des molécules antimicrobiennes pour l'organisme traité.
- tolérance et résistance croissante des germes infectieux aux antibiotiques.
- difficultés rencontrées dans le traitement des maladies exigeant la destruction des germes pathogènes indépendamment des facultés de défense du malade (patients immunodéprimés) [217].

Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et de certains de leurs composés majoritaires. Ce sujet nous a semblé d'autant plus intéressant que la flore marocaine est extrêmement riche en plantes aromatiques riches en huiles essentielles [18].

L'importance indiscutable des plantes aromatiques, leur contenu en HE et la nature chimique de leurs constituants, leur confèrent de grandes perspectives d'application.

Nous avons essayé dans ce travail de résoudre quelques problèmes et de réagir à quelques critiques suscitées par les travaux antécédents.

Dans notre laboratoire nous avons essayé d'améliorer la méthode d'émulsion des HE pour éviter l'utilisation de tout agent dispersant (détergent ou solvant) qui pouvait avoir des interactions avec les constituants des HE. Ceci était nécessaire, pour apprécier le pouvoir bactériostatique et bactéricide des HE à sa juste valeur. Les résultats de ces premiers travaux confirment que ces agents dispersant exercent une inhibition importante de l'activité antimicrobienne des HE [199, 200] .

Dans le premier chapitre, nous avons essayé de déterminer les principes actifs de chaque HE étudiée et leur mode d'action bactéricide.

La méthode d'étude du mécanisme d'action de la polymyxine sur les bactéries à Gram négatif sera modifiée et utilisée pour mettre en évidence le mécanisme d'action bactéricide des HE de girofle et d'origan et de leurs constituants majoritaires, l'eugénol et le thymol sur certaines bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*) et à Gram positif (*Bacillus subtilis*) .

Dans le deuxième chapitre, et en se basant sur les résultats obtenus dans le premier chapitre, on a essayé d'étudier le mécanisme d'action des HE et de leurs constituants majoritaires sur des germes beaucoup plus robustes, qui posent mondialement de graves problèmes pour la santé humaine et animale, ceux du genre *Mycobacterium*.

Cette étude consiste à voir l'action des HE et de leurs constituants phénoliques sur l'acido-alcool-résistance des mycobactéries et, par conséquent, sur leur paroi qui est responsable de cette caractéristique.

Partie Bibliographique

I- Généralités sur les huiles essentielles

I.1-Introduction

Les HE existant dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes senteurs qu'elles dégagent. Les HE se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : dans les feuilles (basilic), dans les fleurs (rose), dans le fruit (citron), dans les graines (coriandre), dans l'écorce (cannelle) et, pour certaines plantes, c'est dans les racines (ail) [114].

I.2- Définition

Les HE sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans des poches au niveau de certains organes [75]. Ces produits odorants sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau ou par pression (cas des agrumes) [184].

I.3- Composition chimique.

Les HE ont une composition assez complexe [11]. On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C_5) et comprennent les monoterpènes en (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}) et les triterpènes en (C_{30}). Ils ont la même origine métabolique. Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. En général, une HE est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'éther-oxydes et de carbures.

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple : Thymus à thymol, à geraniol, à carvacrol, à linalol) [51], et parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement ; On l'appelle composé majoritaire.

La composition chimique des HE varie encore de façon appréciable avec le milieu et la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation [117, 167, 64].

I.4- Répartition botanique.

Les HE sont largement réparties dans le règne végétal. Certaines familles en sont particulièrement riches : Conifères, Myrtacées, Ombellifères, Labiées, Composées [33, 211]. Elle peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux : sommités fleuries, écorce, racines, rhizomes, fruit, bois,...etc. Dans une même plante, elles peuvent être présentes dans différents organes. La composition des HE peut alors varier d'un organe à l'autre [177].

I.5- Propriétés physico-chimiques des HE.

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire.

Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle, de girofle et de sassafras.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation [114].

II- Domaines d'utilisation.

II.1- phytothérapie.

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies.

Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Gattefosse, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie [206].

Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisantes dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries [122, 214, 220]. La listerine qui est une solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les micro-organismes de la salive et de la plaque dentaire [122].

Les huiles essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires.

Malheureusement, ces prescriptions ne possèdent pas de bases scientifiques rigoureuses car elle sont souvent tirées de pratiques et de tâtonnements empiriques [241].

Des études très récentes ont montré que le géraniol a une action sur les cellules cancéreuses du colon [39], en plus de l'activité anti-inflammatoire, récemment mise en évidence [215].

II.2- Utilisation en aéro-ionisation.

Dans les locaux, on peut aseptiser l'atmosphère avec un ionisateur d'huiles essentielles. Il se forme ainsi des aérosols vrais aromatiques, ionisés, créant de l'oxygène naissant ionique, fortement bactéricide, tout en contribuant à dépolluer l'atmosphère [226, 148, 111].

Elles servent dans la fabrication du " paragerm ", solution volatile à base d'essences naturelles (citron, lilas) à activité bactéricide, acaricide et fongistatique qui s'est révélée sans aucune toxicité pour l'homme aux doses utilisées [149].

II.3- Parfumerie et cosmétologie.

L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable [155, 206, 244].

II.4- Industrie alimentaire.

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure. Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des HE [143, 135]. Les plantes aromatiques et leur HE sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires. Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des HE [94], le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire [84]. Ils y sont rajoutées pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires [25, 35, 105, 235]. Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et

champignons responsables de toxi-infections alimentaires [22, 23,25, 146].

III- Pouvoir antimicrobien des HE.

Les vertus antimicrobiennes des HE sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles [91] et des applications sans bases scientifiques précises . On note l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle [24], et qu'en 1919 Gatte Fosse a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huile de pin.

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des HE des plantes aromatiques [52, 71, 82, 153].

In vitro, l'effet microbicide de certaines HE a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques [242]. De plus, elles ont un champ d'action très large. Plusieurs travaux montrent que les HE et leurs composés majoritaires [40] ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif [120, 141, 142, 182, 221]

L'activité antifongique et antibactérienne des HE et de leurs constituants est décrite par plusieurs études récentes [47, 79, 110, 118, 125, 127, 136, 199, 219].

Ultée et coll. [238, 239] ont montré l'effet bactéricide du carvacrol sur *Bacillus cereus* dans les aliments.

Didry [67] a montré l'effet antimicrobien du thymol et du carvacrol, utilisé individuellement ou en combinaison sur des germes d'infection

respiratoire.

Juven et coll. [118] ont obtenu une diminution importante des cellules vivantes de *Salmonella thyphimurum* en la traitant par l'huile de thym et ses constituants actifs.

Récemment, une étude *in vitro* a montré l'effet antiviral de l'HE d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle [216].

L'effet de l'huile de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil) et celle d'eucalyptus d'origine australienne ont été testées sur le virus de l'herpès simplex dans des cultures cellulaires [212].

L'activité antimicrobienne des HE est principalement à leur composition chimique et en particulier à la nature de leur composé majoritaire.

En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des HE se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leur composés majoritaires : Phénol > alcool > aldéhyde > cétone > oxyde > hydrocarbures > esters [83, 139]. L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable [228].

IV- Aperçu sur le mode d'action des HE.

L'activité antimicrobienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale [150, 147, 144]. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces HE [173, 166]. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable.

En effet, certains chercheurs ont montré que la puissance de l'action des HE varie selon leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE, qui est largement diversifié [52, 63, 99, 119].

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude qui puisse nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action.

Quelques investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HE ou de leurs constituants ont été menées par différents auteurs :

Kurita et coll. [133] pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire.

Franchomme [83] suggère que les HE hydroxylées créent des perturbations enzymatiques et prennent pour cibles les enveloppes protectrices, le mésosome et le cytoplasme.

Boochird et Flegel [31] ont suggéré que les HE auraient des cibles qui dépendent de la concentration en HE qui est la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme.

Récemment, Ultée et coll. [237] ont montré que le carvacol provoque un effet inhibiteur chez *Bacillus cereus*. Cet effet réside dans une forte diminution de l'ATP intracellulaire, une réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire et aussi une influence sur le flux de

potassium (intra et extracellulaire). Ceci témoigne de l'endommagement de la membrane cytoplasmique .

Des études sur le mécanisme d'action des HE réalisées en 1978 par Valnet et coll. [242] montrent que dans le corps humain, les HE possèdent un mécanisme d'action différent de celui des ATB et qu'elles agissent à différents niveaux.

Dans cette étude, nous allons essayer d'apporter quelques éclaircissements sur le mode d'action des HE. Il est certain que des efforts plus poussés méritent d'être fournis pour mener des investigations dans ce domaine car depuis quelques années, l'aromathérapie et la phytothérapie connaissent un regain d'intérêt et commencent à prendre de l'importance parmi les autres branches de la thérapeutique médicale.

V- Aperçu sur les techniques d'étude du pouvoir antimicrobien des HE.

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations.

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide.

Nous allons essayer d'énumérer ces différentes méthodes et de discuter chacune d'elle.

V.1-Techniques en milieu liquide.

V.1.i- Méthode des disques de Sarbach. [15, 20]

L'essence est déposée à différentes concentrations sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, l'ensemble est placé dans des tubes à

essai. Dans chaque tube est réparti un certain volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation.

L'action bactéricide totale est confirmée par repiquage en milieu liquide d'une anse prélevée sur le milieu liquide de subculture. Le pouvoir bactéricide partiel est apprécié par l'évaluation du pourcentage de survivants par repiquage en milieu solide.

V.1.ii- Méthode de Maruzuella [15]

Elle permet l'étude du pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'HE dans l'éthanol. Les solutions mères sont préparées dans l'éthanol 95%, la solution alcoolique est ensuite répartie à différentes doses dans le milieu liquide préalablement ensemencé. Après la durée d'incubation, on effectue des subcultures qui permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

V.2-Techniques en milieu solide.

V.2.i- Méthode de Vincent.

Elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme [113]. Dans cette méthode, on utilise des disques de papier filtre de 10 mm de diamètre, imprégnés d'HE et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm.

La dilution des HE se fait toujours dans un solvant tel que l'éthylène glycol [62], l'acétone [154], l'éthanol à 95% [48]. Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'HE par diffusion dans la gélose. Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux

huiles essentielles [50].

Une variante de cette technique consiste en l'aménagement de cavité à l'emporte pièce, dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. On remplit cette cavité d'un volume donné d'HE qui va diffuser dans la gélose, et on procède, après incubation, à la mesure du diamètre d'inhibition comme dans la technique précédente [231].

V.2.ii- Méthode de Morel et Rochaix [24]

Elle permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien des HE par solubilisation dans l'alcool à différentes concentrations et incorporation de chacune des concentrations dans un milieu gélosé,ensemencé, puis coulé en boîtes de Pétri. L'alcool faciliterait la diffusion de l'essence dans le milieu.

V.2.iii- Méthode de microatmosphère [24].

C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance.

V.3- Détermination des CMI et CMB par dispersion des HE dans le milieu de culture.

Cette technique de détermination des CMI par contact direct en milieu gélosé ou liquide, consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié [73]. Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de

diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'émulsions des HE dans des solutions de différents détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 [5, 19, 181] ou de solvant comme l'éthanol [24, 218].

La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs [169].

Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus dans l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'HE.

Bon nombre d'études ont montré que la sensibilité d'un même germe vis-à-vis d'une même HE diffère selon la méthode utilisée ou selon le mode de dispersion de l'HE dans le milieu de culture, ce qui rend toute comparaison inexacte et pousse les chercheurs à bien choisir et améliorer les techniques d'étude.

L'origine de ces critiques est aussi la variation de la densité bactérienne utilisée pour l'inoculum ainsi que la difficulté à déterminer le meilleur agent émulsifiant pour avoir des proportions minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) reproductibles et comparables entre les différents manipulateurs.

D'autres critiques ont été soulevées concernant l'interaction entre les agents émulsifiants et les constituants des HE car, en raison de leur faible solubilité, les agents utilisés pour la dispersion des HE dans le milieu de culture bactérien, représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antibactérienne. Ce problème a été résolu par des travaux réalisés dans notre laboratoire par Remmal et coll. [199, 200] en milieu liquide et

en milieu solide, qui ont montré que les CMI et CMB obtenues en absence de détergents ou de solvants - dispersion dans l'agar 0,02%- sont nettement inférieures à celles obtenues en leur présence. Ceci démontre que le Tween et l'éthanol, couramment utilisés dans ce type d'étude, exercent une inhibition sur l'activité antibactérien des HE.

Monographie de certaines plantes étudiées

Thym : *Thymus broussonetti* ; Famille des Labiées.

Droque : Tige fleurie, le thym est un sous-arbrisseau vivace typiquement méditerranéen.

L'HE de thym renferme 50% de thymol ou de carvacrol .

L'essence de thym est officinale, son utilisation est très courante en usage externe comme cicatrisant et antiseptique.

Le thym est aussi une épice très utilisée en alimentation.

Origan : *Origanum compactum* ; Famille des Labiées.

Droque : Sommité fleurie.

C'est une petite plante vivace, de saveur aromatique.

La plante renferme 0,15% à 0,40% d'essence riche en phénol : carvacrol ou thymol (son isomère de position).

Elle est utilisée sous forme d'infusion pour son action stomacale et antispasmodique.

Giroflier : *Eugenia caryophyllata* ; famille des Myrtacées.

Droque : bouton floral (clou de girofle) à odeur caractéristique et à saveur chaude et piquante. La plante renferme 15 à 20% d'HE extraite à partir des boutons floraux desséchés du giroflier. L'essence renferme 85 à 93 % en volume d'eugénol libre et combinés.

L'essence du girofle est officinale, elle est utilisée en médecine dentaire comme antiseptique caustique et analgésique. Elle entre dans la préparation d'alcoolats (alcoolats de mélisse composé). En alimentation, le clou de

girofle est une épice très utilisée.

Romarin : *Rosmarinus officinalis* ; famille des Labiées

Le romarin renferme 0,5% (plante sèche) d'une essence à la senteur camphrée très pénétrante.

Composée de : α pinène (constituant de l'essence de térébentine), bornéol, cinéol, et de 5 à 15% de camphre.

La plante contient aussi de la choline, des acides organiques et des hétérosides.

Armoise : *Artemisia vulgaris*

Description : L'Armoise est une plante vivace à racine ligneuse, rampante et fibreuse. La tige, qui peut atteindre 1,5 mètre, est herbacée, cylindrique, striée, rougeâtre, un peu velue, dressée et rameuse. Les feuilles sont alternes, découpées en segments, vert foncé dessus, blanches et cotonneuses dessous. Les fleurs jaunes sont groupées en petits capitules et disposées en petits épis dont la réunion constitue une longue panicule. Le fruit est ovale et lisse.

Parties utilisées: Sommité fleurie.

Usage: L'huile essentielle contenue dans la feuille d'armoise a des propriétés régulatrices du cycle menstruel et des règles. La plante sera conseillée chez les femmes présentant un cycle irrégulier et également en cas de règles absentes ou peu abondantes. Prise régulièrement durant la deuxième moitié du cycle, l'armoise permet de supprimer ce que l'on appelle le syndrome prémenstruel, qui regroupe tout un ensemble de troubles dont souffrent les femmes durant les jours qui précèdent leurs règles (rétention d'eau, prise de poids, gonflement des seins, irritabilité...).

Premier chapitre

*Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles
essentielles et de leurs composés majoritaires phénoliques
via à vis des bactéries à Gram négatif (*E. coli*)
et à Gram positif (*B. subtilis*)*

Introduction

Bon nombre de travaux ont été consacré ces dernières années aux propriétés médicales des plantes aromatiques et en particulier aux propriétés antimicrobiennes de leurs extraits odorants : les HE et leurs constituants actifs. Mais les travaux qui s'intéressent au mécanisme d'action de cette activité sont en nombre extrêmement faible [43, 92, 93, 132, 221, 212, 238].

Kurita et Koike ont étudié l'activité antifongique des alcools primaires, des composés phénoliques, des aldéhydes aromatiques et des acides organiques. Ils se sont rendu compte que celle-ci augmente avec l'hydrophobicité de ces composés, ce qui suggère des interactions hydrophobes entre ces composés et les cellules fongiques testées [134].

Kurita et coll. [133] dans leur investigation sur le mécanisme d'action antifongique de certains aldéhydes, ont montré que l'addition de la cystéine inhibe l'activité antimicrobienne de ces aldéhydes. Ces auteurs pensent, donc, que l'activité inhibitrice de ces composés serait sûrement due à leur affinité avec les groupements SH des enzymes impliqués dans la division cellulaire, et que l'activité antibactérienne serait due à l'inactivation de ces groupements SH par fixation des aldéhydes.

Boochird et Flegel [31] se sont aussi penchés sur la question en étudiant l'action de l'eugénol et de la vanilline, qui sont des composés phénoliques. Selon ces auteurs, les cibles des phénols sont la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme. Leurs effets sur ces trois sites dépendent de la concentration utilisée : à de faibles concentrations, ils produisent des effets réversibles, alors qu'avec des concentrations élevées, ils produisent une coagulation générale avec mort des cellules.

L'étude des modifications ultra structurales s'est poursuivie, depuis, sur d'autres germes ,d'autres HE et d'autres extraits aqueux, notamment par Yoshida et coll [258] sur le mécanisme d'action de l'ajoene extrait de l'ail sur *Aspergillus niger*.

On peut aussi citer les observations en microscopie électronique à transmission réalisées par Franchomme [83] qui montrent une désorganisation de l'enveloppe des cellules microbiennes sous l'effet de certaines HE riches en molécules portant le groupement phénol (*Origanum compactum*) .

Ces études montrent certainement une action des HE sur l'enveloppe de la cellule microbienne, mais ne donnent aucune idée sur le site exact de cette action. Ceci, car l'enveloppe des cellules fongiques aussi bien que celle des cellules bactériennes est constituée de la paroi et des membranes externe et cytoplasmique qui sont des structures très complexes et difficiles à observer avec précision par les techniques classiques de la microscopie électronique.

Il est donc indispensable d'utiliser des méthodes qui permettent de vérifier si l'action des HE ou de leur constituants se situe au niveau de la paroi ou au niveau de la membrane des cellules microbiennes sensibles aux HE.

L'inhibition de l'activité antibactérienne des HE par les agents émulsifiants usuels (détergents ; solvants) [200], connus pour leur affinité membranaire laisse penser qu'il y aurait une interaction entre les HE et les membranes bactériennes.

A fin de vérifier cette relation, nous avons adopté la méthode décrite par Newton [171] pour déterminer l'action de la polymyxine B sur la membrane des bactéries à Gram négatif. Cette méthode consiste à suivre la

libération du matériel absorbant à 260 nm libéré par les cellules bactériennes lavées et traitées par les HE ou par leurs composés majoritaires en comparaison avec des bactéries lavées et non traitées. Les molécules libérées par les bactéries appartiennent à plusieurs familles : des phospholipides membranaires et des lipopolysacharides [205], des sucres [230] et des protéines péri plasmiques [69, 70], des bases azotées et des nucléosides absorbant à 260 nm [158, 171]. Cette altération de la structure et de la perméabilité des membranes a pour conséquence de perturber le phénomène de phosphorylation oxydative qui nécessite une membrane intacte pour son déroulement [230, 225].

On a alors choisi deux HE possédant une forte activité bactéricide : l'essence d'origan et l'essence de girofle. Nous avons aussi utilisé deux composés phénoliques purs : thymol et eugenol, composés majoritaires du thym et du girofle respectivement. Ces composés sont utilisés à l'état pur permettant de vérifier si l'effet antimicrobien des HE est lié seulement aux composés majoritaires ou si c'est une synergie entre tous les constituants de l'huile essentielle, même les minoritaires.

Pour vérifier la spécificité de cette méthode dans la mise en évidence de l'action membranaire, nous avons utilisé des antibiotiques (polymyxine B, ampicilline et streptomycine) qui agissent respectivement sur la membrane, la paroi et la synthèse protéique de la bactérie [27, 61] comme témoins.

Enfin, pour mieux interpréter le type d'endommagement causé sur l'enveloppe bactérienne, on a procédé à l'analyse et à la purification d'une grosse molécule absorbant à 260 nm qui est l'ADN, dont la libération témoigne la lyse complète de la paroi cellulaire. Ce résultat est complété par une observation au microscope électronique à balayage.

I- Matériels et méthodes

I.1- Les bactéries

Deux souches de bactérie d'origine aviaire : *Escherichia coli* (à Gram négatif) et *Bacillus subtilis* (à Gram positif), isolées, purifiées et identifiées au laboratoire de Pathologie Aviaire à l'I.A.V Hassan II de Rabat ont été utilisées.

I.2- Les huiles essentielles et leurs constituants

* Composition chimique

Deux HE ont été utilisées dans cette première partie : l'HE d'origan (*Origanum compactum*): 49,1% carvacrol, 17,6% p-cymène et 16,4% γ terpinène et l'HE de girofle (*Eugenia caryophyllata*) contenant 90% d'eugénol. La composition chimique des deux HE a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) par Beraoud et coll. [22b].

Deux constituants d'HE ont été utilisés : le thymol (Janssen, France) constituant majoritaire de l'HE de thym, et l'eugénol (Labosi, France) constituant majoritaire de l'HE de girofle.

*Préparation de l'émulsion des HE dans l'agar

L'émulsion mère des huiles essentielles est de 10%, préparée en ajoutant 100 μ L d'HE ou de constituant majoritaire à 900 μ L d'une solution aqueuse stérile à 0,2% (w/v) d'agar agar [199].

Les concentrations finales des agents antibactériens étudiés [0,025% (v/v) à 0,2% (v/v)] sont obtenues par addition de volumes variables d'HE à partir de la solution mère (10%) au milieu de culture.

*Préparation de la suspension du thymol

Le thymol, constituant majoritaire de thym obtenu commercialisé par Janssen (France), sous forme de poudre cristallisé, est mis en émulsion dans un bain-marie à 50°C puis, mis à une concentration de 10% dans une solution de 0,2% d'agar (solution mère) [199].

I.3- Les antibiotiques

Antibiotiques utilisés :

- polymyxine B sulfate (SIGMA, France) qui agit au niveau de la membrane des bactéries à Gram négatif.
- mélange de bipénicilline-streptomycine 1/1 (VIRBAC, France) qui agissent respectivement sur la paroi et sur la synthèse protéique.
- ampicilline (SIGMA, France) qui agit en inhibant la synthèse de la paroi des bactéries.

I.4- les milieux de culture

Le milieu Muller Hinton (Difco,USA) a été utilisé dans la détermination des CMI et CMB des bactéries vis-à-vis des antibiotiques, des HE et de leurs constituants en milieu liquide.

Les milieux de culture utilisés pour la croissance des bactéries sont le milieu minimum synthétique ABB₁G pour *E. coli* et le milieu minimum synthétique “Spizizen salts” [9] pour *B. subtilis* (voir annexe p : 153).

Le milieu LB (annexe p :152) a été utilisé pour le dénombrement des deux bactéries.

I.5- Culture bactérienne et préparation des bactéries lavées

A partir d'un stock de bactéries conservées à -30°C dans du glycérol (20%), 20 µl sont prélevés puisensemencés dans 200 ml de milieu minimum synthétique ABB₁G pour *E. coli* et le milieu minimum

synthétique “Spizizen salts” pour *B. subtilis*. Après 18 heures d’incubation à 37°C, les bactéries sont lavées selon le protocole suivant : la culture bactérienne de 18 heures est centrifugée à 400 x g pendant 25 minutes, le surnageant est éliminé et le culot bactérien est remis en suspension dans un volume de tampon phosphate (PBS, voir annexe p :154). La suspension bactérienne ainsi obtenue est dite suspension de bactéries lavées.

I.6- Test de fixation des HE sur les bactéries

Le principe de ce test est de mesurer l’absorbance des HE (concentration subinhibitrice) ou de leurs constituants avant et après un bref contact avec les bactéries.

Des suspensions de 5×10^6 et 5×10^5 bactéries/ml sont traitées pendant 15 minutes par une concentration subinhibitrice (0,025%) d’HE d’origan, d’HE de girofle, d’eugénol ou de thymol puis centrifugées à 12000g pendant deux minutes. L’absorbance à 280 nm du surnageant est mesurée en comparaison avec des suspensions d’HE centrifugées de la même façon sans contact avec les bactéries.

I.7-Determination des CMI et des CMB des bactéries traitées par les HE ou par leurs constituants majoritaires

Les HE ou les constituants sont dispersés en présence d’agar agar 0,2% selon la méthode décrite par Remmal et coll. [199]. A partir d’émulsions de 10% d’HE ou de constituants à l’état pur, un volume variable en fonction de la concentration finale désirée est prélevée, puis mélangé avec la suspension de bactéries lavées. Cette suspension de bactéries traitées est mise aussitôt à 37°C au bain-marie avec agitation magnétique pendant toute la durée d’incubation.

I.8- Traitement des bactéries par les antibiotiques

A partir d'une solution mère de polymyxine B à 1mg/ml, d'une solution mère de bipénicilline-streptomycine à 10^5 U/ml et d'une solution mère d'ampicilline à 5mg/ml, un volume variable en fonction de la concentration finale désirée est mélangé avec la suspension des bactéries lavées. La suspension d'*E. coli* traitée par la polymyxine B et la bipénicilline-streptomycine ainsi que celle de *B. subtilis* traitée par l'ampicilline sont mises aussitôt à 37°C au bain-marie avec agitation magnétique durant l'incubation.

I.9- Mesure de la libération des substances absorbant à 260 nm par les bactéries traitées

Pour apprécier la libération du contenu cellulaire absorbant à 260nm, nous avons procédé comme suit :

- tube témoin contenant du PBS et des bactéries lavées.
- tube contenant du PBS + bactéries lavées + volumes variables d'HE ou de composés majoritaires.
- tube contenant du PBS + *E. coli* lavé + volumes variables de polymyxine B.

Test en fonction de la concentration de l'agent antibactérien

Le contact HE/bactéries lavées dure 4h à 37°C au bain marie sous agitation. Un aliquote de 1,5 ml de la suspension bactérienne traitée par les HE ou par l'antibiotique, est en suite transféré dans un tube eppendorff puis centrifugé pendant 2 minutes, à 4°C et à 12000g. Un volume de 1,2 ml du surnagent est prélevé, dilué dans du PBS puis mis dans une cuve en quartz pour lire son absorbance à 260 nm. Le réglage du zéro est réalisé par le surnagent du tube "deux minutes" centrifugé aussitôt après le contact des agents antibactériens avec les bactéries [205].

Test en fonction de la durée du traitement

Le contact HE/bactéries lavées à 37°C au bain marie sous agitation est réalisé pendant des durées variables (0', 20', 30', 60', 90', 120', 180'), en présence d'une concentration d'agent antibactérien qui a donné une forte libération de matériels absorbant à 260 nm et une mortalité bactérienne de 100%.

I.10- Dénombrement des bactéries

Les bactéries sont dénombrées par la méthode de la goutte calibrée décrite par Miles et coll. [160] et par Caillon et Drugeon [37].

La suspension bactérienne subit une série de 4 dilutions progressives au 1/10. A partir de chaque dilution, une goutte calibrée de 25 µl est déposée à la surface d'une boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu nutritif gélosé. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les bactéries sont dénombrées sur la première dilution permettant d'observer entre 7 et 30 colonies nettement séparées.

I.11- Traitement statistique

La signification des différences observées dans les résultats a été vérifiée par le test 't' de Student [56, 210].

I.12- Observation des bactéries traitées au microscope électronique à balayage (MEB).

Après une heure de traitement par des concentrations bactéricides des HE ou de leurs constituants, les bactéries sont préfixées avec une solution de glutaraldéhyde à 2% diluée dans du PBS pendant une heure à 4°C. Une postfixation est effectuée par le tétroxyde d'osmium à 2% diluée dans du PBS pendant 30 minutes à 4°C. Après chaque fixation, les bactéries sont lavées deux fois dans le tampon PBS.

Ensuite, les bactéries sont déshydratées “ au point critique” en présence de CO₂ liquide sous une pression de 95 bars.

Les échantillons sont recouverts d'une couche d'or par pulvérisation cathodique à l'aide d'un métalliseur (Edwards S 150 B) avant d'être examinés au microscope électronique à balayage (Stereoscan 360, Cambridge) [21].

I.13- Lyse des bactéries par les HE et leurs constituants et extrairaction de l'ADN et de l'ARN

Les bactéries sont cultivées pendant 18 heures à 37°C dans 1,5 ml de milieu minimum synthétique ABB₁G pour *E. coli* et le milieu minimum synthétique “Spizizen salts” pour *B. subtilis*, puis récoltées par centrifugation en une minute, à 4°C, à 12000g ; lavées en tampon TGE (voir annexe p : 154) et remises en suspension dans 100 µl de TGE.

Ces bactéries sont ensuite lysées par addition de concentrations croissantes allant de 0,025% à 0,1%, d'HE de girofle, d'HE d'origan et de leurs constituants : l'eugénol et le thymol. Le contenu du tube est homogénéisé au vortex pendant 30 secondes. De même, *E. coli* a été traitée avec des concentrations bactéricides de polymyxine B.

I.14- Extraction et purification des acides nucléiques [151]

Après incubation de 30 minutes à 37°C du lysat obtenu, on ajoute 150µl d'acétate d'ammonium 7,5 M (pH 7,8 ; le lysat est incubé 15 minutes dans la glace pour permettre la précipitation de la majorité des protéines, des ARN de haut poids moléculaire et de l'ADN chromosomique. Ensuite, il est centrifugé 10 minutes à 12000g, à 4°C pour éliminer les débris bactériens, on obtient alors un lysat clair.

Les acides nucléiques sont précipités en mélangeant un volume de surnagent avec deux volumes d'éthanol à température ambiante pendant 30 minutes puis récupérés par centrifugation pendant 15 minutes à 12000g, à

4°C. Le culot d'acides nucléiques est lavé à l'éthanol 70% puis séché quelques minutes à l'étuve à 37°C.

Une fois l'éthanol évaporé, le culot est redissous dans 20 µl de tampon TE (voir annexe p : 154) et conservé à -20°C.

I.15- Electrophorèse en gel d'agarose [151]

0,2g d'agarose sont ajoutés à 25 ml de tampon TAE (voir annexe p : 154), l'ensemble est chauffé jusqu'à dissolution des grains d'agarose, puis coulé dans la cuve d'électrophorèse.

Après solidification du gel, celui-ci est immergé dans une solution de TAE contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (tampon d'électrophorèse). Ensuite, 10 µl de la solution d'acide nucléique sont mélangés avec 2 µl d'une solution de bleu de bromophénol-glycérol, puis déposés au niveau des puits du gel d'électrophorèse. Le glycérol permet d'augmenter la densité de l'échantillon facilitant ainsi son dépôt dans le puits, tandis que le bleu de bromophénol constitue le témoin de migration permettant d'estimer la distance parcourue par l'échantillon. La migration s'effectue sous un courant de 50 volts pendant environ 90 minutes. Le complexe acide nucléique-bromure d'éthidium est visualisé sous rayons UV à 254 nm ou 366 nm.

II- Résultats

II.1- CMI et CMB des antibiotiques, des HE et de leurs constituants

Le tableau II-1 montre les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) des antibiotiques, des HE et de leurs constituants sur *E. coli* et sur *B. subtilis* en milieu minimum synthétique liquide, telles que déterminés selon la méthode décrites par Remmal et coll. [200].

Table II.1 : CMI et CMB des antibiotiques, des HE et de leurs constituants sur *E. coli* et *B. subtilis* en milieu minimum synthétique liquide

	<i>E. coli</i>		<i>B. subtilis</i>	
	<u>CMI %</u>	<u>CMB %</u>	<u>CMI %</u>	<u>CMB %</u>
HE de girofle	0,05	0,1	0,033	0,05
Eugénol	0,05	0,1	0,033	0,05
HE d'origan	0,033	0,05	0,025	0,033
Thymol	0,033	0,05	0,025	0,033
Polymyxine B	2,5 µg/ml	5 µg/ml	ND	ND
Bipénnicilline-streptomycine	1000 U/ml	2500 U/ml	ND	ND
Ampicilline	ND	ND	40 µg/ml	60 µg/ml

ND : non déterminé

II.2- Test de fixation des HE sur les bactéries

La fixation des HE ou de leurs constituants sur les bactéries est estimée par comparaison de leur absorbance à 280 nm dans le surnageant en présence et en absence de bactéries.

Le tableau II-2a montre des différences hautement significatives dans l'absorbance des HE avant et après un bref contact (2 min) avec la bactérie *E. coli*. Le tableau II-2b montre également des différences importantes dans l'absorbance des HE et de leurs constituants après centrifugation en présence de la même souche à raison de 5×10^6 et 5×10^5 bactéries/ml.

Table II.2.a : Résultats du test de fixation de l'HE de girofle, de l'eugénol, de l'HE d'origan et du Thymol sur *E. coli*

	Avant contact avec les bactéries	Après contact avec les bactéries
	<u>Absorbance à 280 nm</u>	
HEde girofle ¹	0,57 ± 0,11	0,38 ± 0,07*
Eugénol	0,45 ± 0,11	0,32 ± 0,07*
HE d'origan	0,38 ± 0,05	0,28 ± 0,06*
Thymol	0,45 ± 0,07	0,27 ± 0,07*

* Différences hautement significatives ($p < 0,0001$, test de Student)

¹ Les HE et leurs constituants majoritaires ont été utilisés à la dilution 0,025% (concentration infra inhibitrice).

Table II.2.b: Test de fixation des HE ou de leurs constituants sur *E. coli* en fonction de la densité des suspensions bactériennes.

	Densité bactérienne	
	<u>5X 10⁵ /ml</u>	<u>5X 10⁶ /ml</u>
HE de girofle ¹	0,48 ± 0,06	0,35 ± 0,01**
Eugénol	0,40 ± 0,04	0,30 ± 0,04**
HE d'origan	0,33 ± 0,03	0,25 ± 0,03**
Thymol	0,30 ± 0,06	0,23 ± 0,07*

¹ Les HE et leurs constituants majoritaires ont été utilisés à la dilution 0,025%

** Différences significatives (p<0,0001, test de Student)

* Différences significatives (p<0,01, test de Student)

II.3- lyse spontanée et viabilité des bactéries en absence d'agent bactéricide

Une suspension de bactéries lavées est incubée à 37 °C sous agitation pendant 180 minutes. Le nombre de bactéries vivantes dans cette suspension et l'absorbance à 260 nm de son surnageant ont été mesurés. Les résultats du Tableau II-3 montrent l'absence de mortalité des bactéries et de libération des substances absorbant à 260 nm dans le milieu d'incubation pendant toute la durée de l'expérience et même après 24 heures.

Table II.3 : Libération et mortalité spontanée des bactéries.

Durée d'incubation (min)	0	30	60	120	180	24H
bactéries vivantes (%)	100	100	100	100	100	100
A ₂₆₀ du surnageant	0,015	0,02	0,013	0,015	0,025	0,018

II.4- Mesure de la libération du matériel absorbant à 260 nm et mortalité d'*E. coli* sous l'action de la polymyxine B

La quantité de matériel absorbant à 260 nm dans le surnagent est estimée après traitement des bactéries (*E. coli*) par une série de concentrations d'antibiotique allant de 1 µg/ml jusqu'à 20 µg/ml pendant 1 heure.

Les figures II-1a et II-1b montrent, respectivement, une augmentation de l'absorbance à 260 nm du milieu d'incubation des bactéries en fonction de la concentration de polymyxine B et de la durée du contact polymyxine - bactéries. Pour le test de la cinétique, on a pris la concentration 10 µg/mL de la polymyxine B.

Cette augmentation de l'absorbance à 260 nm est accompagnée d'une diminution du nombre de bactéries vivantes.

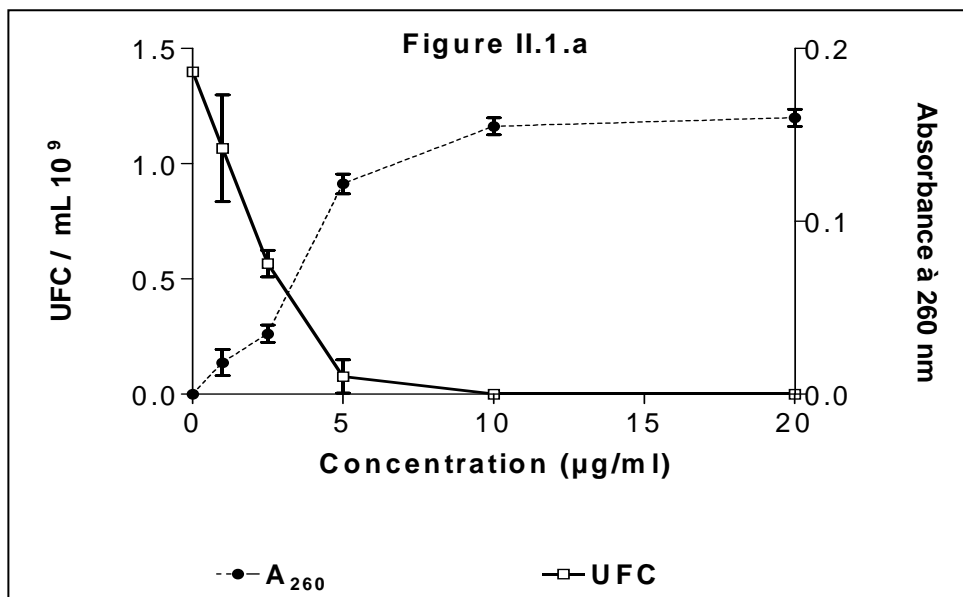


Figure II.1.a : Libération de matériels absorbant à 260 nm et mortalité des bactéries *E. coli* en fonction de la concentration en polymyxine B pendant une heure de traitement

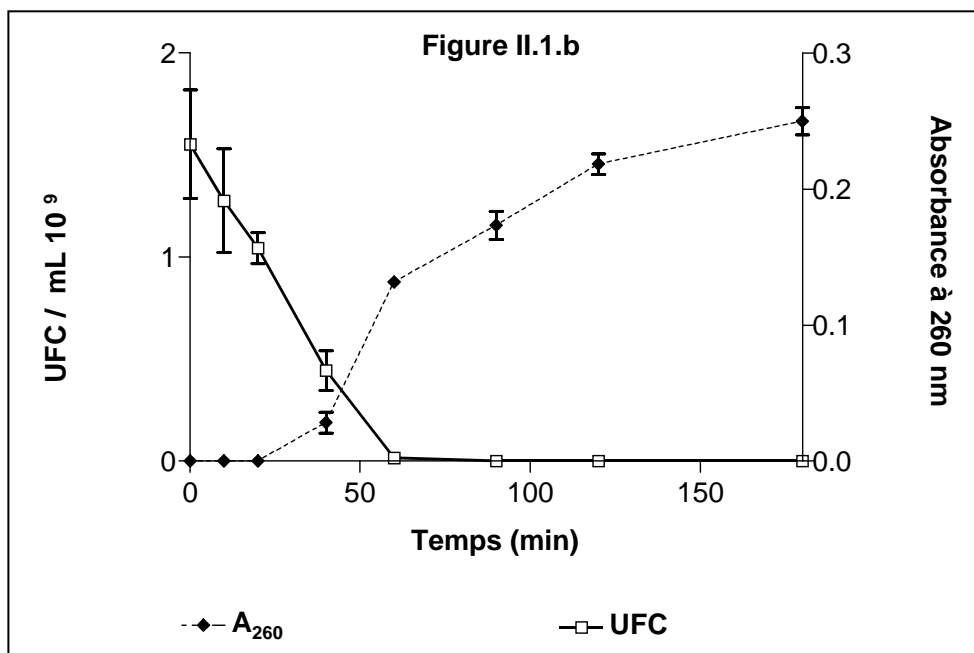


Figure II.1b : Libération de matériels absorbant à 260 nm et mortalité des bactéries *E. coli* en fonction de la durée de traitement avec 10 µg/mL de polymyxine B

II.5- Lyse et mortalité des bactéries sous l'action du mélange bipenicilline-streptomycine (1/1) et d'ampicilline

Les tableaux II-4a et II-4b montrent le résultat du traitement des bactéries *E. coli* et *B. subtilis* par des doses croissantes respectivement de bipenicilline-streptomycine (1/1) et d'ampicilline pendant 180 minutes. On observe une mortalité de 100% des deux bactéries aux concentrations supérieures ou égales à la CMB sans aucune libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm même, après 24 heures.

Table II-4a: Libération du contenu cellulaire et mortalité de *E. coli* lavée en présence de concentrations croissantes de bipenicilline-streptomycine.

<i>E. coli</i>	Concentrations en bipenicilline-streptomycine (U/ml)					
	0	100	500	1000	2500	5000
% de bactéries vivantes	100	100	13	0.15	0	0
A ₂₆₀ du surnagent	0,020	0,025	0,022	0,020	0,028	0,025

Table II-4b: Libération du contenu cellulaire et mortalité de *B. subtilis* lavée, en présence de concentrations croissantes d'ampicilline .

<i>B.</i>	Concentrations en ampicilline (µg/ml)					
	0	10	20	30	40	50
% de bactéries vivantes	100	100	100	21	5	0
A ₂₆₀ du surnagent	0,015	0,020	0,022	0,018	0,025	0,023

II.6- Lyse et viabilité des bactéries en fonction de la concentration des HE et de leurs constituants

Des suspensions de bactéries lavées ont été traitées par des concentrations croissantes d'HE en choisissant des concentrations inférieures, égales ou supérieures à la CMB, pour un temps de 60 min.

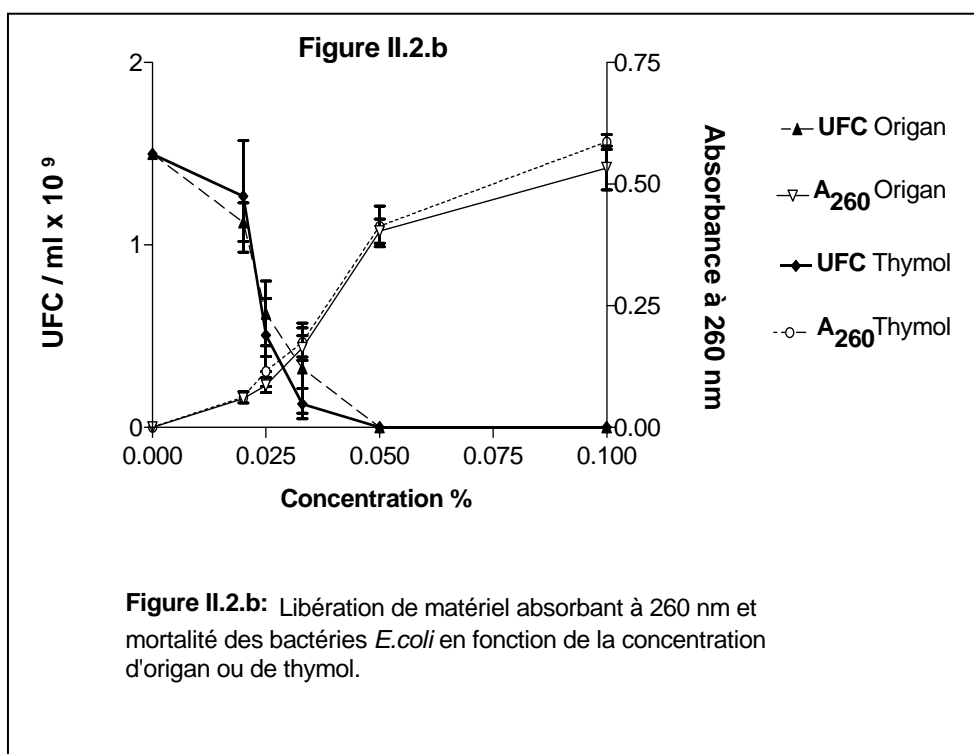
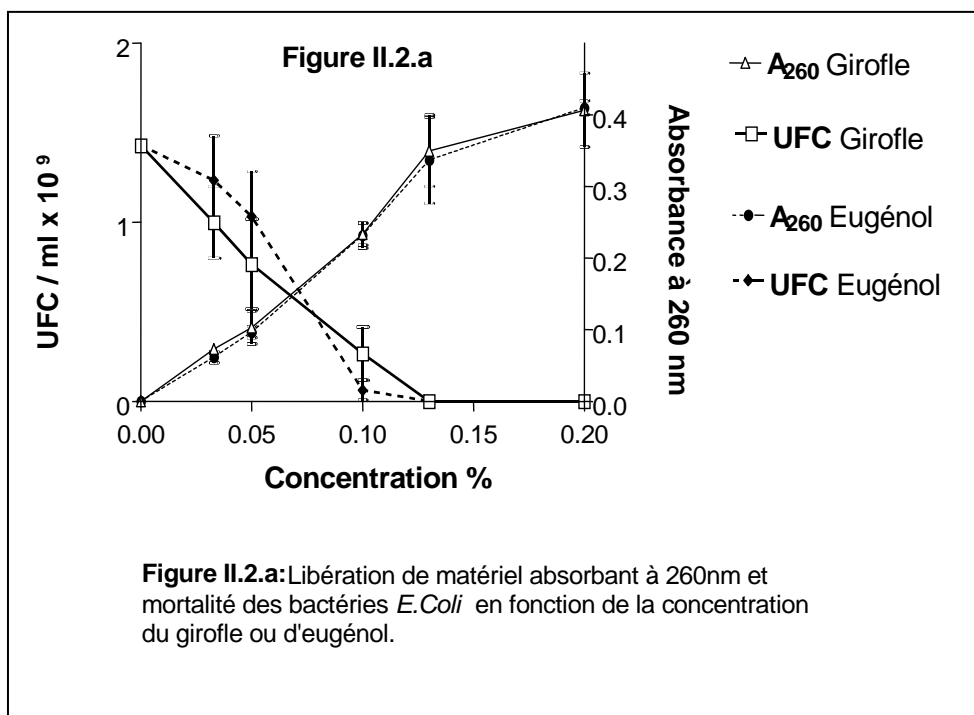
Les figures II-2a, II-2b, II-2c et II-2d montrent les relations entre les concentrations des HE et de leurs constituants d'une part et la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm en parallèle avec la mortalité des bactéries d'autres part. Les courbes obtenues pour les deux souches de bactéries sont comparables : on observe une augmentation de l'absorbance (260 nm) du milieu d'incubation des bactéries traitées accompagnée d'une diminution du nombre de bactéries vivantes en fonction de la concentration.

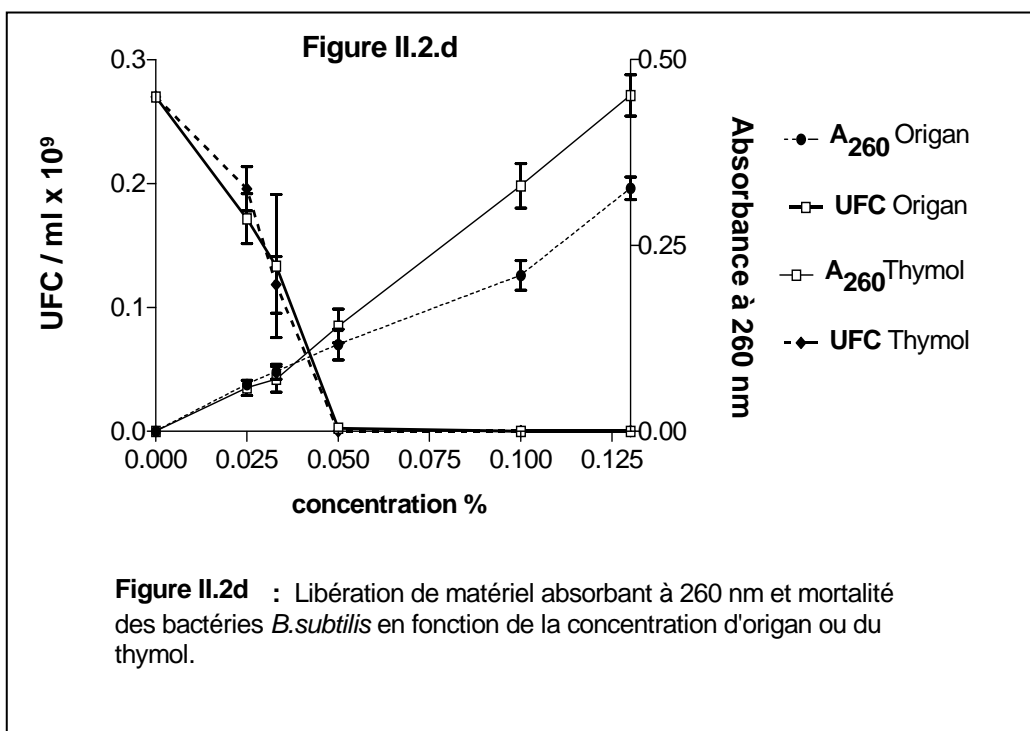
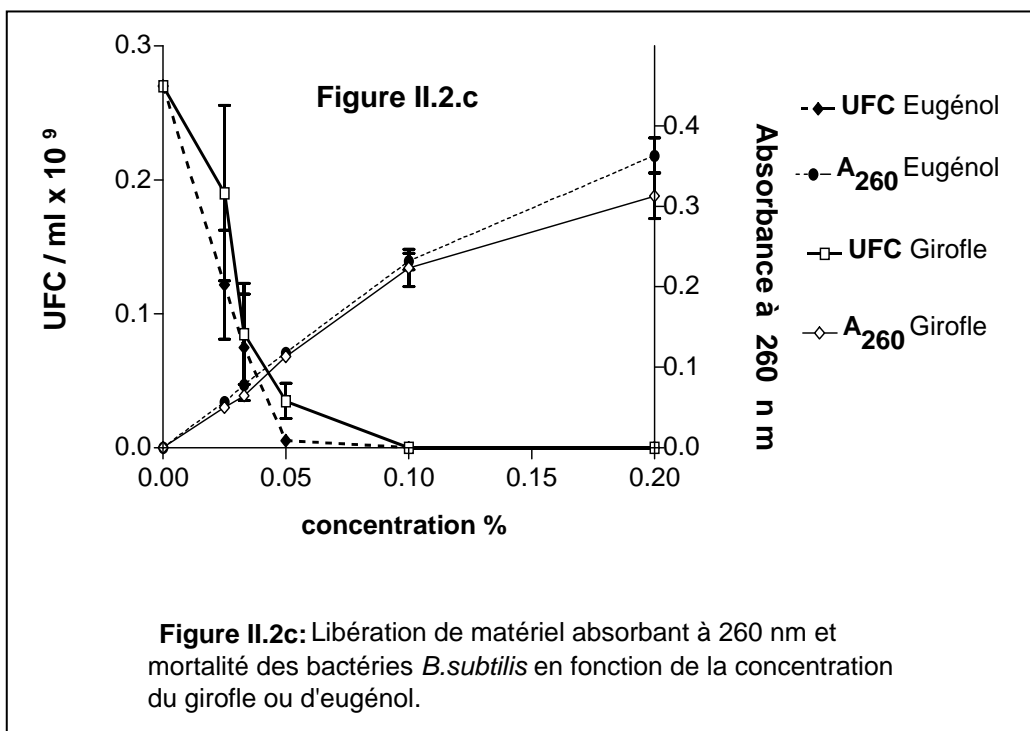
II.7- Lyse bactérienne en fonction de la durée du traitement par les HE et par leurs constituants

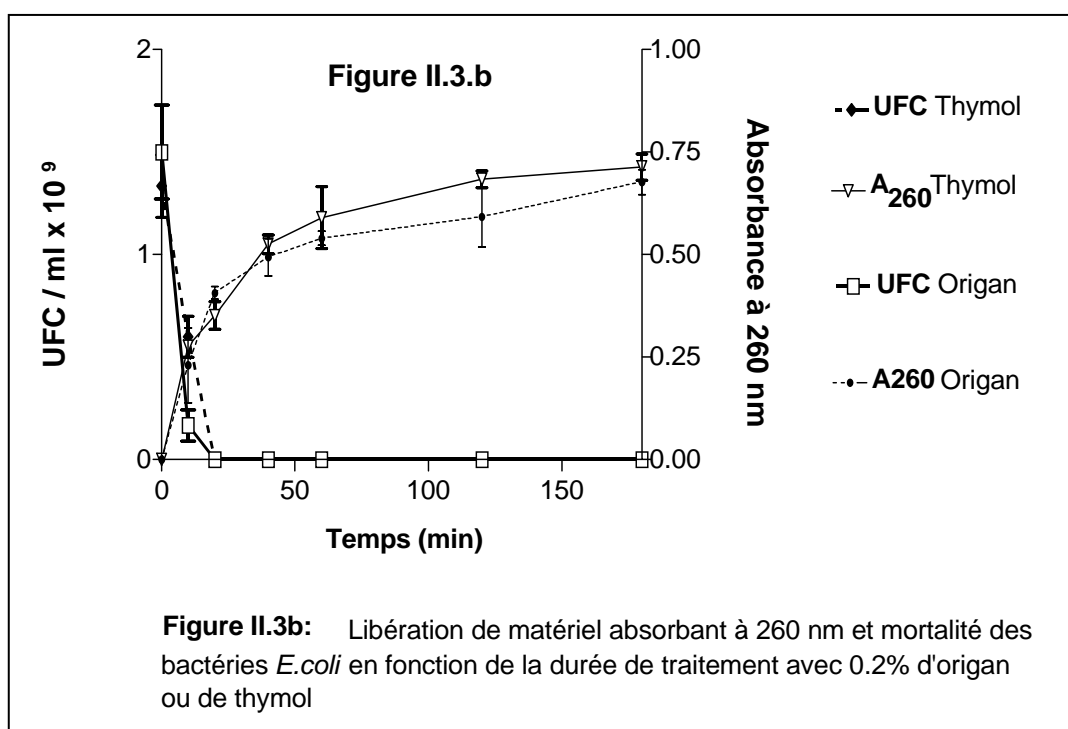
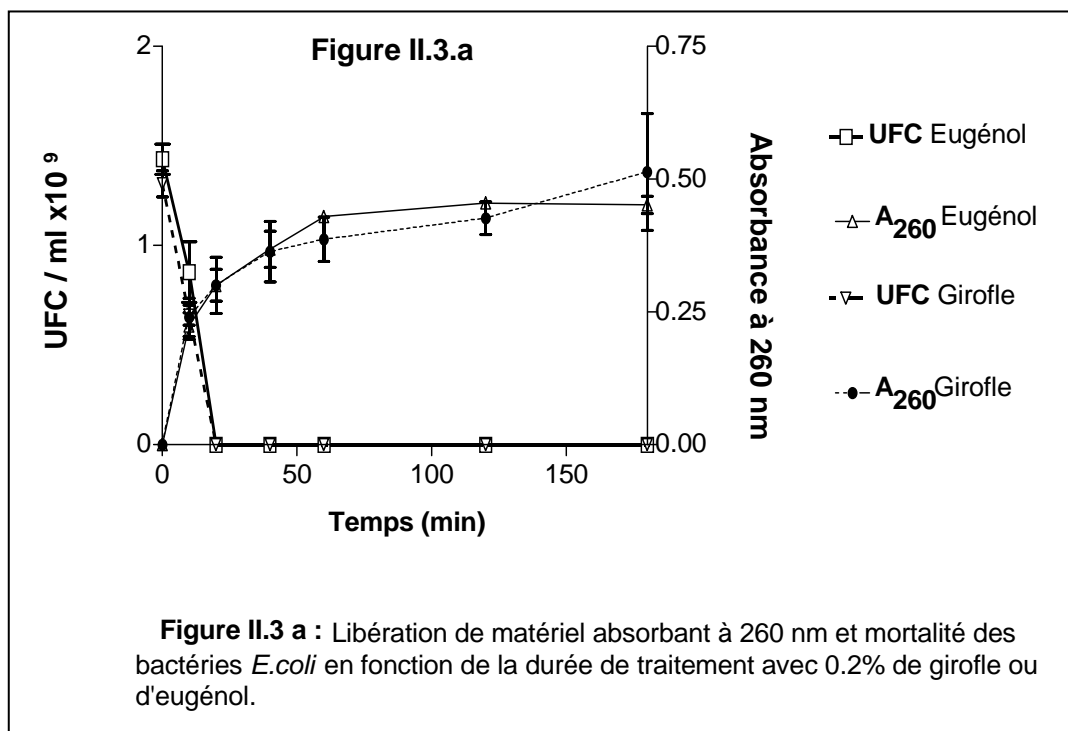
Des suspensions de bactéries lavées ont été traitées pendant des durées variables entre 0 et 180 minutes avec des concentrations fixes d'eugénol et d'HE de girofle (0,2%) et des concentrations fixes de thymol et d'HE d'origan (0,1%).

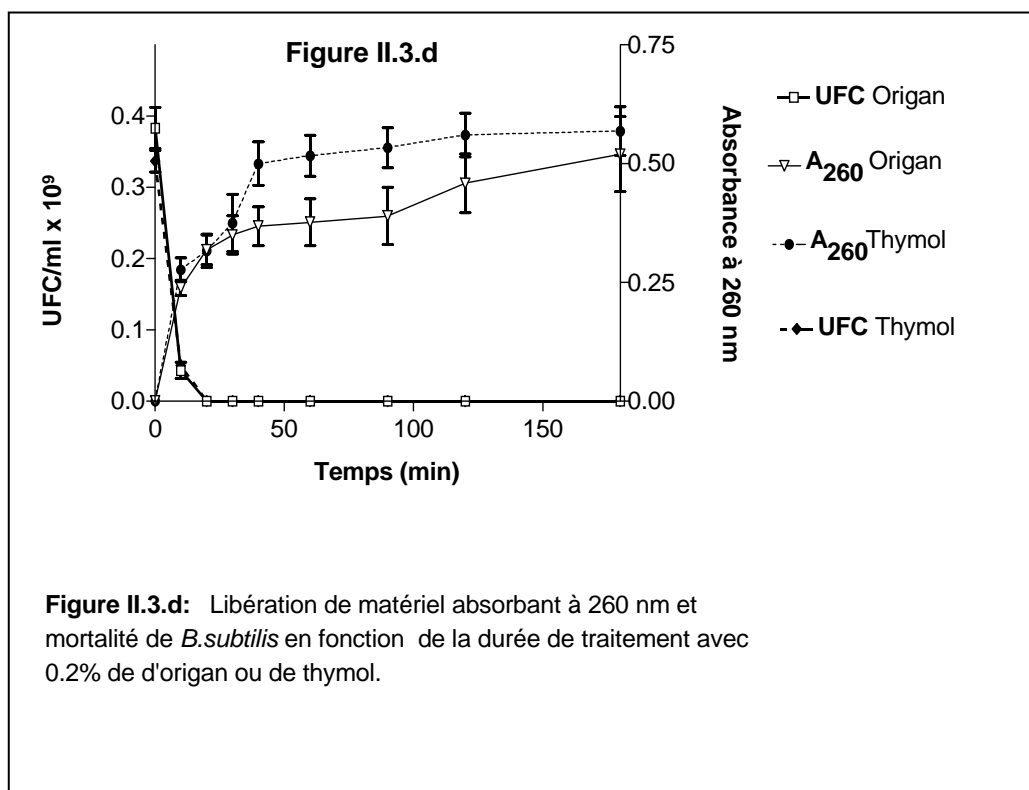
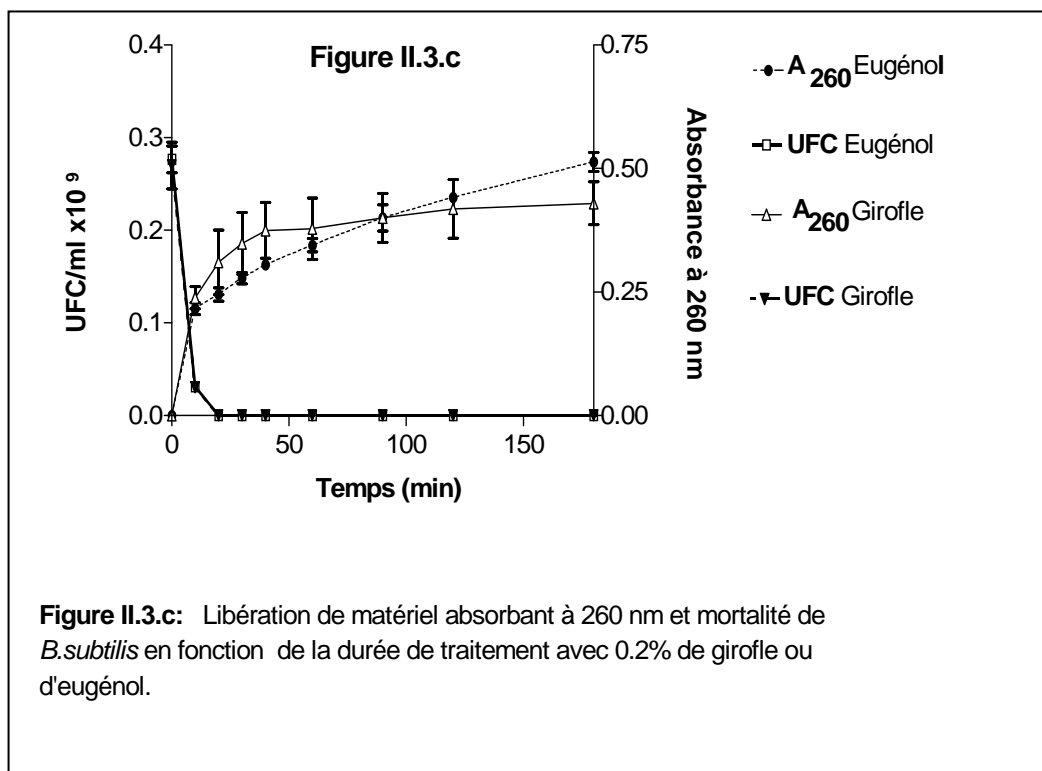
Les figures II-3a, II-3b, II-3c et II-3d montrent les relations entre la durée de traitement des bactéries et la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm en parallèle avec la mortalité des bactéries.

Ces résultats montrent une libération initiale très rapide durant les 30 premières minutes, qui représente 80% de la libération à 24 heures, suivie d'une libération lente pendant la suite du traitement. La mortalité est brutale dès les premières minutes du traitement.









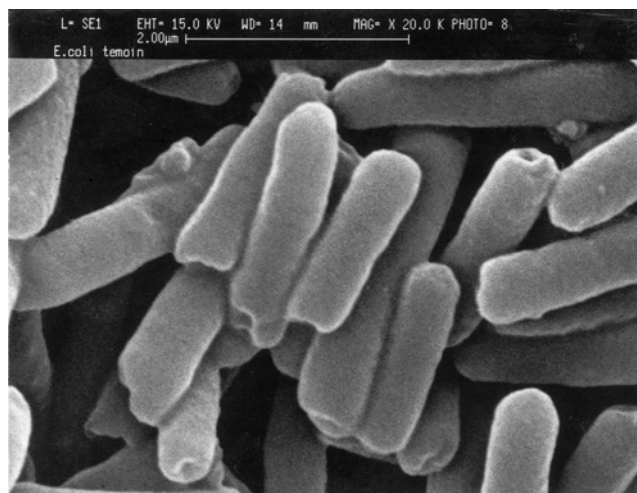
II.8- Microscopie électronique à balayage des bactéries traitées par les HE et leurs constituants

Les planches III et IV représentent des électronographies des deux bactéries (*E. coli* et *B. subtilis*) traitées par les HE testées ou par leurs constituants.

L'observation au MEB d'*E. coli* traitée par l'HE de girofle (figure III-d) et de l'HE d'origan (photo III-b) montre des changements morphologiques à la surface des bactéries qui sont absents chez les bactéries non traitées (photo III-a).

L'eugénol, à des concentrations bactéricides, provoque la libération de petites vésicules dans le milieu extérieur.

Au MEB, les cellules de *B. subtilis* traitées par les HE ou par leurs constituants apparaissent enflées et déformées (photos IV-b à IV-e).



a

Planche III : Microscopie à balayage
d'*E. coli*.

Photo III.a : *E. coli* non traitée

Photo III.b : *E. coli* traitée par l'HE d'origan

Photo III.c : *E. coli* traitée par le thymol

Photo III.d : *E. coli* traitée par l'HE de girofle

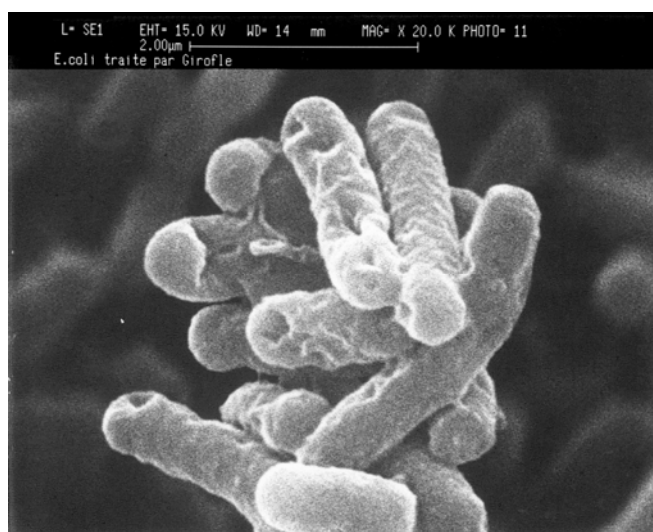
Photo III.e : *E. coli* traitée par l'eugénol



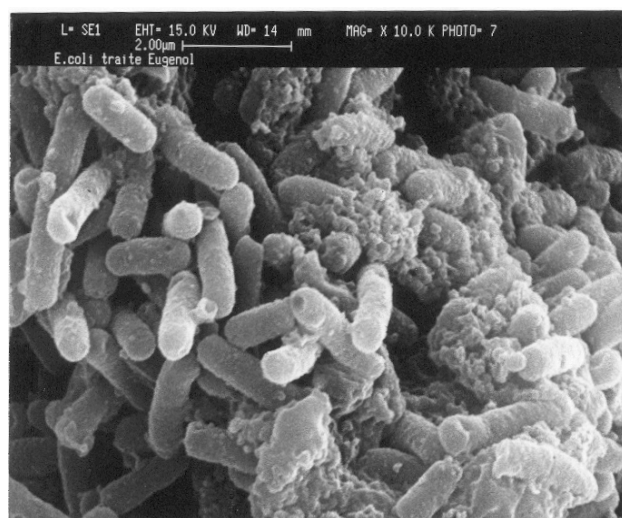
b



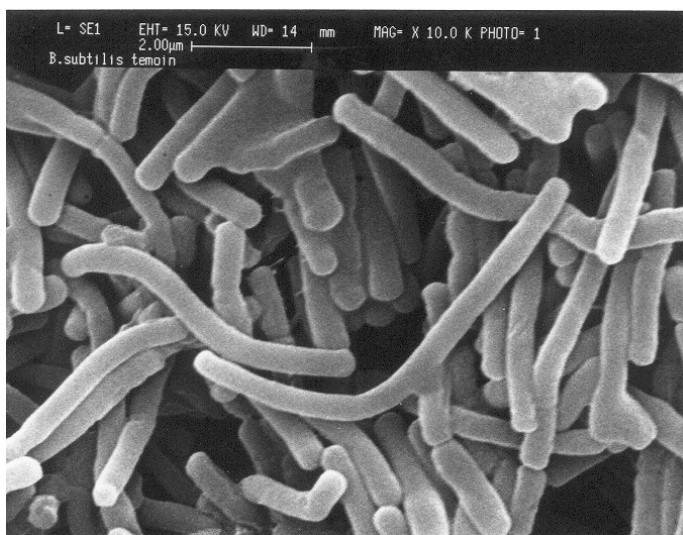
c



d



e



a

Planche IV : Microscopie à balayage de
B. subtilis.

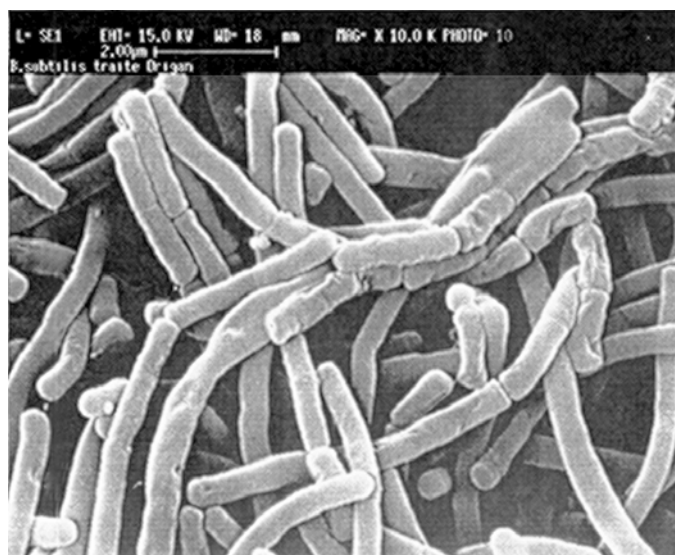
Photo IV.a : *B. subtilis* non traitée

Photo IV. b : *B. subtilis* traitée par l'HE d'origan

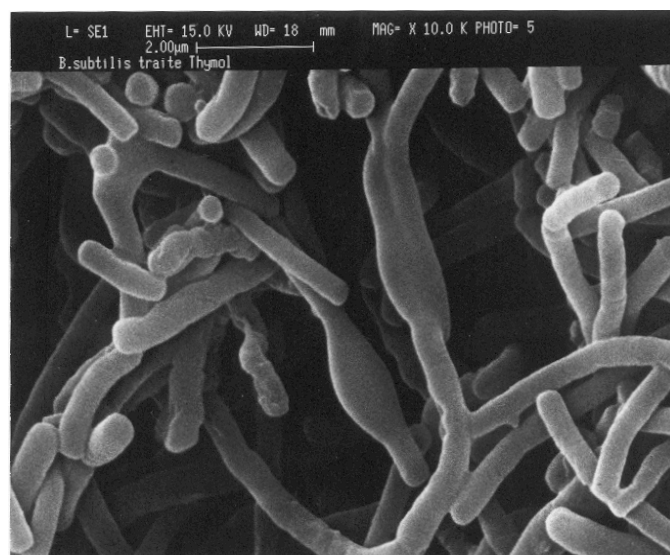
Photo IV .c : *B. subtilis* traitée par le thymol

Photo IV .d : *B. subtilis* traitée par l'HE de girofle

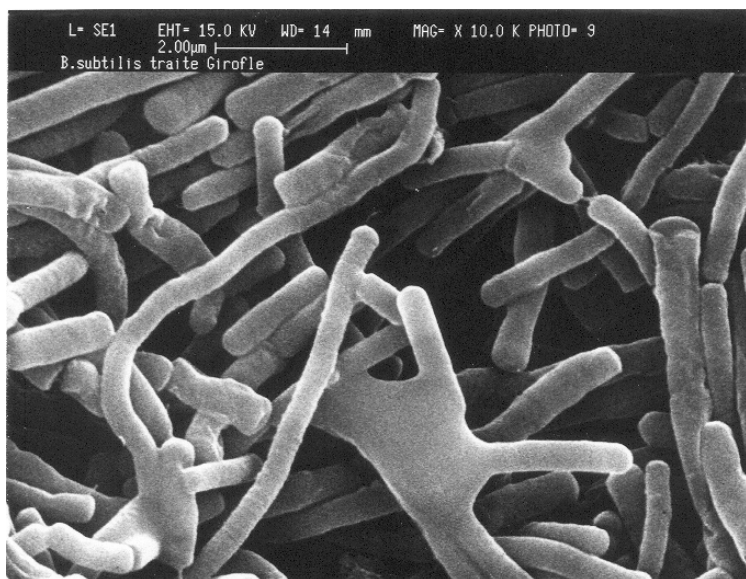
Photo IV .e : *B. subtilis* traitée par l'eugénol



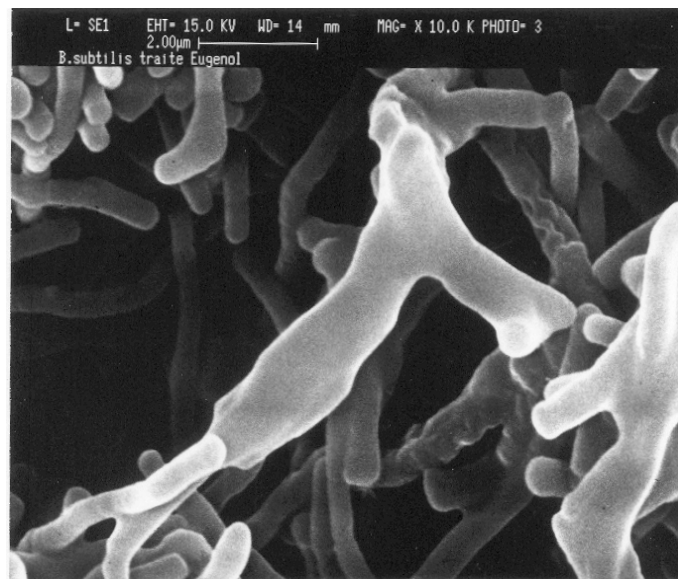
b



c



d



e

II-9 Extraction et purification des acides nucléiques des bactéries traitées par les HE et leurs constituants

Après traitement et extraction des acides nucléiques, le lysat est soumis à une analyse électrophorétique sur gel d'agarose en présence de 0,5% de bromure d'éthidium. Le gel est ensuite éclairé pour visualiser les différents types d'acide nucléique.

Les figures IV et V représentent deux photos des gels d'électrophorèse des lysats cellulaires respectivement d'*E. coli* et de *B. subtilis*.

La révélation du gel aux rayons UV du lysat de *E. coli* traité par les HE d'origan, de thymol, de girofle et d'eugénol à une concentration de 0,2% montre l'existence de bandes dans la région de 23 Kb et des taches diffuses de faible PM correspondant à de l'ARN (figure V.b).

La souche *E. coli* montre un plasmide de PM intermédiaire (environ 2 Kb).

L'analyse du gel de lysat de *B. subtilis* traité par 0,2% d'HE d'origan, de thymol, de girofle et d'eugénol montre de l'ADN (23Kb) et de l'ARN avec un rendement semblable pour les différentes substances testées (Figure VI.b).

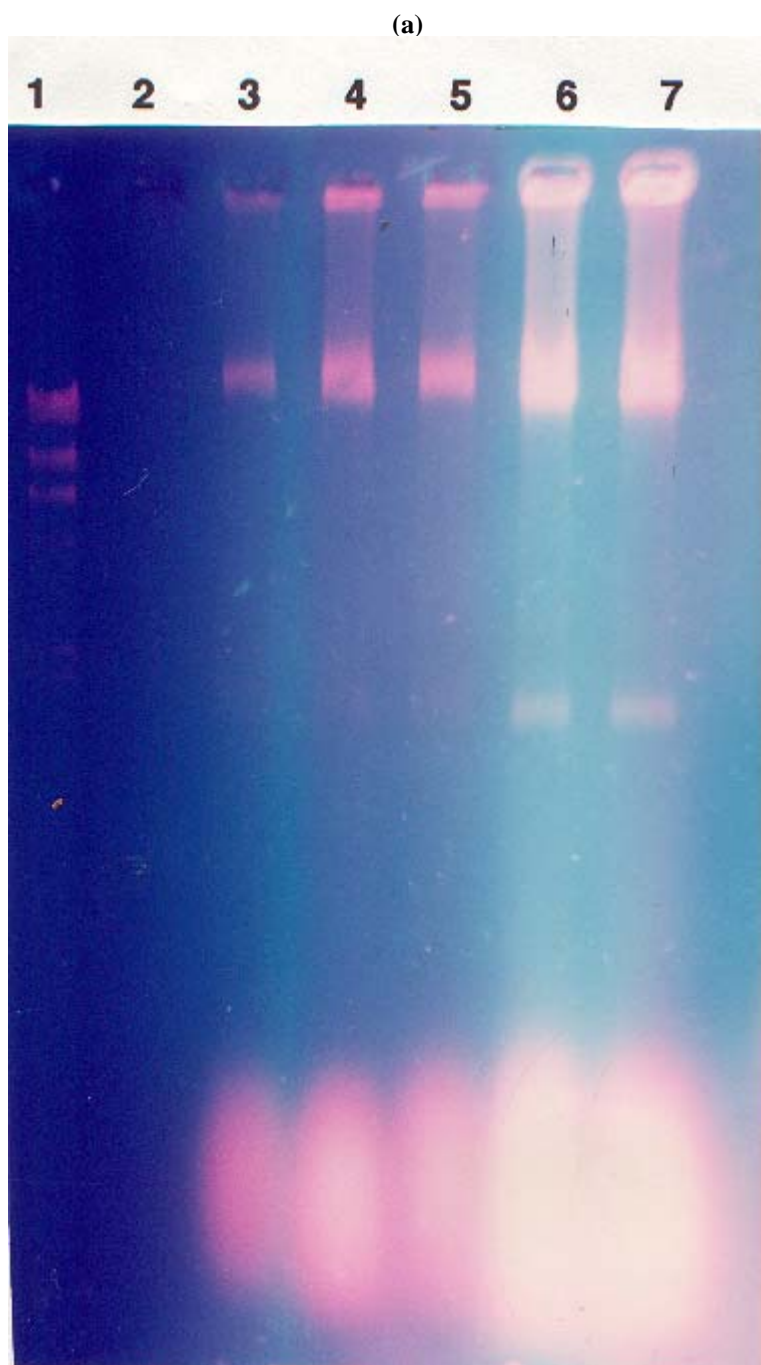
Les résultats des témoins d'*E. coli* et de *B. subtilis* non traité ne montrent aucune bande d'acides nucléiques.

Les résultats des gels des bactéries traitées par le thymol à des concentrations croissantes allant de 0,025% à 0,2% pour *E. coli* et 0,02% à 0,2% pour *B. subtilis* montrent un rendement croissant d'extraction des acides nucléiques, que ce soit de l'ADN ou de l'ARN (figures V.a, VI.a).

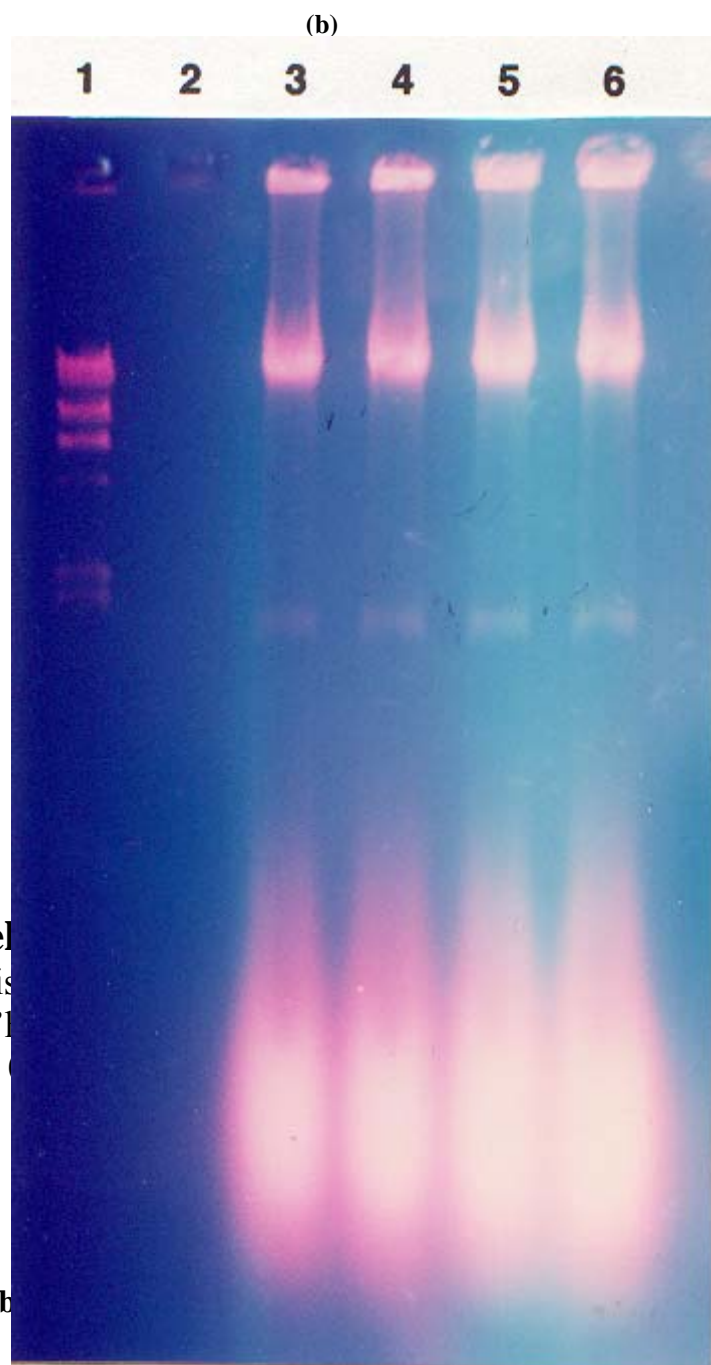
Les bandes plasmidiques d'*E. coli* ne sont visibles qu'aux fortes concentrations en thymol.

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'HE de girofle, l'eugénol et l'HE d'origan : un rendement important d'ADN et d'ARN est observé avec les fortes concentrations d'HE et de leurs constituants.

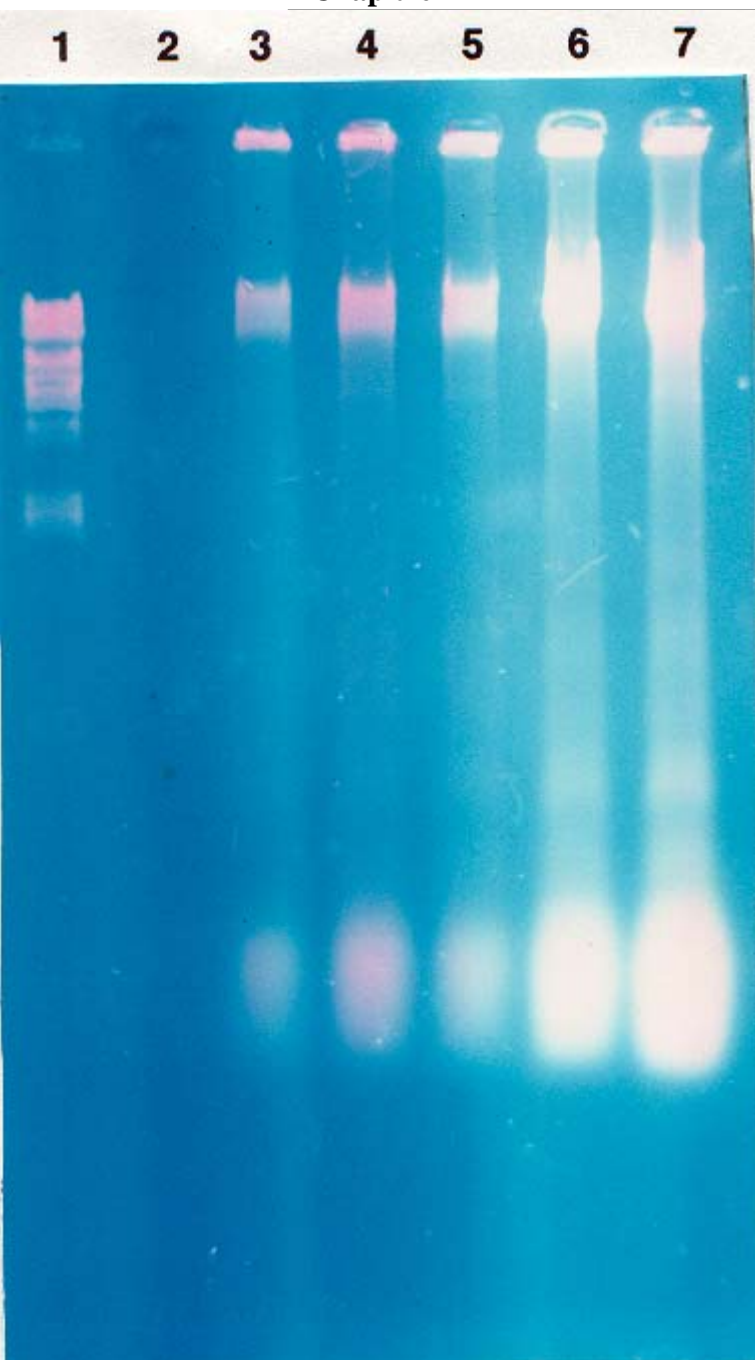
Le résultat du gel de *E. coli* traitée par des concentrations bactéricides de polymyxine B ne montre aucune bande nucléique (Résultat non montré).



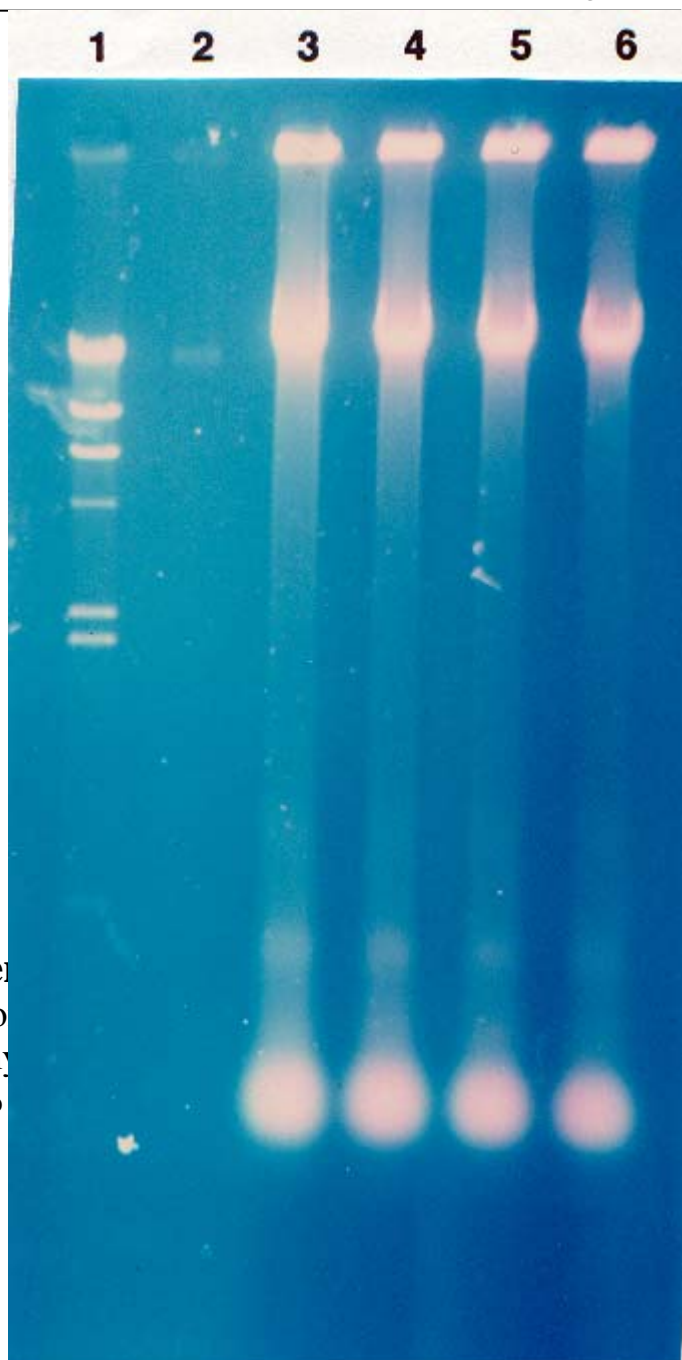
- 2 : Témoin négatif
3 : Lyse par 0,025 % de thymol
4 : Lyse par 0,033 % de thymol
5 : Lyse par 0,05 % de thymol
6 : Lyse par 0,1 % de thymol
7 : Lyse par 0,2 % de thymol



- 2 : Témoin négatif
3 : Lyse par 0,2 % d'eugénol
4 : Lyse par 0,2 % de girofle
5 : Lyse par 0,2 % d'origan
6 : Lyse par 0,2 % de thymol



- avec l'enzyme Hind III
- 2 : Témoin négatif
 - 3 : Lyse par 0,025 % de thymol
 - 4 : Lyse par 0,033 % de thymol
 - 5 : Lyse par 0,05 % de thymol
 - 6 : Lyse par 0,1 % de thymol
 - 7 : Lyse par 0,2 % de thymol



- avec l'enzyme Hind III
- 2 : Témoin négatif
 - 3 : Lyse par 0,2 % d'eugénol
 - 4 : Lyse par 0,2 % de girofle
 - 5 : Lyse par 0,2 % d'origan
 - 6 : Lyse par 0,2 % de thymol

III- Discussion

III.1- Test de fixation des HE ou de leurs constituants sur les bactéries

Le principe du test est de mesurer l'absorbance des HE (concentration subinhibitrice) ou de leurs constituants avant et après un bref contact avec les bactéries. Les résultats obtenus montrent une diminution importante (de 30 à 40%) de l'absorbance des HE et de leurs constituants après leur contact avec les bactéries. Ceci peut s'expliquer par une diminution de la concentration de ces molécules dans le surnageant après centrifugation en présence de bactéries. Cette diminution rapide de l'absorbance serait due à une sédimentation des constituants des HE absorbant à 280 nm fixés sur les bactéries. Pour confirmation, les résultats du tableau II-2b montrent que l'absorbance de ces molécules est significativement plus élevée après un contact avec un faible nombre de bactéries (5×10^5 bactéries/ml) qu'après un contact avec un nombre 10 fois plus élevé (5×10^6 bactéries/ml).

Ceci suggère que les HE et leurs constituants s'adsorbent à la surface des bactéries ou pénètrent dans le cytoplasme bactérien. En effet, les HE sont des molécules hydrophobes, il est prévisible qu'elles interagissent avec les membranes et les parois des bactéries.

III.2- Lyse spontanée et viabilité des bactéries en absence d'agent bactéricide

Les résultats de cette vérification (Tableau II-3) ne montrent ni mortalité ni libération spontanée du contenu cytoplasmique absorbant à 260 nm dans nos conditions de travail. Ceci peut être considéré comme un indice de l'intégrité de l'enveloppe des bactéries lavées une seule fois et mises en suspension dans du PBS. Les résultats présentés par Newton [171] montrent que dans ses conditions de travail (lavage multiples et suspension

dans NaCl 1%), les bactéries libèrent spontanément 10% de leur contenu après 3 heures et 30% après 24 heures. Cette libération laisse penser que les bactéries étaient fragilisées par les conditions expérimentales.

Il est donc nécessaire de faire un témoin de libération spontanée dans chaque expérience, car la réponse des bactéries préalablement fragilisées risque d'être exagérée [229, 252].

III.3-Lyse et viabilité bactérienne en présence de la polymyxine B

Les résultats présentés dans la figure II-1a montrent une libération du contenu bactérien absorbant à 260 nm qui augmente progressivement en fonction de la concentration de polymyxine B avec un maximum à 10 µg/ml. Cette libération est accompagnée d'une diminution du nombre de bactéries vivantes.

La figure II-1b montre la cinétique de libération du contenu bactérien absorbant à 260 nm sous l'action de la polymyxine B à la concentration 10 µg/ml. La libération du contenu bactérien absorbant à 260 nm commence à la quarantième minute de contact polymyxine-bactérie et augmente progressivement en fonction du temps. En parallèle, la viabilité des bactéries diminue : la diminution commence dès les dix premières minutes de contact polymyxine-bactérie et se termine par une mortalité de 100% entre 60 et 90 minutes.

Les polymyxines altèrent et perturbent la perméabilité de la membrane cytoplasmique externe. Ceci se traduira par une libération sélective des protéines périsplasmiques (absorbants à 280 nm) dès les premières minutes [42, 69] puis la membrane cytoplasmique est atteinte à son tour, ce qui entraîne la sortie des constituants cellulaires [171].

Nos conditions de travail permettent de suivre de façon précise la libération du contenu absorbant à 260 nm en fonction de la dose d'antibiotique et en fonction de la durée de contact polymyxine-bactérie.

III.4- Lyse et viabilité bactérienne en présence d'ampicilline et de bipénicilline-streptomycine

Ce test a été effectué dans le but de vérifier que la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm peut être considérée comme un indice d'altération des membranes bactériennes. En effet, le mécanisme d'action de l'ampicilline et de la bipénicilline est l'inhibition de la synthèse de la paroi [243] et celui de la streptomycine est l'inhibition de la synthèse protéique [208].

L'association de la bipénicilline et de la streptomycine donne une parfaite synergie, donc un effet fortement bactéricide sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif [222]. La mortalité des bactéries est totale sans aucune libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm, ceci même après un traitement de 24 heures [Tableau II-4a et II-4b].

La libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm est donc un bon indicateur de l'altération membranaire provoquée par les agents bactéricides agissant directement sur la membrane, comme la polymyxine et les antibiotiques peptidiques (Figure II-1a, II-1b et Tableau II-5).

III.5- Lyse et viabilité bactérienne en présence des HE ou de leurs constituants

Un test préliminaire nous a permis de choisir une durée de contact d'une heure pour l'HE de girofle et l'eugénol et de deux heures pour l'HE d'origan et le thymol. La concentration donnant lieu à une libération maximale dans la dose-réponse a été utilisée pour la cinétique.

Les résultats des dose-réponses des HE ou de leurs constituants montrent une augmentation de l'absorbance à 260 nm du milieu d'incubation des cellules traitées accompagnée d'une diminution du nombre de bactéries vivantes.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec *E. coli* traitée par la polymyxine B. Cependant, la quantité du matériel absorbant à 260 nm libérée par *E. coli* en présence des HE ou de leurs constituants (à la concentration bactéricide) est plus importante que celle libérée en présence de polymyxine B (à la concentration bactéricide) même après 24 heures. De plus, la libération du contenu cellulaire d'*E. coli* traité par les HE commence dès les premières minutes de traitement.

En ce qui concerne l'effet bactéricide, il y a perte totale de la viabilité des bactéries dès les premières minutes de contact avec les HE, alors que pour la polymyxine B, cet effet ne se manifeste qu'après une heure.

Les HE et leurs constituants donnent des résultats comparables entre *E. coli* et *B. subtilis*.

III.6- Observation au MEB des bactéries traitées par les HE et les constituants phénoliques

Pour compléter nos résultats, nous avons effectué une observation au microscope électronique à balayage. Comme prévu, les photos de la microscopie montrent des altérations évidentes de la paroi d'*E. coli*. Avec chaque substance utilisée (HE, thymol, eugenol), on observe une grande différence par rapport au témoin (photo III.a). Mais le traitement par le girofle et l'origan (photos III.b – III.d), donne des altérations plus exprimées que ce qu'on observe avec le thymol et l'eugenol (photos III.c – III.e). Cette différence dans l'intensité de l'altération observée chez *E. coli*, ne se reflète ni dans le test de la libération du matériel absorbant à 260 nm, ni dans la mortalité bactérienne, ni dans la quantité d'ADN et d'ARN observée sur les gels d'électrophorèse obtenus (photo V).

Malgré cela, on peut dire qu'il y a une action évidente des HE et de leurs composés majoritaires phénoliques (thymol et eugenol) sur la surface bactérienne (paroi et membrane).

Pour les observations au MEB concernant *B. subtilis*, on voit aussi une différence nette entre les cellules non traitées (photo IV.a) et les bacilles traitées soit par les HE (photo IV.b – IV.d) soit par les composés phénoliques (thymol et eugenol) (photos IV.c – IV.e). Ces altérations se présentent sous forme de déformations cellulaires diverses avec présence de cellules renflées et turgescentes. Pour *Bacillus* aussi ces différences dans le type d'altération ne se reflètent pas dans le test de la libération du matériel absorbant à 260 nm, ni dans la mortalité bactérienne, ni dans la quantité d'ADN et d'ARN observée sur les gels d'électrophorèse obtenus (photo VI).

La microscopie électronique confirme l'action des huiles essentielles sur l'enveloppe bactérienne (paroi et membrane). Les différences dans le type d'altération pariétales pour *E. coli* et pour *B. subtilis* peuvent être dues à la différence structurale de leur paroi.

Des résultats semblables ont été rapportés par Siddiqui et coll. [216], sur l'altération des enveloppes des virus de la maladie de Newcastle et de l'*Herpès simplex* traités par l'HE d'origan.

III.6- Extraction et purification des acides nucléiques des bactéries traitées par les HE et leurs constituants

Les chercheurs qui ont utilisé cette méthode pour la première fois, pensent que les molécules absorbant à 260 nm libérées par les cellules traitées sont probablement des acides nucléiques et leurs dérivés [171, 158]. Pour vérifier la lyse bactérienne sous l'effet des HE et confirmer la nature des molécules libérées dans le surnageant, les cellules sont traitées par les HE (à concentrations bactéricides), leurs acides nucléiques sont partiellement purifiés et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

L'analyse des gels d'électrophorèse montre la présence de bandes d'ADN et de taches d'ARN libérés suite à la lyse des bactéries par les HE. Ceci est

en accord avec les résultats obtenus sur la libération de matériel absorbant à 260 nm par les bactéries traitées par les HE et leurs constituants majoritaires phénoliques. Cela concorde avec les observations au MEB des deux bactéries qui montrent une désorganisation de la surface externe des cellules. Ainsi, nous pouvons supposer que le mécanisme d'action antibactérienne des HE à composé majoritaire phénolique serait l'altération des membranes et des parois cellulaires.

L'analyse du gel d'électrophorèse obtenu avec *E. coli* traitée par des doses bactéricides de polymyxine B ne révèle aucune bande d'acides nucléiques. Ceci suggère que la polymyxine B agit en provoquant de petits trous dans la membrane cytoplasmique qui ne libèrent que des petites molécules comme les nucléotides libres et les bases azotées qui absorbent à 260 nm.

Ceci explique pourquoi la libération de matériel absorbant à 260 nm est plus faible en présence de polymyxine B (à concentration bactéricide) comparée à la libération obtenue en présence des HE et leurs constituants.

Ainsi, ces résultats permettent de penser que les HE et leurs constituants majoritaires phénoliques provoquent des altérations de la membrane et de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ils permettent aussi, de mettre au point une méthode simple de lyse des bactéries pour extraire l'ADN et l'ARN sans avoir recours à des enzymes spécifiques (lysozymes, lysostaphine, ...) ni à des détergents dénaturants comme le SDS ou le Triton X100 [151].

En conclusion, cette étude a permis :

- la mise en évidence d'une fixation des HE et de leurs constituants sur la bactérie *E. coli*.
- l'adaptation d'une méthode permettant de suivre la libération du contenu cellulaire en parallèle avec la mortalité des bactéries.

- de montrer que les HE d'origan et de girofle exercent leur activité bactéricide principalement grâce à leurs constituants majoritaires qui appartiennent à la famille des phénols.
- de montrer une altération des parois des bactéries *E. coli* et *B. subtilis* sous l'effet des HE et leurs constituants détectée par microscopie électronique à balayage.
- de montrer l'activité lytique des HE et leurs constituants sur les deux bactéries permettant la libération des acides nucléiques révélés par électrophorèse.

Il semble donc que l'activité bactéricide des HE débiterait par une fixation de ces molécules sur les membranes bactériennes provoquant des altérations de structure et de perméabilité, conduisant à la perte de constituants cellulaires due à une lyse importante des cellules bactériennes.

Chapitre II

*L'étude de l'effet des huiles essentielles et de certains de leurs
constituants à l'état pur sur les mycobactéries*

Le but du présent chapitre

Ce travail se base sur les résultats obtenus dans le chapitre précédent sur l'étude *in vitro* du mécanisme de l'activité bactéricide des huiles essentielles sur la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif et sur les résultats des autres travaux récemment réalisés sur différents germes : bactéries, champignons, virus, etc.

Ce travail vise de tester l'effet de ces produits naturels sur les germes du genre *Mycobacterium*, face à la propagation croissante de la tuberculose à Bacilles Multi-Résistants (TB-MR).

Le travail du présent chapitre a porté sur l'étude de l'effet inhibiteur de nouvelles molécules naturelles jamais testées sur *Mycobacterium* jusqu'à aujourd'hui. Ces molécules seront testées seules et en combinaison avec les antibacillaires usuels (potentialisation). En plus, aucune étude déjà effectuée sur les bactéries à Gram négatif, ou à Gram positif ou sur les champignons, n'a révélé l'apparition de souches résistantes aux HE, ce qui nous a encouragé à tester ces substances et leurs constituants à l'état pur sur des mycobactéries atypiques (*Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*) connues par leur résistance aux antibacillaires même les plus bactéricides.

L'identification par électrophorèse sur gel d'agarose des acides nucléiques libérés dans le milieu de culture après traitement par les HE, montre l'endommagement de la paroi mycobactérienne causé par ces substances.

I- Introduction

Introduction Bibliographique

I-1. La tuberculose.

C'est une maladie infectieuse chronique ou aiguë, due à une bactérie appartenant au complexe : *Mycobacterium tuberculosis*, qui peut affecter toutes les parties du corps humain mais que l'on retrouve le plus souvent dans les poumons. Le nom de tuberculose vient de la formation par l'organisme de structures cellulaires, les tubercules, qui ensèrent et piègent le bacille. En plus des humains, les animaux domestiques, bovins, porcins ou volailles, souffrent fréquemment de cette maladie. En revanche, les animaux sauvages qui évoluent dans leur environnement naturel en sont rarement atteints.

I.1.a- Historique.

Mycobacterium tuberculosis et l'homme ont toujours cohabité. On a pu retrouver son existence jusqu'au troisième millénaire avant Jésus-Christ dans des squelettes du néolithique [44], et sur différents continents du monde tels que l'Égypte de l'ère prédynastique, ou l'Amérique des temps paléolithiques. En Europe, la tuberculose inquiéta peu avant le XVII^{ème} siècle où les bouleversements économiques et sociaux déclenchèrent une épidémie galopante. Celle-ci se propagea à toute l'Europe occidentale au cours des deux siècles suivants [48]. Les migrants européens du début du XIX^{ème} siècle transmittent l'épidémie aux Indiens de l'Amérique du Nord. L'épidémie gagna ensuite toutes les autres parties du globe telles que l'Europe de l'Est et l'Inde à la fin du XIX^{ème} siècle puis l'Afrique Subsaharienne et la Nouvelle Guinée.

Au début du XIX^{ème} siècle, les médecins français Gaspard Laurent Bayle et René Laennec décrivent la tuberculose en tant qu'entité pathologique et en définirent les formes. Les deux hommes moururent de

cette maladie. A cette époque, on a commencé à chercher comment isoler l'agent responsable de cette maladie. Le caractère microbien de la tuberculose est soupçonné dès 1865 par Villemin. En inoculant des broyats de lésions tuberculeuses, celui-ci produit chez le lapin et le cobaye une maladie identique à la phtisie humaine, il en conclut que la tuberculose est une maladie spécifique. Sa cause réside dans un agent inoculable [140]. Ce fut un microbiologiste allemand, Robert Koch qui, en 1882 [128], a pu donner la preuve définitive du caractère infectieux de la tuberculose par la découverte du bacille responsable de cette maladie [128]. Quand Robert Koch eut découvert le bacille de la tuberculose, toute son attention fut absorbée par l'utilisation du bacille qu'il venait de découvrir pour le traitement de la tuberculose. Il fit d'abord des extraits de ces bacilles et aboutit finalement à la tuberculine brute. La tentative d'utilisation de ces extraits dans le traitement de la maladie aboutit à un échec. Par contre, les conséquences fâcheuses dues aux réactions d'hypersensibilité lui permirent de découvrir la réaction d'hypersensibilité retardée (réaction tuberculinique), c'est à ce moment qu'il a mis au point le test de la tuberculine permettant le diagnostic de la maladie. Depuis, plusieurs tentatives de vaccination expérimentale chez l'animal ont été entreprises par Koch au moyen de bacilles tuberculeux, de bacilles tuberculeux virulents ou faiblement virulents avec Von Behring en 1902 et de bacilles tuberculeux fortement modifiés ou tués avec Lanza 1906.

Le problème de la vaccination antituberculeuse occupait une place prépondérante dans l'immunologie des trente premières années du siècle dernier. Après une première période de tâtonnement avec des méthodes de vaccination plus ou moins efficaces, mais inutilisables dans la pratique, l'intérêt s'est porté, surtout depuis 1920, sur la souche de bacille tuberculeux de type bovin qui a été le fruit des recherches effectués par

Th. Smith entre 1896-1902. Dès lors, les trois grandes variétés de bacilles pathogènes (humain, bovin, et aviaire) sont bien connues [140].

De 1908 à 1920, Calmette et Guérin mettent au point le vaccin qui porte leurs noms, le bacille de Calmette et Guérin (BCG) et qui est employé pour la première fois en 1921. La souche de BCG a été obtenue à la suite de repiquage successifs de la souche bovine sur un milieu de culture spécial. Vers 1930, elle a été utilisée de plus en plus fréquemment pour la vaccination de l'homme. On peut évaluer aujourd'hui à plus de trois milliard, le nombre de vaccinations par le BCG effectuées dans le monde entier depuis la mise en pratique de cette méthode préventive [240]. Le taux de protection induit par le BCG dépend de la population vaccinée et du type de BCG utilisé [29]

Cependant, le BCG reste un vaccin dont l'efficacité doit être renforcée, puisqu'il s'est avéré que son pouvoir préventif contre la tuberculose pulmonaire était faible chez l'adulte dans certaines régions de l'Inde [235, 236], bien qu'il soit efficace en Angleterre [100], en France et dans d'autres pays développés [36]. Bien entendu, ce renforcement doit s'accompagner d'une étude approfondie des réponses immunitaires de l'hôte.

Au Maroc, la vaccination par le BCG est obligatoire à la naissance. Son pouvoir prophylactique est très discuté chez l'adulte, par contre, elle protège contre les formes graves de tuberculose chez l'enfant.

Il fallut attendre l'année 1944 qui marqua le début de la chimiothérapie de la tuberculose grâce à la découverte de la streptomycine par Selman Abraham Waksman, microbiologiste américain. Mais le traitement connut des progrès révolutionnaires avec l'apparition de l'acide

paraminosalicylique (PAS) en 1949, puis avec l'isoniazide en 1952 et, après de nombreux autres années, la rifampicine en 1967.

I.1.b- Etiologie et incidence de la tuberculose.

Le bacille tuberculeux est présent dans les crachats des malades [161]. Il est transmis par des gouttelettes aérosols ou par des particules de poussière, plus rarement par les sécrétions ou les produits alimentaires (*M. bovis*). A la différence d'autres maladies infectieuses, il n'y a pas de période d'incubation déterminée. Une seule infection ne confère pas une immunité durable. En fait, le bacille peut rester longtemps dans l'organisme à l'état latent et attendre un affaiblissement des défenses immunitaires de l'organisme pour se multiplier et provoquer les symptômes de la maladie. Plus d'un quart de la population mondiale est porteuse de l'infection maladie. Pourtant, seule une très faible proportion de ces personnes développe la maladie de façon apparente. La prévalence de la tuberculose est plus importante dans les régions pauvres et surpeuplées. Dans certains pays d'Asie, d'Afrique, d'Amérique du Sud ou d'Europe, la prévalence de la tuberculose s'élève à plusieurs centaines de cas pour 100 000 habitants, on estime actuellement que deux milliards d'individus sont infectés avec *M.tuberculosis* [57, 130] et un taux de mortalité de trois millions par an [213] ; le taux d'infection pulmonaire est multiplié par un facteur non négligeable chez des sujets traités pour le cancer [151, 227] ou atteint de SIDA (syndrome d'immuno-déficience acquise). Le vaccin BCG est donc indispensable dans toutes les régions du globe, il reste le seul moyen de prévention disponible actuellement contre cette maladie infectieuse grave.

I.1.c- Dépistage, diagnostic et traitement

Une radiographie des poumons permet le dépistage systématique des tuberculoses pulmonaires à un stade précoce. Cette opération met en évidence des lésions pulmonaires, mais la confirmation du diagnostic nécessite des examens complémentaires. Le test de la tuberculine consiste à injecter en intradermique une substance protéique dérivée de la culture de bacilles tuberculeux . Une réaction cutanée positive indique la présence d'une infection, virulente ou non. Il faut alors rechercher le bacille tuberculeux dans les crachats pour déterminer s'il est actif.

Les phases précoces ne sont généralement pas symptomatiques. A des stades plus avancés, toutes les formes de tuberculose se traduisent par des symptômes communs : fièvre, fatigue, sueurs nocturnes, perte d'appétit et amaigrissement. Dans la tuberculose phthisique viennent s'ajouter des troubles respiratoires, la toux, des douleurs thoraciques et des crachats sanguinolents. L'hospitalisation est parfois nécessaire en début de traitement, mais le patient peut reprendre une activité normale dès que le malade n'est plus contagieux. Le traitement dure de six mois à 9 mois.

I.1.d- Diagnostic classique

Le diagnostic de la tuberculose et d'autres mycobactérioses repose sur la mise en évidence des mycobactéries dans les échantillons pathologiques qui constituent une confirmation directe de la maladie. Actuellement, les méthodes classiques de diagnostic reposent sur l'examen microscopique, sur l'isolement en culture du germe responsable et sur l'identification de ce dernier par l'étude de ses caractéristiques biochimiques et physiologiques [59].

Malheureusement, cette procédure souffrant de la lenteur de croissance des mycobactéries – nécessite généralement plusieurs semaines- reste la méthode de référence jusqu'à nos jours, malgré la concurrence de nouvelles techniques. La culture se fait par ensemencement sur milieu Lowenstein et Jensen après décontamination des produits pathologiques. Il est fondamental de considérer que la croissance des colonies sur ce milieu après incubation n'est pas systématiquement synonyme de la présence de BK. Avant de conclure, il est nécessaire de procéder à un certain nombre de tests biochimiques d'identification qui permettent de reconnaître une mycobactérie tuberculeuse d'autres non tuberculeuses [49, 124].

I.1.e- Diagnostic sérologique

La place de la sérologie dans le diagnostic de la tuberculose est très controversée [54, 163]. Cependant, elle peut être d'un apport supplémentaire dans plusieurs formes de tuberculose, plus particulièrement, extrapulmonaire (miliaires, méningites) et dans les primo-infections [204]. La spécificité et la sensibilité de cette méthode dépendent de la nature des antigènes utilisés [6, 164, 246]; le plus utilisé est l'antigène A60 [90].

I.1.f- Diagnostic par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La lenteur de croissance des mycobactéries ne permet pas la réalisation d'un diagnostic rapide des infections dues à ces germes. Récemment, une technique nouvelle basée sur l'utilisation de sondes spécifiques, a été appliquée au diagnostic des infections mycobactériennes. La technique d'amplification d'ADN ou PCR consiste à traiter l'échantillon clinique afin d'extraire l'ADN mycobactérien [96], qui sera ensuite amplifié *in vitro* lors d'une succession de cycles de température en présence de couples d'amorces spécifiques [2, 112, 174].

Actuellement, plusieurs travaux rapportent l'utilisation de la PCR dans le diagnostic rapide de la tuberculose [3, 109, 117, 137, 138, 233] avec une sensibilité et une spécificité variables entre 80 et 100%.

I.2- La tuberculose et le SIDA

Le réservoir naturel de *M.tuberculosis* est l'espèce humaine. L'éradication de la tuberculose est donc un objectif possible dans un avenir à moyen terme. Cependant, cette vision optimiste s'est assombrie à cause, entre autres, de l'avènement du SIDA qui a aggravé la situation même dans les pays développés puisqu'on constate une recrudescence spectaculaire des infections tuberculeuses [32,145]. En outre, nombre d'espèces saprophytes et commensales sont devenues pathogènes (dites espèces opportunistes, atypiques ou potentiellement pathogènes) chez les personnes immuno-déprimées. On constate que, parmi les infections mycobactériennes, celles dues à des mycobactéries atypiques peuvent être impliquées dans plus de 50% des cas [32, 80, 145, 166, 187], alors qu'elles représentaient avant l'apparition du SIDA 5 à 10% des cas de tuberculose [30, 108, 254]. Plusieurs espèces des mycobactéries atypiques ont été fréquemment isolées chez les patients infectés par le virus VIH [4, 30, 28, 86, 259, 261].

L'infection à VIH peut entraîner la réaction d'une infection tuberculeuse latente ou favoriser la progression rapide de nouvelles infections chez les séropositifs. L'incidence de la tuberculose chez les malades sidéens est environ 500 fois plus élevée que chez la population générale [197].

Aux Etats-Unis, 4,3% des malades sidéens ont une association VIH/TB. Dans certains pays d'Afrique, la prévalence de la tuberculose chez les patients VIH positifs varie entre 30 et 89%. Entre 80 et 90% de

ces mycobactérioses sont dues aux complexe MAC (*M. avium* intracellulaire); 3 à 7% d'entre elles sont dues à *M. kansasii* [88].

Au Maroc, le nombre de cas de SIDA déclaré jusqu'au 1996 est de 434. Plus de 70% de ces sujets développent une tuberculose au cours de leur maladie. La tuberculose, dans ces cas, est difficilement traitable du fait de la multirésistance; elle est généralement mortelle.

La prise en charge des malades VIH/TB doit faire l'objet de suivi régulier et rigoureux. Les problèmes de tolérance aux antibiotiques de première ligne sont fréquents chez ces malades (20%), ce qui peut être à l'origine des irrégularités dans la prise des antibiotiques et de favoriser la résistance acquise aux antibiotiques [162]. Une modification et une adaptation de la thérapie chez ce groupe de patient est alors nécessaire [89, 191]. La prophylaxie primaire chez les sidéens a montré son efficacité dans plusieurs études [224].

I.3- Traitement de la tuberculose

La monothérapie à la Streptomycine favorisa la résistance à cet antibiotique durant les années 50 [121] ce qui a incité à la recherche d'autres antituberculeux.

Actuellement, six médicaments sont recommandés [255] et constituent la base des traitements. Leur activité est variable selon le statut métabolique et le type de la population bacillaire.

Quatre sont bactéricides : l'isoniazide, la rifampicine, la streptomycine et la pyrazinamide (bactéricide sur les bacilles en environnement acide). Deux, ne sont que bactériostatiques et sont des médicaments d'appoint : l'éthambutol et le thiosemicarbazone (utilisé surtout dans les pays en voie de développement, en raison de son faible prix).

I.4- La résistance du bacille de la tuberculose et ses conséquences

Comme les autres bactéries, le bacille de la tuberculose est capable d'acquérir une résistance aux différentes drogues antibacillaires. Ce phénomène est fondamental pour la conduite des traitements.

I-4-a Résistance à la rifampicine

La rifampicine est un antibiotique à large spectre d'action agissant sur les populations extra et intracellulaires. La résistance à cet antibiotique entraîne une sélection de bacilles résistants aux autres antituberculeux du régime thérapeutique court. La résistance à la rifampicine constitue donc un bon paramètre pour évaluer la résistance au traitement en général [46]. La rifampicine, antibiotique fortement bactéricide, inhibe la transcription de l'ADN en interagissant avec l'ARN polymérase, enzyme multimérique impliquée dans la transcription et donc indispensable à la vie de la bactérie. La proportion des mutants résistants dans une population bacillaire normale est d'environ 1 pour 10^7 pour la rifampicine [76].

I-4-b Résistance à l'isoniazide

L'isoniazide est un antibacillaire bactéricide, il agit efficacement sur *M. tuberculosis* et *M. bovis* à des concentrations faibles de 0,02 à 0,2 µg/ml [65]. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme d'action de l'isoniazide : il semble que ce dernier, après sa diffusion dans le cytoplasme d'une souche sensible, soit activé par l'enzyme catalase peroxydase. Sa forme activée inhibe le processus de synthèse des acides mycoliques de la paroi. Les premières études sur la résistance à l'isoniazide notaient une corrélation entre la résistance et la perte ou l'atténuation de l'activité catalase-peroxydase. En plus, il a été observé une perte de la coloration Ziehl-Neelsen après traitement par l'isoniazide [253]. La proportion des mutants résistants dans une population bacillaire normale est

d'environ 1 pour 10^5 pour l'isoniazide [76]. Cette mutation affecte, entre autres, le gène isoniazide A codant pour l'enzyme isoniazide A impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques.

I-4-c Résistance à la streptomycine

L'activité antibactérienne de la streptomycine et des aminoglycosides chez *M. tuberculosis* est due à l'inhibition et l'élongation de la traduction [170, 186]. Le mécanisme de résistance à cet antibiotique chez *M.tuberculosis* est décrit par Douglas [72]; La mutation touche le gène codant pour la protéine ribosomale S12 entraînant des substitutions en aminoacides [123], d'autres mutations touchent le locus rrs codant pour l'ARN ribosomale 16S [189].

La proportion des mutants résistants dans une population bacillaire normale est d'environ 1 pour 10^5 pour la streptomycine [76].

I-4-d Résistance à la pyrazinamide

La pyrazinamide agissant efficacement sur les bacilles intracellulaires (milieu acide) entraîne probablement la production d'un dérivé toxique [129, 234].

La résistance à la pyrazinamide est aussi d'origine génétique [104].

I-4-e Résistance à l'éthambutol

L'éthambutol agit sur la synthèse des polysaccharides de la paroi par inhibition de l'enzyme arabinosyl transférase qui permet la polymérisation d'arabinose avec l'arabinogalactane. La résistance à l'éthambutol est due soit à une surexpression de l'enzyme par mutation du gène responsable soit à un défaut de régulation de l'expression du gène par absence du régulateur. Une autre hypothèse suppose que la résistance à l'éthambutol résulte du changement de perméabilité de la paroi [26].

La proportion des mutants résistants dans une population bacillaire normale est d'environ 1 pour 10^6 pour l'éthambutol [76].

I.4.f- Résistance aux fluoroquinolones

Dérivé de l'acide nalidixique, à large spectre, agissant par inhibition de l'activité de l'ADN gyrase. Les quinolones ont montré leur efficacité contre les mycobactéries [66, 245] à des CMI $< 1\mu\text{g/ml}$. La résistance aux quinolones chez *M.tuberculosis* est due, comme chez les autres bactéries, à des mutations au niveau du gène *gyrA* [26].

I.5- Prévention

L'émergence de souches résistantes étant la conséquence directe de la sélection par les antibiotiques des mutants présents dans les populations bacillaires, il importe de respecter scrupuleusement dans la prescription de ces drogues certaines règles permettant d'éviter cette sélection : la résistance peut en effet être prévenue, son développement est la conséquence d'erreurs thérapeutiques.

Ce qu'on a exposé ci-dessus montre en effet que, dans une lésion riche en bacille, une monothérapie sera suivie inéluctablement de la sélection d'une souche résistante. Par contre, la prescription de deux antibiotiques réduit considérablement cette possibilité, si du moins la souche infectante est " normale " .

En raison de l'indépendance des mutations, il est peu probable qu'il existe un mutant double.

Il est évident toutefois que la prescription de deux antibiotiques n'est pas forcément efficace. Si la souche comporte un nombre plus élevé de mutants, la prescription de deux antibiotiques peut être insuffisante, d'où le traitement standard actuel comportant systématiquement d'emblée une

triple association (isoniazide + rifampicine + éthambutol en général) ou même quadruple (avec en plus la pyrazinamide) puisqu'on ne peut attendre la réponse de l'antibioGramme qui demande plusieurs semaines.

Au Maroc, une étude conduite au laboratoire de l'institut Pasteur de Casablanca entre 1992 et 1994, a montré un taux de résistance primaire de 24%. 15% des souches isolées étaient résistantes à un seul antibiotique, et 9% résistantes à deux antibiotiques ou plus. Le taux de tuberculose multirésistantes est faible, il a été estimé à 0,5% [77, 78]. Chez les patients chroniques marocains, 77% des souches isolées sont multirésistantes.

I.6- Classification et nomenclature des mycobactéries

Les bactéries du genre *Mycobacterium* [131] appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des *Actinomycétales* et classe des Schizomycètes. Le genre *Mycobacterium* regroupe plusieurs espèces. Sa classification repose sur trois critères : propriétés d'acido-alcoolo-résistance des bacilles, composition en acides mycoliques et richesse en guanine-cytosine (% CG) [187, 248].

I.6.a Caractères bactériologiques

Les mycobactéries se présentent sous forme de petits bacilles fins de 0,2 à 0,6 μm de large sur 1 à 10 μm de long, légèrement incurvé, immobiles, acapsulés et aérobies [49, 140, 190].

Les espèces de mycobactéries ont les mêmes caractéristiques tinctoriales, sont capables de produire la même réaction cutanée et génèrent des lésions histologiques comparables à celles causées par le bacille de Koch [55]. Bien qu'ayant la structure générale des bactéries à Gram positif, les mycobactéries sont difficilement colorables par les colorants usuels. Mais colorées par la fuchsine phéniquée à chaud selon la méthode de Ziehl

Neelsen, elles retiennent le colorant malgré l'action combinée des acides dilués et de l'alcool (Acido-Alcool-Résistance) et apparaissent alors comme de fins bâtonnets rouges. Colorées par l'auramine phéniquée, elles deviennent fluorescentes sous l'influence de la lumière UV [37, 68, 73, 140].

L'acido-alcool-résistance est liée à la présence, dans la paroi des mycobactéries, de lipides particuliers : acides mycoliques.

Les mycobactéries se caractérisent par des mycolates de très longues chaînes, de 60 à 90 atomes de carbones, des acides gras à longues chaînes carbonées α ramifiés β hydroxylés liés au peptidoglycane et l'arabinogalactane constituant une barrière hydrophobe [55]. Ces acides gras présentent une variation selon le genre mycobactérien.

Au microscope électronique, la paroi de mycobactérium (*M.tuberculosis*) épaisse de 10 à 20 nm, apparaît constituée de quatre couches différentes. Au-delà de la membrane cytoplasmique, existe une couche interne qui correspond au peptidoglycane, puis viennent trois couches dont les deux internes contiennent des éléments ayant l'apparence de cordage de plus en plus denses et enchevêtrés à mesure que l'on se rapproche de la surface de la bactérie. La couche est faite d'éléments enrubannés. La structure globale de la paroi des mycobactéries est donc similaire à celle des bactéries Gram positif, qui est caractérisée par plusieurs couches de peptidoglycane et par l'absence de membrane externe. La spécificité des mycobactéries réside dans l'épaisseur et la nature de la couche externe de la paroi (voir schéma de Mc Neil) [157].

I.6.b- Facteurs de virulence chez les mycobactéries : (*Mtuberculosis*)

La virulence est liée à la capacité du bacille à survivre et à se multiplier à l'intérieur des macrophages de l'organisme hôte. Ses facteurs chez *M. tuberculosis* sont de trois types : 1-Cord factor, 2-Sulfatide et 3-Mycosides. Chacun de ces facteurs est localisé au niveau de la couche externe de la paroi [192, 193], donc on peut conclure que la paroi est le support moléculaire des ennuis causés par ces bactéries, dont les formes pathogènes représentent un risque meurtrier pour les espèces humaines et animales ce qui préoccupe tous les chercheurs du domaine.

I.7- Les mycobactéries atypiques

Ces mycobactéries apparaissent comme des saprophytes, extrêmement répandues, rencontrées dans le sol (fumier), les eaux usées, certains aliments (lait, végétaux) [179, 185]. Ce sont des commensaux de l'homme, elles peuvent être les agents de mycobactérioses, maladies proches de la tuberculose, mais d'évolution généralement plus bénigne. Ils sont généralement peu ou pas contagieuses.

Certaines de ces mycobactéries sont responsables de la mycobactériose chez les individus immunodéprimés. En plus de la rapidité de croissance, les mycobactéries atypiques présentent un certains nombre de caractères biochimiques différents des autres qui permettent leur identification [207] (tableaux A et B).

I.8- La lèpre

Bien que la lèpre soit connue depuis la plus haute antiquité, qu'elle ait été reconnue dans tous les continents et que son agent étiologique, *Mycobacterium leprae* (synonyme : bacille de Hansen, bacille lépreux) ; ait été découvert par Hansen à Bergen en Norvège en 1873 [197, 249], elle reste encore à de nombreux égards une maladie mystérieuse. Jusqu'à aujourd'hui, en effet, aucun micro-organisme ayant des caractéristiques morphologiques, biochimiques, immunologiques et de pouvoir pathogène comparables à celles du bacille de Hansen n'a été cultivée sur milieu artificiel [58, 60], donc, toutes les tentatives de mise en culture *in vitro* de cet agent pathogène ont été infructueuses.

Mycobacterium leprae est un parasite strict de l'espèce humaine. Aucun animal, même familier de l'homme, n'est naturellement infecté. Toutefois, la découverte, en 1975, de l'infection du Tatou [223, 250] puis celle du singe Mangabey [159], conduit à reconsidérer la notion de parasitisme strict pour l'homme de ce micro-organisme .

La découverte d'antibiotiques efficaces tels que le Dapasone (DDS) en 1943, le chlorfazimine en 1962 et la rifampicine en 1967 est à l'origine de la mise au point du traitement de la lèpre.

Tableau A : Caractéristiques des Mycobactéries atypiques par rapport aux autres Mycobactéries [88].

	Mycobactéries atypiques	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
Ecologie	Ubiquitaire	Parasite strict	Parasite strict
Rongeurs	Non pathogène ^a	Pathogène	Pathogène
Maladie	Opportunistes	Tuberculose	Lèpre
Antibiotiques antituberculeux	insensibles	sensible	Sensible ^b

a : A l'exception de *M.avium*, *M.marinum* et *M.ulceran*.

b : En particulier à la rifampicine et aux thionamides (éthionamide, protionamide)

Tableau B : Classification des mycobactéries atypiques [207]

Groupe I	Mycobactéries photochromogènes	Croissance lente (plusieurs semaines), colonies non pigmentées, pigmentation jaune-orange après exposition à la lumière.
Groupe II	Mycobactéries scotochromogènes	Croissance lente, colonies pigmentées en jaune-orange même si la croissance a lieu à l'obscurité.
Groupe III	Mycobactéries non photochromogènes	Croissance lente, colonies habituellement non pigmentées, mais possibilité d'accumulation de pigments dans des cultures âgées
Groupe IV	Mycobactéries à croissance rapide	Croissance rapide, colonies visibles en moins de 7 jours.

Représentation schématique de la paroi des mycobactéries d'après Mc Neil et Breenan (1991).

II- Matériels et méthodes

II.1- Les micro-organismes étudiés

Nous avons choisi d'étudier l'effet des HE sur des mycobactéries atypiques à croissance rapide (48h), non pathogènes, pris comme un modèle de mycobactéries. Il s'agit de :

- *Mycobacterium phlei*

- *Mycobacterium fortuitum*

Ces deux bactéries sont isolées, purifiées et identifiées au laboratoire du département de Virologie, Immunologie et Maladies infectieuses à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat.

II.2- Les agents antibactériens testés

II.2.i- Les huiles essentielles et leurs constituants

Dans cette étude, on a utilisé l'huile essentielle de thym qui est parmi les huiles essentielles fortement bactéricides, l'huile essentielle de romarin et l'huile essentielle d'armoise (voir monographie p: 20, 21, 22).

Parmi les constituants majoritaires phénoliques utilisés à l'état pur : le carvacrol, le thymol, l'eugenol sont respectivement les composés majoritaires de l'origan, du thym et du girofle.

Deux autres composés sont également utilisés : la carvone et l'isopulegol.

II.2.ii- Les antibiotiques

Les antibiotiques utilisés sont : l'isoniazide, la rifampicine et la tétracycline.

II.3- Formules chimiques

Les formules chimiques du carvacrol, du thymol, de l'eugenol, de la carvone et de l'isopulegol, ainsi que celles des antibiotiques testés sont présentées dans les planches II.3.1, II.3.2 et II.3.3:

II.4- Les milieux de culture

Le milieu 7H9 (annexe p : 154) est utilisé pour les cultures mères et pour la conservation des souches.

Le milieu de Muller Hinton (liquide et solide) (Difco, USA), et le milieu LB ont été utilisés pour la détermination des CMI et des CMB des HE, de leurs composés à l'état pur et des ATB.

II.5- Préparation des bactéries

A partir d'une culture de *M. phlei* et de *M. fortuitum* sur milieu 7H9, on prélève 100 µl de suspension bactérienne qu'on ensemence dans 10 ml du milieu Muller Hinton liquide ou sur boîte de Petri contenant une gélose de Muller Hinton.

Après 48 heures d'incubation, on constate une bonne croissance des mycobactéries. On vérifie la culture par l'absorbance à 650 nm et on vérifie l'absence des contaminants par la réalisation des frottis colorés par Ziehl Neelsen et par l'auramine.

II.6- Lavage des mycobactéries

La culture bactérienne obtenue après 48 heures d'incubation est centrifugée à 400g pendant 25 minutes, le surnagent est éliminé et le culot bactérien est remis en suspension dans un volume de tampon phosphate PBS stérile (annexe p : 154) égale au volume initial de la culture bactérienne. La suspension ainsi obtenue est dite suspension lavée. L'acido-alcool-résistance des cellules lavées a été vérifiée après lavage.

II.7- Test de fixation des HE sur les mycobactéries

Pour vérifier l'adsorption des huiles essentielles et de leurs constituants sur les mycobactéries, des suspensions bacillaires lavées sont traitées pendant 20 minutes par une concentration subinhibitrice à 0,04% d'HE de thym, puis centrifugées à 12000g pendant 2 minutes.

L'absorbance à 280 nm du surnagent est mesurée en comparaison avec des suspensions d'HE centrifugées de la même façon sans contact préliminaire avec les bactéries.

II.8- Examens optiques

La vérification microscopique s'effectue après coloration. Les méthodes de coloration utilisées sont basées sur la propriété tinctoriale caractéristique des mycobactéries : l'acido-alcool-résistance .

II.8.i- Préparation des frottis

La suspension bactérienne (1 ml) est centrifugée à 12000g pendant 5 minutes. Le culot obtenu est étalé en couche mince sur les deux tiers de la lame de verre, le frottis est ensuite séché puis fixé avant coloration.

II.8.ii- Technique de coloration de Ziehl Neelsen [38, 161]

1^{er} temps :

- Coloration : recouvrir la lame en totalité de fuchsine phéniquée, chauffer doucement, laisser agir pendant 5 minutes.

2^{ème} temps :

- Décoloration : laver immédiatement la lame à l'eau courante et la recouvrir avec le mélange " acide-alcool ", laisser agir 3 minutes.

3^{ème} temps :

- Contre coloration : laver à l'eau courante, recolorer le frottis pendant une minute par la solution de bleu de méthylène.

4^{ème} temps : Observation microscopique

Après séchage des lames colorées, elles sont examinées au microscope optique à différents grossissements.

A fort grossissement (objectif 100) et avec une goutte d'huile d'immersion, les observations sont photographiées.

II.8.iii- Coloration à l'Auramine [161]

L'une des variantes de la coloration de Ziehl Neelsen la plus couramment utilisée est la coloration par les fluorochromes (auramine). C'est une méthode de coloration (méthode de Dégommier), au terme de laquelle les bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) apparaissent fluorescents sur un fond sombre. La lecture s'effectue à l'aide d'un microscope à épifluorescence dans une pièce sombre et en lumière ultra violette (UV). Les mycobactéries intactes apparaissent fluorescentes. Cette technique permet la mise en évidence d'un plus grand nombre de BAAR et une exploration plus rapide du frottis (3 minutes à faible grossissement). Elle permet d'éliminer très rapidement les lames négatives ou contaminées. Un résultat positif par cette méthode doit toutefois toujours être confirmé par la méthode classique de Ziehl Neelsen. On note bien qu'un frottis coloré à l'auramine peut être recoloré par la technique de Ziehl Neelsen. La méthodologie des différentes colorations et la préparation des colorants sont citées dans l'annexe (annexe p : 156).

II.9- Détection de l'activité antimicrobienne des HE, de leurs constituants et des ATB

Plusieurs techniques ont été mises au point pour cette détection, la plupart d'entre elles sont basées sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans les milieux de culture liquide ou solide pour inhiber la croissance des micro-organismes testés.

II.9.i- Les émulsions des huiles essentielles

Les HE et leurs constituants à l'état pur sont dispersés en présence d'agar agar 0,2% selon la méthode décrite par Remmal et coll. [199] : l'émulsion mère des huiles essentielles est de 10%, préparée en ajoutant 100 µL d'HE ou de constituant majoritaire à 900 µL d'une

solution aqueuse stérile de 0.2% (w/v) d'agar agar. Les concentrations finales des agents antibactériens étudiés (0,02% (v/v) à 0,1% (v/v)) sont obtenues par addition de volumes variables d'HE à partir de la solution mère (10%) au milieu de culture.

II.9.ii- Traitement en milieu solide (test préliminaire)

La boîte de Petri est préalablement ensemencée en surface par une suspension fraîche de mycobactéries (culture de 48 heures), puis on procède à l'aménagement de cavités à l'emporte-pièce stérile dans le milieu gélosé coulé et solidifié en boîte. On remplit ces cavités d'un volume de 100µl d'HE ou d'ATB (concentration élevée) qui va diffuser dans la gélose et on procède après incubation à l'observation des diamètres d'inhibition.

II.9.iii- Traitement en milieu liquide

II.9.iii.a- L'inoculum

A partir d'une suspension bactérienne de 48h, on prélève 50 µl, qui seront inoculés dans chaque tube contenant des concentrations variables d'HE ou d'ATB en milieu de Muller Hinton.

II.9.iii.b- Traitement des mycobactéries par les ATB

A partir des solutions mères préalablement préparée de chaque antibiotique testé, on prépare une gamme de concentrations allant de faibles concentrations à des concentrations reconnues bactéricides pour *M.tuberculosis* (1 à 4 µg/ml pour l'INH et des concentrations ≥ 1 µg/ml pour la rifampicine)

II.9.iii.c- Test de croissance des mycobactéries en présence de concentrations croissantes en HE

A partir d'une émulsion à 10%, stable et homogène d'HE ou de constituant pur, un volume variable en fonction de la concentration finale désirée (0,02% à 0,1%) est prélevé et ajouté au milieu de culture de Muller Hinton, qui ensuite inoculé par la suspension bactérienne (50 µL). Les

tubes sont bien agités et incubés à 37°C. Un tube témoin ne contenant pas d'agent antimicrobien est réalisé (tube témoin de croissance et de contamination).

Quarante huit heures plus tard, la croissance des bactéries est observée chez le témoin à l'œil nu grâce à la turbidité et la floculation des bactéries. La pureté des cultures bactériennes est vérifiée par coloration au Ziehl Neelsen. Les tubes contenant les différentes concentrations en HE ou en ATB sont observés de la même façon. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la plus faible concentration d'HE à laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil [98, 256]. Une fraction de 50 µl des tubes à croissance nulle est aseptiquement transférée dans des tubes contenant 4 ml du milieu stérile, ainsi la quantité d'HE contenue dans 50µl sera diluée 80 fois pour éviter le "carry over". Après 48 à 72h d'incubation, les tubes sont examinés. En cas de non croissance, les tubes à partir desquelles la fraction de 50 µl a été prélevée sont considérés comme contenant une concentration minimale bactéricide d'HE (CMB). Ainsi, la CMB est définie par la plus faible concentration ayant donnée 100% de bactéries non viables [37, 73]. La détermination des CMI et des CMB des ATB a été réalisée de la même façon.

La croissance bactérienne en présence de concentrations croissantes d'HE est aussi mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 650nm.

II.9.iii.d- Test de coloration après traitement des germes par HE ou par ATB

Le protocole appliqué dans cette étude est celui de l'Institut Pasteur [161]. On réalise 2 à 3 frottis sur lames à partir du tube témoin (culture non traitée) pour vérifier la croissance et la pureté de la souche.

Deux à trois frottis sont aussi réalisés à partir des tubes tests à concentration inhibitrice et à concentration bactéricide. Les tubes à croissance inhibée ont été centrifugés afin de concentrer les cellules de l'inoculum dans le culot d'où on prélève le frottis de coloration.

Les deux types de coloration (Ziehl Neelsen et auramine) déjà décrits sont utilisés pour cette vérification.

II.10- Mesure de la lyse bactérienne par la DO_{260} du milieu d'incubation

Pour apprécier la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm, une suspension de bactéries lavées est traitée par des concentrations inhibitrices et bactéricides d'HE ou de leurs composés phénoliques, par des concentrations fortes d'isoniazide ($>2\mu\text{g/ml}$) et de rifampicine ($>1\mu\text{g/ml}$) pendant une heure et demie. Des tests préliminaires de cinétique nous ont permis de choisir cette durée. Les tubes eppendorffs sont ensuite centrifugés pendant 2 minutes, à 4°C et à 12 000g. Ensuite, le surnagent est prélevé, dilué dans du PBS puis mis dans une cuve en quartz pour lire son absorbance à 260 nm. Le réglage du zéro est réalisé par le surnagent du tube "deux minutes" centrifugé aussitôt après le contact des agents antibactériens avec les bactéries [205].

Ce test est suivi de l'extraction et de la purification des acides nucléiques (pour les tests des antibiotiques, l'incubation a duré 24 heures).

II.11- Lyse des mycobactéries

II.11.i- Méthode de lyse classique

Cette technique a été utilisée pour réaliser le témoin positif de lyse [10, 151, 168].

Protocole expérimental :

- 1- Inoculer les souches dans le milieu de culture solide, incubé à 37°C jusqu'à apparition de colonies.
- 2- Transférer un amas de colonies dans des eppendorffs contenant 500 µl de 1xTE
- 3- Chauffer 20 min à 80°C avec agitation. Rapporter à température ambiante.
- 4- Ajouter 50 µl de lysozyme (10 mg/ml). Mélanger doucement, incubé à 37°C pendant 1 heure et demi avec agitation.
- 5- Ajouter 75 µl du mix (10% SDS / Protéinase K). Mélanger doucement et incubé minimum 15 min à 65°C.
- 6- Ajouter 100 µl de NaCl (5M) + 100 µl d'une solution de CTAB/NaCl, solution préchauffée à 65°C. Bien mélanger jusqu'à apparition de couleur blanche. Incuber 15 min à 65°C.
- 7- Ajouter un volume égal (750 µl) de chloroforme/isoamyl-alcool (24 / 1 ; v/v). Mélanger doucement pendant 10 secondes. Centrifuger à température ambiante pendant 5 min à 12000g .
- 8- Transférer le surnagent (en quantité de 180 µl) dans des eppendorffs frais et bien propres.
- 9- Ajouter 500 µl d'isopropyl. Mélanger doucement, placer à -20°C pendant au moins 30 min.
- 10- Centrifuger pendant 15 min à température ambiante.
- 11- Éliminer la grande partie du surnagent. Laisser à peu près 20 µl.
- 12- Ajouter 1 ml d'éthanol froid à 70%. Faire tourner doucement le tube plusieurs fois.
- 13- Centrifuger à 12 000g pendant 5 min à température ambiante. Éliminer le surnagent, laisser à peu près 20 µl.

14- Centrifuger à 12000g pendant 1 min. Eliminer soigneusement les derniers 20µl du surnagent à l'aide d'une micro pipette (P-20). Bien s'assurer que toute trace d'éthanol est éliminée.

15- Laisser sécher le culot pendant 15 à 20 minutes à température ambiante.

16- Redissoudre le culot dans 20 µl de 1xTE (l'ADN peut être conservé à -20°C pour utilisation ultérieure).

Remarque : Si la culture est en milieu liquide, on prélève 1,5 ml en phase de croissance, on chauffe à 80°C pendant 20 min pour tuer les cellules, on centrifuge à 12000g on élimine le surnagent puis on re-suspend le culot dans 500 µl de 1xTE. Le protocole de lyse commence donc à partir de l'étape 2. La préparation des différents réactifs de lyse est notée dans annexe (p : 154-155).

II.11.ii- Méthode de lyse par les HE

1,5 ml de la culture mycobactérienne en phase de croissance en milieu Muller Hinton est centrifugée à 12 000g pendant 5 minutes. Le surnagent est stérilement éliminé. Le culot est re-suspendu dans un volume de 1 ml du tampon PBS stérile additionné par des volumes variables d'HE selon la concentration finale désirée (0,025% à 0,1%). Les suspensions traitées sont incubées pendant 90 min à 37°C. Une forte concentration d'isoniazide (2 µg/ml) a été aussi appliquée dans ce test pour comparer son effet à celui des HE. Après l'incubation, le protocole d'extraction commence à partir de la 6^{ème} étape .

II.12- Electrophorèse sur gel d'agarose.

0.2g d'agarose sont ajoutés à 25 ml de tampon TAE (annexe p : 154), l'ensemble est chauffé jusqu'à dissolution des grains d'agarose, puis coulé dans la cuve d'électrophorèse.

Après solidification du gel, celui-ci est immergé dans une solution de TAE contenant 0.5 µg/ml de bromure d'éthidium (tampon d'électrophorèse). Ensuite, 8 µl de la solution d'acide nucléique sont mélangés avec 2 µl d'une solution de bleu de bromophénol-glycérol, puis déposés au niveau des puits du gel d'électrophorèse. Le glycérol permet d'augmenter la densité de l'échantillon facilitant ainsi son dépôt dans le puits, tandis que le bleu de bromophénol constitue le témoin de migration permettant d'estimer la distance parcourue par l'échantillon. La migration s'effectue sous un courant de 50 volts pendant environ 120 minutes. Puis, le gel est rincé excessivement à l'eau distillée

Le complexe acide nucléique-bromure d'éthidium est visualisé sur un gel transilluminateur à UV, pour visualiser les bandes d'ADN dont les poids moléculaires sont estimés en utilisant "DNA Molecular Weight Marker II (0.12-23.1 kbp)" (Boehringer Mannheim GmbH Germany) comme marqueur de taille (annexe p : 159).

II.13- Effet de l'association des huiles essentielles et des antibiotiques sur la croissance des mycobactéries

II.13.i- Concentrations infra inhibitrices

En se basant sur les résultats obtenus dans le test de la détermination des CMI et des CMB des HE, de leurs constituants phénoliques et de celles des ATB, on a choisit le thymol (0,03%) , le carvacrol (0,03%), l'INH (2µg/ml), la rifampicine (1µg/ml) et la tétracycline (4µg/ml).

II.13.ii- Préparation de la culture mycobactérienne

Mycobacterium phlei et *Mycobacterium fortuitum* sont cultivées dans 10 ml de milieu de Muller Hinton, incubées à 37°C pendant 24 heures jusqu'à une densité optique $DO_{650} = 0,25$. La culture résultante est

aseptiquement répartie dans des tubes eppendorffs à raison de 1 ml par tube.

II.13.iii- Protocole expérimental en milieu liquide

Dans les tubes contenant les cultures bactériennes, on distribue des volumes de thymol ou de carvacrol à partir de la suspension mère (10%), afin d'obtenir une concentration finale de 0,03% et un volume d'ATB pour obtenir 2µg/ml de l'INH, 1 µg/ml de la rifampicine et 4 µg/ml de la tétracycline. Le tube témoin est préparé en ajoutant la solution stérile de 0,2% d'agar pour stabiliser un même volume. A des intervalles de temps différents, la croissance est déterminée par mesure de la densité optique à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre .

II.13.iv- Protocole expérimental en milieu solide

Le test d'association d'HE et d'ATB est également réalisé en milieu gélosé par la méthode des puits. Les concentrations infra inhibitrices (0,03%) pour le carvacrol et le thymol, ainsi que celles des antibacillaires (2µg/ml pour l'INH et 1µg/ml pour la rifampicine) appliquées seules en milieu solide donnent des tapis bactériens.

Ce test d'association a été également réalisé avec un ATB qui n'est pas prescrit pour les mycobactérioses, c'est la tétracycline qui inhibe la synthèse des protéines chez les bactéries. La tétracycline a été utilisée dans cette étude pour essayer d'expliquer et d'interpréter le mode d'action des huiles essentielles.

Après incubation à 37°C pendant 48 heures, on procède à l'observation des auréoles d'inhibition autour du puits de dépôt.

III- Résultats

III.1- Test de fixation des HE sur les mycobactéries

La fixation des HE ou de leurs constituants purs par les mycobactéries est estimée par comparaison de leur absorbance à 280 nm, dans le surnageant après contact ou non avec les bactéries.

Pour ce test, on a travaillé avec des densités bactériennes différentes : à partir d'une culture mère, de dilutions au 1/10, et au 1/100 de cette culture mère, tout en utilisant les tubes les tubes témoins sans bactéries.

Les tableaux III.1a et III.1b montrent des différences très significatives et importantes dans l'absorbance des HE ou de leurs constituants après centrifugation après contact avec des densités différentes de cellules ou en absence complète des cellules mycobactériennes.

Table III.1a: Résultats du test de fixation des HE et de leurs constituants sur *M. phlei*.

	Absorbance à 280 nm	
	Avant contact avec les bactéries**	Après contact avec les bactéries
Thymol ¹	0,70 ± 0,10	0,38 ± 0,07*
Carvacrol	0,65 ± 0,10	0,32 ± 0,07*
Eugenol	0,78 ± 0,05	0,28 ± 0,06*
Carvone	0,65 ± 0,07	0,27 ± 0,07*
Isopulegol	0,75 ± 0,10	0,25 ± 0,07*
HE de thym	0,85 ± 0,10	0,32 ± 0,05*
HE de romarin	0,78 ± 0,05	0,28 ± 0,06*
HE d'armoise	0,65 ± 0,07	0,27 ± 0,07*

* Différences significatives (p<0.0001, test de Student)

¹ Les HE et leurs constituants majoritaires ont été utilisés à la dilution infra-inhibitrice 0,025%.

** nombre de bactéries : culture mère diluée au 1/10.

Table III.1b : Test de fixation des HE ou de leurs constituants sur *M. phlei* en fonction de la densité des suspensions bactériennes par la mesure de la DO₂₈₀.

	Densité bactérienne	
	Dilution 1/100	Culture mère
HE de thym ¹	0,48 ± 0,06	0,35 ± 0,01**
Eugenol	0,40 ± 0,04	0,30 ± 0,04**
Carvacrol	0,33 ± 0,03	0,25 ± 0,03**
Thymol	0,30 ± 0,06	0,23 ± 0,07*

¹ Les HE et leurs constituants majoritaires ont été utilisés à une concentration infra-inhibitrice (0,025%)

** Différences significatives (p<0,0001, test de Student)

* Différences significatives (p<0,01, test de Student)

III.2- L'inhibition des mycobactéries en milieu gélosé

Les photos III.2a, III.2b, III.2c montrent des auréoles d'inhibition bien apparentes autour des puits de dépôt des huiles essentielles.

Ces photos représentent *Mycobactérium fortuitum* traitée respectivement par le thym, le thymol et le carvacrol en milieu Muller Hinton gélosé.

Les autres HE et les constituants phénoliques ont montré des résultats similaires avec les deux espèces de mycobactérie testées. Les témoins sans traitement ont donné des tapis bactériens.

Les antibiotiques utilisés à la concentration choisie (entre 1 et 2 µg/mL pour l'isoniazide et 1 µg/mL pour la rifampicine) n'ont montré aucune auréole d'inhibition.

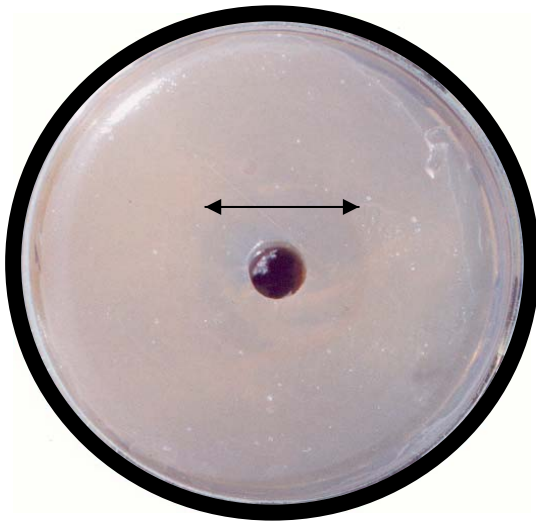


Photo III.2.a : *Mycobacterium . fortuitum* traité par le carvacrol (0,1%)

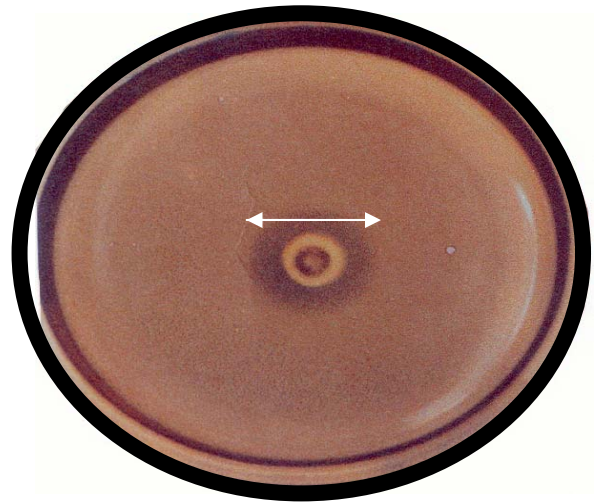


Photo III.2.b: *Mycobacterium . fortuitum* traité par le thymol (0,1%)

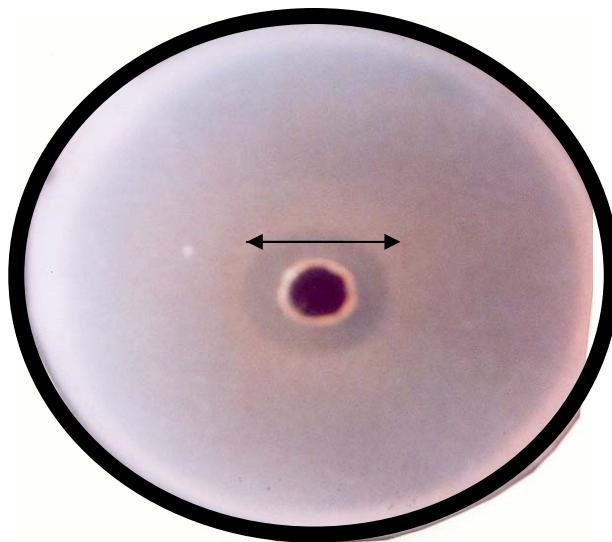
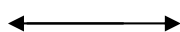


Photo III.2.a : *Mycobacterium . fortuitum* traité par l'HE de thym (0,1%)



La double flèche indique l'auréole d'inhibition

Le milieu de culture préconisé dans le traitement des mycobactéries par les antibiotiques est Muller Hinton liquide et solide.

III.3- CMI et CMB des HE, des constituants à l'état pur et des antibiotiques en milieu liquide.

La détermination des CMI et des CMB nous permet d'évaluer l'activité antimicrobienne des HE et de leurs constituants majoritaires à l'état pur.

Les tableaux III.3.a et III.3.b montrent, les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides des huiles essentielles et des composés majoritaires des huiles essentielles à l'état pur vis à vis de *M. fortuitum* et *M. phlei*.

Les deux types de mycobactéries atypiques n'ont montré aucune inhibition de croissance en présence d'ATB à la concentration choisie. Ces concentrations sont reconnues bactéricides pour *M. tuberculosis*.

L'effet des HE et de leurs constituants sur la croissance de *Mycobacterium fortuitum* ou sur *M. phlei* est aussi évalué par la mesure de l'absorbance à 650 nm, après 48 heures d'incubation en présence de concentrations croissantes d'HE. Les résultats sont présentés dans les figures III.3.c, III.3.d et III.3.e.

L'étude de l'effet des antibiotiques sur la croissance des espèces avait pour but de déterminer une concentration infra inhibitrice qui va nous servir dans le test de l'association des ATB et des HE (potentialisation) pour le traitement des mycobactéries testées et pour essayer d'expliquer le mécanisme d'action des HE.

Tableau III.3.a : CMI et CMB des HE sur *M. phlei* et *M. fortuitum* en milieu Muller Hinton liquide

	Les souches bactériennes			
	<i>M. phlei</i>		<i>M. fortuitum</i>	
	CMI%	CMB%	CMI%	CMB%
Thym	0,05	0,13	0,05	0,24
Romarin	0,13	0,50	0,10	0,48
Armoise	0,13	0,50	0,25	0,60

Tableau III.3.b : CMI et CMB des constituants des HE sur *M. phlei* et *M. fortuitum* en milieu Muller Hinton liquide.

	Les souches bactériennes			
	<i>M. phlei</i>		<i>M. fortuitum</i>	
	CMI (%)	CMB (%)	CMI (%)	CMB (%)
Thymol	0,05	0,13	0,04	0,10
Eugénol	0,06	0,20	0,05	0,13
Carvacrol	0,05	0,13	0,04	0,10
Carvone	0,10	0,40	0,06	0,40
Isopulégol	0,10	0,40	0,06	0,33

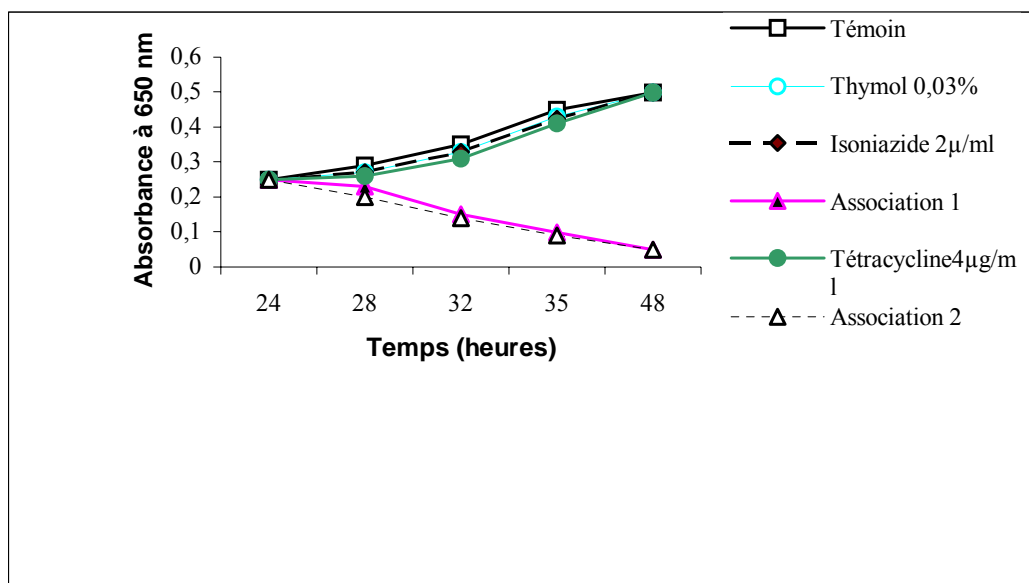


Figure III.3.c : L'absorbance à 650 nm du *M. fortuitum* en fonction de la concentration en thymol, carvacrol, eugenol, carvone et isopulegol.

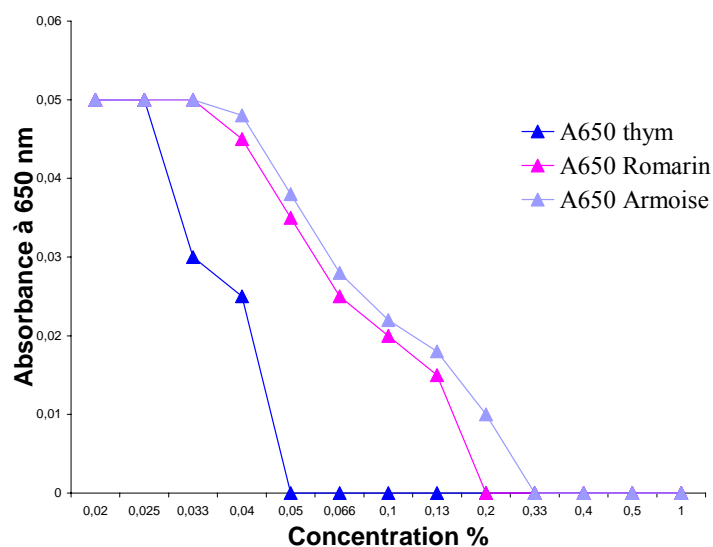


Figure III.3.d : L'absorbance à 650 nm du *M. fortuitum* en fonction de la concentration du thym, d'armoïse et du romarin

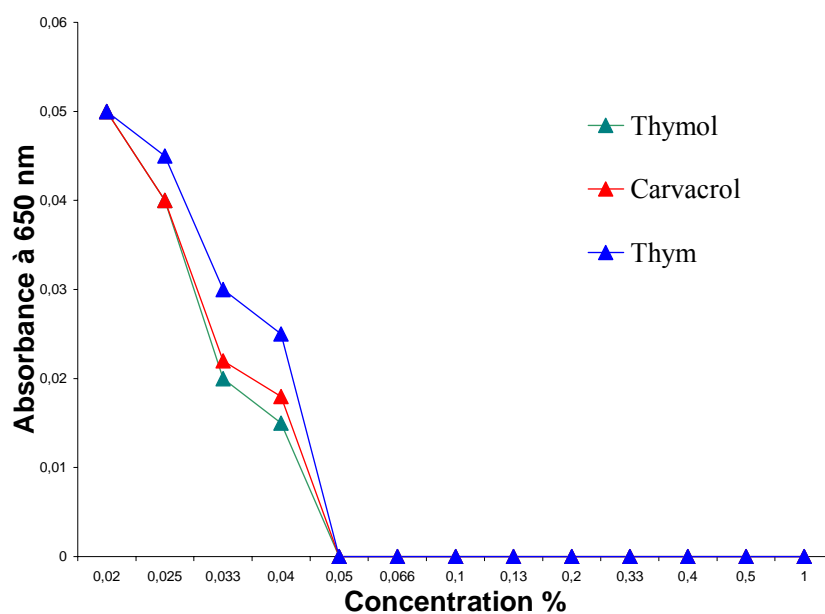


Figure III.3.c : L'absorbance à 650 nm du *M. fortuitum* en fonction de la concentration du thym, du carvacrol et du

III.4- L'effet de l'isoniazide à forte dose sur la libération du matériel absorbant à 260 nm

Des suspensions de bactéries lavées ont été traitées par des concentrations très élevées en isoniazide -antibiotique qui inhibe la synthèse de la paroi-, incubées à 37°C pendant 24 heures puis centrifugées à 12000xg à température ambiante. L'absorbance à 260 nm du surnageant a été mesurée (tableau III.4). Le culot est utilisé pour la réalisation des frottis.

Tableau III.4 : Vérification de l'effet de l'isoniazide sur la libération du contenu cellulaire de *M. fortuitum* et *M. phlei* absorbant à 260 nm.

Concentration INH (µg/ml)		0	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
A ₂₆₀	<i>M.phlei</i>	0,011	0,013	0,010	0,015	0,010	0,013	0,011	0,013
	<i>M.fortuitum</i>	0,011	0,011	0,013	0,013	0,011	0,013	0,015	0,015

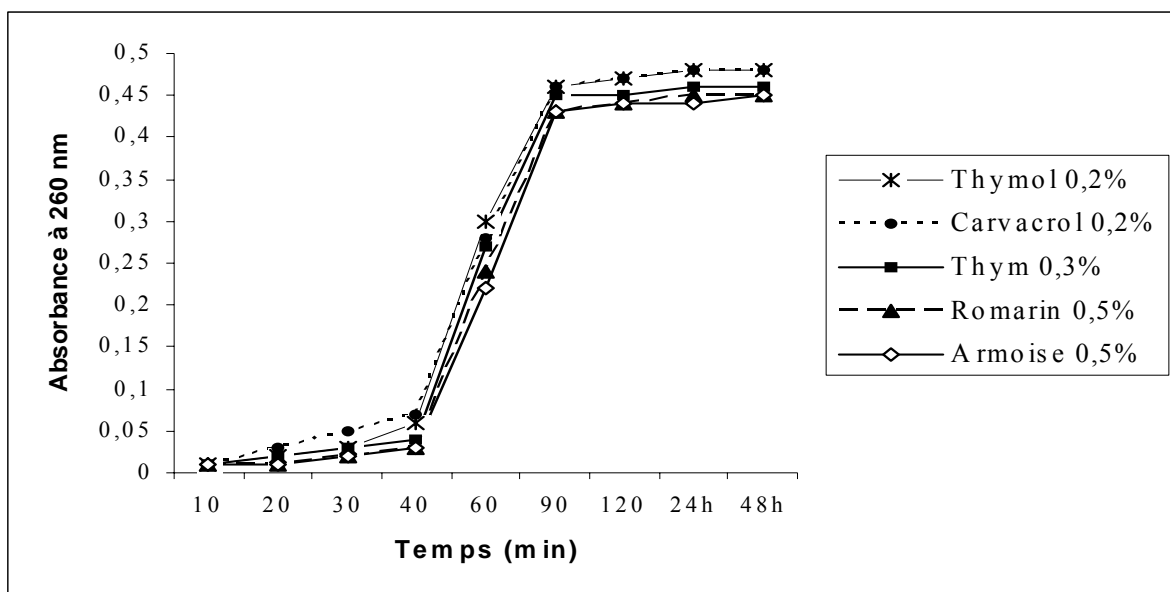
A de très fortes doses en isoniazide ($\geq 3\mu\text{g/ml}$) - concentration très élevée par rapport à la concentration inhibitrice pour *M. tuberculosis* ($2\mu\text{g/ml}$), certains frottis révèlent l'existence de quelques bacilles bleus. Le même test a été réalisé avec de la rifampicine vis-à-vis de *M. fortuitum* et *M. phlei*, et n'a montré aucune libération de substances absorbant à 260 nm.

III.5- Lyse bactérienne en fonction de la durée du traitement par les HE

La lyse des mycobactéries est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 260 nm. A des intervalles de temps variés, la DO₂₆₀ nm du surnageant d'une suspension de bactéries traitées par une concentration bactéricide en HE (l'HE de thym a été utilisé à 0,3%, le

Romarin à 0,5%, l'Armoise à 0,5% et les constituants à l'état pur ont été utilisés à 0,2%) a été évaluée pour déterminer la durée nécessaire pour une lyse complète des mycobactéries par les HE.

Figure III.5 : Absorbance à 260 nm du milieu extracellulaire en fonction de la durée du traitement de *M. fortuitum*.



La figure III.5 montre la relation entre la durée de traitement des bactéries par les HE ou par leurs constituants à une concentration bactéricide et la libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm. Ces résultats montrent qu'une durée de 90 minutes est suffisante pour avoir une bonne lyse de mycobactéries par les HE que ce soit pour *M. fortuitum* ou pour *M. phlei*. Ce résultat va être complété par la réalisation des gels d'électrophorèse.

III.6- Observation des frottis

K Coloration au Ziehl Neelsen

Les photos III.6.a et III.6.a', représentent respectivement des frottis photographiés de *M. phlei* et *M. fortuitum* avant le traitement (témoin) au microscope optique au fort grossissement (G :x1000) en présence d'huile à immersion.

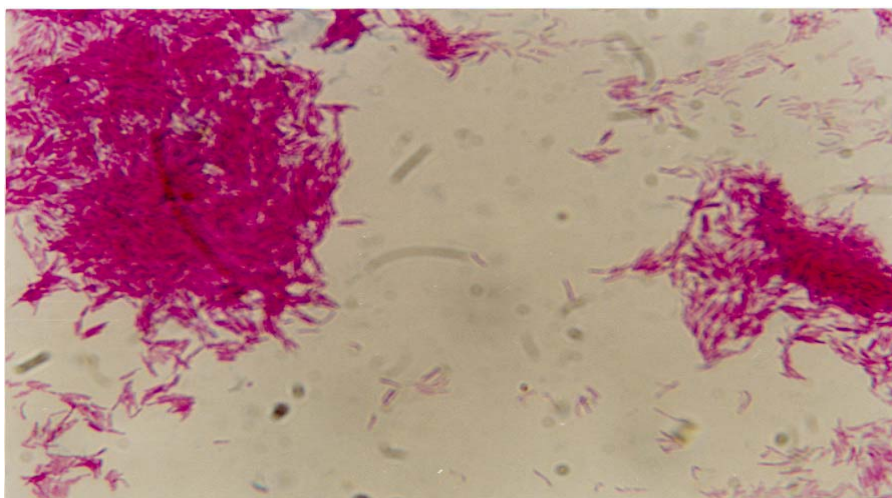
III.6.a'' et III.6.a''' représentent des frottis photographiés avant le traitement par les HE de *M. phlei* et *M. fortuitum* au microscope à épifluorescence.

Les photos III.6.b et III.6.c représentent des frottis photographiés de *M.phlei* traitée respectivement par une concentration inhibitrice et une concentration bactéricide du carvacrol, puis colorée au Z.N.

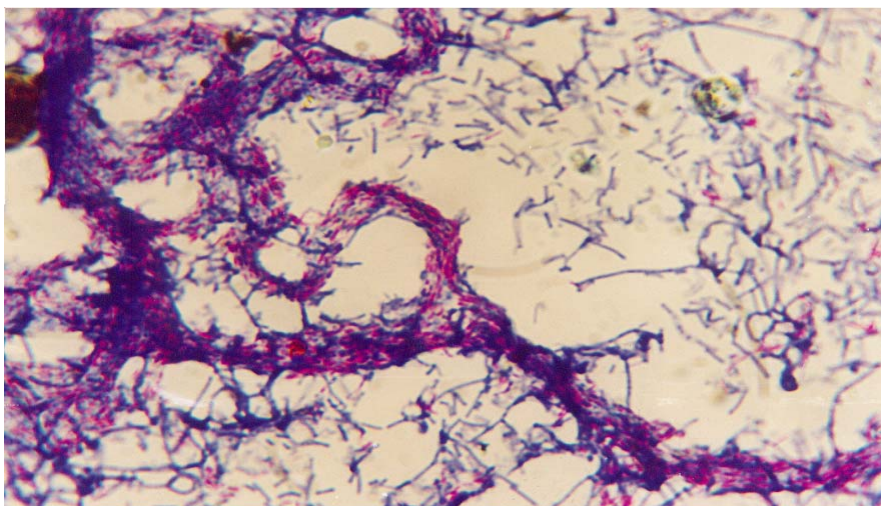
Les photos III.6.b' jusqu'à III.6.e' représentent *M. fortuitum* traitée respectivement par des concentrations inhibitrices et bactéricides de thymol puis colorées au Ziehl Neelsen.

La coloration à l'auramine est réalisée dans le but de vérifier la mort des cellules.

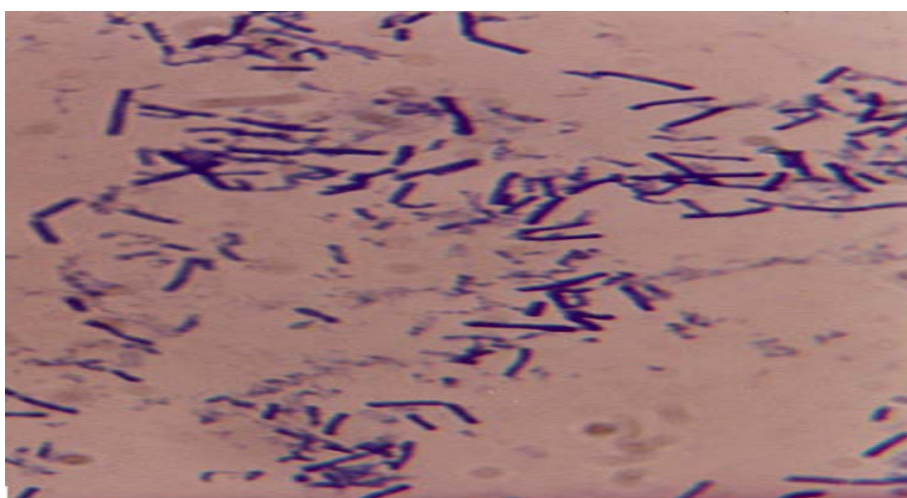
Des résultats similaires ont été obtenus en traitant avec les HE et avec les autres constituants utilisés dans cette étude, une légère différence réside seulement dans les valeurs des CMI et des CMB (résultats non présentés).



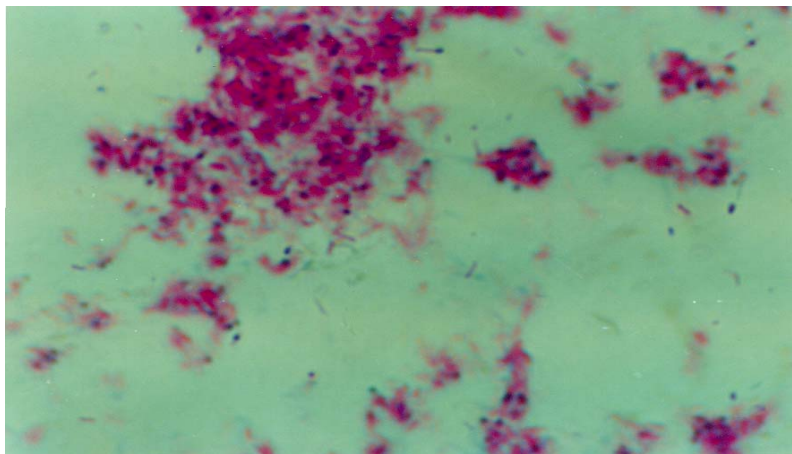
←**Photo.III.6.a:**
Mycobacterium phlei non
traîtée (témoin).
G : x 1000



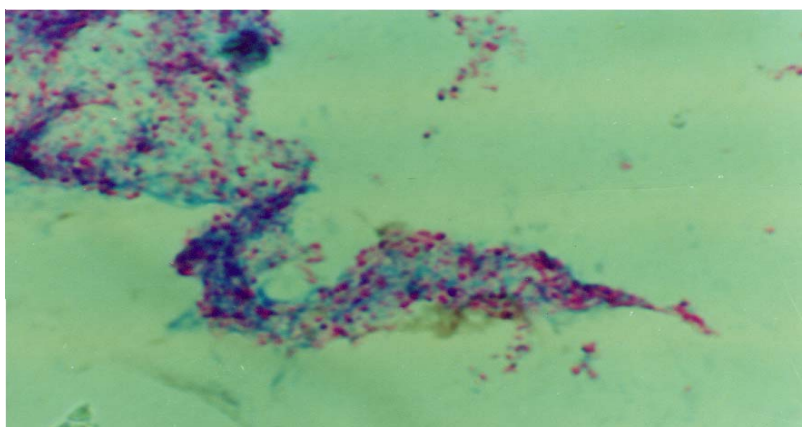
←**Photo.III.6.b :**
Mycobacterium phlei traitée
par le carvacrol à 0,05%.
G : x 1000



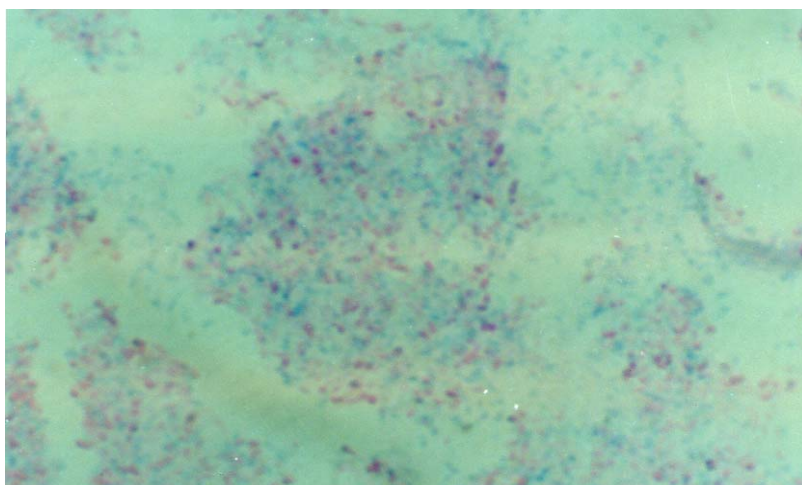
←**Photo.III.6.c :**
Mycobacterium phlei traitée
par le carvacrol à 0,1%.
G : x 1000



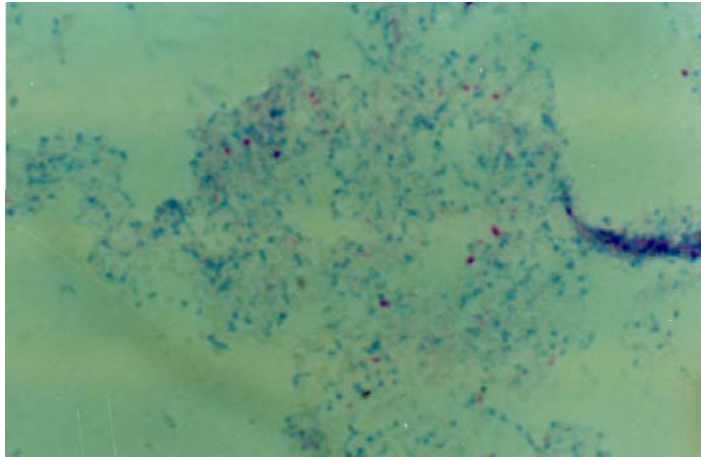
←Photo.III.6.a' :
Mycobacterium fortuitum non
traîtée (témoin)
G : x 1000



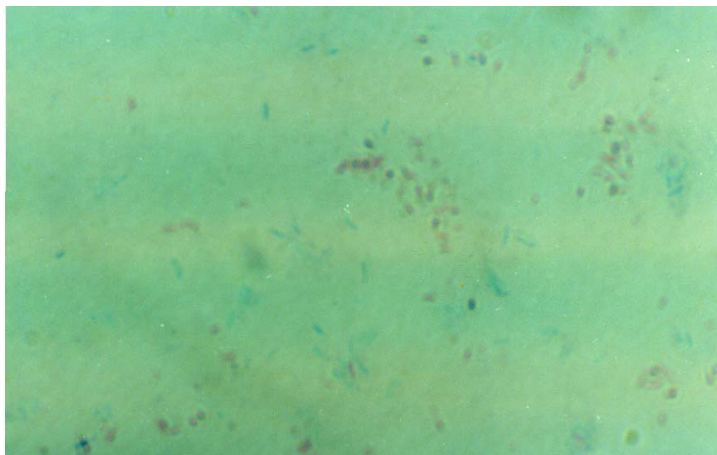
←Photo.III.6.b' :
Mycobacterium fortuitum
traîtée par le thymol à 0,04%
G : x 1000



←Photo.III.6.c' :
Mycobacterium fortuitum
traîtée par le thymol à 0,06%
G : x 1000



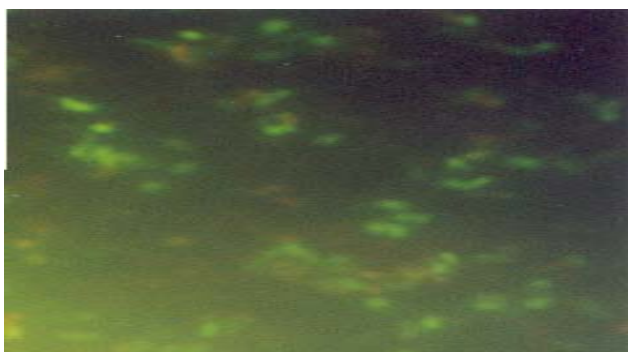
←**Photo.III.6.d'** :
Mycobacterium fortuitum
traitée par le thymol à 0,08%
G : x 1000



←**Photo.III.6.e'**:
Mycobacterium fortuitum
traitée par le thymol à 0,1%
G : x 1000

K Coloration à l'auramine

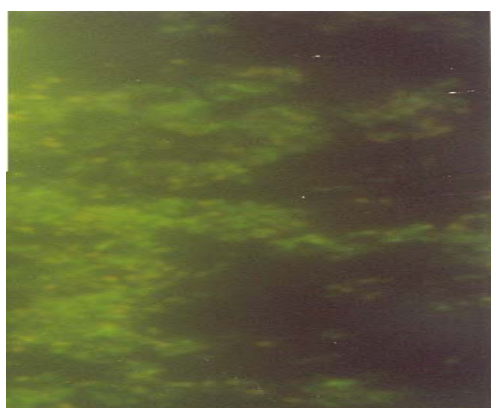
←**Photo.III.6.a''** :
Mycobacterium phlei non traitée
(témoin)
G : x 1000



←**Photo.III.6.b''** :
Mycobacterium phlei traitée
traitée par le carvacrol à 0,06%
G : x 1000



←**Photo.III.6.a'''** :
Mycobacterium fortuitum
non traitée (témoin)
G : x 1000



←**Photo.III.6.b'''** :
Mycobacterium fortuitum
traitée par le thymol à 0.06%
G : x 1000

III.7- Extraction et purification des acides nucléiques des mycobactéries traitées par les HE ou par leurs constituants

Après traitement et extraction des acides nucléiques, le lysat est soumis à une analyse électrophorétique sur gel d'agarose en présence de 0,5 % de bromure d'éthidium. Le gel est ensuite éclairé pour visualiser les différentes bandes d'acides nucléiques. Les lyses sont réalisées chez *M. phlei* et *M. fortuitum*.

Les photos de la figure 7 correspondent à la lyse de *M. phlei* par des concentrations croissantes de carvacrol, des concentrations bactéricides des HE et composés à l'état pur, et un témoin positif de lyse par la méthode classique. Le test de traitement des mycobactéries par une forte concentration d'INH ou de rifampicine à forte concentration a été également réalisé.

Les photos de la figure 8 montrent le résultat d'extraction et de migration d'acides nucléiques de *M. fortuitum* traitée avec des concentrations croissantes de thymol et d'eugénol, et par des concentrations bactéricides d'HE et de constituants d'HE purs.

Les photos de la figure 9 montrent les résultats d'extraction et de migration d'acides nucléiques de *M. phlei* traitée par deux concentrations différentes de thym et deux concentrations différentes de romarin, ainsi qu'avec des concentrations croissantes d'HE de thym.

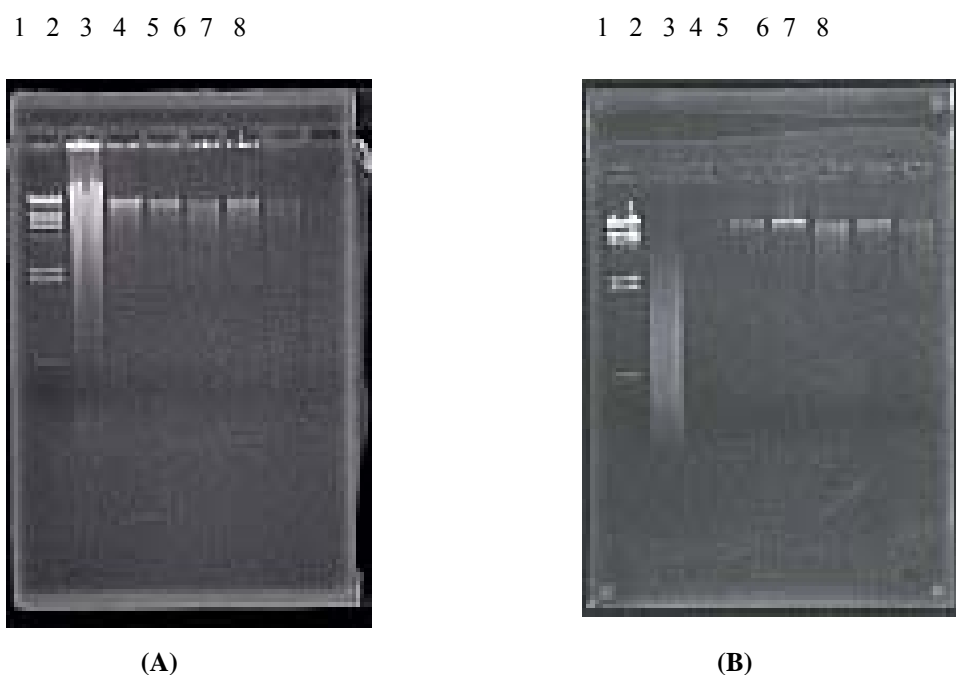


Figure 7 : Electrophorèse en gel d'agarose de lysats de *M.fortuitum*

Indications sur la figure :

Photo(A)

- 1 : Marqueur de taille
- 2 : Témoin positif
- 3 : Lyse par 0,2 % de carvacrol
- 4 : Lyse par 0,15 % de carvacrol
- 5 : Lyse par 0,1 % de carvacrol
- 6 : Lyse par 0,06 % de carvacrol
- 7 : Lyse par 0,05 % de carvacrol
- 8 : Lyse par 2µg/mL d'INH

Photo (B)

- 1 : Marqueur de taille
- 2 : Témoin positif
- 3 : Lyse par 1µg/mL de rifampicine
- 4 : Lyse par 0,1 % d'eugénol
- 5 : Lyse par 0,1 % de carvacrol
- 6 : Lyse par 0,1 % de carvone
- 7 : Lyse par 0,1 % de thymol
- 8 : Lyse par 0,1 % d'isopulegol

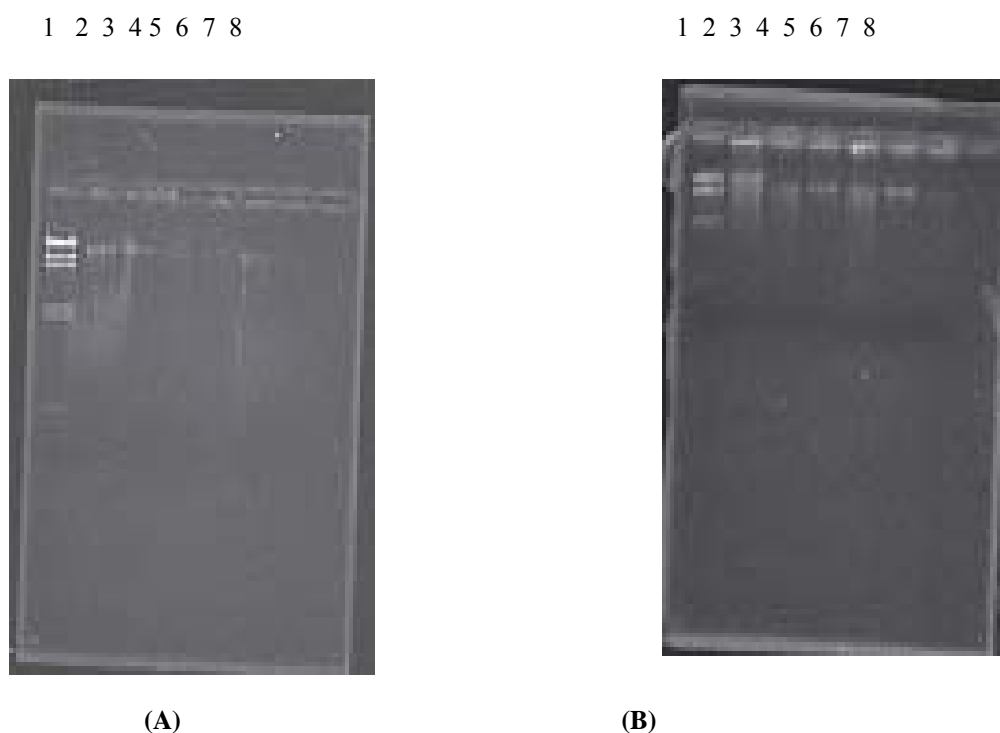


Figure 8 : Electrophorèse en gel d'agarose de lysats de *M. phlei*

Indications sur la figure :

Photo (A)

- 1 : Marqueur de taille
- 2 : Témoin positif
- 3 : Lyse par 0,2 % de thymol
- 4 : Lyse par 0,1 % de thymol
- 5 : Lyse par 0,05 % de thymol
- 6 : Lyse par 0,2 % d'eugenol
- 7 : Lyse par 0,1 % d'eugenol
- 8 : Lyse par 0,05 % d'eugenol

Photo (B)

- 1 : Marqueur de taille
- 2 : Témoin positif
- 3 : Lyse par 0,1% d'eugénol
- 4 : Lyse par 0,1% de carvacrol
- 5 : Lyse par 0,1% de carvone
- 6 : Lyse par 0,1% de thymol
- 7 : Lyse par 0,1% d'isopulegol
- 8 : Témoin négatif

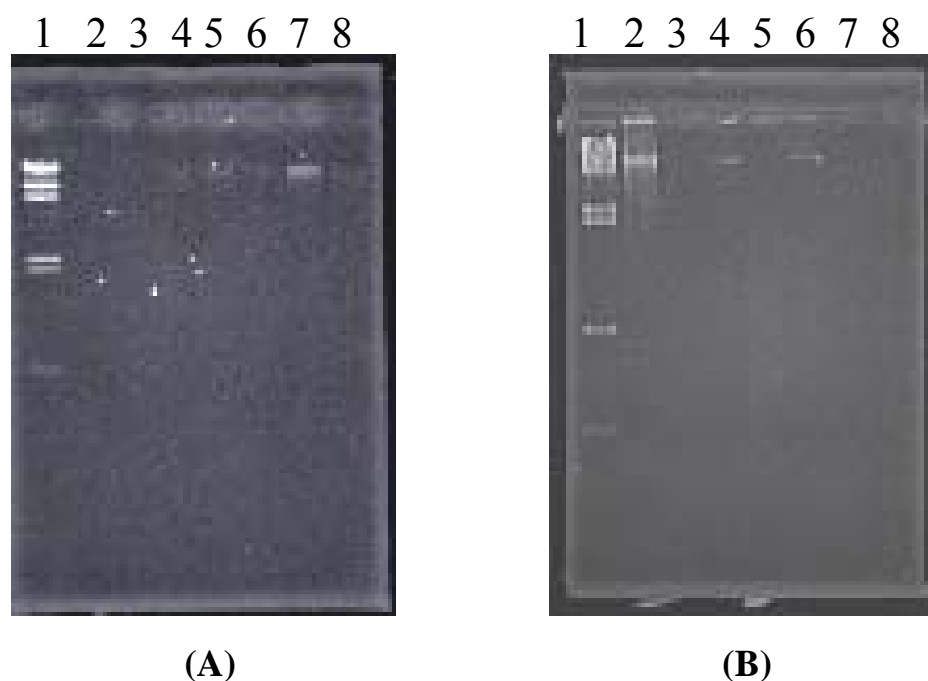


Figure 9 : Electrophorèse en gel d'agarose de lysats de *M. phlei*

Indications sur la figure :

Photo (A)

- 1 : Marqueur de taille
- 2 : Témoin négatif
- 3 : Lyse par 0,05 % de thym
- 4 : Lyse par 0,06 % de thym
- 5 : Lyse par 0,08 % de thym
- 6 : Lyse par 0,1 % de thym
- 7 : Lyse par 0,2 % de thym
- 8 : Lyse par 0,2 % de thym

Photo (B)

- 1 : Marqueur de taille
- 2 : Témoin positif
- 3 : Témoin négatif
- 4 : Lyse par 0,1% du carvone
- 5 : Lyse par 0,025% du carvone
- 6 : Lyse par 0,1% d'isopulegol
- 7 : Lyse par 0,025% d'isopulegol
- 8 : Lyse par 1 µg/ml de rifampicine

III.8- L'association des huiles essentielles avec les antibiotiques

Afin d'étudier l'action de la combinaison des HE avec les antibacillaires usuellement utilisés dans la lutte contre la tuberculose, nous avons réalisé des tests préliminaires à chaque agent antimicrobien, pour choisir les concentrations infra-inhibitrices convenables à cette association [81]. Se basant sur les résultats obtenus, on a choisi une combinaison de 2 µg/ml pour l'isoniazide avec 0,03% de thymol, vis-à-vis de *M. fortuitum*, et 1 µg/ml de rifampicine avec 0,03% de carvacrol vis-à-vis de *M. phlei*.

La planche III.8 illustre le résultat de tels tests en milieu solide. Pour ces résultats, on a montré ceux de l'isoniazide combiné au thymol et ceux du carvacrol associé à la rifampicine vis-à-vis de *M. fortuitum* (III.8a, III.8b). Les autres associations ont donné des résultats fortement similaires.

L'inhibition de *M. fortuitum* et de *M. phlei* n'est réalisée qu'à de fortes doses en isoniazide ou en rifampicine par rapport à celles utilisées contre *M. tuberculosis*.

Les tests de l'inhibition de croissance sont réalisés également en milieu liquide sur les deux souches, en combinant des concentrations infrainhibitrices du thymol et des concentrations infrainhibitrices de l'isoniazide. Les résultats montrent également qu'une concentration de 2µg/ml d'isoniazide et une concentration de 0,03% de thymol provoquent une parfaite inhibition en milieu liquide (figure III.8.c, III.8.d).

Donc, une combinaison de 0,03% de thymol avec 2 µg/ml de l'isoniazide donne une réduction marquée de la croissance des *M. fortuitum* et une concentration de 0,03% de carvacrol combinée à une concentration de 1 µg/ml de rifampicine donne des résultats similaires.

Ce test, réalisé sur milieu solide, montre des auréoles d'inhibition qui étaient absentes dans le test de traitement par ces agents antimicrobiens seuls à des concentrations infrainhibitrices (tapis bactérien).

L'inhibition apparente de la croissance des mycobactéries étudiées par l'association de tétracycline avec le carvacrol ou avec le thymol, pourrait expliquer facilement le mode d'action des huiles essentielles (figures III.8.c, III.8.d).

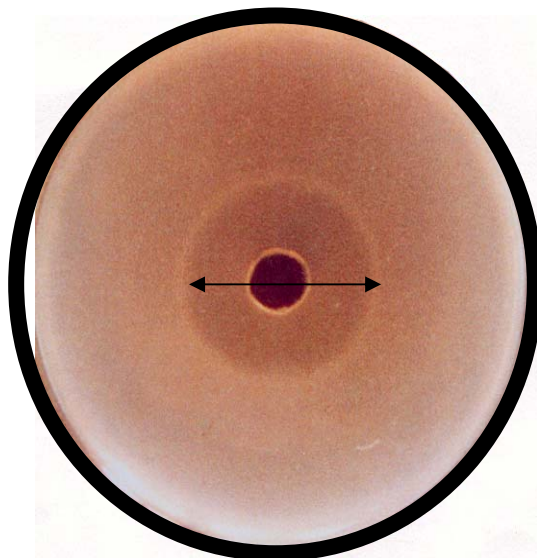
Planche III.8 :

Figure III.8.a : Effet combiné de thymol + isoniazide sur la croissance de *M. fortuitum*

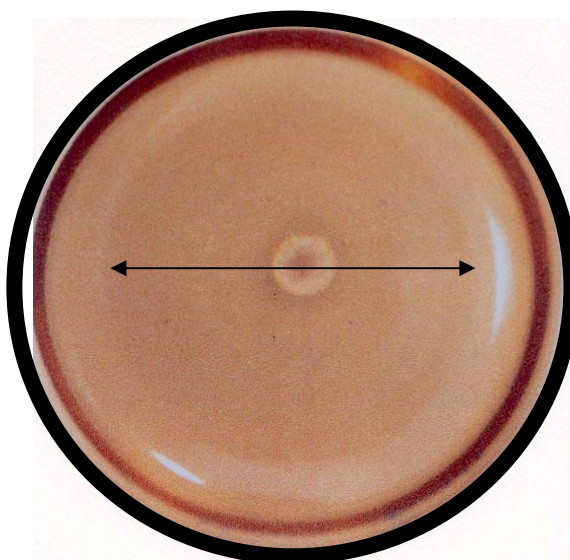
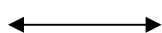
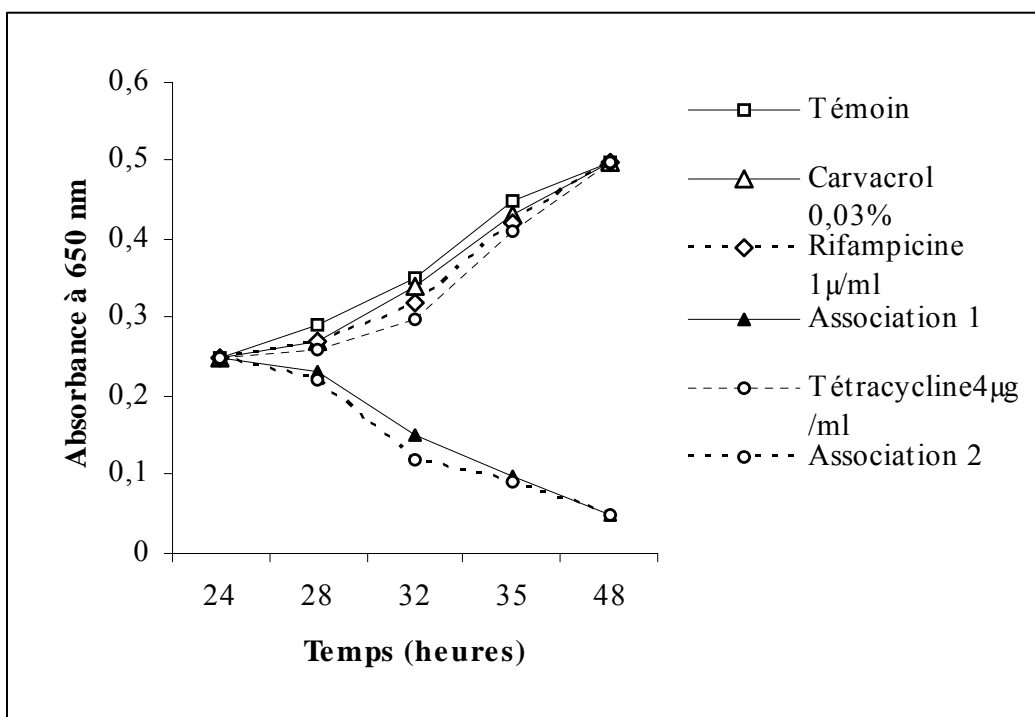
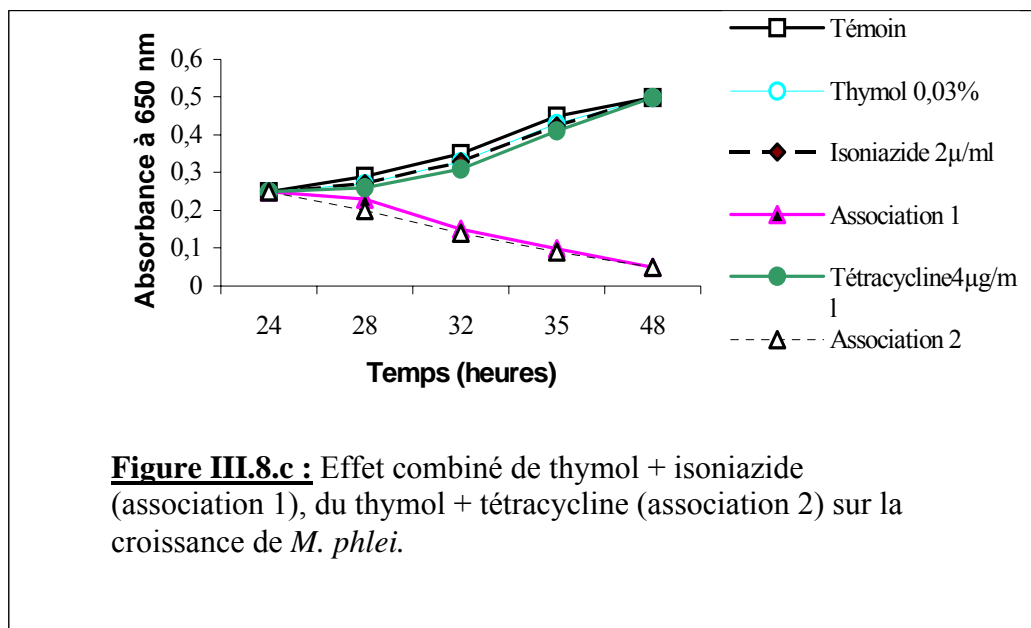


Figure III.8.b : Effet combiné de carvacrol + rifampicine sur la croissance de *M. fortuitum*



La double flèche indique l'auréole d'inhibition



IV - Discussion

La paroi d'une cellule bactérienne est son enveloppe la plus externe. Elle constitue une structure rigide entourant la membrane cytoplasmique et donnant sa forme à la bactérie. C'est la paroi qui est le point de contact entre la cellule et le monde externe. Celle des mycobactéries est très riche en lipides, elle est responsable de la plupart des propriétés biologiques des mycobactéries. C'est pour cette raison que les chercheurs se sont intéressés à cette structure subcellulaire. Il a été établi que cette paroi joue un rôle dans la résistance aux ATB, dans la pathogénicité et dans les interactions moléculaires entre les mycobactéries et les cellules hôtes infectées [193]. Pour cela, la paroi mycobactérienne a été notre première cible dans cette étude.

En vue de tester l'adsorption des huiles essentielles et de leurs constituants sur les cellules mycobactériennes, le test de fixation qui a pour principe la mesure de l'absorbance des HE ou de leurs constituants à une concentration subinhibitrice, avant et après un bref contact avec les bactéries, a été réalisé. Les résultats obtenus montrent une diminution importante de 50 à 60 % de l'absorbance des HE et de leurs constituants après leur contact avec les bactéries. Ceci peut s'expliquer par une diminution de la concentration de ces molécules dans le surnagent après centrifugation en présence des bactéries. Cette diminution rapide de l'absorbance serait due à une sédimentation par adsorption sur les bactéries des constituants absorbant à 280 nm.

Ce résultat montre que l'absorbance est significativement plus élevée quand les HE sont en contact avec un nombre de cellules faible (dilution 1/1000) qu'avec un nombre plus élevé (dilution 1/10). Ceci suggère que les HE et leurs constituants sont fixés à la surface des bactéries ou pénètrent dans le cytoplasme des cellules mycobactériennes. En effet, les HE sont des molécules hydrophobes ; il est prévisible

qu'elles donneront lieu à des interactions hydrophobes avec les membranes et les parois des bactéries.

En ce qui concerne l'activité anti-mycobactérienne des HE et de leurs constituants, la culture cellulaire de chaque souche donnait lieu à une croissance normale dans le milieu de culture seul; en présence d'HE, la croissance s'est modifiée en fonction de la concentration. Au fur et à mesure que la concentration en huiles essentielles augmente, la croissance cellulaire devient plus lente, jusqu'à ce qu'elle devienne nulle en présence de concentrations élevées. L' A_{260} du milieu extracellulaire augmente excessivement (tableau III.5).

L'analyse des tableaux III.3.a et III.3.b montre que les CMI et les CMB des mycobactéries vis-à-vis des HE sont beaucoup plus élevées que celles pour les bactéries à Gram négatif (*E. coli*), et les bactéries à Gram positif (*B. subtilis*). Cette différence ne peut être expliquée que par la différence structurale de la paroi de ces différentes catégories de bactéries.

La figure III.3.e illustre que les composés correspondant aux produits majoritaires des HE ne sont pas nécessairement plus efficaces que les huiles elles-mêmes. Il existe certainement des phénomènes de synergie ou d'antagonisme entre les différents composants de l'essence naturelle.

Après avoir mis en évidence le mécanisme d'action membranaire des HE et de leurs constituants chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif dans le premier chapitre, nous avons utilisé cette technique pour étudier l'action de ces produits naturels sur l'enveloppe cellulaire de *Mycobacterium*.

Les résultats des doses réponses des HE ou de leurs constituants montrent une libération du contenu cellulaire absorbant à 260 nm, qui augmente progressivement en fonction de la concentration. Cette

libération s'accompagne d'une augmentation du nombre de bacilles qui ont perdu l'acido-alcool-résistance comme le montre les photos des frottis réalisés. La cinétique de libération aux concentrations mycobactéricides montrent une libération du contenu cellulaire après 90 minutes de traitement.

L'activité antimicrobienne des HE utilisées a été testée contre *M.phlei* et contre *M. fortuitum*. Pour ces deux espèces mycobactériennes, on a observé une inhibition totale de croissance autour de la zone de dépôt des HE ou de leurs constituants au centre de la boîte de Pétri (figures III.3.a, III.3.b, III.3.c). Le diamètre d'inhibition et les résultats rapportés dans les tableaux III.3.a et III.3.b, montrent qu'au sein des micro-organismes étudiés, il existe des degrés de sensibilité différents vis-à-vis de ces agents antimicrobiens. On remarque que *M. fortuitum* est légèrement plus sensible que *M. phlei*. Cette sensibilité est plus élevée pour le thymol, le carvacrol, l'eugenol et pour l'huile de thym que pour l'isopulegol, la carvone, le romarin ou pour l'huile d'armoise. On peut aussi déduire que le principe actif des HE réside dans leurs constituants majoritaires et que la sensibilité des souches vis-à-vis d'une HE donnée diffère donc selon l'espèce, comme elle peut varier selon d'autres critères.

Ces résultats montrent que les mycobactéries sont très sensibles aux HE, que soit en milieu solide ou en milieu liquide.

Les observations au microscope optique des frottis réalisés après traitement des mycobactéries par les HE ou par les constituants à l'état pur, révèlent des bâtonnets qui ont perdu leur caractère tinctorial d'A.A.R qui est une caractéristique de la paroi. Par conséquent, on peut déduire que les HE ont provoqué des altérations touchant la paroi mycobactérienne. La mort des bactéries a été vérifiée par la coloration à l'auramine.

Les colorants fluorescents sont souvent utilisés pour mettre en évidence les différentes structures d'une cellule. Parmi ces colorants, les dérivés de l'acridine ont une forte affinité pour les acides nucléiques. L'acridine orange se fixe sur les groupements phosphates de l'ADN toutes les trois paires de bases. Il se fixe aussi sur l'ARN, toutes les paires de bases et forme des dimères. Ces dimères entraînent une émission fluorescente orangée (650-665 nm) (phénomène de métachromasie). L'acridine orange permet de différencier les bactéries en activité des bactéries mortes ou au repos : les bactéries qui se multiplient sont riches en ARN_m (la fluorescence observée sera orangée) (photo III.6.a'', III.6.a'''), alors que les bactéries qui ne peuvent plus se multiplier n'ont pas d'ARN_m, la fluorescence sera verte liée à l'ADN [37, 73, 161] (photos III.6.b'', III.6.b''').

Donc, on peut conclure que les concentrations très élevées des HE ou de leurs constituants provoquent la mort des mycobactéries.

La paroi mycobactérienne est le site d'action de certains ATB tel que l'isoniazide qui inhibe la synthèse des acides mycoliques de la membrane de *M. tuberculosis* [16]. La paroi mycobactérienne est très riche en acides mycoliques et en acides gras complexes [196]. Plusieurs travaux montrent que la résistance des mycobactéries à certains ATB est due principalement à l'imperméabilité de leur paroi [194].

Chez plusieurs espèces bactériennes, la résistance aux ATB est étroitement liée à l'apparition de mutations.

L'isoniazide est un antibiotique utilisé dans la lutte contre la tuberculose, seul ou associé avec d'autres antibacillaires [76]. Le thymol, composé majoritaire de l'HE de thym est une substance naturelle de qualité alimentaire et thérapeutique, utilisée dans différentes industries pour des protocoles de conservation [152, 195].

Dans cette étude, nous avons considéré les effets de ces deux agents antimicrobiens [81] pour le contrôle de la croissance des deux mycobactéries atypiques utilisées dans ce chapitre et qui reflètent les propriétés structurales de *M. tuberculosis*.

L'isoniazide inhibe la synthèse de la paroi chez les mycobactéries, le thymol exhibe une activité similaire à celle de la polymyxine B. Chez les bactéries à Gram négatif, il cause une dissipation des métabolites intracellulaires due aux modifications structurales et à la perméabilité membranaire [198]. Selon les travaux menés par Ultée [237] le traitement de *Bacillus cereus* par le carvacrol qui est un isomère de position du thymol conduit à une perte immédiate du potassium cellulaire, de la dépolarisation de la membrane cytoplasmique et de l'efflux de l'ATP cellulaire.

L'inhibition complète de la croissance mycobactérienne par une combinaison du thymol et de l'isoniazide, et par celle, du carvacrol et de la rifampicine qui inhibe la synthèse des acides nucléiques, ne peut être expliquée que par une déstabilisation pariétale induite par le thymol ou par le carvacrol menant à une perméabilité augmentée, respectivement, pour l'isoniazide et pour la rifampicine.

L'association (tétracycline+carvacrol) et (tétracycline+thymol) montrent également une forte inhibition de croissance. La tétracycline, qui est un ATB inhibiteur de la synthèse des protéines bactériennes, n'a pas d'action inhibitrice sur les mycobactéries. Par conséquent, le traitement par combinaison d'HE et d'ATB provoque une entrée massive d'ATB à l'intérieur de la cellule facilitant leur adsorption directe sur leurs sites d'action provoquant l'inhibition de la croissance cellulaire.

Les effets synergiques de l'association thymol+isoniazide et carvacrol+rifampicine peuvent être considérablement utile dans une

rectification des concentrations efficaces de l'isoniazide ou de la rifampicine habituellement utilisés pour le traitement de la tuberculose.

Dans notre étude *in vitro*, nous avons démontré que ces concentrations peuvent être réduites de 25 à 30 %. Ceci conduira à la diminution du coût des médicaments, qui tend à augmenter considérablement surtout dans les pays pauvres. De plus, l'utilisation de faibles concentrations d'antibactériens peut réduire la probabilité d'apparition de souche résistantes. Ainsi, grâce aux HE l'imperméabilité de la paroi des mycobactéries vis-à-vis des antibiotiques ne resterait plus un obstacle.

Puisque les HE et leurs constituants sont capables d'inhiber la croissance des mycobactéries, on a voulu savoir si cet effet est dû ou non à une détérioration de la paroi mycobactérienne comme cela été montré chez *E. coli* et chez *B. subtilis* (chapitre 1).

Les méthodes classiques d'extraction d'ADN ne sont pas très efficaces chez les mycobactéries. Ceci est dû principalement aux lipides de la paroi qui sont très abondants et qui protègent le peptidoglycane des enzymes lytiques. Ainsi, la découverte d'enzymes dégradant cette paroi était le but de plusieurs recherches. L'une de ces tentatives consistait à extraire des enzymes lytiques à partir des mutants thermosensibles du mycobactériophage D29, phage à large spectre d'adsorption chez les mycobactéries [59, 60], ainsi que la mise en évidence par Iraqui et coll. [107] d'un extrait (stazyme) isolé d'une souche staphylococcique capable d'inhiber la croissance *M. smegmatis*.

Le lysozyme est une enzyme qui hydrolyse le peptidoglycane de la paroi des bactéries, favorisant leur lyse. Par conséquent, cette enzyme lytique est très utilisée dans les protocoles qui visent l'extraction de grandes quantités d'ADN. Cette enzyme est inactive chez les

mycobactéries à cause de la complexité structurale de leur paroi (le peptidoglycane est protégé par les lipides de la paroi).

L'extraction de l'ADN est habituellement réalisée grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de la biosynthèse de la paroi (par exemple : la D-cyclosérine) [194, 195]. Cet inhibiteur est rajouté dans le milieu de culture pendant la phase exponentielle de croissance et il est maintenu dans la culture pendant environ trois générations (une génération de *M.tuberculosis* correspond à environ 18 heures). Après cette incubation en présence d'inhibiteur, les cellules mycobactériennes sont ensuite lysées par l'addition d'agents lytiques classiques (SDS, lysozyme).

La méthode de lyse, ainsi décrite, n'est pas très pratique car elle demande beaucoup de temps et ne peut pas être utilisée comme technique de routine.

Des études effectuées sur les parois des mycobactéries montrent que lorsqu'elles sont additionnées, d'huiles minérales ou végétale et mises en suspension dans du soluté physiologique en présence d'un émulsifiant, qui sont par exemple capable d'accroître la résistance de la souris à la tuberculose [7, 8, 201, 202], à des infections diverses [176], à des tumeurs synergiques [13, 45, 203, 259, 260], elles sont également capables d'induire la régression de certaines tumeurs chez le cobaye [203, 260] ; elles peuvent remplacer les mycobactéries entières dans l'adjuvants de Freund [1, 12].

L'éclatement des mycobactéries intactes est également possible par les ultrasons , par une agitation en présence de bille en verre de 0.1 mm de diamètre, un traitement par le phénol ou une délipidation [45]. Tout cela laisse penser à chercher un protocole plus simple et plus pratique qui ne représente pas un fardeau pour le manipulateur ou le chercheur.

Les résultats obtenus *in vitro* sur les parois des bactéries à Gram négatif (*E. coli*) et des bactéries à Gram positif (*B. subtilis*) par MEB et par les gels d'électrophorèse ainsi que l'augmentation de l'absorbance à 260 nm du milieu extracellulaire, après traitement des mycobactéries par les HE ou par leurs constituants sans oublier l'inhibition de leur croissance, indiquent que l'activité des HE sur les mycobactéries est liée à leur capacité de provoquer l'endommagement de la paroi de cette bactérie.

Ceci est confirmé par le test de potentialisation et par le fait que les HE et leurs constituants phénoliques permettent l'extraction de l'ADN à partir des mycobactéries comme cela été montré dans les gels ci-dessus sans utilisation de produits de lyse conventionnels (SDS, lysozyme, etc). En plus, on voit que le génome mycobactérien purifié est intact, ce qui montre que les huiles essentielles n'attaquent pas l'ADN.

Conclusion

A côté des substances antimicrobiennes produites par les micro-organismes, différentes plantes aromatiques synthétisent des molécules odorantes, qui constituent les huiles essentielles, capable d'exercer un effet équivalent à celui des antibiotiques, et ce grâce à la nature chimique de ces constituants et en particulier des constituants majoritaires.

Différents travaux ont montré que les HE dont le composé majoritaire est de nature phénolique, ont un large spectre d'inhibition, comprenant des bactéries à Gram positif, et à Gram négatif, des champignons et même des virus.

Dans cette étude, on a testé ces substances naturelles sur d'autres germes ceux du genre *Mycobacterium*, qui menacent encore la santé publique, surtout avec l'avènement de la maladie du SIDA, et dont l'espèce pathogène pour l'homme est *M. tuberculosis*. La particularité de ce germe réside dans la structure pariétale très complexe, qui est différente de celle des bactéries précédemment citées.

Les bovins, qui représentent aussi une source alimentaire importante pour l'homme, sont aussi attaqués par des bactéries du genre *Mycobacterium*.

Malgré tous les efforts déployés dans l'antibiothérapie, on est toujours surpris par l'apparition de souches résistantes à un ATB ou même à l'association de plusieurs ATB en même temps, ce qui rend l'éradication de ce germe fatal est irréalisable.

Les antibacillaires utilisés jusqu'aujourd'hui, ont tous un effet inhibiteur au niveau d'un processus du cycle biologique du bacille mycobactérien : La rifampicine qui agit au niveau de la transcription, l'INH qui bloque la synthèse des acides mycoliques, etc.... Tous ces effets peuvent se transformer en résistance résultante d'une mutation génomique qui rend le germe tolérant l'ATB approprié ou même multi-résistant à l'association de plusieurs antibacillaires.

Tous ces obstacles, n'ont pas été rencontrés en utilisant les HE ou leurs composés majoritaires phénoliques seules ou associés avec les antibiotiques *in vitro*, puisqu'ils attaquent directement la bactérie en se fixant sur son enveloppe cellulaire, entraînant un déséquilibre de la perméabilité membranaire et un blocage de la phosphorylation oxydative qui représente la source de la vie respiratoire, comme cela a été respectivement montré par Ultée et Gale en utilisant certains phénols.

L'inhibition de la croissance de *M.phlei* et de *M.fortuitum* révèle des CMI voisines à celles obtenues avec *E.coli* ou avec *B.subtilis*, alors que les CMB sont plus élevées à cause de la structure multi-stratifiée et complexe de la paroi, qui nécessite des concentrations plus élevées pour l'attaquer.

L'examen microscopique des frottis réalisés à partir bactéries traitées, fait preuve de l'effet direct des HE ou des constituants majoritaires sur la paroi bactérienne : l'endommagement observé dans les photos de la microscopie électronique et la perte de l'acido-alcool-résistance des mycobactéries, ainsi que la présence de cellules turgescentes qui témoignent une entrée massive du milieu à l'intérieur de la cellule qui ne peut être réalisé qu'à travers des ouvertures localisées au niveau de l'enveloppe cellulaire, alors que ce phénomène n'a pas été observé en traitant par les antibacillaires, ce qui peut être renforcé par les résultats obtenus par Heipieper et coll [102] qui montrent une excrétion massive de l'ion potassium dans l'environnement externe en exposant *Pseudomonas putida* P8 au phénol.

Pour vérifier que l'effet est propre aux huiles essentielles, les émulsions ont été réalisées avec l'agar selon Remmal et coll, pour éviter toute interaction entre l'effet des HE et celui des émulsifiants usuels comme a été montré dans plusieurs travaux [95, 200] et par A.Ortalo, quand il a trouvé qu'un bref traitement avec le

Tween 80, entraîne l'élimination des lipides qui se trouvent à la surface de l'enveloppe du bacille tuberculeux [172].

Les acides nucléiques sont des molécules de grande taille moléculaire, ne peuvent être libérés à l'extérieur que par une lyse complète de la paroi cellulaire, par des agents chimiques, enzymatiques ou physiques très puissants. Les bandes génomiques mycobactériennes observées sur les gels d'électrophorèse obtenus après traitement par les HE ou par leurs constituants ne peuvent qu'approuver un effet direct et lytique de ces substances naturelles sur les parois bactériennes.

Références Bibliographiques

- 1-Adam A., Ciobaru R., Pett J.F. & Lederer E. – Isolation and properties of a macromolecular water-soluble immunoadjuvant fraction from the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), **1972**, 69 : 851-854.
- 2- Afgani B. & Stutman H.R. – Diagnostic of tuberculosis : Can the polymerase chain reaction replace acid-fast bacilli smear and culture ? J. Infect. Dis. **1995**, 172 : 903-904.
- 3- Akcan Y., Tuncer S., Hayran M., Sungur A., Unal S. -PCR on disseminated tuberculosis in bone marrow and liver biopsy specimens : correlation to histopathological and clinical diagnosis. Scand. J. Infect. Dis., **1997**, 29 : 271-274.
- 4- Albrecht H., Rusch-Gerdes S., Stellbrink H.J., Greten H., Jackle S. - Disseminated *Mycobacterium genavense* infection as a cause of pseudo-Whipple's disease and sclerosing cholangitis. Clin. Infect., **1997**, 25 : 742-743.
- 5-Allegrini J., Simmeon de Buochberg M. & Billot A. –Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier, **1973**, 33 : 73-86.
- 6- Amicosante M., Paone G., Ameglio F. & Bianchi E.L. – Antibody repertoire against the A60 antigen complex during the course of pulmonary tuberculosis. Eur. Resp. J. **1993**, 6 : 816-822.
- 7- Anacker R.L., Barklay W.R., Brehmer W., Goode G., List R.H., Ribì E & Tarmina D.F. – Effectiveness of cell walls of *Mycobacterium bovis* strain BCG administrated by various routes and different adjuvants in protecting mice against airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis* strain H37 RV. Amer. Rev. Resp. **1969**, 99 : 242-248.
- 8- Anacker R.L., Bickel W.D., Brehmer W. Niwa M. Ribì E. & Tarmina D.F. – Immunization of mice by combinations of inactive fractions of *Mycobacterium tuberculosis* strain BCG (33642). Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y), **1969**, 130 : 723-729.
- 9- Anagnostopoulos C.A et Spizizen J. - Requirements for transformation in *B.subtilis*. J.Bacteriol., **1961**, 81 : 741-746.
- 10- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidan J.G., Smith J.A. & Struhl K.- Current protocols in molecular biology. Greene Publishing associates, Brooklyn, N.Y. Section 2.4.
- 11- Azevedo N.R., Campos I.F., Fereira H.D., Prtes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C., Paula J.R. & Ferri P.H. – Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. Phytochemistry ; **2001**, 57(5) : 733-736.
- 12- Azuma I., Kishimoto S., Yamamura Y. & Petit J.F.- Adjuvanticity of mycobacterial cell walls. Jap. J. Microbil., **1971**, 15 : 193-197.

- 13- Azuma I., Ribí E., Meyer T. & Zbar B.** –Biologically active components from mycobacterial cell walls. – I. Isolatin and composition of cell wall skeleton and component P₃. J. nat. Cancer Inst., Inst., **1974**, 52 : 95-101.
- 14- Baghdad F.** - L'aromathérapie et citrus. Thèse de pharmacie, Montpellier, France. **1988**.
- 15- Banquour N.** – Etude de l'effet de thym (decoction) et de son huile essentielle sur l'évolution de la flore microbienne et quelques paramètres chimiques du Smen, au cours de son élaboration.
Thèse de doctorat de 3^{ème} cycle en microbiologie. University Cadi Ayad, faculté des Sciences, Marrakech.
- 16- Baulard A.R., Betts J.C., Engohang-Ndong J., Quan S., Brennan P.J., Loth C. & Besra S.S.** – Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. J. Biol. Chem. **2000**, 275(36): 28 326- 28 331.
- 17- Belanger A.E., Besra G.S., Ford M.E., Mikusova K., Belisle J.T., Brennan P.J. & Inamine J.M.** – The emb AB gene of *Mycobacterium avium* encodes an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa **1996**, 15 : 11919-11924.
- 18- Bellakhdar J.** - Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. **1978**. Edition technique nord-africaine. Rabat.
- 19- Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-Alaoui M. & Ayadi A.**
- Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes Médicinales et Phytothérapie. **1986**,20(2): 155-167.
- 20- Benouda A.** – Les propriétés antiseptiques des huiles essentielles de trois plantes médicinales marocaines : L'armoise blanche, Le thym et l'eucalyptus. Thèse de doctorat en médecine, faculté de médecine et de pharmacie, Rabat (**1982**).
- 21- Benyahya M., Senaud J. & J. Bohatier.** -Colonisation et dégradation de fragments de paille de blé par les ciliés du rumen *Epidinium*, *Entodinium* et *Isotricha* : étude en microscopie électronique. Annales des sciences Naturelles , Zoologie, Paris ; 13^{ème} série. **1992**, Vol.13, p103-119.
- 22.a- Beraoud L., Bessière J.M. & Tantaoui Elaraki A.** – Chemical composition of the essential oils of selected plant materials used in Moroccan cuisine. Al-Birunya Rev. Mar. Pharm., **1991**, 7, 49-69.
- 22.b- Beraoud L.** -Effet de certains épices et plantes aromatiques et leurs extrait sur la croissance et la toxinogénèse d'*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Thèse 3^{ème} cycle. **1990**. Faculté des sciences de Rabat. Maroc.
- 23- Beuchat L.R** ; -Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. J. Food. Sc., **1976**, 41, 899-902.

- 24- Beylier-Maurel M.F;** -Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.*, **1976**, 58: 283-286.
- 25- Bilgrami K.S. ; Sinha K.K & Sinha A.K ;** -Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* **1992.**, 96, 171-175.
- 26- Blanchard J.S. –** Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Biochem.* **1996.** 65 : 215-239.
- 27- Blumberg P.M & Strominger J.L ;** - interaction of penicillin with the bacterial cell : penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. *Bactériol. Rev.* **1974.**, 38, 291-335.
- 28- Bogdan C., Kern P., Richter E., Tannapfel A., Rusch-Gerdes S., Kirchner T. & Solbach W. –** Systemic infection with *Mycobacterium genavense* following immunosuppressive therapy in a patient who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin infect. Dis.*, **1997**, 24 : 1245-1247.
- 29- Bonnaud F. –** Calmette-Guerrin (BCG) vaccinat. *Rev. Prat.* **1996**, 46(11): 1362-1367.
- 30- Bonnet E., Massip P., Bauriaud R., Alric L., Auvergnant J.C.-** Disseminated *Mycobacterium gordonae* infection in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.*, **1996**, 23 : 644-645.
- 31- Boochird C & Flegel M.W.-** In vitro antifungal activity of Eugenol and Vanillin against *candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Can.J. Microbiol.*, **1982**, 28 : 1235-1241.
- 32- Brettle R.P.-** *Mycobacterium Avium* intracellulare infection in patients with HIV or AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.*, **1997**, 40 : 156-160.
- 33- Boulos L ;** Medicinal plants of north Africa, Ed. Reference Publication Inc., Michigan., **1983**.
- 34- Budhiraja S.S., Cullum M.E., Evangelistra L. & Habanova S.T.**
- Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. *J. Manipulative Physiol. Ther.*, **1999**, 22 : 447-453.
- 35- Busta F.F & foegeding P.M.-** Chemical food preservatives.
In S. block. “ Disinfection, sterilization and preservation ”., **1980**, 656-694. Lea and febiger Eds, Philadelphia. USA.
- 36- Caffrey J.P. –**Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. *Vet. Microbiol.* **1994**, 40: 1-4.
- 37- Caillon & Drugeon.–** Dénombrement des bactéries vivantes p 127-137. Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques.
Edité par : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J.P & Goldstein F. Maloine Paris, **1991**.

- 38- Carbonnelle B. & Carpentier E.** –Diagnostic bactériologique de la tuberculose : hiérarchisation actuelle des méthodes. Rev. Méd. Int. **1995**, 16 : 519-523.
- 39- Carnesecchi S., Schneider Y. Ceraline J. Duranton B., Gosse F., Seiler N. & Raul F.-** Geraniol, a Component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. J. Phamacol. Exp. Ther. **2001**, 298(1): 197-200.
- 40- Carson C.F. & Riley T.V.-** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Appl Bacteriol **1995**, 78(3): 264-269.
- 41- Cawthorn A.** – A review of the litterature surrouding the research into aromatherapy. Complement Ther Nurs Midwifery. **1995**, 1(4): 118-120.
- 42- Cerney G & Teuber M.-** Differential release of periplasmic versus cytoplasmic enzymes from *Esherichia coli* by polymixin B. Arch. Mikrobiol., **1971**. 78 : 166-179.
- 43- Chang S.T., Chen P.F., Wang S.Y. & Wu H.H.-** Antimite activity of essential oils and their constituents from *Taiwania cryptomerioides*. J. Med Entomol. **2001**, 38(3) : 455-457.
- 44- Charpin J. & Charpin D.-** la tuberculose. Eds. Presses Universitaires de France, Paris, **1983**, p121.
- 45- Chedid L., Laensans A., Parant F., Pirant M., Adam A., Petit J.F. & Lederer E.-** Protective effect of delipdated mycobacterial cells and purified cell walls against *Ehrlich carcinoma* and a syngeneic lymphoid leukemia in mice. Cancer Res., **1973**, 33 : 2187-2195.
- 46- Cole S.T. -** *Mycobacterium tuberculosis* : Drug resistance mechnism. Trends Microbiol. **1994**, 2(10) : 411-415.
- 47- Conner D.E.** – Naturally occurring compounds. P.441-468.In P.M.davidson, and A.Branen (ed.), Antimicrobials in foods, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York,N.Y. **1993**.
- 48- Conner D.E. & Beuchat L.M. -** Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. J. Food. Sci. **1984**, 49: 429-434.
- 49- Collins C.H., Grange J.M. & Yates M.D.** – cultural methods. In : Organisation and practice in tuberculosis bacteriology. Ed. Butterworth and coll. Cambridge.UK, **1985** : 44-97.
- 50- Cornet F.** – L'aromatogramme. Phytomédecine, **1981**, 1&2, 109-117.
- 51- Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. & Palmas F.** – In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Lett Appl Microbiol. **1999**, 29(2): 103-105.

- 52- Cox S.D., Mann CM., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R & Wyllie S.G.-** The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J. Appl. Microbiol. **2000**, 88(1): 170-175.
- 53- Croxson T.S., Ebanks D. & Mildvan D.-** Atypical mycobacteria and Kaposi's sarcoma in the same biopsy specimens. N. Engl. J. Med., **1983**, 16 : 1476.
- 54- Cruaud P. –** La tuberculose : Les réponses humorales, vers un diagnostic? Méd. Mal. Infect. **1996**, 26 : 898-903.
- 55- Daffe M. –** Structure de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis* . Med. Mal. Infect. **1996**, 26 : 891-897.
- 56- Dagnelie: -**Theories et méthodes statistiques; presses agronomiques Gempoux Tome 1:**1973**;Tome 2:**1975**.
- 57- Dalin P.J., Raviglione M.C. & Kochi A.-** Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. World Health Organization, **1994**, 72 : 213-220.
- 58- Danhaive P., Hoet P. & Cocito. –** Base composition and homologies of deoxyribonucleic acids of corynebacteria isolated from human leprosy lesions and of related mico-organisms. Int. J. System. Bacteriol. **1982**, 32: 70-76.
- 59- David H.L., Lévy-Frébault V. & Thorel M.F. –** Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Unité de la tuberculose et des mycobactéries, Ed. Commission des Laboratoires de Référence et d'expertise de l'institut Pasteur, Paris., **1989**, pp 1-88.
- 60- David H.L., Clavel S., Clement F. & Lesourd M. –** Paracrystalline inclusions in *Mycobacterium leprae*. Ann. Microb. (Inst. Pasteur). **1981**, 132A: 41-50.
- 61- Davis B.D . -** Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides Microbiol. Rev., **1987**, 51 : 341-350.
- 62- DAYAL B. & Purohit R.M. –** Screening of some indian essential oils for their antifungal activity. The flavor industry, **1971**, 2 : 484-485.
- 63- De Buochberg M.S., Allegrini S., Bessiere C., Attisso M., Passet J. & Granger R. –**Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris linnaeus*. Rivista. Italiana. E.P.P.O.S. **1976**, 58: 527-536.
- 64- Demetzos C, Stahl B., Anastassaki T., Gazouli M, Tzouvelekis L.S. & Rallis M. –** Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin Ladano, of its essential oil and of the isolated compounds. Planta Med. **1999**. 65(1): 76-78.
- 65- Derectic V., Philipp W., Dhandayu Mapni S., Mudd M.H., Curcic R., Garbe T., Heyen B., Via and L.E. & Cole S.T. -** *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with and inactivated oxydative-stress regulatory gene : implication for sensitivity to isoniazid. Mol. Microbiol. **1995**, 17(5) : 889-900.

- 66- Dhople A. & Ibanez M.A.** – In vitro activity of three new fluoroquinolones and synergy with anamycins against *Mycobacterium leprae*. J. Antimicrob. Chemother. **1993**, 32 : 445-451.
- 67- Didry N., Dubreuil L. & Pinkas M.** – Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. Pharmazie **1993**, 48(4) : 301-304.
- 68- Dilip K. et Banerjee.** -Microbiologie clinique. Atlas de poche. MEDSI. **1986**.
- 69- Dixon R.A & Chopra I.** - Polymyxin B and nonapeptide alter cytoplasmic membrane permeability in *Escherichia.coli*. J.Antimicrob. Chemother., **1986a**, 18 : 557-563.
- 70- Dixon R.A & Chopra I.**- Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia.coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. Antimicrob. Agents. Chemother.,**1986b**, 29 : 781-788.
- 71- Dorman H.J. & Deans S.G;**- Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. J. Appl. Microbiol. **2000**, 88(2): 308-316.
- 72- Douglass J. & Lafras M.S.** – A ribosomal gene mutation in Streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J. Infect. Dis. **1993**, 167 : 1505-1506.
- 73- Drugeon H., Legallou F. & caillon J.**- Méthodes d'étude de l'activité bactéricide p 113-126. Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques.
Edité par : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J.P & Goldstein F. Maloine Paris, **1991**.
- 74- Dubos R.J. & Middlebrook G.** - Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli. Am. Rev. Tuber. **1948**, 58 : 698-699.
- 75- Duquenois P.** – L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, leur normalisation et l'europe du médicament. Parf. Cosm. Sov. **1968**, 11: 414-418.
- 76- Duval J., Soussy C.J.**- Antibiotérapie, Bases bactériologiques pour l'utilisation des antibiotiques. 4^{ème} édition. Masson, **1990**.
- 77- El-Baghdadi J., Lazraq R., Ibrahimy S., Bouayad Z., Guinet R., Benslimane A.** – Survey of primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. Inter. J. Tubercul. Lung Dis. **1997**, 1(4) : 309-313.
- 78- El-Baghdadi J., Lazraq R., Ibrahimy S., Bouayad Z., Guinet R., Benslimane A.** – Typage moléculaire de souches marocaines de *Mycobacterium tuberculosis*. Bull. Soc. Pathol. Ex. **1997**, 90(3) : 156-159.
- 79- El Naghy M.A ; Maghazy S.N ; Fadl-Allah & El Gendy Z.K.**
-Fungistatic action of natural oils and fatty acids on dermatophytic and saprophytic fungi. Zentralbl. Microbiol. **1992**, 147 : 214-220.

- 80- Enarson D., Jentgenes H. & Oberhoffer M.** – HIV et tuberculose. In.: Guide de la tuberculose pour les pays à haute prévalence. 2nd Ed. UICTMR, Paris, France, **1992**, 36-50.
- 81- Ettayebi K., El-Yamani J. & Rossi-hassani B.D.** – Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. FEMS. Microbiology Letters. **2000**, 183: 191-195.
- 82- Flamini G. Cioni P.L., Puleio R., Morelli I. & Panizzi L.**- antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. Phytother Res. **1999**, 13(4): 349-351.
- 83-Franchomme P.**- L'aromatologie à visée anti-infectueuse. Phytomedicine. **1981**, 1 : 25-47.
- 84- Fenaroli G.** – Fenaroli's Handbook of flavor ingredient, 3rd ed.CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. **1995**.
- 85- Gale E.F ; Cundliffe E ; Reynolds P.E ; Richmond M.H & warring M.J ; -** Chap4 : Drugs affecting the function of the cytoplasmic membrane in : The Molecular basis of antibiotic action. J. Wiley & Sons (eds). London. **1981**.
- 86- Good R.C.** - Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. Ann. Rev. Microbiol., **1985**, 39 : 347-369.
- 87- Graham J.G., Quinn M.L., Fabricant D.S. & Farnsworth N.R.**- Plants used against cancer- an extention of the work of Jonathan Hartwell. Journal of Ethnopharmacology, **2000**, 73(3): 347-377.
- 88- Grosset J., Truffot-Pernot C., Boisevert H. & Lalande V.** – Qu'est ce que les mycobactéries atypiques ? Med. Mal. Infect. **1995**, 25 : 327-333.
- 89- Guimard Y. & Portaels F.** – Pseudo-infections à mycobactéries atypiques : Détection, prévention et recommandations. Bull. Séanc. Acad. R. Sci ; Outre-Mer **1996**, 42 : 221-236.
- 90- Gupta S., Bhatia R. & Datta K.K.** – Serological diagnosis of childhood tuberculosis by estimation of mycobacterial antigen 60 specific immunoglobulins in the serum. Tubercle Lung Dis. **1997**, 78(1): 21-27.
- 91- Hala G.M., Christ H. & Carla K.**- Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of essential oils. Journal of Ethnopharmacology, **2000**, 71(3): 513-520.
- 92- Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V.**- In vitro Activities of Ketoconazole, Econazole, Miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil against *Malassezia* Species. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **2000**, vol.42,N°.2, 467-469.

- 93- Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V.-** In vitro Susceptibilities of lactobacilli and Organisms Associated with Bacterial Vaginosis to *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **1999**, vol.43,N°.1, 196-196.
- 94- Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V.-** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl Microbiol. **1999**, 86(6): 985-990.
- 95- Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V.-** Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil in vitro. J. Appl Microbiol. **1999**, 86(3): 446-452.
- 96- Hance A.J., Grandchamp B., Lévy-frébault V., Lecossier D., Rauzier J., Bocart D. & Gicquel B.-** Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol. Microbiol., **1989**, 3(7) : 843-849.
- 97- Hansen G.A.-** Undersogelser angaende spedalskhedens arsager. Norsk Magasin for Laegevitenskapen, **1874**, 4 : 1-88.
- 98- Hansen K.T., Clark R.B. & Sanders W.E. –** Effect of different test conditions on the susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* to amikacin. J. Antimicrob. Chemother. **1994**, 33 : 483-494.
- 99- Harkenthal M., Reichling J., Geiss H.K. & Saller R.-** Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput, oil, niaouli oil, manuka oil, Kanuka oil, and eucalyptus oil. Pharmazie. **1999**, 54(6): 460-463.
- 100- Hart P.D. & Sutherland I. –** BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life ; Br. Med. J., **1977**, 2 : 293-295.
- 101- Hart P.E ; Russel E.Jr & Remington J.S.-** The compromised host and infection II, Deep fungal infection J. Infect.Dis., **1969**, 120 : 169-176.
- 102- Heipieper H.J., Diefenbach R. & Keweloch. –**Conservation of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading pseudomonas putida P8 from substrate toxicity. Appl Environ. Microbiol. **1992**, 58: 1847-1852.
- 103- Hill R.B.Jr, Rowlands D.J Jr & Rifkind D.-** Infectious pulmonary disease in patient receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. N. Engl. J. Med. **1964**, 271 : 1021-1028.
- 104- Hirano K.T., Takahushi M., Kzumi Y., Fukasawa F., Abe C. –** Mutation in *pnc A* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle Lung Dis. **1998**. 78(2) : 117-122.
- 105- Hitokoto H., Morozomi S., Wauke T., Sakai S & Kurata H. -** Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. Appl. Environ. Microbil. **1980**, 39 : 818-822.

- 106- Hmamouchi M., Tantaoui-Elaraki A., Es-safi N & Agoumi A.-** Mise en évidence des propriétés antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles d'eucalyptus. *Plantes médicinales et phytothérapie*. **1990**, XXIV (4) : 278-289.
- 107- Houssaini-Iraqi M., Lazraq R., Clavel-Sérès S., Rastogi N. & David H.L. –** Cloning and expression of *Mycobacterium aurum* carotenogenesis genes in *Mycobacterium smegmatis* . *FEMS. Microbiol. Lett.* **1992**, 90: 239-244.
- 108- Horsburgh C.R., Mason U.G. III, Farhi D.C. & Iseman M.D -**Disseminated infection with *Mycobacterium avium*-intracellular. A report of 13 cases and a review of the literature. *Medecine (Baltimore)*, **1985**, 61 : 36-48.
- 109- Ichiyama S., Linuma Y., Yamori S., Hasegawa Y., Shimokata K. Nakashima N. -***Mycobacterium* growth indicator tube testing in conjunction with the AccuProbe or the AMPLICOR-PCR assay for detecting and identifying mycobacteria from sputum samples. *J. Clin. Microbiol.*, **1997**, 35 : 2022-2025.
- 110- Inyoue S., Tsuruoka T., Uchida K. & Ymaguchi H. –** Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol Immunol.* **2001**, 45(3): 201-208.
- 111- Inyoue S., Goi H., Miyouchi K., Ogihara M & Iwanami I. -** Inhibitory effect of volatil components on the proliferation of bacteria. *Bokin.Bobai*. **1983**. 11 : 609-615.
- 112- Iralu J.V., Sritharan V.K. & Piecclak W.S.-** Diagnosis of *Mycobacterium avium* bacteremia by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **1993**, 31(7) : 1811-1814.
- 113- Jacob M., Pellecuer J. & Tomei R. –** Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* **1979**, 11: 26-30.
- 114- Jacques G. Paltz s.a.-** Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. Fascicule du laboratoire "Jacque Paltz". **1997**.
- 115- Jing Y. & Waxman S.-** Structural requirements for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavors. *Anticancer Res.*, **1995**, 15: 1147-1152.
- 116- Joklik W.K., Willett H.P & Asmos D.B.-** Zinser micriobiology (17th edition). Edited by: Appleton-Centry-Crofts. **1980**. New.York.
- 117- Jou N.T., Yoshimori R.B., Mason G.R., J.S. & Liebling M.R. -** Single – tube. nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **1997**, 35 : 1161-1165.
- 118- Juven B.J., Kanner J., Schved F., and Weisslowicz H. -**Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl.Bacteriol.* **1994.76** : 626-631.

- 119- Kandil O., Radwan N.M., Hassan A.B., Amer A.M., el-Banna H.A. & Amer W.M.-** Extracts and fractions of *Thymus Capitatus* exhibit antimicrobial activities. J Ethnopharmacol. **1994**, 44(1): 19-24.
- 120- Karaman S., Digrak M., Ravid U. & Ilcim A. –** Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *thymus revolutus* Celak from Turkey. J. Ethnopharmacology; **2001**, 76(2): 183-186.
- 121- Kass I., Russel W.F., Heaton A., Miyamoto T., Middlebrook G. & Dressler S.H. –** Changing concepts in the treatment of pulmonary tuberculosis, Ann. Intern., Med. **1957**, 47: 744.
- 122- Kato T., Lijima H., Ishihara K., Kanek T., Hirai K., Naito Y & Okuda K. -** Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. Bull. Tokyo. Dent. Coll. **1990**. 31(4) : 301-307.
- 123- Kenny T.J. & Churchward G. –** Cloning and sequence analysis of the rpsL and rpsG genes of *Mycobacterium smegmatis* and characterization of mutations causing resistance to streptomycin. J. Bacteriol. **1994**, 176(19): 6153-6156.
- 124- Kent P.T. & Kubica G.P. –** Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Centers for Disease Control, Division of Laboratory training and consultation, Atlanta, **1985**.
- 125- Kim J.M., Mashall M.R., Cornell J.A., Preston III J.F, and Wei C.I. -** Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Sallmonella typhimurum* in culture medium and on fish tubes. J. Food Sci. **1995**, 60 : 1364-1374.
- 126- Kleeberg H.H.-** Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiozoo. **1984**, 3: 11-32.
- 127- Knobloch K., Weigand H., Weis N., Schwarm H.M. and Vogenschow H. -** Action of terpenoids on energy metabolism, p.429-445. In E.J. Brunke (ed.), Progress in essential oil research. Walter de Gruyter, Berlin, Germany, **1986**.
- 128- Kock R. –**L'étiologie de la tuberculose. Traduction de la Berliner Klinische Wochenschrift 1882, XIX, 221. Bull. Un. Int. Tuberc. **1981**, 56: 96-109.
- 129- Konno L., Feldmann F.M. & Mc Dermott W. –** Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am. Rev. Resp. Dis. **1967**, 95: 461.
- 130- Kramnik I., Dietrich W.F., Demant P. & Bloom B.R. –** Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **2000**, 97(15): 8560-8565.
- 131- Kubica G.L. & Wayne L.G.** The mycobacteria. Marcel Dekker, new-york and Bale, **1984**.

- 132- Kulik E., Lenkeit K. & Meyer J.** – Antimicrobial effects of tea oil (*Melaleuca alternifolia*) on oral microorganismes. Schweiz Monatsschr Zahnmed. **2000**, 110(11): 125-130.
- 133- Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y & Ichimura K.**
-Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. Agric. Bil. Chem. **1979**., 43 : 2365-2371.
- 134- Kurita N. & Koike S.** – Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. Agric. Bil. Chem. **1982**. 46 : 159-165.
- 135- Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcock A. & Coventry M.J.** –The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L) against acid-tolerant food microflora. Lett Appl Microbiol. **1998**, 26(3): 209-214.
- 136- Lagouri.V., Blekas, G., Tsimidou M., Kokkini S. & Boskou D.** –Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in greece. Z. Lebensm.- Unters.- Forsch. **1993**, 197: 20-23.
- 137- Lazraq R., Clavel-Sérès S., David H.L. & Roulland-Dussoix D.** – Conjugative transfer of a shuttle plasmid from *Escherichia coli* to *mycobacterium smegmatis*. FEMS Microbiol. Lett. **1990**, 69 : 135-138.
- 138- Lebrum L., Mathieu D., Saulnier C. & Nordmann P.-** Limits of commercial molecular tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Eur. Respir. J., **1997**, 10: 1874-1876.
- 139- Lee K.H., Huang E.S., Pagana J.S & Geissman T.A.-** Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones. Cancer.Reasearch. **1971**, 31: 1649-1654.
- 140- Le Minor L. & Véron M.** – Bactériologie Médicale. Méd. Sci. Flammarion. 2^{ème} Ed. **1990**, chapitre 48, 965-1017.
- 141- Lis-Balchin M., Hart S & Simpson E.** – Buchu (*Agathosma betulina* and *A.crenulata*, Rutaceae) essential oils: their pharmacological action on guinea-pig ileum and antimicrobial avtivity on microorganisms. J. Pharm Pharmacol., **2001** Apr; 53(4): 579-582.
- 142- Lis-Balchin M., Hart S.L. & Deans S.G.** – Pharmacological and antimicrobial studies on different tea- (*Melaleuca alterniafolia*, *Leptospermum scoparium* or *Manuka Kunzea ericoides* or *Knuka*), originating in australia and New Zealand. Phytother. Res; **2000**, 14(8): 623-629.
- 143- Lis-Balchin M., Buchbauer G., Hirtenlehner T. & Resch M.** – antimicrobial Activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system. Lett Appl Microbiol. **1998**, 27(4): 207-210.

- 144- Lis-Balchin M., Buchbauer G., Ribisch K. & Wenger M.T.** – Comparative antibacterial effects of novel Pelargonium essential oils and solvent extracts. Lett Appl Microbiol. **1998**, 27(3): 135-141.
- 145- Low N., Pfluger D. & Egger M.** – Disseminated *mycobacterium avium* complex disease in the Swiss HIV Cohort Study : increasing incidence, unchanged prognosis. AIDS, **1997**, 11: 1165-1171.
- 146- Madhyasta M.S & Bhat R.V.-** *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. Appl. Environ. Microbiol. **1984**, 48: 376-379.
- 147- Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A.L., Chinou I.B. & Mitaku S.-** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus* var. chia. Planta Med. **1999**, 65(8): 749-752.
- 148- Makarchuk N.M., Krivenko V.V., Akimov Yu.A., Smorodinskaja V.G & Marchenko K.P.-** Antimicrobial activity of essential oils-peppermint, lavender, wormwood & lemon. Khim. Vzaimodeistvie. Rast. **1981**, 1: 146-150.
- 149- Mallea M., Soler M., Anfosso F & Charpin J.** – Activité antifongique d'essences aromatiques. Pathol. Biol. **1979**, 27: 597-602.
- 150- Mangena T. & Muyima N.Y.-** Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Romarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. Lett Appl Microbiol. **1999**, 28(4): 291-296.
- 151- Maniatis T., Fritsh E.F. & Sambrook J.** – molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. **1989**, pp 86-94.
- 152- Manou I., Bouillard L. Devleeschouwer M.j. & Barel A.O.** – Evaluation of the preservative propertive of *thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challange test. J. Appl. Microbiol., **1998**. 83: 368-376.
- 153- Marino M., Bersani C. & Comi G.-** Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. J. Food Prot. **1999**, 62(9): 1017-23.
- 154- Martinez Nadal N.G., Montalvo A.E. & Seda M.** – Antimicrobial properties of bay and other phenlic essential oils. Cosmetics and perfumery. **1973**, 88: 37-38.
- 155- Maruzzella J.C.-** The germicidal properties of perfume oils perfumery chemicals. Am. Perfum. Cosmet. **1962**, 77(1): 67-72.
- 156- Maudsley F. & Kerr K.G.-** Microbiological safety of essential oil used complementary the raies and the activity of these compounds against bacterial and fungal pathogens. Support Care Cancer. **1999**, 7(2): 100-102.

- 157- Mc Neil M.R & Breenan P.J.** – Structure, function and biogenesis of the cell envelope of Mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res. Microbiol.* **1991**, 142: 451-463.
- 158- Meyer E., Parker W.L & Brown W.E.-** A new polypeptide antibiotic active against cell membranes. *Ann. NY. Acad.* **1974**, 235: 493-501.
- 159- Meyers WM., Walsh G.P., Brown H.L. Binford C.H., Fukunishi Y., Gerne P.J., Wolf R.H. Gormus B.J., Martin L., Harboe M. & Imaeda T.** – Leprosy in a mangabey monkey- Naturally acquired infection. *Int. J. Lepr.* **1985**, 53: 1-14.
- 160- Miles A.A. Misra S.S & Irwin J.O.** – The estimation on the bactericidal power of blood. *Journal of hygiene, Cambridge.* **1938**, 38 : 732-749.
- 161- Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur.-** Microbiologie, Immunologie, 3^{ème} édition, **1987**.
- 162- Mitchell I., Wendon J. Fitt S. & Williams R.** – Anti-tuberculous therapy and acute liver failure. *Lancet* **1995**, 345 : 555-556.
- 163- Mitchison D.A.** – Bactériologie et immunologie de la tuberculose. *Bull. Union Inter. Tubercul.* **1983**, 58(1) : 37-43.
- 164- Moinard D. & Rembeaux A.** – Diagnostic sérologique de la tuberculose par l'antigène 60. *Méd. Mal. Infect.* **1989**, 19(4) : 183-185.
- 165- Montes-Belmont A. & Carvajal M.** – Control of *Aspergillus flavus* in maize with lant essential oils and their components. *J. Food. Prot.*, **1998**, 61 : 616-619.
- 166- Montessori V., Phillips P., Montaner J., Haley L., Craib K., Bessuille E & Black W.-** Species distribution in human immunodeficiency virus-related mycobacterial infectious : implications for selection of initial treatment. *Clin. Infect. Dis.*, **1996**, 22 : 989-992.
- 167- Mundina M., Vila R., Tomi F., Tomas X., Ciccio J.F., Adzet T., Casanova S. & Canigüeral S.** – Composition and Chemical polymorphism of the essential oils from *Pipper lanceafolium*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, 29(7) : 739-748.
- 168- Murray M.G. & Thomson W.F.-** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA *Nucl. Res.* **1972**, 8: 4321-4325.
- 169- Narashima Rao B.G.V. & Subba Rao.** – The efficacy of some essential oils on pathogenic fungi. II. The flavor industry. **1972**, 3 : 368-370.
- 170- Nese B. & Mans E.** – Mutation in 23S ribosomal RNA perturb RNA selection and can lead to streptomycin dependence. *J. Mol. Biol.* **1994**, 235 : 813-824.

- 171- Newton B.A.-** The release of soluble constituents from washed cells of *Pseudomonas aeruginosa* by the action of polymixin. J. Gen. Microbiol. **1953**, 9 : 54-64.
- 172- Ortalo-Magne A., Lemassu A., Laneelle M.A., Bardou F., Silve G., Gounon ., Marchal G. & Daffe M.-** Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. J. Bacteriol. **1996**, 178(2): 456-461.
- 173- Osawa K., Matsumoto T., Mruyama T., Tkiguchi T & Takazoe I.**
-Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their components against periodontopathic bacteria. Bull. Tokyo. Dent. Coll. **1990**, 31(1) : 17-21.
- 174- Palenque E., Rebollo M.J. & Aguado J.M. -** Amplification of *Mycobacterium tuberculosis* from pripheral blood. Lancet **1994**, 344: 1021.
- 175- Pan P.H., Finnegan M.B., Sturdivant L. & Barnet M.L.-** Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse in vitro. J.Clin. Periodontol. **1999**, 26(7): 474-476.
- 176- Parant M., Parant F., Chedid L., Drapier J.C., Petit J.F., Witzerbin J. & Lederer E.** –Enhancement of non-specific immunity to bacterial infection by cord factor (6,6'-trehalose dimycolate). J. infect. Dis., **1977**, 135: 171-177.
- 177- Paris M & Hurabielle.** – Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Masson. Paris. France. **1981**.
- 178- Pattnaik S., Subramanyam V.R., Bapaji M. Kole C.R.** –Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios. **1997**, 89 (358): 39-46.
- 179- Patrick B; Jean-Louis G. & Michel S.** – Les bactéries des infections humaines. Bactériologie. Med. Sciences. Flammarion. 1^{ère} édition. **1988**.
- 180- Peana A.T., Moretti M.D. & Juliano C.-** Chemical composition and antimicrobial action of the essential oil of *Salvia desoleana* and *S.sclarea*. Planta Med. **1999**, 65(8): 752-745.
- 181- Pellecuer J., Allegrini J. & De Buocberg S.M.** – Huiles essentielles bactéricides et fongicides. Revue de l'institut Pasteur de Lyon. 1976, 9 : 135-159.
- 182- Perez C., Agnese A.M. & Cabrera J.L.-** The essential oil of *Senecio graveolens* (Compsitae): Chemical composition and antimicrobial activity tests. J. Ethnopharmacol. **1999**, 66(1): 91-96.
- 183- Persidis A.-** Antibacterial and antifugal drug discovry. Nature Biotechnol., **1999**, 17 : 1141-1142.

- 184- Peyron L & Naves Y.R.** – Lexique des termes et expressions utilisées dans les industries des matières premières aromatiques.(les huiles essentielles). Rivista italiana. E.P.P.O.S., **1977**, 59 : 550-564.
- 185- Pilet C., Bourdon J., Towa B., Marchal N., Balbastre C. & Person J.M.** - Bactériologie : Médicale et vétérinaire systématique bactérienne. Doin, **1987**, Nouvelle édition.
- 186- Pinard R., Cote M. Payant C. & Brakier-Gingras L.** – Positions 13 and 914 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNAase involved in the control of translational accuracy. Nucleic Acid. Res. **1994**, 22(4) : 619-624.
- 187- Portaels F.** – Epidemiology of mycobacterial diseases. Clin. Dermatol. **1995**, 13 : 207-222.
- 188- Porter N.G. & Wilkins A.L.**-Chemical, Physical and antimicrobial properties of essential oils of *Liptosptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. Phytochemistry. **1999**, 50(3): 407-415.
- 189- Powers T. Noller H.F.** – Selective perturbation G530 of 16S rRNA by translational microbing agents and a streptomycin-dependance mutations in protein S12. J. Mol. Biol. **1994**, 235 : 156-172.
- 190- Prescott., Harley & Klein.**- Microbiologie. **1995**, De Boeck-Wesmael.S.A. Bruxelles.
- 191- Rastogi N., Goh K.S. & Bryskier A.** – Activities of roxithromycin used alone and in combination with ethambutol, rifampin, amikan, ofloxacin and clofazimine against *Mycobacterium avium* complex. Antimicrob. Agents Chemother. **1994**, 38(6) : 1433-1438.
- 192- Rastogi N.** – Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope : elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug resistance. Res. Microbiol, **1991**, 142 : 464.
- 193- Rastogi N. & David H.L.** – Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. Biochimie, **1988**, 70 : 1101-1120..
- 194- Rastogi N., Frehel C., Ryter A., Ohayon O., Lesourd M. & David H.L.** – Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium* : is the wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents?. Antimicrob. Agents Chemother. **1981**, 20: 666-677.
- 195- Rastogi N., Lévy-Frébault V. & David H.L.**- Spheroplast formation from nine rapidly growing mycobacteria. Curr. Micrbiol. **1983**, 9: 201-204.
- 196- Rastogi N. & David H.L.**- Ultrastructural and chemical studies on wall-deficient forms, spheroplasts and membrane vesicles from *Mycobacterium aurum*. J. Gen. Microbiol. **1981**, 124: 71-79.

- 197- Raviglione M.C, Snider D.E. & Kochi A.** – Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *Jama* **1995**, 273 : 220-226.
- 198- Remmal A.-** Activités antibactérienne et antivirale des huiles essentielles d'origan, de girofle et de thym. Thèse de doctorat d'état ès-sciences naturelles. Université Sidi Mohammed ben Abdellah. Fès, **1994**.
- 199- Remmal A., Tantaoui Elaraki A., Bouchikhi T., Rhayour K & Ettayebi M.** – Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. *J. Essent. Oil. Res.* **1993a**, 5 : 179-184.
- 200- Remmal A., Tantaoui Elaraki A., Bouchikhi T & Ettayebi M.** –Inhibition of antibacterial activity of essential oils by Tween 80 and Ethanol in liquid medium. *J. pharm. Belg.* **1993b**, 48(5): 352-356.
- 201- Ribi E., Larson C., Wight W., List R & Goode G.** – Effective nonliving vaccine against experimental tuberculosis in mice. *J. Bact.* **1966**, 91: 975-983.
- 202- Ribi E., Anaker R.L., Barclay W.R., Brehmer W., Harris S.C, Leif W.R & Simmons J.-** Efficacy of mycobacterial cell walls as a vaccine against airborne tuberculosis in the rhesus monkey. *J. infect. Dis* **1971**, 123: 527-538.
- 203- Ribi E., Milner C. Granger D.J., Kelly, M.T., Yamamoto K., Brehmer W., Pakker R. Smith R.F. & Strain S.M.** – Immunotherapy with non-viable microbial components. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1976**, 277, 228-238.
- 204- Rook G.A.W. & Hernandez-Pando R.** – Réponses cellulaires au cours de la tuberculose: Immunité et immunopathologie. *Méd. Mal. Infect*; **1996**, 26: 904-910.
- 205- Rosenthal K.S., Swanson P.E & Storm D.R.-** Disruption of *Escherichia coli* outer membranes by EM 49. A new membrane active peptide antibiotic. *Biochem.* **1976**, 15: 5783-5792.
- 206- Roulier G.** - Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Edt. Dangles. France, **1992**.
- 207- Runyon E.H.-** Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North. Am.* **1959**, 43: 273-290.
- 208- Salauze D & Davies J.-** Mécanismes moléculaires de la bactéricidie : Aminoglycosides. p23-p34. Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques. Edité par : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J.P & Goldstein F. Maloine Paris, **1991**.
- 209- Salton M.R.J & Tomasz A.-** Mode of action of antibiotics on microbial walls and membranes. *Ann. NY. Sci.* **1974**, 235 : 1-31.

- 210- Saporta G.**, Theories et methodes de la statistique ; Edition Pechnip Paris **1978**.
- 211- Sauvage C.-** L'état actuel de nos connaissances sur la flore du Maroc. Collogue du CNRS n° 235, la flore du bassin méditerranéen, Paris, **1974**-
- 212- Schnitzler P., Schon K. & Reichling J.** – antiviral activity of australian tea oil and eucalyptus oil against *herpes simplex* virus in cell culture. *Phamazie*. **2001**, 56(4) : 343-347.
- 213- Shinnick T.M., King C.H. & Quinn F.D.** – Molecular biology, virulence, and pathogenicity of mycobacteria. *Am. J. Med. Sci.* **1995**, 309(2): 92-98.
- 214- Schwartz R., Davis R & Hilton T.J.-** Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. *Am. J. Dent.* **1992**, 5(3) : 147-150.
- 215- Siani A.C., Ramos M.F.S., O. Menezes-de-Lima Jr., Ribeiro-dos-Santos R., Fernadez-Ferreira E., Soares R.O.A., Rosas E.C., Susunaga G.S., Guimaraes A.C., Zoghbi M.G.B. & Henriques M.G.M.O.-** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**. 66(1): 57-69.
- 216- Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M & Al-Ahdal M.N.-** Effect of essential oils on the enveloped viruses : antiviral activity of oregano and clove oils on *herpes simplex* virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med. Sci.Res.* **1996**, 24 : 185-186.
- 217- Siegenthaler W & Luthy R.-** Current chemotherapy. Proceeding 10th international congress of chemotherapy.II. Washington DC, Am. Soc. Microbiol, **1978**.
- 218- Simeon De bouchberg M., Allegrini A., Bessière C., Attisso M., Passet J. & Granger R.** -Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* Linnaeus. *Rivista Italiana., E.P.P.O.S.* **1976**, 58 : 527-536.
- 219- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou, Kokkini S., Lanaras T., & Arsenakis M.** - Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. *J. Agric. Food.* **1996**, 44: 1202-1205.
- 220- Sourai P.G.-** Antimicrobial action of dental materials used in operative dentistry : a review *Odontostomatol. Proodos.* **1989**, 43(5) : 399-408.
- 221- Sow A.I., Koyalta D., Boye C.S., Diedhiou/Badiane D. & Bassene E.-** Antibacterial activity of essential oils from mint in Senegal. *Dakar med.* **1995**, 40: 193-195.
- 222- Soussy C.J.-** Associations d'antibiotiques. p173-182. Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques. Edité par : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J.P & Goldstein F. Maloine Paris, **1991**.
- 223- Smith J.H., Folse D.S Long E.G., Christie J.D., Croisse D.T., Tewes M.E., Gatson A.M., Eh-Rhardt R.L., File S.K. & Kelly M.T.** –Leprosy in wild armadillos

(*Daypsus novemcinctus*) of the Texas Gulf Coast: epidemiology and mycobacteriology. J. Reticuloendothel. Soc. **1983**, 34: 75-88.

224- Stevens J.P. & Daniel T.M. – Chemoprophylaxis of multidrug-resistant tuberculous infection in HIV-uninfected individuals using ciprofloxacin and pyrazinamide. A decision analysis. Chest **1995**, 108 : 712-717.

225- Storm D.R., Kenneth S.R & Swanson P.E.- Polymixin and related peptide antibiotics. Ann. Rev. Biochem. **1977**, 46 : 723-763.

226- Taldykin O.E.- Use of phytoncidic activity of essential oils for improving the air in sealed place. Rol Biogeotsenozkh Znach Med Mater Soveshch. **1979**, 1 : 201-203.

227- Tang L.M., Chen S.T & Chang H.S.- Tuberculous meningitis in patients with nasopharyngeal carcinoma. Scand. J. Infect. Dis., **1996**, 28 : 195-196.

228- Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H & Errifi A.- Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus Broussonettii*, *T.zygis* and *T.satureioides*. J. Essent. Oil. Res. **1993a**, 5 : 45-53.

229- Teuber M.- Lysozyme-dependant production of spheroplast-like bodies from polymixin-B treated *salmonella thyphimurium*. Arch. Mikrobiol. **1970**, 70 : 139-146.

230- Teuber M.- Action of polymixin-B on bacterial membranes III. Differential inhibition of cellular functions on *salmonella thyphimurium*. Arch. Mikrobiol. **1974**, 100 : 131-144.

231- Tharib S.M., Gnan S.O. & Veitch G.B.A. – Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. J. Food. Prot. **1983**, 46 : 681-685.

232- Tiwari R., Dikshit R.P., Chandan N.C., Saxena A., Gupta K.G & Vadehra D.E.- Inhibition of growth and aflatoxin B₁ Production of *Aspergillus parasiticus* by spice oils. J. Food. Sci. Technol. **1983**, 20 : 131-133.

233- Tortoli E., Lavinia F & Simonetti M.T.- Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. J. Clin. Microbiol. **1997**, 35 : 289-294.

234- Triveddi S.S. & Desai S.G. – Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium tuberculosis* a test of sensitivity to pyrazinamide. 25- Tubercle **1987**, 68 : 221-224.

235- Tuberculosis prevention Trial - Trial of BCG vaccines in South India For Tuberculosis prevention. First report. Bull. Wld. Hlth. Org., **1979**, 57 : 819-827.

236- Tuberculosis prevention Trial - Trial of BCG vaccines in South India For Tuberculosis prevention. Indian J. Med. Res., **1979**, 70 : 349-363.

237- Ultée A. Kets E.P.W. & Smid E.J.- Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. J. Appl. Microbiol. **1999**, 65(10) : 4606-4610.

- 238- Ultée A., Gorris L.M.G & Smid E.J.-** Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. J. Appl. Microbiol. **1998**, 85 : 211-218.
- 239- Ultée A., Slump R.A., Steging G. & Smid E.J. –**Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. J. Food Prot. **2000**, 63(5): 620-624.
- 240- United Nations Children’s Emergency Fund (UNICEF).-** The state of the world’s children. 131, Oxford University Press, **1985**.
- 241- Valnet J.-** Phytothérapie et aromatothérapie : nouvelles observations. Plantes médicinales et phytothérapie. **1974**, 8 : 229-236.
- 242- Valnet J. Duraffourd C.H., Duraffourd P & Cilapraz J.-** L’aromatogramme : nouveaux résultats et essais d’interprétation sur 268 cas cliniques. Plant Med Phytother, **1978**, 12 : 43-52.
- 243-Van Heijenoort J.-** Mécanismes moléculaires de la bactéricidie :beta-lactamines.. p13-p22. Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques. Edité par : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J.P & Goldstein F. Maloine Paris, **1991**.
- 244- Vargas I., Sanz I. & Prima-Yufera E. –** Antimicrobial and Antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed range essential oil. J. Food Prot. **1999**, 62(8): 929-932
- 245- Vazzana I., Novelli F. & Sparatore F. –** Quinolizidine derivatives with antitubercular activity. II pharmaco **1994**, 49(2) : 105-110.
- 246- Verbon A., Weverling G.J., Kuijper S., Speelman P., Jansen H.M. & Kolk A.H.J. –** Evaluation of different tests for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of Likelihood ratios in serology. Am. Rev. Respir. Dis. **1993**, 148 : 378-384.
- 247- Vila R., Valenzuela L., Bello H., Cangueral S., Montes M. & Adzet T. –** Composition and antimicrobial activity of the essential oil *Peumus boldus* leaves. Planta Med; **1999**, 65(2): 178-179.
- 248- Vincent V. Levy Frebault & Portaels F. –** Proposed minimal standards for the genus *Mycoterium* and for description of a new slowly growing mycobacterium species. Int. Syst. Bacteriol. **1992**, 42: 315-323.
- 249- Vogelsang T.M. & Gerhard Henrik Armauer HANSEN 1841-1912. –**The discover of leprosy bacillus. His life and work. Intern. J; Lepr. **1978**, 46: 257-332.
- 250- Walsh G.P., Storrs E.E., Burchfield H.P., Cottrell E.H., Vidrine M.F. & Binford C.H. –** Leprosy- like disease occurring naturally in armadillos. J. Reticuloendoth. Soc. **1975**, 17: 347-351.
- 251- Wan J., Wilcock A. & Coventry M.J. –**The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophilata* and *Pseudomonas Fluorescens*. J. Appl Microbiol. **1998**, 27(3): 135-141.

- 252- Warren G.H., Gray J & Yurchenco J.A.-** Effect of polymixin on lysis of *Neisseria catarrhalis* by lysozyme. J. Bacteriol., **1957**, 74, 788-793.
- 253- Winder F.G. & Collins P.B.** –Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Gen. Microbiol. **1970**, 63 :41.
- 254- Wolinsky E.** – Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am. Rev. Resp. dis., **1979**, 119 : 107-159.
- 255- World Health Organization** –Guidelines of the management of drug resistant tuberculosis. WHO/TB. **1996**, 21-22.
- 256- Yajko D.M., Madry J.J., Lancaster M.V., Sanders C.A., Cawthon V.L., Gee B., Babst A. & Hadley W.K.** – colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. **1995**, 33(9) : 2324-2327.
- 257- Yamamura Y., Azuma I., Taniyama T., Sugimura K., Hirao F., Tokuzen R., Okabe M., Waro N., Yasumoto K & Ohta M** – Immunotherapy of cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis*, bacillus Calmette-Guérin experimental and clinical results. Ann. N.Y. Acad. Sci., **1976**, 277 : 209-227.
- 258- Yoshida S., Kasuga S., Hayashi N., Ushiroguchi T., Matsuura H. & Nakagawa S.** –Antifungal activity of ajoene derived from garlic applied and environmental Microbiology. **1987**, 53: 615-616.
- 259- Young L.S., Inderlied C.B., Berlin O.G & Gottlieb M.S.-** Mycobacterial infections in AIDS patients with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1985**, 82 : 2583-2587.
- 260- Zbar B., Ribi E., Meyer T., Azuma I. & Rapp H.J.** – Immunotherapy of cancer : regression of established intradermal tumors after intralesional-injection of mycobacterial cell walls attached to oil droplets. Nat. Cancer. Inst. Monogr., **1974**, 52 : 1571-1577.
- 261- Zurawski C.A., Cage G.D., Rimland D & Blumberg H.M.-** Pneumonia and bacteremia due to *Mycobacterium celatum* masquerading as *Mycobacterium xenopi* in patients with AIDS : an underdiagnosed problem? Clin. Infect. Dis., **1997**, 24 : 140-143.

Annexe

Composition et préparation des milieux de culture et des solutions tampon utilisés:

Milieu Lauria broth (LB) liquide: pour un litre

Tryptone	10g
Extrait de levure	05g
NaCl	05g

Autoclaver 20 minutes à 121°C

Milieu Lauria broth (LB) gélosé: pour un litre

Tryptone	10g
Extrait de levure	05g
NaCl	05g
Agar agar	15g

Autoclaver 20 minutes à 121°C

Milieu Muller Hinton liquide : pour un litre

Infusion de viande bovine	02.0g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon soluble	01.5g

Autoclaver 20 minutes à 115°C

Milieu Muller Hinton gélosé : pour un litre

Infusion de viande bovine	02.0g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon soluble	01.5g
Agar agar	15.0g

Autoclaver 20 minutes à 115°C

Gélose nutritive : pour un litre

Tryptone	10g
Extrait de viande	05g
NaCl	05g
Agar agar	15g

Autoclaver 20 minutes à 121°C

Milieu minimum synthétique ABB₁G: préparé à partir de quatre solutions:**Solution A:**

(NH ₂)SO ₄	40g
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	120g
KH ₂ PO ₄	60g
NaCl	60g

Compléter le volume à 4 litres avec H₂O distillée

Solution B:

MgCl ₂ 6H ₂ O	50g
CaCl ₂ 2H ₂ O	2.24g
FeCl ₃ 6H ₂ O	20mg
HCl (concentré)	50 ml

Compléter le volume à 250 ml avec H₂O et autoclaver à 121°C pendant 20 minutes.

Solution B₁ :

Thiamine	1mg/ml
----------	--------

Solution G: 40%

Le milieu ABB₁G est préparé en mélangeant :

- 200 ml de la solution A (compléter à 1 litre avec H₂O et autoclaver)
- 2 ml de la solution B stérile
- 1 ml de la solution B₁
- 10 ml de la solution G

Milieu minimum Spizizen Salts[9]: pour un litre

(NH ₄) ₂ SO ₄	02g
K ₂ HPO ₄	14g
KH ₂ PO ₄	06g
Citrate trisodique 2HO ₂	01g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g

Milieu 7H9 (Middlebrook) :

Milieu commercialisé sous forme de poudre prêt à l'emploi.

- 4.7 g de base déshydratée du Middlebrook 7H9 dans 900 ml H₂O distillée
- Porter à ébullition
- Autoclaver à 120°C pendant 10 à 15 minutes
- Rapporter la température à 50 – 55°C
- Ajouter stérilement l'ADC enrichissement (100ml)
- Répartir sur tubes à vis stériles
- Incuber à 37°C pendant 24 – 48 pour test de stérilité

Enrichissement (ADC) :

Albumine bovine	05g
Dextrose	02g
Catalase	0.003g

Stériliser par filtration

Solution tampon PBS: pour un litre

NaCl	08g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.13g
KH ₂ PO ₄	0.2g

Tampon TGE:

Tris	25 mM	PH 7.5
EDTA	10 mM	
Glucose	50 mM	

Tampon de conservation de l'ADN: TE

Tris	10 mM	PH 8
EDTA	01 mM	

Tampon d'électrophorèse: TAE (50X) : pour un litre

Tris	242g (2M)
EDTA	100 ml (50mM)
Acide acétique glacial	57.1ml

Tampon de charge :

Bleu de bromophénol	0.25%
Glycérol	40.0%

Solution de lysozyme

- 10 mg/ml

Conserver à -20°C pas plus de 12 mois.

Solution de 10% de SDS

- 10g SDS (BDH, Biochemical) / 100 ml d'eau distillée

Conserver à -20°C pas plus de 12 mois.

Protéinase K

- 10 mg de protéinase K (Boehringer) / ml d'eau distillée

Aliquoter et conserver à -20°C pas plus de 12 mois.

5 M NaCl

29.20 g NaCl / 100 ml d'eau distillée

Conserver à température ambiante pas plus de 12 mois.

Chloroform / isoamyl alcool (24/1)

On mélange 24 volumes de Chloroform avec un volume d'isoamyl alcool.

Conserver à température ambiante pas plus de 12 mois.

Méthodologie des différents colorants et la préparation des colorants pour les mycobactéries

A- Méthode de Z.N :

FUCHSINE PHENIQUEE

(tenir à l'abris de la lumière et filtrer avant usage)

Eau distillée	100 ml
Fuchsine basique	1 g
Phénol aqueux	5.5 ml
Alcool à 95%	10 ml

BLEU DE METHYLENE

(tenir à l'abris de la lumière et filtrer avant usage)

Eau distillée	100 ml
Bleu de méthylène	2 g
Phénol aqueux	2.2 ml
Alcool à 95%	10 ml

ACIDE

Eau distillée	75 ml
Acide sulfurique	25 ml

ALCOOL

Alcool à 100% (éthanol absolu)

THECHNIQUE

- Fuchsine 10 minutes (chauffer et sécher)-
- Rincer à l'eau
- Acide 3 minutes
- Rincer à l'eau
- Alcool absolu 5 minutes
- Rincer à l'eau
- Bleu de méthylène 2 minutes
- Rincer à l'eau Laisser sécher.

B- Coloration à froid (Kinyoun modifiée).

FUCHSINE PHENIQUEE

- Fuchsine basique	4 g
- Solution de Phénol aqueux 8%	100 ml
- Alcool à 95%	20 ml

ACIDE-ALCOOL :

- Acide chlorhydrique	3 ml
- Ethanol 95%	97 ml

CONTRE COLORANT :

Eau distillée	100 ml
Bleu de méthylène	0.3 g

THECHNIQUE

Identique à la technique de Z.N, sauf pour la fuchsine de Kinyoun elle est déposée 15 minutes sans chauffage.

C- Coloration fluorescente.

La méthode de coloration par fluorescence est basée sur le même principe que la méthode classique à la fuchsine basique, c'est une coloration de la totalité de la préparation suivie d'une décoloration sélective par l'alcool-acide puis d'une recoloration du fond.

1-Méthode de DEGOMMIER***AURAMINE :**

Eau distillée tiède	2000 ml
Auramine	2 g

*Agiter en chauffant jusqu'à dissolution

Solution aqueuse à 10% de $MgCl_2$ 4ml	
Phénol aqueux	40 ml

*Agiter et filtrer.

ROUGE DE THIAZINE :

Eau distillée tiède	2000 ml
Rouge de thiazine	2 g

*Agiter en chauffant jusqu'à dissolution.

Solution aqueuse à 10% de $MgCl_2$	4 ml
Phénol aqueux	40 ml

*Agiter et filtrer.

ALCOOL-ACIDE :

Alcool à 95%	2000 ml
HCl	10 ml

TECHNIQUE

- Auramine 15 minutes
- Rincer à l'eau distillée
- Alcool - Acide 5 minutes
- Rincer à l'eau distillée
- Rouge de thiazine 1 minutes 30 secondes
- Rincer à l'eau distillée
- Laisser sécher.

NB : tenir à l'abris de la lumière et à une température inférieure à 25°C pour les colorants 1 et 2.

1-Méthode de SMITHWICK**A- Réactifs****Auramine phéniquée :**

Auramine	0.1 g
Ethanol 90-95°	10 ml

Ajouter à une solution de 3 g de phénol dans 87 ml d'eau distillée stocker en bouteille ambrée.

Acide-Alcool

Alcool à 70%	100 ml
HCl	0.5 ml

Contre colorant :

Orange d'acridine	0.01 g
ou rouge de thiazine	0.1 g
solution aqueuse de phosphate disodique à 0.01%	100 ml

TECHNIQUE

Identique à celle de DEGOMMIER

*Publications
&
Communications*

I- Articles

KHADIJA RHAYOUR, TOURIA BOUCHIKHI, SENDIDE KHALID, ADNANE REMMAL, A. TANTAOUI-ELARAKI .

“The Mechanism of Bactericidal action of Oregano and Clove Essential Oils and Their Phenolic Major Components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*”

Journal of Essential Oil Research Accepté pour publication le 19 Février 2002 (Sous presse) .

REMMAL A., TANTAOUI ELARAKI A., BOUCHIKHI T., RHAYOUR K & ETTAYEBI M.

–Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. J. Essent. Oil. Res. **1993**, 5 : 179-184.

RHAYOUR. K, BENDADDA. O, BERRADA. J & REMMAL. A.

- L'effet des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires phénoliques sur les mycobactéries-.

Soumis

II- Communication

K. RHAYOUR, T. BOUCHIKHI, O. BENDADDA, J. BERRADA et A. REMMAL.

“ Principe actif et mécanisme d'action de l'activité bactéricide des huiles essentielles ”

PREMIER CONGRES DE L'ASSOCIATION MAROCAINE DE PHYSIOLOGIE ENDOCRINIENNE ET PLANTES MEDICINALES (**AMPEPEM**) A LA FACULTE DES SCIENCES, UNIVERSITE IBN TOFAIL-KENITRA DU 01 AU 03 NOVEMBRE 2001.

(Communication affichée).

A. REMMAL ; K. RHAYOUR ; T. BOUCHIKHI ; A. TANTAOUI ELARAKI.

“ Dispersion des huiles essentielles en milieux aqueux sans détergent – application à l'activité antibactérienne –”.

PREMIER CONGRES DE L'ASSOCIATION MAROCAINE DE PHYSIOLOGIE ENDOCRINIENNE ET PLANTES MEDICINALES (**AMPEPEM**) A LA FACULTE DES SCIENCES, UNIVERSITE IBN TOFAIL-KENITRA DU 01 AU 03 NOVEMBRE 2001.

(Communication orale)