



HAL
open science

Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action

E. Guinoiseau

► **To cite this version:**

E. Guinoiseau. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Corse, 2010. Français. NNT: . tel-00595051

HAL Id: tel-00595051

<https://theses.hal.science/tel-00595051>

Submitted on 23 May 2011

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

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



UNIVERSITE DE CORSE-PASQUALE PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
UMR CNRS 6134 SPE
Faculté des Sciences et Techniques



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE**
Mention : Biochimie - Biologie moléculaire

Soutenue publiquement par

Elodie Guinoiseau

le 06 décembre 2010

**Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles :
séparation, identification et mode d'action**

Jury

Rapporteurs :

Mme Foglino Maryline, Dr-HDR, Université de la Méditerranée
M. Alziari Serge, Professeur, Université de Clermont

Examineurs :

M. Bolla Jean-Michel, Dr-HDR, Inserm, Marseille
M. Casanova Joseph, Professeur, Université de Corse
Mme Berti Liliane, Professeur, Université de Corse

Directrices :

Mme Berti Liliane, Professeur, Université de Corse
Mme Luciani Anne, Dr, Université de Corse

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	1
--------------------------	----------

INTRODUCTION

1- LES ANTIBIOTIQUES	5
-----------------------------------	----------

1-1 LES ANTIBIOTIQUES NATURELS ET SYNTHETIQUES	5
--	---

1-2 LES CIBLES BACTERIENNES DES ANTIBIOTIQUES	7
---	---

2- LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	9
--	----------

2-1 LA RESISTANCE NATURELLE	9
-----------------------------------	---

2-2 LA RESISTANCE ACQUISE.....	9
--------------------------------	---

2-3 EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	11
---	----

2-4 LES MECANISMES DE RESISTANCE	11
--	----

2-4-1 <i>Diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques</i>	12
--	----

2-4-1-1 Modification de la perméabilité membranaire	13
---	----

2-4-1-2 Les systèmes d'efflux bactériens.....	14
---	----

2-4-2 <i>Dégradation et modification enzymatique des antibiotiques</i>	16
--	----

2-4-3 <i>Altération des cibles cellulaires des antibiotiques</i>	18
--	----

3- STRATEGIES MOLECULAIRES DE LUTTE CONTRE LA RESISTANCE BACTERIENNE	19
---	-----------

3-1 LES NOUVELLES CIBLES BACTERIENNES.....	20
--	----

3-1-1 <i>Les β-lactamases</i>	20
--	----

3-1-2 <i>Les pompes d'efflux</i>	22
--	----

3-1-3 <i>Les facteurs de virulence</i>	26
--	----

3-1-3-1 Les toxines.....	26
--------------------------	----

3-1-3-2 Les adhésines et les biofilms	28
---	----

3-1-3-3 Le quorum sensing	29
---------------------------------	----

3-1-3-3-1 Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives	29
---	----

3-1-3-3-2 Le quorum sensing chez les bactéries Gram positives.....	31
--	----

3-1-3-4 Les inhibiteurs des facteurs de virulence	32
---	----

3-1-3-4-1 Les inhibiteurs des toxines	33
---	----

3-1-3-4-2 Les inhibiteurs des adhésines	33
---	----

3-1-3-4-3 Les inhibiteurs du quorum sensing	34
---	----

3-2 LES NOUVEAUX ANTIBIOTIQUES	36
--------------------------------------	----

3-2-1 <i>Les bactériophages</i>	36
---------------------------------------	----

3-2-1-1 Les propriétés fonctionnelles des bactériophages.....	36
3-2-1-2 L'avenir de la phagothérapie	37
3-2-2 Les peptides antimicrobiens	38
3-2-2-1 Les peptides cationiques antimicrobiens (PCAs).....	38
3-2-2-1-1 Aspects structuraux	38
3-2-2-1-2 Mode d'action des PCAs	40
3-2-2-2 Les peptides anioniques antimicrobiens.....	43
3-2-2-3 Les peptides antimicrobiens en développement clinique.....	43
3-2-3 Les plantes.....	44
3-2-3-1 Les plantes, source naturelle d'antimicrobiens	45
3-2-3-2 Les plantes, source naturelle d'inhibiteurs de l'efflux bactérien	46
3-2-3-3 Les plantes, productrices d'analogues des N-acylhomosérine-lactones (AHLs).....	48
3-2-4 Les huiles essentielles	48
3-2-4-1 Définition	49
3-2-4-2 Les activités biologiques des huiles essentielles	49
3-2-4-3 Les activités antibactériennes des huiles essentielles.....	50
3-2-4-4 La composition des huiles essentielles.....	51
3-2-4-4-1 La composition chimique des huiles essentielles	51
3-2-4-4-2 Les constituants des huiles essentielles	53
3-2-4-5 Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants	56

MATERIEL ET METHODES

1- MATERIEL	63
1-1 LES SOUCHES BACTERIENNES.....	63
1-2 LES HUILES ESSENTIELLES.....	63
1-3 LES ANTIBIOTIQUES.....	63
2- METHODES	64
2-1 METHODES MICROBIOLOGIQUES	64
2-1-1 Activité antibactérienne	64
2-1-1-1 Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque	64
2-1-1-2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	65
2-1-1-2-1 Technique de macrodilution en milieu liquide	66
2-1-1-2-2 Technique de microdilution en milieu liquide	67
2-1-1-2-3 Technique de macrodilution en milieu solide.....	67
2-1-1-3 Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide	68
2-1-2 Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne (Time-kill assay).....	69
2-1-3 Expérience de lyse cellulaire	70

2-1-4 Microscopie Electronique à Transmission (MET).....	71
2-2 METHODES CHIMIQUES	72
2-2-1 Chromatographie sur colonne de silice (CC).....	72
2-2-2 Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	72
2-2-3 Résonance magnétique nucléaire (¹³ C RMN)	72
2-2-4 Identification des composés	73

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : ETUDE DU MODE D'ACTION D'HUILES ESSENTIELLES A ACTIVITE ANTIBACTERIENNE..... 71

1- RESULTATS..... 76

1-1 CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES HUILES ESSENTIELLES SUR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	76
1-2 CARACTERISATION DU MODE D'ACTION DES HUILES ESSENTIELLES D' <i>INULA GRAVEOLENS</i> ET DE <i>SANTOLINA CORSICA</i> SUR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	78
1-2-1 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrice (CMI) et Bactéricide (CMB) des huiles essentielles d' <i>Inula graveolens</i> et de <i>Santolina corsica</i>	78
1-2-2 Dynamique d'action des huiles essentielles d' <i>Inula graveolens</i> et de <i>Santolina corsica</i> : expérience de mort cellulaire.....	79
1-2-3 Détermination de l'action lytique des huiles essentielles d' <i>Inula graveolens</i> et de <i>Santolina corsica</i>	81
1-2-4 Observation des effets cellulaires générés par les huiles essentielles d' <i>Inula graveolens</i> et de <i>Santolina corsica</i> en Microscopie Electronique à Transmission (MET)	83

2- DISCUSSION 86

2-1 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES HUILES ESSENTIELLES D' <i>INULA GRAVEOLENS</i> ET DE <i>SANTOLINA CORSICA</i>	86
2-2 CARACTERISATION DU MODE D'ACTION DES HUILES ESSENTIELLES D' <i>INULA GRAVEOLENS</i> ET DE <i>SANTOLINA CORSICA</i>	87

CHAPITRE 2 : MOLECULES IMPLIQUEES DANS L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CISTUS LADANIFERUS*..... 86

1- RESULTATS..... 92

1-1 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CISTUS LADANIFERUS</i>	92
1-1-1 Analyses microbiologiques de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i>	92
1-1-1-1 Criblage de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i> par la méthode de diffusion par disque	92
1-1-1-2 Tests de détermination de la CMI de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i>	94

1-1-2 Analyses chimiques de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i>	96
1-2 MOLECULES IMPLIQUEES DANS L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CISTUS LADANIFERUS</i>	98
1-2-1 Chromatographie sur colonne de silice de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i>	98
1-2-1-1 Analyses chimiques des fractions chromatographiques FH et FO de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i>	99
1-2-1-2 Détermination de la CMI des fractions chromatographiques FH et FO de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i>	101
1-2-2 Chromatographie sur colonne de silice de la fraction oxygénée de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i>	102
1-2-2-1 Analyses chimiques des fractions chromatographiques FO _A et FO _B , isolées de la fraction oxygénée FO ..	103
1-2-2-2 Détermination de la CMI des fractions chromatographiques FO _A et FO _B de la fraction oxygénée FO	105
1-2-3 Bilan	106
1-2-3-1 Protocole de fractionnement	106
1-2-3-2 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i> et de ses fractions chromatographiques	107
1-2-4 Observation en MET des effets cellulaires induits par l'huile essentielle de <i>Cistus ladaniferus</i> et sa fraction oxygénée FO _B sur <i>E. aerogenes</i> EA 289	108
2- DISCUSSION	112
2-1 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CISTUS LADANIFERUS</i>	112
2-2 MOLECULES IMPLIQUEES DANS L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CISTUS LADANIFERUS</i>	113
2-3 EFFETS CELLULAIRES INDUITS PAR LES ALCOOLS TERPENIQUES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CISTUS LADANIFERUS</i> SUR LA BACTERIE MULTI-RESISTANTE <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i> EA289	114
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
ANNEXE : PUBLICATIONS	

AVANT-PROPOS

Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme.

La montée des résistances est due à la prescription immodérée et souvent inappropriée des antibiotiques. Administrés à titre curatif ou préventif, les antibiotiques favorisent l'élimination des bactéries sensibles et la sélection des plus résistantes. Ce phénomène de résistance aux antibiotiques est général et concerne toutes les espèces bactériennes. Des bactéries résistantes aux diverses classes d'antibiotiques disponibles sur le marché ont, en effet, été identifiées. Certains pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*), responsables de pneumopathies, de méningites et d'otites, sont devenus résistants à la pénicilline. De même, de nombreuses souches de staphylocoques dorés (*Staphylococcus aureus*), à l'origine d'abcès ou de septicémies, sont devenues multi-résistantes. Elles sont insensibles à plusieurs antibiotiques, y compris à la vancomycine, qui était, encore très récemment, utilisée comme le médicament du dernier recours. La situation est identique pour les entérocoques (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*), des bactéries présentes normalement dans l'intestin, qui peuvent aussi causer de graves endocardites et septicémies.

La prolifération de bactéries résistantes est devenue une préoccupation majeure dans le domaine de la santé. En devenant insensibles à tout traitement, ces bactéries limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par les bactéries résistantes entraînent souvent une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité. L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour, finalement, conduire à une impasse thérapeutique.

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

Le but de mon travail a été de caractériser le mode d'action des huiles essentielles à activité antibactérienne et de rechercher, dans le réservoir de molécules chimiques qu'elles constituent, des composés susceptibles d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes.

INTRODUCTION

1- Les antibiotiques

Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » (Prescott *et al.*, 1995). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides». L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé.

1-1 Les antibiotiques naturels et synthétiques

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

Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un « âge d'or », qui s'est étendu de 1936 à 1962 (fig. 1).

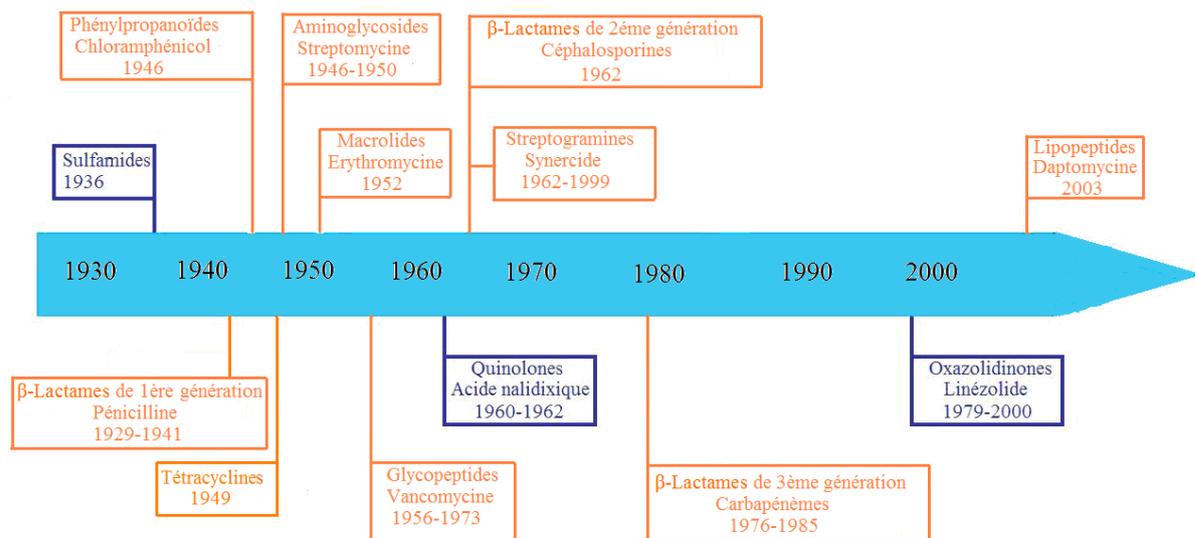


Figure 1 : Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle () et d'origine synthétique () (d'après Singh et Barrett, 2006)

La pénicilline, premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium* sp, marque le début de l'ère antibiotique. Elle appartient à la classe des β-lactames. Sa découverte a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les phénylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogramines et les β-lactames de deuxième génération. Une troisième génération de β-lactames a été commercialisée à la fin des années 1970 : les carbapénèmes.

Il existe seulement trois classes d'antibiotiques synthétiques. La première classe est représentée par les sulfamides, qui sont aussi les premiers antibiotiques à avoir été utilisés cliniquement (Laub, 1986). La seconde classe, les quinolones (ou fluoroquinolones), a été découverte lors de la synthèse de la chloroquine, un anti-paludéen, en 1962 (Singh et Barrett, 2006). Les oxazolidinones représentent la troisième classe d'antibiotiques synthétiques. Découverte en 1979, celle-ci a conduit au développement et à la commercialisation du linézolide en 1999. Avec les lipopeptides cycliques (daptomycine), les oxazolidinones constituent l'une des rares classes d'antibiotiques mise sur le marché au cours de ces dix dernières années.

1-2 Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie (fig. 2).

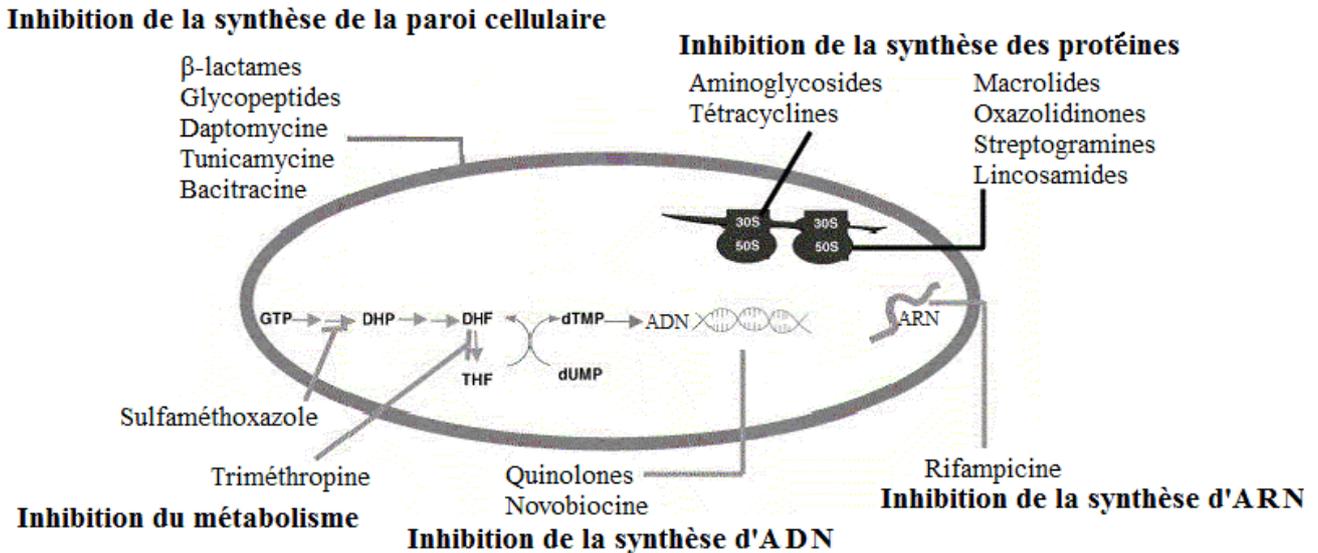
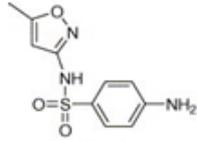
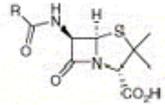
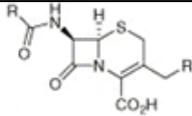
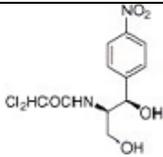
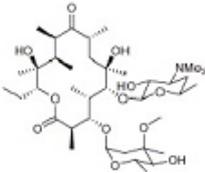
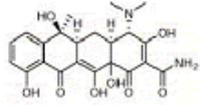
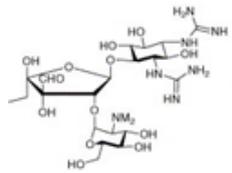
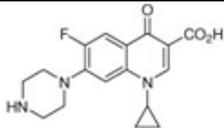


Figure 2 : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

Avec DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate

Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (tableau 1).

Tableau 1 : Mode d'action des principales classes d'antibiotiques

Classe	Origine	Mode d'action	Exemple	Structures chimiques (Singh et Barrett, 2006)
Sulfamides	Synthétique	- Inhibent la synthèse de l'acide folique - Entraînent une diminution de la production	Sulfaméthoxazole	
β - Lactames de 1 ^{ère} génération	<i>Penicillium notatum</i>	Inhibent la synthèse du peptidoglycane par blocage de la transpeptidation	Pénicilline	
β - Lactames de 2 ^{ème} génération	<i>Cephalosporum</i>	Inhibent la synthèse du peptidoglycane par blocage de la transpeptidation	Céphalosporine	
Phénylpropanoïdes	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	Chloramphénicol	
Macrolides	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Se fixent sur la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	Erythromycine	
Tétracyclines	<i>Streptomyces</i>	Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome	Tétracycline	
Aminoglycosides	<i>Streptomyces</i> ou <i>Micromonospora</i>	Se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et bloquent en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture	Streptomycine	
Quinolones et fluoroquinolones	Synthétique	Inhibent la gyrase bactérienne	Ciprofloxacine	

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

2- La résistance aux antibiotiques

2-1 La résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle. Les bactéries du genre *Mycoplasma* sp illustrent ce dernier exemple. Le composant principal de la paroi des bactéries est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Dépourvus de cet élément constitutif, les mycoplasmes présentent une résistance intrinsèque aux β -lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (Normak et Normak, 2002).

2-2 La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens *et al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou

incorrectement dosées (Yagupsky, 2006). La France, malgré une décroissance de sa consommation, peut-être liée aux campagnes publiques de sensibilisation, reste le second pays consommateur d'antibiotiques en Europe. L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (Yagupsky, 2006).

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (fig. 3)

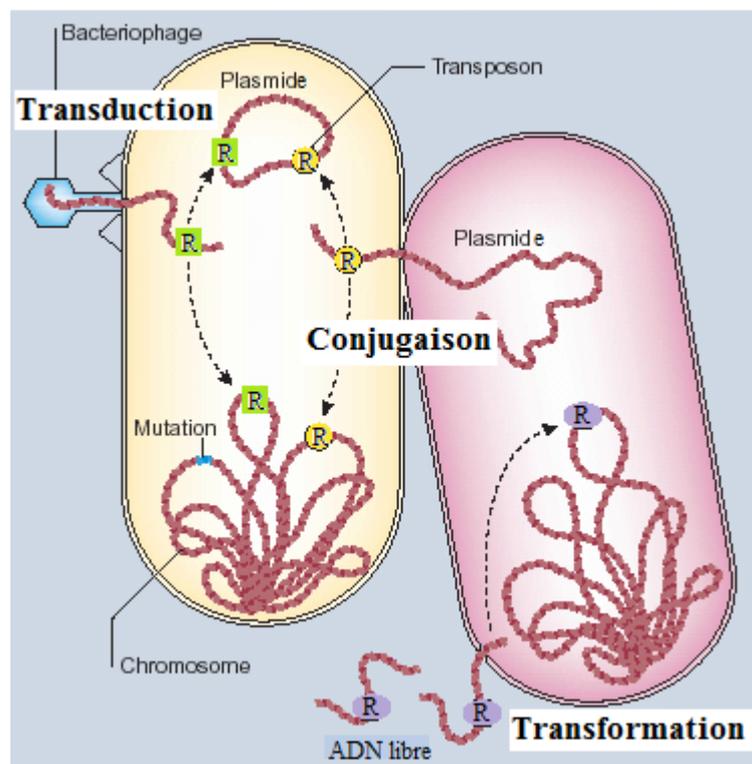


Figure 3 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004)

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron *vanA*, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Noble *et al.*, 1992 ; Alekshun et Levy, 2007).

2-3 Épidémiologie de la résistance aux antibiotiques

Les résistances s'étendent quantitativement mais aussi qualitativement. Depuis plus de 20 ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrits avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes (Aleksun et Levy, 2007). C'est le cas des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), à la vancomycine (SARV) ou de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA), des souches de pneumocoques de sensibilité diminuée ou résistantes aux pénicillines (PSDP et PRP, respectivement), des souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides (ERG), des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ou des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Des souches de SARMs résistantes à la daptomycine, antibiotique agréé depuis 2003, ont récemment été identifiées (Mangili *et al.*, 2005 ; Marty *et al.*, 2006). L'impact de cette multi-résistance aux antibiotiques est important au niveau clinique, en termes de morbidité et de mortalité, mais aussi sur le plan économique car les infections liées aux bactéries multi-résistantes engendrent des coûts d'hospitalisation élevés (6 000 à 30 000 \$, soit 4 300 à 21 550 €) (Cosgrove *et al.*, 2005 ; Maragakis *et al.*, 2008). L'extension géographique des résistances se produit au niveau international (Afset et Maeland, 2001 ; Boras *et al.*, 2001) mais aussi dans le milieu de vie. Les infections causées par les bactéries résistantes et multi-résistantes, autrefois cantonnées au milieu hospitalier, deviennent communautaires (extra-hospitalières) (Crum, 2005 ; Maltezou et Giamarellou, 2006). Ainsi, le nombre de personnes, susceptibles d'être exposées aux bactéries résistantes et multi-résistantes, est continuellement démultiplié.

2-4 Les mécanismes de résistance

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances (fig. 4).

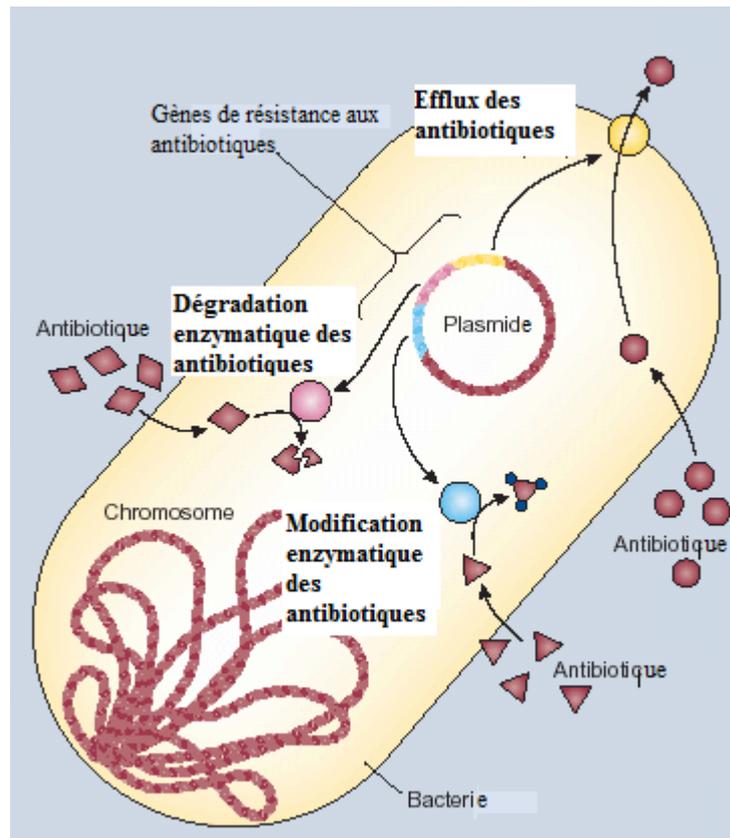


Figure 4 : L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy et Marshall, 2004)

Aux niveaux physiologique et moléculaire, la résistance bactérienne est la résultante de trois phénomènes : la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique par diminution de la perméabilité membranaire et/ou sur-activation de l'efflux bactérien (fig. 4), l'inactivation des antibiotiques par dégradation ou modification enzymatique (fig. 4) et l'altération de leurs cibles cellulaires.

2-4-1 Diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques

Les bactéries sont capables de se protéger de l'action des antibiotiques en réduisant la concentration intracellulaire de ces derniers. Pour cela, leur absorption dans les cellules peut être limitée par une modification de la perméabilité membranaire. Pour les antibiotiques ayant pénétré dans le milieu intracellulaire, une deuxième option est envisageable : leur prise en charge par les pompes d'efflux membranaires, qui assurent leur exportation active hors des cellules.

2-4-1-1 Modification de la perméabilité membranaire

La paroi des bactéries Gram positives est presque exclusivement constituée de peptidoglycane, auquel sont associés des polymères d'acide teichoïque. La paroi des bactéries Gram négatives est plus complexe. Le peptidoglycane, réduit à une fine couche, est entouré par deux membranes. La membrane interne comporte majoritairement des phospholipides alors que la membrane externe présente une structure asymétrique, avec une face interne constituée de phospholipides et une face externe, caractérisée par la présence du lipopolysaccharide (LPS) (Cronan *et al.*, 1987). Le LPS représente 75% de la surface totale de la membrane externe et établit des interactions spécifiques avec des protéines membranaires, telles que les porines.

Le LPS est constitué de trois domaines structuraux, comprenant le lipide A, qui assure son ancrage à la membrane externe, un oligosaccharide central et l'antigène O, formé de plusieurs unités oligosaccharidiques. Son caractère hydrophile rend la membrane externe des bactéries Gram négatives imperméable à la plupart des macromolécules hydrophobes. Cette particularité structurale est, en partie, responsable de la résistance intrinsèque des entérobactéries et de *P. aeruginosa* à certains antibiotiques hydrophobes, comme les macrolides (Normak et Normak, 2002). La forte charge négative du LPS facilite néanmoins le passage des antibiotiques cationiques. Des modifications chimiques, visant à diminuer la charge négative nette du LPS, ont ainsi été observées dans certains cas de résistances. Le transfert de groupements polaires, comme la phosphoéthanolamine ou le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose sur le lipide A, confère à certaines souches de *Salmonella enterica* une résistance accrue à la polymyxine B (Helander *et al.*, 1994).

Certains antibiotiques, comme les β -lactames, le chloramphénicol et les fluoroquinolones, traversent la membrane externe des bactéries Gram négatives et atteignent leurs cibles grâce aux porines (Nikaido, 2003). De ce fait, des changements au niveau de ces canaux protéiques limitent l'efficacité des antibiotiques. La résistance de certaines souches d'*Enterobacter aerogenes* à l'imipénème (β -lactame de 3^{ème} génération) est ainsi causée par une diminution de l'expression des gènes codant pour les porines (Chow et Shlaes, 1991). La taille ou la sélectivité des porines peut également être modifiée et aboutir à une exclusion des antibiotiques (Nikaido et Rosenberg, 1981).

2-4-1-2 Les systèmes d'efflux bactériens

Les premiers cas de résistance par efflux ont été mis en évidence pour des agents chimiothérapeutiques, efflués par la glycoprotéine P des cellules cancéreuses de mammifères (Juliano et Ling, 1976). L'efflux des antibiotiques a été observé pour la première fois avec la tétracycline à la fin des années 1970 (Levy et McMurry, 1978).

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Ces pompes peuvent être des transporteurs « drogue-spécifiques » et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques. Tel est le cas des pompes Tet, qui effluent exclusivement les tétracyclines ou des pompes Mef, qui sont spécifiques des macrolides (Markham et Neyfakh, 2001). Cependant, la plupart de ces transporteurs peut prendre en charge des composés de structures très différente et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MDR : multi-résistance aux drogues) des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2004). Les gènes, codant pour les pompes « drogue-spécifiques », sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui codent pour les pompes MDR sont, pour la plupart, chromosomiques (Butaye *et al.*, 2003).

Chez les bactéries Gram négatives, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites constitués d'une pompe transmembranaire, d'une protéine périplasmique de jonction (MFP : Membrane Fusion Protein) et d'une porine, enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protein). Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont les pompes AcrB chez *Escherichia coli* ou MexB chez *P. aeruginosa*. Chez les bactéries Gram positives, les systèmes d'efflux ne sont constitués que de la pompe. Les plus étudiés sont les pompes NorA ou QacA, chez *S. aureus*, et PmrA chez *Streptococcus pneumoniae*.

Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par la dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, SMR et RND) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par l'hydrolyse de l'ATP (famille ABC) (fig. 5).

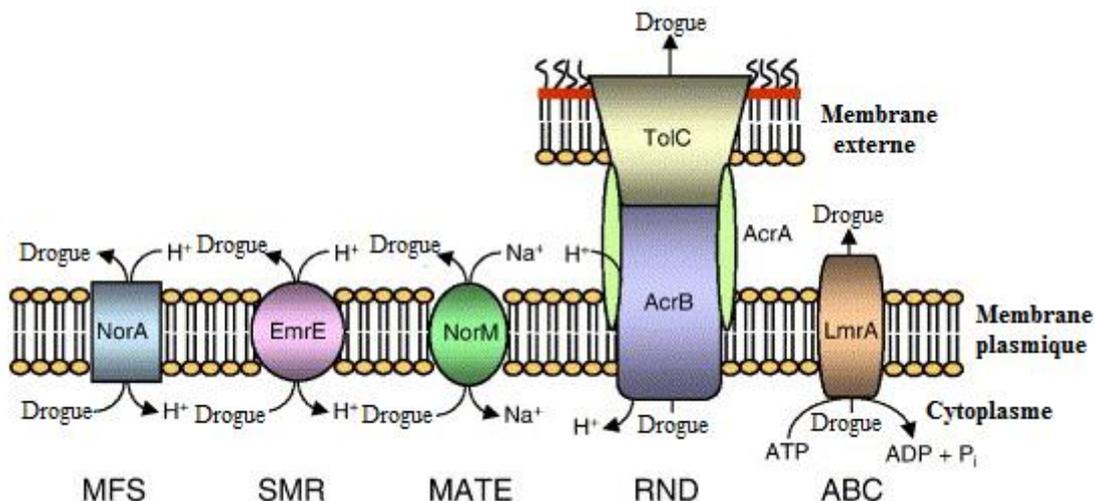


Figure 5 : Illustration schématique des principales pompes bactériennes d'efflux
(Kumar et Schweizer, 2005)

La famille des MFS (Major Facilitator Superfamily) a été découverte par séquençage de génome (Pao *et al.*, 1998). Les systèmes de transport, utilisés par cette famille, peuvent être de type uniport, symport et antiport. Les pompes MFS sont impliquées dans le transport des sucres, des métabolites, des anions et des antibiotiques. Cette diversité permet de diviser cette famille en 17 sous-groupes (Pao *et al.*, 1998). Les pompes MFS, effluant les antibiotiques, forment des systèmes antiport antibiotique/H⁺. Chez *S. aureus*, la pompe NorA est responsable de la résistance aux fluoroquinolones (Yoshida *et al.*, 1990).

Les transporteurs de la famille SMR (Small Multidrug Resistance) sont de petite taille (Paulsen *et al.*, 1996). Ce sont des tétramères constitués d'environ 110 acides aminés qui utilisent la force protomotrice pour effluer les colorants, les antibiotiques et les cations. Chez *S. aureus*, on retrouve la pompe Smr dont le gène est porté par un plasmide (Grinius *et al.*, 1992). Chez *Escherichia coli*, cette famille est représentée par la pompe EmrE.

La famille des RND (Resistance-Nodulation cell Division) représente la principale cause de résistance et de multi-résistance par efflux chez les bactéries Gram négatives. Les pompes RND peuvent prendre en charge différents antibiotiques mais aussi des métaux lourds, des colorants, des détergents et des solvants. Le mécanisme utilisé pour le transport est un antiport substrat/H⁺. Le système AcrAB-TolC d'*E. coli* est constitué de la pompe RND AcrB, de la MFP AcrA et de l'OMP TolC (Ma *et al.*, 1995).

Les transporteurs de la famille MATE (Brown *et al.*, 1999) ont une topologie membranaire identique à ceux de la famille MFS, mais n'ont pas d'homologie de séquence

avec ces derniers. Ces pompes utilisent le gradient de Na^+ comme source d'énergie pour effluer les colorants cationiques et les fluoroquinolones. On peut citer comme exemple NorM, pompe d'efflux de *Vibrio parahaemolyticus* formée d'environ 450 acides aminés (Morita *et al.*, 1998).

Les transporteurs ABC sont essentiels au métabolisme bactérien (Van Veen et Konings, 1998). Ils sont chargés d'importer de nombreuses substances nécessaires à la bactérie, comme les sucres, les acides aminés, les ions métalliques et les protéines. Ces transporteurs sont des complexes multi-protéiques constitués d'une partie transmembranaire, formant un pore, et de deux sous-unités cytoplasmiques, qui possèdent l'activité ATPasique, nécessaire au transport. Cependant, les pompes d'efflux appartenant à cette famille sont rares chez les bactéries (Kumar et Schweizer, 2005). La pompe LmrA de *Lactococcus lactis* est donc très étudiée car cette bactérie non pathogène, pourrait transférer ce gène de résistance à d'autres bactéries (Bolhuis *et al.*, 1996).

2-4-2 Dégradation et modification enzymatique des antibiotiques

Les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier les antibiotiques. Les réactions enzymatiques, conduisant à l'inactivation des antibiotiques, peuvent s'effectuer par hydrolyse, transfert de groupements chimiques ou oxydo-réduction (Wright, 2005).

De nombreux antibiotiques possèdent, dans leur structure, des liaisons chimiques sensibles à l'hydrolyse. Des enzymes du métabolisme bactérien ont évolué pour cliver ces liaisons, entraînant ainsi l'apparition de souches résistantes. Les β -lactamases, qui clivent le noyau β -lactame des pénicillines et des céphalosporines, font partie de ces enzymes. Pour exercer leur action, les β -lactamases à sérine requièrent la présence d'un résidu de sérine au niveau de leur site catalytique, tandis que les métallo- β -lactamases nécessitent l'intervention d'un ou plusieurs ions métalliques, comme le zinc Zn^{2+} (fig. 6).

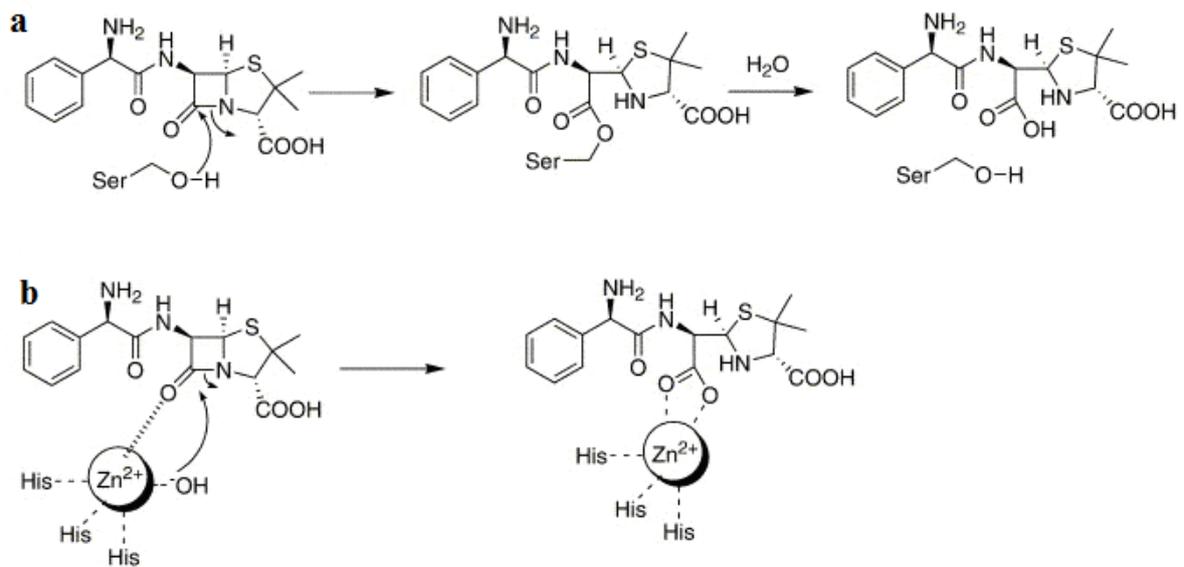


Figure 6 : Mode d'action des β -lactamases à sérine (a) et des métallo- β -lactamases (b) contre l'amoxicilline (Wright, 2005)

Le premier cas de résistance aux pénicillines (ou β -lactames de 1^{ère} génération), par production de pénicillinases (β -lactamases), a été identifié chez *E. coli* en 1940 (Abraham et Chain, 1940). Certaines β -lactamases sont qualifiées de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) car elles provoquent simultanément la résistance aux β -lactames de première, deuxième et troisième générations, ainsi qu'à l'aztréoname. La présence de BLSE est souvent liée à des taux de morbidité et de mortalité élevés (Masterton *et al.*, 2003). A côté des β -lactamases, d'autres enzymes, comme certaines estérases, participent à l'inactivation des antibiotiques. Les macrolides sont cyclisés grâce à une liaison ester et sont rendus inactifs par les macrolides estérases, qui clivent cette liaison fonctionnelle (fig. 7) (Wright, 2005). Les gènes, qui codent pour la synthèse de ces enzymes sont situés sur des éléments mobiles du génome, ce qui implique une grande diffusion de ce mode de résistance (Biskri et Mazel, 2003).

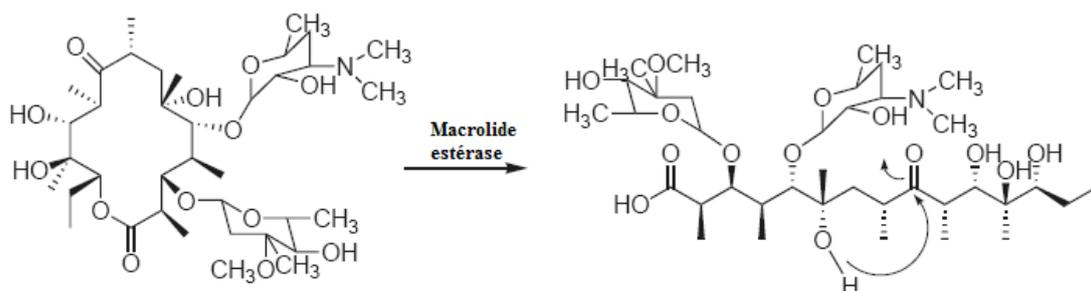


Figure 7 : Macrolide inactivé par action d'une macrolide estérase (Wright, 2005)

Les antibiotiques peuvent également être inactivés par ajout de groupements chimiques au cours de réactions d'acétylation, de phosphorylation, de glycosylation, de nucléotidylation ou de ribosylation. Les enzymes impliquées dans ce type de mécanisme forment le groupe le plus vaste des enzymes de résistance. Elles ont généralement besoin de co-substrats, tels que l'ATP ou l'acétyl-CoA, présents dans le cytoplasme. L'inactivation des antibiotiques ne se produira donc qu'après leur pénétration dans la bactérie (Wright, 2005). Ainsi, les aminoglycosides acétyltransférases (AAC) ajoutent un groupement acétyle sur les fonctions amine ou hydroxyle des aminoglycosides. Cette modification diminue l'affinité de ces derniers pour leur cible, à savoir la sous-unité 30S des ribosomes. Les aminoglycosides sont aussi la cible des aminoglycosides kinases, qui empêchent leur liaison à leur cible, en catalysant le transfert d'un groupement phosphate sur une fonction hydroxyle. Les modifications par nucléotidylation, ribosylation ou glycosylation se retrouvent souvent chez les bactéries productrices d'antibiotiques. En développant ces mécanismes de résistance, elles sont capables de se protéger de l'action de ces derniers.

Les modes de résistance par hydrolyse et par modification enzymatique sont les plus répandus mais de nouvelles voies d'inactivation des antibiotiques apparaissent. Ainsi, l'activité d'enzymes oxydo-réductrices a été décelée dans les mécanismes de résistance développés par certaines bactéries. Ces mécanismes sont comparables au processus de détoxification des mammifères, catalysé par les cytochromes P-450 (Guengerich, 2001).

2-4-3 Altération des cibles cellulaires des antibiotiques

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance (Lambert, 2005). Elle est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation. Les changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire de la cible.

La biosynthèse du peptidoglycane est assurée par une transpeptidase. L'acquisition d'une transpeptidase modifiée confère la résistance à la méthicilline et aux autres β -lactames, à de nombreuses bactéries, incluant les SARMs (Enright *et al.*, 2002). Cependant, cette modification doit être compensée par des changements cellulaires. Ainsi, pour que la synthèse du peptidoglycane se déroule correctement, la composition et la structure de ce dernier doivent être légèrement modifiées, ce qui implique la mise en jeu de nombreux autres gènes bactériens (Lambert, 2005). Les enzymes impliquées dans la réplication, comme l'ADN gyrase, et la transcription, comme l'ARN polymérase, sont respectivement prises pour cibles

par les fluoroquinolones et la rifampicine. Des mutations, au niveau des gènes codant pour ces enzymes, ont été mises en évidence chez *Helicobacter pylori* et *Mycobacterium tuberculosis* (Willmott et Maxwell, 1993 ; Heep *et al.*, 2000).

La modification peut toucher la structure de la cible mais aussi sa concentration. Les cibles de la vancomycine sont les sous-unités constitutives du peptidoglycane. L'épaississement de la paroi, observé chez des souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (SARV), serait responsable de l'inactivation de cet antibiotique. En effet, l'augmentation du nombre de cibles piègerait les molécules de vancomycine, les rendant ainsi inefficaces contre ce type de bactéries (Cui *et al.*, 2003).

3- Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne

La montée des résistances contre les principales classes d'antibiotiques, combinée au nombre limité d'agents en cours de développement, a conduit à l'avènement de l'ère post-antibiotique. Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les champs d'investigation sont vastes. Toutefois, deux grandes stratégies, recourant aux progrès récents de la modélisation moléculaire, de la biologie moléculaire, de la génomique et de la protéomique, se dessinent dans le domaine de la recherche.

La plus originale se base sur l'identification de nouvelles cibles bactériennes, en vue de développer des agents susceptibles d'inhiber les mécanismes de résistance ou d'interférer avec la virulence bactérienne (Tan et Darren, 2000 ; Schmidt, 2004 ; Falconner et Brown, 2009). Au lieu de tuer les bactéries, ces nouvelles molécules atténueraient leur pouvoir pathogène en ciblant leurs gènes de résistance, leurs facteurs de virulence ou en entravant la communication intercellulaire. L'idée sous-jacente est d'empêcher les bactéries de s'adapter à leur environnement sans porter atteinte à leur survie, ce qui devrait ainsi limiter l'apparition des résistances. En réduisant la pathogénicité et la résistance bactérienne, ces molécules devraient permettre de restaurer l'activité des antibiotiques conventionnels devenus aujourd'hui inefficaces.

Les efforts se concentrent également sur la recherche d'agents antibactériens, capables d'agir par de nouveaux mécanismes d'action (Tan et Darren, 2000 ; Schmidt, 2004 ; Falconner et Brown, 2009). Ces molécules devraient être radicalement différentes des antibiotiques classiques, qui concentrent leurs effets sur une seule et même cible bactérienne. Aussi, pour être innovants, les nouveaux antibactériens devraient pouvoir induire la mort

cellulaire en agissant simultanément sur plusieurs cibles bactériennes ou en développant des mécanismes d'action originaux. Depuis quelques années, les substances naturelles, qui avaient été délaissées au profit des molécules de synthèse, connaissent un regain d'intérêt. Les ressources naturelles sont donc à nouveau exploitées pour mener à terme de telles recherches. Actuellement, l'accent est mis sur l'exploration de nouveaux réservoirs naturels, comme les peptides antimicrobiens, qui montrent déjà des résultats prometteurs. Les ressources plus anciennes, comme les bactériophages ou les plantes, suscitent également un regain d'intérêt.

3-1 Les nouvelles cibles bactériennes

3-1-1 Les β -lactamases

L'une des approches pour rétablir l'efficacité des antibiotiques classiques, consiste à rechercher des molécules capables d'interférer avec les mécanismes de résistance développés par les bactéries. Ce concept, connu sous le nom de « conversion phénotypique », a déjà conduit à la commercialisation de l'Augmentin® dès le début des années 1980. Ce médicament, administré par voie orale, est une combinaison de deux molécules : un inhibiteur des β -lactamases (β LI), l'acide clavulanique, et un antibiotique appartenant à la classe des β -lactames, l'amoxicilline. En protégeant l'antibiotique de l'action enzymatique, l'acide clavulanique restaure son spectre d'action contre la plupart des germes producteurs de β -lactamases (fig. 8), dont *S. aureus* et *E. coli*. L'usage clinique de l'Augmentin® et de son analogue, le Timentin® (acide clavulanique-ticarclilline), a permis de traiter un panel très large d'infections allant de la sinusite à la septicémie (Drawz et Bonomo, 2010).

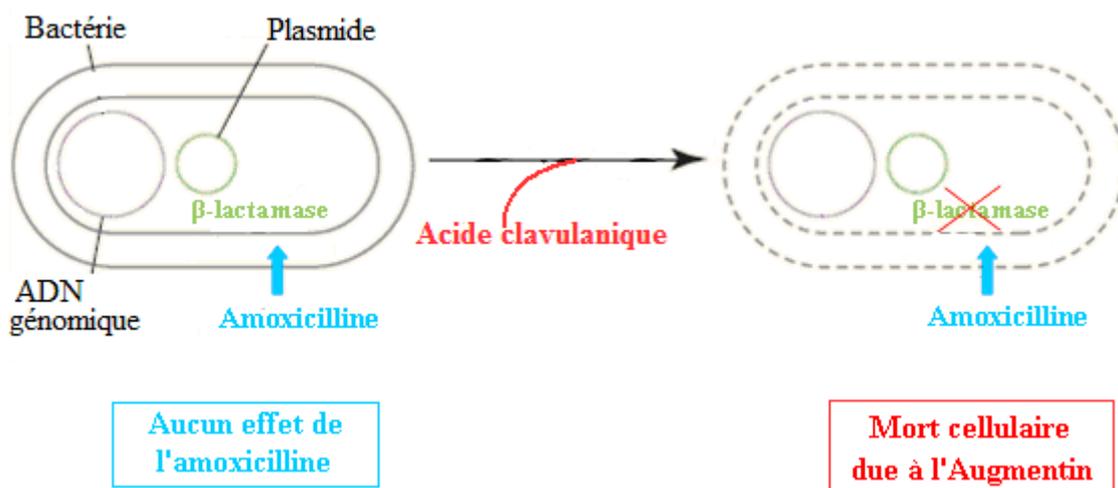


Figure 8 : Mode d'action de l'Augmentin® (adapté de Tan et Darren, 2000)

Avec l'identification des inhibiteurs sulbactame et tazobactame (fig. 9), d'autres combinaisons (piperacilline-tazobactame, ampicilline-sulbactame) ont vu le jour et donné lieu à la commercialisation du Zosyn® et de l'Unasyn®.

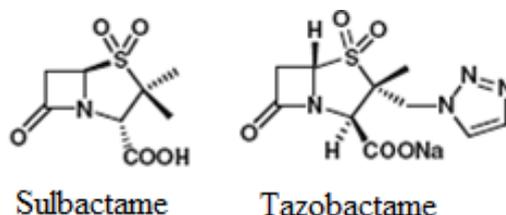


Figure 9 : Structures chimiques de deux inhibiteurs des sérine- β -lactamases : le sulbactame et le tazobactame (Drawz et Bonomo, 2010)

Toutefois, sans entacher l'efficacité de ces médicaments, il apparaît que la plupart des β LIs agissent sur les β -lactamases à serine. L'identification d'inhibiteurs des métallo- β -lactamases (M β Ls) représente un réel enjeu, car les souches productrices de M β Ls sont résistantes à une vaste gamme de β -lactames, incluant les carbapénèmes, ainsi qu'à la plupart des inhibiteurs des β -lactamases à sérine (Walsh *et al.*, 2005). Leur conception a été en partie limitée par la diversité structurale des M β Ls, qui comprennent trois sous-classes (B1, B2, B3), ainsi que par la complexité de leurs profils catalytiques, qui requièrent l'intervention d'un ou plusieurs ions métalliques au niveau du site actif. Les récents progrès de la cristallographie aux rayons X ont facilité la compréhension du mécanisme d'action des M β Ls et permis de développer des inhibiteurs potentiels comme les biphényles tétrazoles, les cystéinyle-peptides, les mercaptocarboxylates et les dérivés de l'acide succinique. Les molécules les plus prometteuses sont celles dotées d'un groupement chélateur (thiol, carboxylate) et d'un cycle aromatique. Cette structure leur permet de rétablir l'activité antibiotique de plusieurs familles de β -lactames (Bebrone *et al.*, 2010).

Si les β -lactamases sont une cible de choix pour la conception de molécules capables d'inhiber la résistance bactérienne, d'autres enzymes, également impliquées dans la dégradation des antibiotiques, ont été étudiées en vue d'identifier des inhibiteurs potentiels de leur action. Ainsi, en recourant à la biologie moléculaire, Guerrier-Takada *et al.* (1997) ont achevé la conversion phénotypique de souches résistantes d'*E. coli* par transfert de plasmides contenant des oligoribonucléotides spécifiques, appelés EGS. Ces séquences ont été conçues pour se complexer avec les ARNm codant pour la synthèse de deux enzymes : les acyltransférases, responsables de l'inactivation du chloramphénicol, et les β -lactamases à

sérine, qui dégradent le noyau β -lactame des ampicillines. Les complexes ainsi formés deviennent la cible de l'endoribonucléase RNase P, qui inactive ces ARNm par clivage enzymatique. Par cette démarche singulière, les souches résistantes redeviennent sensibles à deux familles d'antibiotiques simultanément : les phénylpropanoïdes et les β -lactames.

3-1-2 Les pompes d'efflux

A un autre niveau, la conversion phénotypique peut être obtenue par la restauration d'une concentration seuil en antibiotique, capable d'induire la mort cellulaire. Cette voie originale se base essentiellement sur la recherche d'inhibiteurs des pompes d'efflux (EPIs). Deux options sont envisageables pour procéder à l'identification de tels agents.

La première approche utilise la spécificité d'action des pompes d'efflux, vis-à-vis de certaines classes d'antibiotiques, pour concevoir des molécules antagonistes de ces derniers. Les antibiotiques, qui servent de point de départ à la synthèse de ces molécules, sont modifiés par dérivatisation chimique. La présence de motifs structuraux conservés assure leur prise en charge par les pompes d'efflux, au niveau desquelles elles vont générer une inhibition. Ainsi, l'administration de tels EPIs avec des antibiotiques devrait permettre de restituer le spectre initial d'action de ces derniers (Lynch, 2006). L'exemple le plus éloquent en la matière, concerne une série de molécules dérivant de la tétracycline par des substitutions en position C-13, comme la 13-cyclopentylthio-5-hydroxy tétracycline (13-CPTC) (Nelson *et al.*, 1993 et 1994 ; Neson et Levy, 1999). La 13-CPTC (fig. 10) est un inhibiteur compétitif de la tétracycline et de la doxycycline. En se liant à la protéine antiport TetB, elle bloque l'efflux de ces antibiotiques et restaure leur activité contre des bactéries Gram négatives (*E. coli*) et Gram positives (*S. aureus*), résistantes à la famille des tétracyclines (Nelson et Levy, 1999). Plus récemment, German *et al.* (2008) ont identifié, par le même procédé, un inhibiteur potentiel des pompes d'efflux MFS (NorA) et MATE (MepA) chez *S. aureus*. Obtenu par l'ajout d'un motif bisaryl urée en position C-7 de l'ofloxacine, cet EPI rétablit la sensibilité de *S. aureus* aux fluoroquinolones. Cependant, malgré les résultats prometteurs qu'offre cette catégorie d'EPIs, aucune molécule candidate au développement clinique n'a encore été répertoriée dans la littérature.

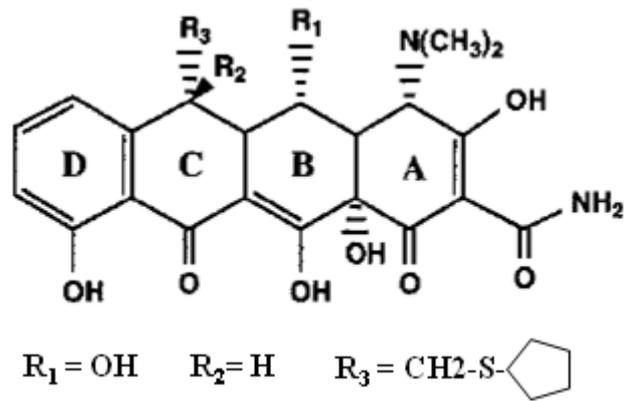


Figure 10 : Structure chimique de la 13-cyclopentylthio-5-hydroxy tétracycline (13-CPTC), inhibiteur de la pompe d'efflux TetB (Nelson et Levy, 1999)

La seconde approche vise à déterminer le potentiel synergétique de différentes combinaisons « EPI-antibiotique » par des criblages moléculaires à haut débit. Lors de ces essais, des molécules provenant de différentes chimiothèques, sont mises en présence de concentrations sub-inhibitrices en antibiotique. Les combinaisons, ainsi générées, sont testées sur des souches bactériennes possédant un efflux basal ou surexprimé. Leur capacité à restituer la sensibilité de ces bactéries aux antibiotiques est alors évaluée, afin d'identifier des inhibiteurs potentiels. Les EPIs, découverts par cette méthode, incluent des molécules d'origine synthétique et naturelle. Le premier inhibiteur synthétique des pompes RND a été découvert en 1999. Renau *et al.* (1999) ont mis en évidence l'activité inhibitrice de plusieurs molécules contre les pompes MexAB-OprM, Mex CD-OprJ et MexEF-OprN, qui contribuent à la résistance aux fluoroquinolones de *Pseudomonas aeruginosa*. La caractérisation de ces EPIs a conduit à l'identification du dipeptide MC-207,110, désigné sous le nom de Phenyl-Arginine- β -Naphthylamine (PA β N) (fig. 11a). Ce composé, administré avec la lévofloxacine, potentialise son activité *in vitro* (Renau *et al.*, 1999 ; Lomovskaya *et al.*, 2001) en générant une inhibition compétitive (Lomovskaya *et al.*, 2001 ; Pagès et Amaral, 2009). Le PA β N est un inhibiteur à large spectre d'action, car il bloque les systèmes d'efflux de nombreuses autres bactéries Gram négatives, comme *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *E. aerogenes* et *S. enterica* (Yeaman et Yount, 2003 ; Lomovskaya et Bostian, 2006 ; Lomovskaya *et al.*, 2007). Cet EPI permet, à lui seul, de restaurer l'activité de plusieurs familles d'antibiotiques, dont les fluoroquinolones, les macrolides et les tétracyclines (Lomovskaya *et al.*, 2007).

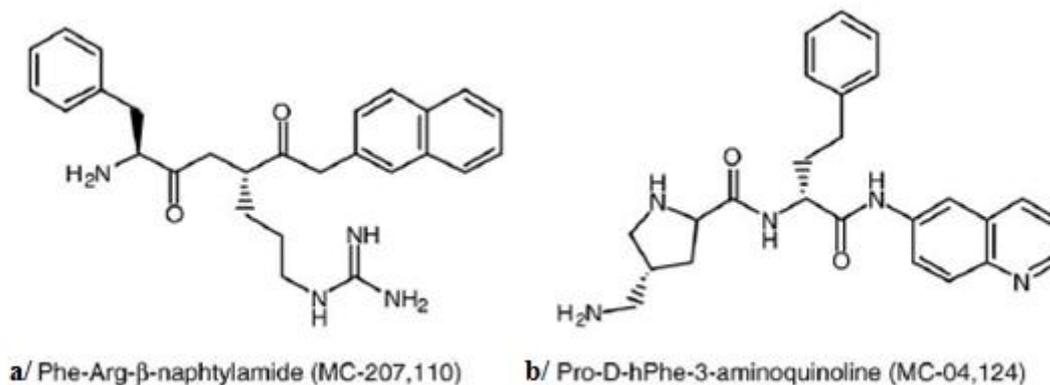


Figure 11 : Structures du principal inhibiteur des pompes d'efflux RND, le PAβN, et de son dérivé, le MC-04,124 (Pagès et Amaral, 2009)

Des molécules, dérivant du PAβN, ont été conçues pour améliorer sa stabilité (Renau *et al.*, 2001 et 2002), sa solubilité et réduire sa toxicité (Nakayama *et al.*, 2003a et 2003b). La combinaison de ces efforts a conduit à la production d'une deuxième génération d'EPIs, parmi lesquels figure le composé MC-04,124 (fig. 11b). Hormis une toxicité réduite, cet EPI présente une plus grande stabilité biologique et potentialise les effets des fluoroquinolones sur des souches de *P. aeruginosa* infectant un modèle animal expérimental (Renau *et al.*, 2003). Des inhibiteurs des pompes AcrAB-TolC et AcrEF-TolC, les alkylaminoquinolones (Mallea *et al.*, 2003 ; Chevalier *et al.*, 2004) et les arylpipérazines (Bohnert et Kern, 2005), ont également été synthétisés. Ils permettent de restaurer l'activité des fluoroquinolones sur des souches résistantes d'*E. coli*.

Si la plupart des molécules synthétiques, décrites jusqu'à présent, inhibent préférentiellement les pompes d'efflux des bactéries Gram négatives, la tendance semble être inversée pour les EPIs d'origine naturelle. Le potentiel inhibiteur de la 5'-méthoxyhydnocarpine (5'-MHC), une flavonoligane produite par la plante *Berberis fremontii*, a été découvert lors d'une étude conduite par Stermitz *et al.* (2000a). En bloquant les pompes d'efflux NorA, exprimées par des souches sauvages de *S. aureus*, la 5'-MHC (fig. 12a), potentialise l'activité antibactérienne de la berbérine, un alcaloïde isolé de la même plante. De la même manière, la 5'-MHC restaure les effets d'autres substrats des pompes NorA, incluant la norfloxacine.

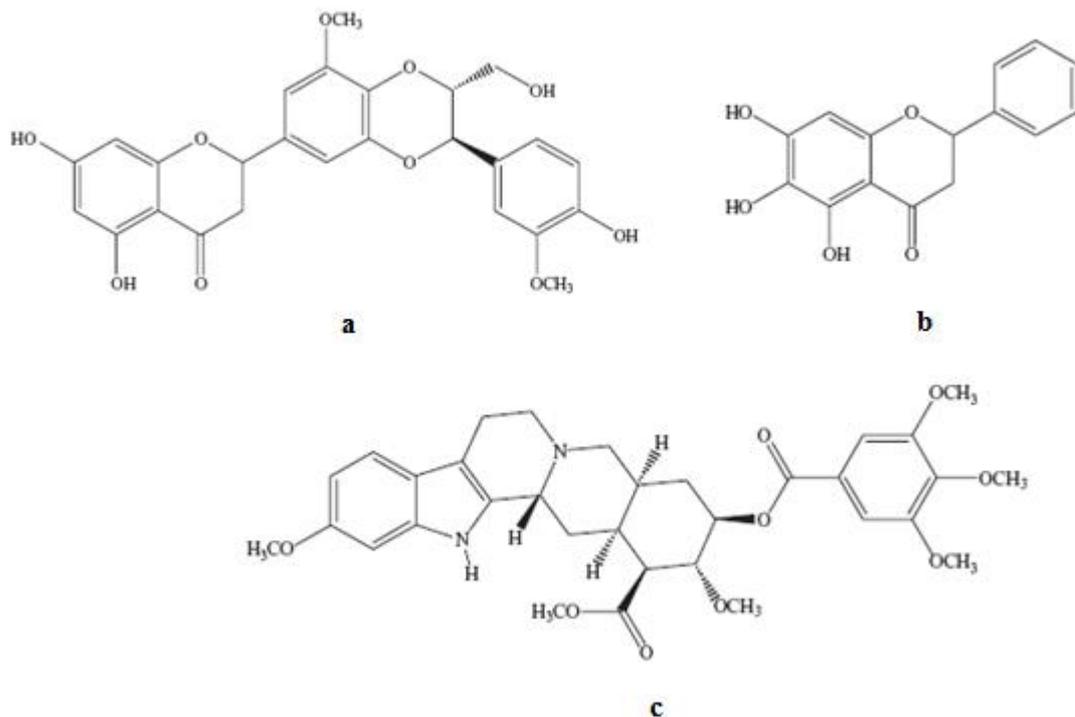


Figure 12 : Structures chimiques de quelques inhibiteurs des pompes d'efflux isolés de plantes : 5'-méthoxyhydronecarpine (a), baicaléine (b) et réserpine (c) (Stavri *et al.* 2007)

La baicaléine (fig. 12b), une trihydroxy flavone isolée des feuilles de *Thymus vulgaris*, présente un intérêt particulier du fait de son aptitude à restaurer l'activité de plusieurs antibiotiques, dont la tétracycline, l'oxacilline, le cefmétazone et l'ampicilline, sur des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARMs) (Fujita *et al.*, 2005). Deux isopimaranes, produites par *Lycopus europaeus*, augmentent les activités de la tétracycline et de l'érythromycine sur les souches résistantes *S. aureus* IS-58 et RN4220, en bloquant les pompes d'efflux TetK et MsrA (Gibbons *et al.*, 2003). La réserpine (fig. 12c), un alcaloïde produit par *Rauwolfia vomitoria* Afz, restaure les effets des fluoroquinolones (Schmitz *et al.*, 1998) et de la tétracycline contre des souches de *S. aureus* multi-résistantes, incluant *S. aureus* IS-58 et deux isolats cliniques MRSA (Gibbons et Udo, 2000). Cet EPI agit également sur les pompes d'efflux Bmr, impliquées dans la résistance à la tétracycline chez *Bacillus subtilis* (Neyfakh *et al.*, 1991).

Malgré les efforts entrepris pour identifier des inhibiteurs potentiels de l'efflux bactérien, aucune formulation de type « EPI/antibactérien » n'a encore été mise sur le marché. Des études supplémentaires, visant à évaluer la pharmacocinétique et la toxicité de ces EPIs, sont requises.

3-1-3 Les facteurs de virulence

Les bactéries synthétisent de nombreux facteurs de virulence pour assurer la dissémination de l'infection dans les cellules hôtes. Ces facteurs incluent les toxines, qui tuent directement les cellules infectées ou altèrent la transduction du signal des cellules eucaryotes, et les adhésines, qui facilitent la colonisation de l'hôte.

3-1-3-1 Les toxines

Les toxines constituent un exemple spectaculaire du détournement des fonctions cellulaires eucaryotes au profit des bactéries. De nombreuses bactéries, rencontrées en pathologie humaine, produisent ces toxines (Hedge *et al.*, 2008 ; Shrivastava et Miller, 2009). Les plus connues sont les toxines AB, comme la « Shiga toxine » d'*E. coli*, qui provoque des colites hémorragiques et la toxine de *Bacillus anthracis*, responsable de la maladie du charbon ou anthrax. Ces toxines sont composées de deux sous-unités : la sous-unité A, qui est active, et la sous-unité B, qui est une protéine de liaison multimérique (Schiavo et van der Goot, 2001). Après ancrage de la sous-unité B à un récepteur spécifique de la surface cellulaire eucaryote, la sous-unité A transite à travers la membrane de l'hôte et pénètre dans le milieu intracellulaire pour y exercer son activité enzymatique.

Dans le cas de la « Shiga toxine » (fig. 13a), la sous-unité B se lie aux gangliosides globosylcéramides Gb3, particulièrement abondants dans les reins et le cerveau. La sous-unité A inhibe la synthèse protéique de l'hôte, en clivant une liaison glycosidique de l'ARN 28S présent dans la sous-unité ribosomique 60S (Kaper *et al.*, 2004).

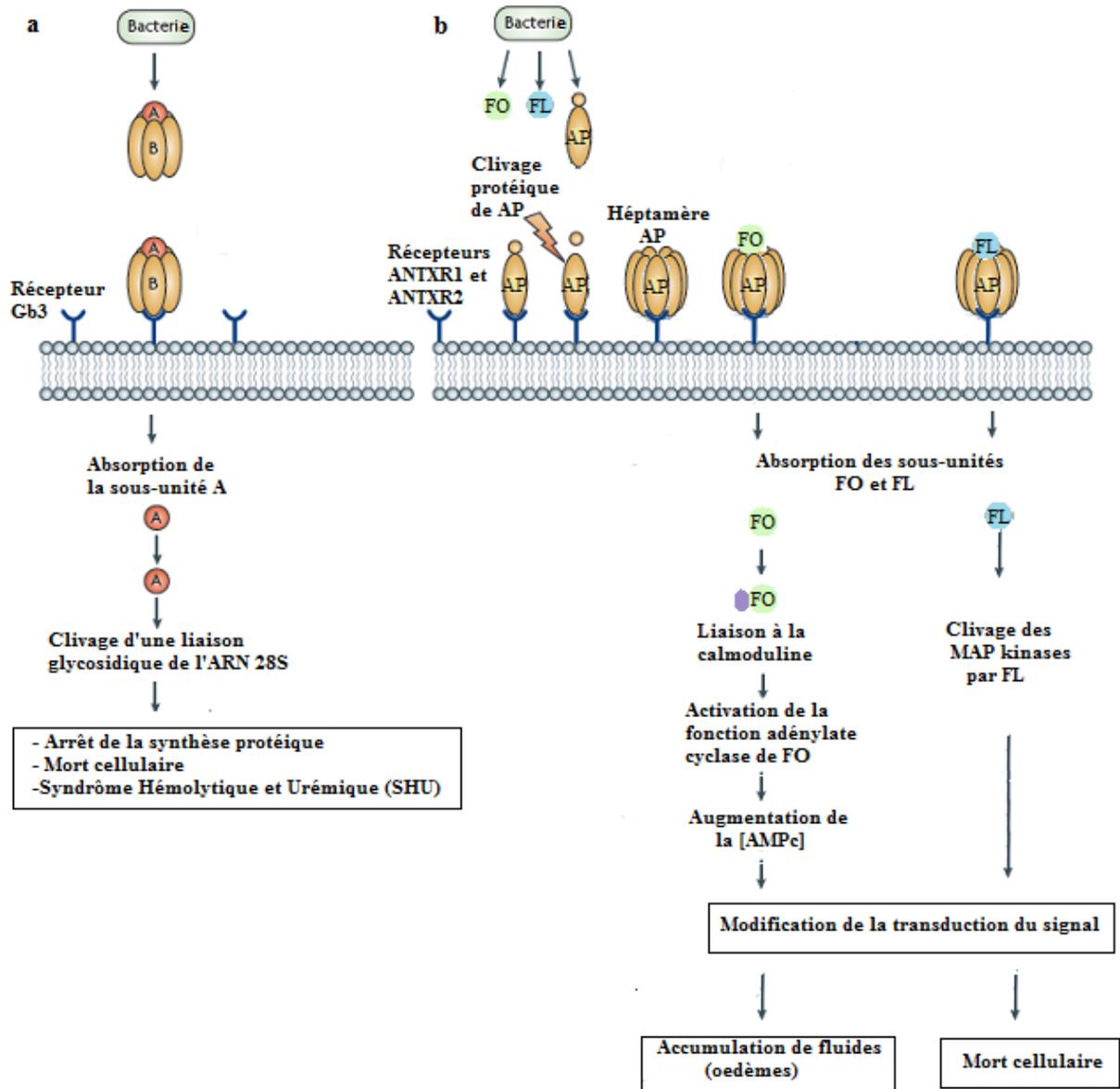


Figure 13 : Processus de transformation et d'activation des toxines bactériennes AB d'*Escherichia coli* (a) et de *Bacillus anthracis* (b) (Rasko et Sperandio, 2010)

La toxine du charbon (fig. 13b) est une toxine tripartite constituée d'une protéine de liaison, l'antigène protecteur (AP), et de deux sous-unités actives: le facteur létal (FL) et le facteur œdémateux (FO). L'antigène AP se lie aux récepteurs ANTXR1 (également dénommé ATR ou TEM8) et ANTXR2 (ou CMG2), exposés à la surface cellulaire de l'hôte (Flynn *et al.*, 2001 ; Bradley et Young, 2003). Cette liaison active une protéase de l'hôte, qui, en clivant l'antigène AP lui permet de s'associer à d'autres monomères AP pour former un complexe heptamérique. Sous cette forme, l'heptamère AP peut interagir avec le facteur FO ou le facteur FL et le faire transiter dans le cytoplasme de l'hôte. Une fois dans le milieu

intracellulaire, la liaison entre la calmoduline de l'hôte et le facteur FO entraîne l'activation de sa fonction adénylate cyclase. Il en résulte une augmentation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique et une perturbation de la transduction du signal. Au niveau tissulaire, les effets du facteur FO se traduisent par une accumulation de fluides dans les espaces extracellulaires, qui conduisent à la formation d'œdèmes. Le facteur FL est une métalloprotéase qui agit en clivant les MAP kinases de l'hôte. Il s'ensuit une modification de la voie de la signalisation interne entraînant la mort cellulaire.

3-1-3-2 Les adhésines et les biofilms

Pour de nombreux agents pathogènes, la première phase du processus infectieux se caractérise par l'attachement spécifique des bactéries aux cellules de l'hôte. Cette adhérence, qui facilite la colonisation du milieu infecté, résulte d'une interaction spécifique entre une adhésine bactérienne, le plus souvent de nature protéique, et un récepteur cellulaire présent à la surface de l'hôte. Les structures servant de lien entre la bactérie et l'hôte sont des appendices peptidiques de type pili ou fimbriae, voire, dans certains cas, des flagelles (Proft et Baker, 2009). Les adhésines les plus décrites dans la littérature sont celles exprimées par les souches uropathogènes d'*E. coli* (UPEC), qui représentent la première cause d'infections de l'appareil urinaire. L'opéron *pap* des souches UPEC code pour la synthèse des pili de type I et de type P, qui sont requis pour la propagation de l'infection à l'ensemble des voies urinaires. L'adhésion des pili I aux récepteurs glycolipidiques des cellules de l'urothélium confine l'infection à la vessie, alors que les pili P permettent aux UPEC de coloniser toute l'aire péri-urétrale, et ce, en dépit du flux urinaire (Wright et Hultgren, 2006 ; Lane et Mobley, 2007). Les bactéries ont la capacité d'adhérer à des surfaces autres que les surfaces cellulaires, comme les biomatériaux implantés de type cathéter ou prothèse. Pour faciliter leur adhésion aux matrices inertes, ces bactéries vont s'organiser en biofilm. A l'intérieur du biofilm se trouve un amas de cellules bactériennes, qui adhèrent entre elles et à la surface colonisée, grâce à la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice, essentiellement constituée de polymères hydratés. La communication cellulaire au sein du biofilm s'effectue *via* la diffusion de molécules « signal » dont l'expression est soumise à un système de régulation complexe. L'organisation en biofilm rend les bactéries adhérentes plus résistantes à l'action des antibiotiques (Costerton *et al.*, 1999) et les protège contre le système immunitaire du patient infecté. Les biofilms compliquent la guérison de nombreuses maladies infectieuses d'autant

plus qu'ils sont associés à des bactéries responsables d'infections nosocomiales sévères, comme *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Singh *et al.*, 2000 ; Olson *et al.*, 2002).

3-1-3-3 *Le quorum sensing*

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

Le quorum sensing (QS) utilise les voies de la communication intercellulaire pour synchroniser l'expression de gènes cibles au sein d'une population bactérienne. Dans ce système, les bactéries peuvent évaluer leur densité de population *via* la synthèse et la diffusion de molécules « signal », appelées auto-inducteurs. Ces molécules diffusent librement dans le milieu et peuvent transiter à travers la paroi et la membrane bactérienne. Lorsque leur concentration atteint un certain seuil, les auto-inducteurs se lient à des récepteurs bactériens intracytoplasmiques, qui sont des facteurs de transcription. La formation des complexes auto-inducteur/récepteur active la transcription de certains gènes, dont les gènes de virulence. Ainsi, par cette voie de communication, le QS permet de synchroniser et d'amplifier la virulence à l'ensemble de la population bactérienne.

Les molécules « signal » du QS diffèrent suivant que les bactéries soient de type Gram négatif ou de type Gram positif. Les bactéries Gram négatives synthétisent des auto-inducteurs, qui sont des dérivés furaniques acylés de la famille des *N*-acylhomosérines lactones (AHLs). Les bactéries Gram positives produisent, quant à elles, des auto-inducteurs de nature peptidique (AIPs). Les gènes impliqués dans la voie de la signalisation du QS ont été identifiés chez de nombreuses bactéries, responsables d'infections opportunistes comme *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

3-1-3-3-1 Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives

P. aeruginosa est une bactérie Gram négative que l'on retrouve fréquemment chez des sujets immunodéprimés, comme les patients atteints de mucoviscidose ou de pneumopathies acquises sous ventilation assistée. L'expression des gènes de virulence de *P. aeruginosa* joue un rôle dans la physiopathologie des infections qu'il provoque (Chastre *et al.*, 1995 ; Fagon *et al.*, 1996). La transcription de ces gènes est sous le contrôle de deux systèmes de QS nommés *las* et *rhl* (Rodrigue *et al.*, 2000). Le système *las*, premier système à avoir été décrit

(Gambello et Iglewski, 1991), comprend le gène *lasR*, codant pour la protéine régulatrice R, et le gène *lasI*, codant pour une enzyme auto-inducteur synthase, LasI. Cette enzyme est nécessaire à la synthèse d'une AHL : la *N*-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine (3-oxo-C12-HSL). Lorsque la concentration en 3-oxo-C12-HSL atteint un seuil critique, une molécule d'AHL se lie à une protéine LasR, pour constituer un complexe activateur de la transcription de plusieurs gènes (fig. 14) :

- *lasB* (Gambello et Iglewski, 1991), *lasA* (Toder *et al.*, 1991), *aprA* (Gambello et Iglewski, 1993), qui codent respectivement pour deux élastases et pour une protéase alcaline, contribuant chacune à la destruction des tissus pulmonaires,

- *exoA* (Gambello et Iglewski, 1993), codant pour une exotoxine ADP-ribosylante,

- *xcpR* et *xcpP* (Chapon et Herve, 1997), codant pour des protéines de la machinerie de sécrétion de type II, nécessaires à l'exportation de ces facteurs hors de la bactérie,

- et *lasI*, permettant une augmentation rapide de la synthèse des 3-oxo-C12-HSL et donc une amplification du signal par auto-induction (Seed *et al.*, 1995).

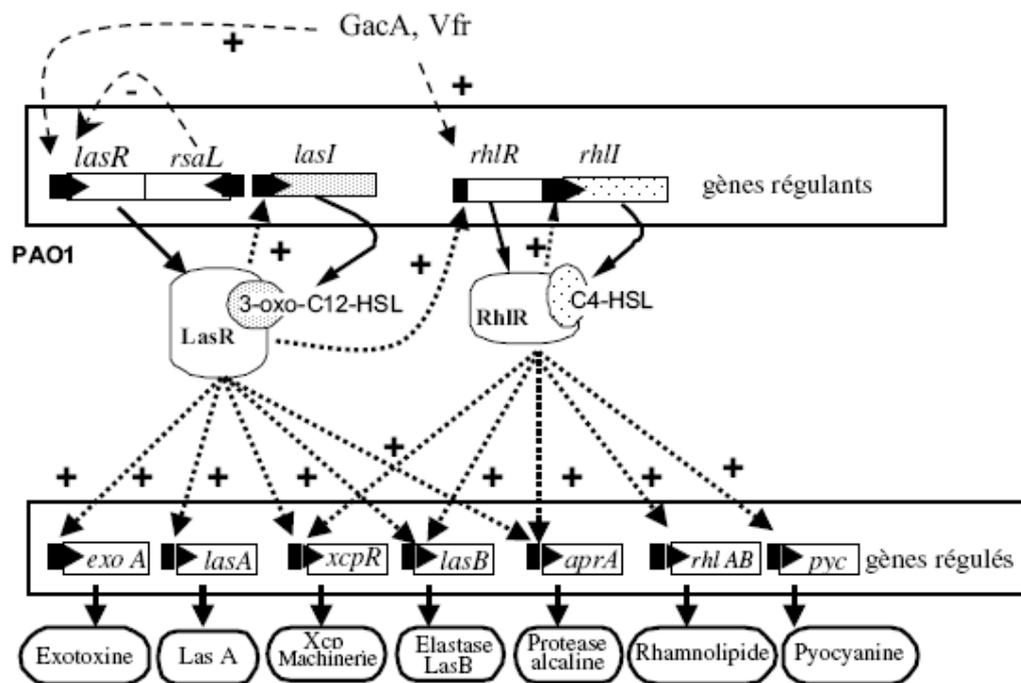


Figure 14 : Mécanisme moléculaire du quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* (Ruimy et Andremont, 2004)

Le système *las* contrôle le système *rhl*, qui fonctionne selon le même schéma. Il comprend le gène *rhlR*, codant pour la protéine régulatrice RhIR et le gène *rhlI*, codant pour une enzyme auto-inducteur synthase, RhII nécessaire à la synthèse d'un second type d'AHL : la *N*-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL).

3-1-3-3-2 Le quorum sensing chez les bactéries Gram positives

S. aureus est le premier pathogène responsable d'infections nosocomiales. Il peut causer des infections sévères comme les endocardites, les septicémies et les pneumonies. *S. aureus* est une bactérie Gram positive, qui présente deux phénotypes : l'un est non invasif et plus ou moins bien toléré par l'hôte tandis que l'autre est invasif, infectieux et responsable de graves altérations tissulaires. Le passage d'une forme à l'autre est régulé par le système de QS *agr*. Le système *agr* est un opéron constitué de quatre gènes (*agrA*, *agrB*, *agrC* et *agrD*), qui codent pour la synthèse d'autoinducteurs peptidiques (AIPs), secrétés sous la forme de thiolactones cycliques dans le milieu extracellulaire (fig.15). Ces AIPs sont produits par les protéines AgrB et AgrD. Ils se lient aux histidine kinases AgrC, enchâssées dans la membrane bactérienne, qui activent à leur tour le facteur de transcription intracellulaire AgrA (Njoroge et Sperandio, 2009). La phosphorylation du régulateur AgrA conduit à la sécrétion de

l'effecteur RNAIII. L'expression de RNAIII se traduit alors par l'activation des facteurs de virulence, comme les protéases, les toxines et les lipases (George et Muir, 2007 ; Novick et Geisinger, 2008 ; Njoroge et Sperandio, 2009), et la répression des adhésines de surface.

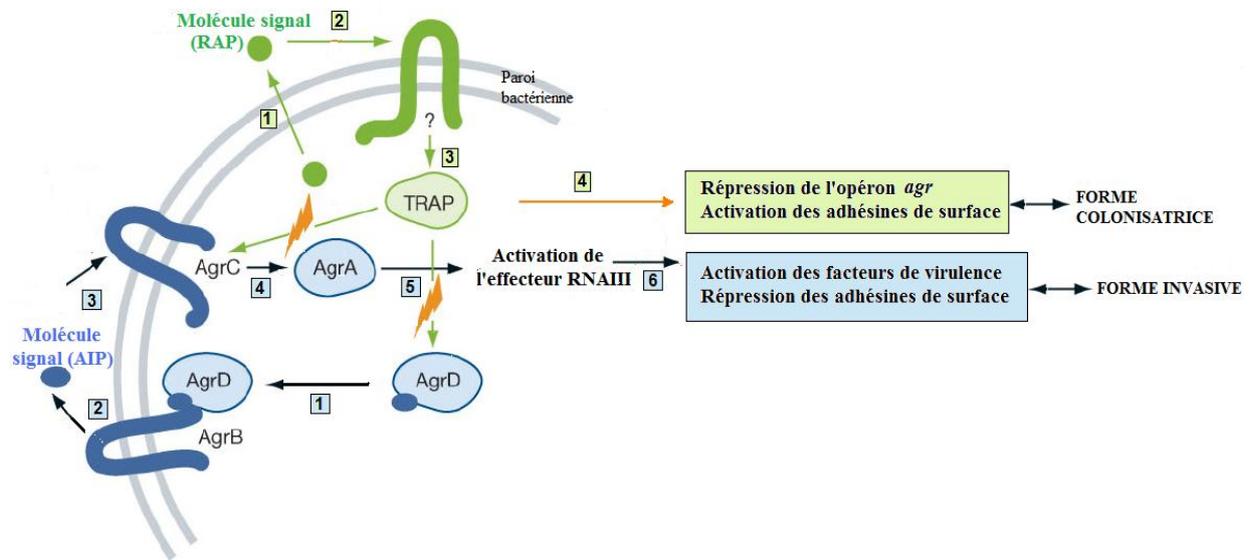


Figure 15 : La régulation du quorum sensing chez *S. aureus*
(adapté de Njoroge et Sperandio, 2009)

La formation des biofilms par *S. aureus* implique le passage à la forme colonisatrice non invasive. L'expression des adhésines est régulée par le système RAS/TRAP. Dans ce modèle, la protéine activatrice RAP, qui joue le rôle d'auto-inducteur, est excrétée hors de la cellule. Ensuite, par un mécanisme qui demeure toujours inconnu, l'auto-inducteur RAP transite dans le milieu intracellulaire pour activer sa cible, la protéine TRAP. Cette activation réprime l'expression de l'opéron *agr* et active la sécrétion des adhésines, favorisant ainsi l'adhérence cellulaire et la formation des biofilms (Harraghy *et al.*, 2007 ; Peterson *et al.*, 2008 ; Njoroge et Sperandio, 2009).

3-1-3-4 Les inhibiteurs des facteurs de virulence

La connaissance des mécanismes moléculaires de la pathogénie bactérienne a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer de nouvelles stratégies visant à bloquer les facteurs de virulence bactériens. Ces stratégies se basent sur la recherche de

molécules capables d'inhiber les toxines et les adhésines bactériennes et d'interférer avec la voie de la signalisation du quorum sensing.

3-1-3-4-1 Les inhibiteurs des toxines

De nombreuses recherches ont été menées pour identifier des inhibiteurs de la toxine de *B. anthracis*, qui constitue une véritable arme bactériologique. Scobie *et al.* (2005) ont démontré que l'administration de récepteurs solubles, analogues aux récepteurs de l'antigène AP, protégeaient des rats F344 contre la toxine létale FL de l'anthrax. Une autre stratégie, utilisée pour inhiber l'antigène AP, est la production d'anticorps spécifiques, qui, en l'empêchant d'accéder aux récepteurs ANTXR1 et ANTXR2, rendent impossible toute interaction avec la membrane cellulaire de l'hôte (Chen *et al.*, 2006). Des composés de faible masse moléculaire, conçus pour inhiber l'heptamère AP, ont également été développés. Karginov *et al.* (2005) ont synthétisé une β -cyclodextrine, qui, en se fixant sur l'heptamère AP, bloque le passage du facteur FL à travers la membrane cellulaire de macrophages de rat, les protégeant ainsi contre la cytotoxicité du facteur létal. Moayeri *et al.* (2006) ont observé les mêmes effets pour le cisplatine, qui protège les modèles infectieux BALB/cJ et F344 contre des doses mortelles du facteur FL. D'autres travaux sont plus axés sur l'identification de molécules, qui interagissent directement avec le facteur FL. En 2005, Shoop *et al.* ont montré qu'un dérivé de l'hydroxamate avait la propriété d'inactiver le facteur FL. La liaison du groupement hydroxamate au facteur FL empêche les ions Zinc d'accéder au site actif de l'enzyme, inhibant ainsi son activité métalloprotéase-zinc dépendante. Les complexes hydroxamate-FL se sont révélés efficaces dans la protection de nombreux modèles animaux contre le facteur létal de l'anthrax (Shoop *et al.*, 2005).

3-1-3-4-2 Les inhibiteurs des adhésines

L'adhésion des bactéries à leurs cellules hôtes est rendue possible par la présence de pili à leur surface. L'inhibition de ces structures de liaison permet de prévenir l'adhésion et la colonisation bactérienne. Svensson *et al.* (2001) ont observé une nette diminution de la colonisation de l'aire uro-génitale par des isolats de bactéries uropathogènes (UPEC) suite à l'administration de pilicides. Les pilicides sont des peptides mimétiques (analogues compétitifs) de la sous-unité constitutive des pili : la piline. Lorsqu'ils sont incorporés en lieu et place des monomères de piline, ils bloquent l'élongation du pilus en cours de synthèse, le

rendant ainsi infonctionnel. Des pilicides, capables d'inhiber l'assemblage du pilus de type P des UPECs, ont été identifiés. Ces molécules, qui appartiennent à la famille des 2-bicyclo pyridiones, induisent une diminution de la formation des pili chez *E. coli* (Aberg *et al.*, 2006). Pinkner *et al.* (2006) ont synthétisé des inhibiteurs de la biogénèse des pili de type I et de type P des UPECs. *In vitro*, ces composés, qui dérivent des 2-bicyclo pyridiones, réduisent la quantité de pili par cellule et inhibent l'adhésion des UPECs aux cellules de la vessie. Ils empêchent également la formation des biofilms.

3-1-3-4-3 Les inhibiteurs du quorum sensing

Plusieurs stratégies ont été développées pour bloquer la communication cellulaire bactérienne. Certaines d'entre elles, comme le « quorum quenching », se basent sur la recherche d'enzymes capables de bloquer les molécules « signal » du QS : les auto-inducteurs. Une *N*-acyl homosérine lactonase, qui dégrade le noyau lactone des AHLs, a ainsi été découverte chez *Bacillus* sp (Dong et Zang, 2005). D'autres stratégies visent à identifier des inhibiteurs de la voie de la signalisation du QS. Ces molécules peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. L'algue *Delisea pulchra* bloque les gènes de virulence de *Serratia liquefaciens* par la production de furanones halogénées, qui agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs des AHLs (Rasmussen *et al.*, 2000) La potentialisation de cette activité inhibitrice a été obtenue par la synthèse de la furanone C-30. En plus de bloquer les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, ce composé inhibe ses propriétés d'adhésion, facilitant ainsi l'élimination des biofilms formés par le pathogène (Christensen *et al.*, 2007). Les mêmes effets ont pu être observés pour certaines mycotoxines produites par le champignon *Penicillium* sp. Ainsi, la patuline et l'acide pénicillique se révèlent être de puissants inhibiteurs du QS de *P. aeruginosa*. Ces composés permettent également de potentialiser l'action de certains antibiotiques. Co-administrée avec la trobamycine, la patuline augmente la sensibilité des biofilms à cet antibiotique, facilitant ainsi l'élimination du pathogène du modèle infectieux BALB/c (Rasmussen *et al.*, 2005). D'autres inhibiteurs, qui interfèrent avec l'expression de la protéine régulatrice LasR (Müh *et al.*, 2006) ou qui limitent les interactions entre LasR et l'auto-inducteur LasI (Smith *et al.*, 2003a et 2003b), ont été synthétisés (fig. 16a). Leur utilisation *in vitro* a permis de réduire considérablement la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Toutefois, leur efficacité *in vivo* reste encore à démontrer.

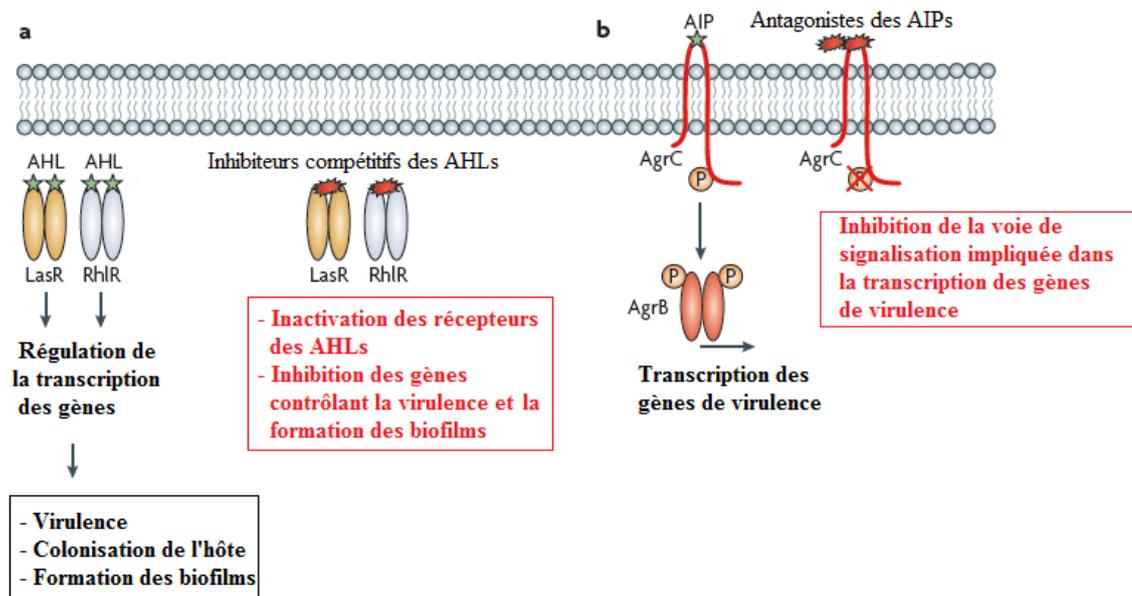


Figure 16 : Inhibition du quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* (a) et *Staphylococcus aureus* (b) (adapté de Rasko et Sperandio, 2010)

Des inhibiteurs du système *agr*, impliqué dans la régulation des facteurs de virulence des bactéries Gram positives, comme *S. aureus*, ont également été identifiés (fig. 16b). Ce sont, pour la plupart, des antagonistes des protéines auto-inductrices (AIPs). En se fixant sur l'histidine kinase AgrC, récepteur spécifique des AIPs, ils bloquent l'activation de l'opéron *agr* entraînant ainsi l'inhibition des facteurs de virulence (George *et al.*, 2008). La répression de l'opéron *agr* peut également être induite par des anticorps monoclonaux. Park *et al.* (2007) ont ainsi montré que des anticorps, dirigés contre la protéine activatrice AP4 de *S. aureus*, réduisent la pathogénicité de la souche RN4850 et limitent la propagation de l'infection *in vivo*. Des inhibiteurs de la protéine activatrice RNAIII ont été évalués dans de nombreux modèles infectieux. Ils se sont révélés être particulièrement efficaces pour prévenir les infections staphylococciques en limitant la formation des biofilms (Balaban *et al.*, 2007).

3-2 Les nouveaux antibiotiques

3-2-1 Les bactériophages

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

3-2-1-1 Les propriétés fonctionnelles des bactériophages

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

Les nouvelles études s'intéressent plus aux produits des gènes de phage qu'aux phages entiers car ces derniers peuvent être immunogènes (Matzusaki *et al.*, 2005). Ainsi, les lysines, qui détruisent la paroi cellulaire des bactéries Gram positives, sont largement décrites dans la littérature (Fischetti, 2005 ; Hermoso *et al.*, 2007 ; Kursepa *et al.*, 2009). Elles exercent leurs activités enzymatiques (muramidase, transglycosylase, L-alanine amidase et endopeptidase) en rompant l'une des quatre principales liaisons, qui relie les éléments constitutifs du peptidoglycane (Hermoso *et al.*, 2007 ; Fischetti, 2008). La plupart des lysines sont dépourvues de « séquence signal » ; aussi, leur passage à travers la membrane plasmique est assuré par d'autres protéines phagiques, les holines. Durant la phase de maturation des virions, les lysines synthétisées s'accumulent dans le cytoplasme de l'hôte tandis que les holines s'agrègent dans la membrane où elles forment des pores non spécifiques. Les lysines, qui peuvent alors accéder à leur cible, perforent la paroi cellulaire par digestion du

peptidoglycane entraînant ainsi la lyse de la bactérie infectée (Wang *et al.*, 2000 ; Ugorakova et Bukovska, 2003 ; Loessner, 2005).

3-2-1-2 L'avenir de la phagothérapie

De nombreux travaux ont démontré l'efficacité de la phagothérapie dans le traitement ou la prévention des maladies infectieuses, causées par les bactéries Gram positives et Gram négatives. Le principal avantage des bactériophages et des enzymes phagiques est leur haute spécificité d'action, qui est dirigée contre une seule espèce bactérienne, voire quelques sous-espèces d'un même genre bactérien (Nelson *et al.*, 2001 ; Frias *et al.*, 2009). Ainsi, leur utilisation en phagothérapie permet de traiter les maladies infectieuses de manière ciblée. Ce type de thérapie n'affecte pas les bactéries de la flore commensale, contrairement aux traitements antibiotiques qui éliminent, sans aucune distinction, les bactéries pathogènes et les bactéries non pathogènes. De plus, la contamination bactérienne par les phages s'illustre comme un mécanisme d'action original et singulier. En induisant la destruction des cellules bactériennes peu de temps après l'infection, les phages neutralisent les capacités adaptatives des bactéries, limitant ainsi l'apparition des résistances.

Toutefois, des risques potentiels existent quant à l'utilisation des bactériophages en thérapeutique. Ils sont liés aux propriétés lysogéniques des phages dits « tempérés », qui ont la capacité d'intégrer leur ADN dans le génome bactérien et de persister à l'état latent sous forme de prophages. Ils sont alors susceptibles de transmettre des gènes supplémentaires au génome bactérien, comme des gènes de virulence ou des gènes de résistance aux antibiotiques, qui, en cas de réactivation des prophages, peuvent se disséminer entre espèces bactériennes (Loeffler *et al.*, 2001). La réactivation des prophages, encore appelée « processus d'induction », implique l'excision de l'ADN phagique du génome bactérien et le retour à un cycle lytique. La lyse cellulaire alors occasionnée entraîne la libération de nombreuses endotoxines bactériennes, qui peuvent provoquer des chocs septiques (Matsuda *et al.*, 2005 ; Skurnik et Strauch, 2006). Pour limiter ces risques, les recherches actuelles se concentrent sur la création de phages génétiquement modifiés, incapables d'adopter ce comportement de latence et/ou d'entrer en phase d'induction (Hagens et Blasi, 2003 ; Hagens *et al.*, 2004).

3-2-2 Les peptides antimicrobiens

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

3-2-2-1 Les peptides cationiques antimicrobiens (PCAs)

Jusqu'à présent, plus de 750 peptides cationiques antimicrobiens (PCAs) ont été isolés de divers organismes, incluant les animaux, vertébrés et invertébrés, les plantes, mais aussi les bactéries et les champignons (Lehrer et Ganz, 1999 ; Hancock, 2001 ; Zasloff, 2002, Vizioli et Salzet, 2002 ; Brogden *et al.*, 2003 ; Ganz, 2003). La plupart des PCAs présentent un spectre d'activité très étendu puisqu'il couvre la majorité des espèces bactériennes et fongiques, notamment celles pathogènes pour l'Homme, des virus enveloppés et des protozoaires (Hancock, 2001). Des PCAs, à spectre d'activité plus réduit, ont toutefois été identifiés. Ce sont essentiellement des peptides d'origine bactérienne, tels que les bactériocines, produites par les bactéries lactiques. L'activité antibactérienne de ces PCAs est limitée car restreinte aux bactéries proches de la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009). Chez les organismes multicellulaires, les PCAs sont les molécules effectrices de l'immunité innée. Leur action dans la lutte antimicrobienne peut s'exercer de deux manières distinctes : soit par une action de type antibiotique, ciblant directement les microorganismes en vue de les détruire, soit par une activité immuno-modulatrice, passant par le recrutement et l'activation des cellules immunitaires sur le lieu de l'infection (Hancock, 2001).

3-2-2-1-1 Aspects structuraux

Les PCAs présentent une très grande diversité structurale (fig. 17). Ils sont codés génétiquement et dérivent de précurseurs peptidiques, *via* une ou plusieurs voies d'activation protéolytiques (Bals, 2000). Ce sont de courts peptides, constitués de 10 à 50 acides aminés en moyenne, uniquement de type lévogyre. Ils présentent une charge nette positive (généralement +2 ou +9) et une proportion conséquente ($\geq 30\%$) de résidus hydrophobes, qui leur confère des propriétés amphiphiles (Zasloff, 2002 ; Hancock et Sahl, 2006). Suivant la composition en acides aminés, la longueur et le mode de repliement de ces peptides, on distingue 4 grands groupes structuraux :

- les peptides linéaires formant des hélices α (fig. 17a),

- les peptides riches en résidus cystéyl formant des ponts disulfures (fig. 17b),
- les peptides de structure étendue enrichis en acides aminés spécifiques (fig. 17c),
- les peptides avec des acides aminés modifiés (fig. 17d).

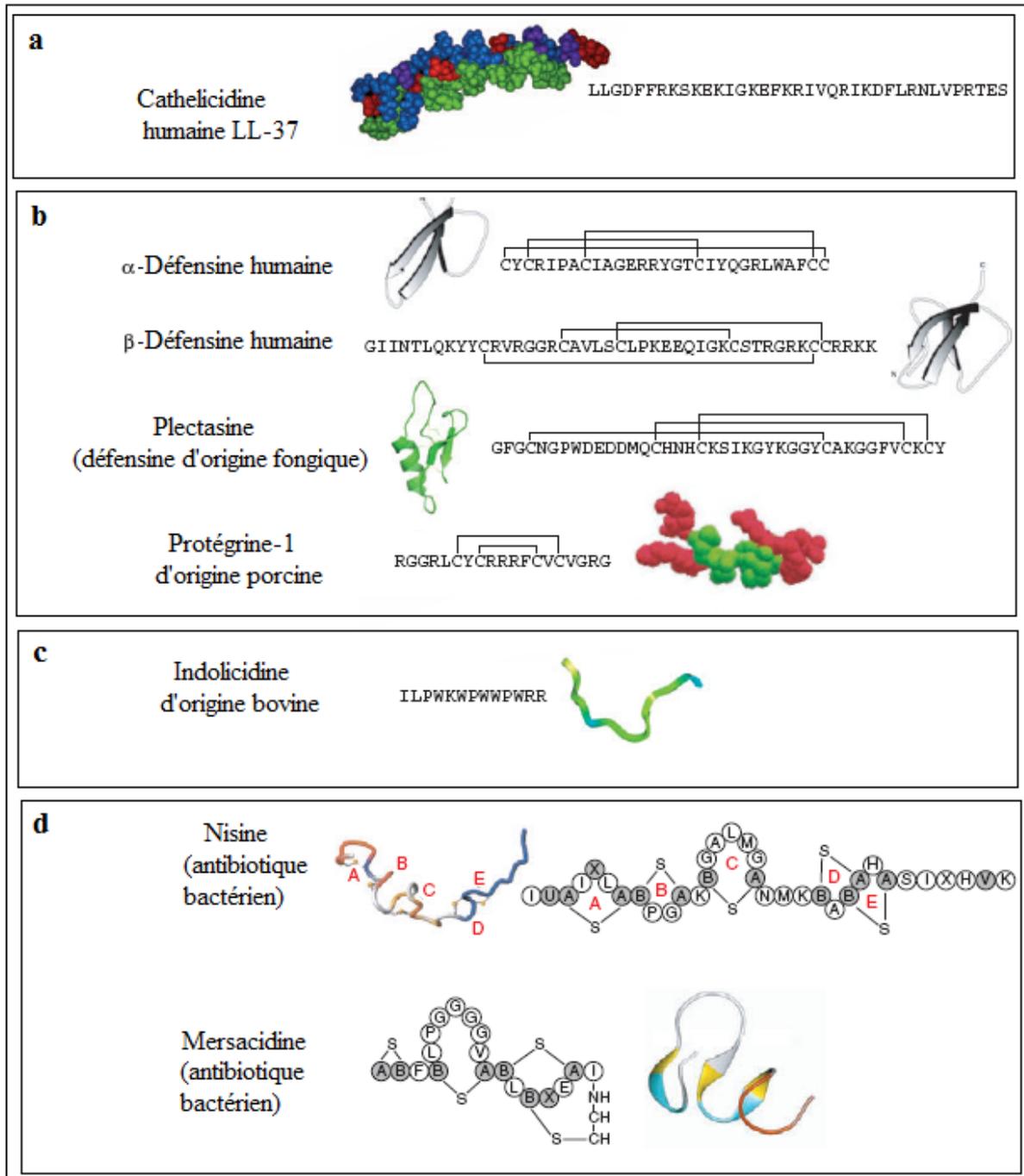


Figure 17 : Séquences et structures de quelques peptides cationiques antimicrobiens
(adapté de Hancock et Sahl, 2006)

Les cécropines, les magainines et les cathélicidines sont les prototypes des peptides appartenant au premier groupe. Ces PCAs, de forte charge positive, sont dépourvus de résidu

cystéyl. Peu solubles et non structurés en solution aqueuse, ils adoptent une conformation hélicoïdale stable en présence de solvants mimant l'environnement membranaire, comme le trifluoroéthanol, les micelles de SDS et les vésicules de phospholipides (Gennaro et Zanetti, 2000). La conformation hélicoïdale semble d'ailleurs être corrélée à l'activité antimicrobienne. Comme cela a été observé pour la buforine II et la cathélicidine LL-37, une structure riche en hélice α potentialise leur activité, aussi bien contre les bactéries Gram positives que les bactéries Gram négatives (Park *et al.*, 2000).

Parmi les familles du second groupe figurent les α et β défensines de mammifères, d'insectes et de plantes (Brogden, 2005). Ces peptides, qui contiennent 6 résidus cystéyl, sont stabilisés par 3 ponts disulfures intramoléculaires et forment des hélices α ou des feuilletts β . Font également partie de ce groupe, les PCAs stabilisés par un ou deux ponts disulfures comme les brévénines secrétées par *Rana palustris* (Basir *et al.*, 2000) et les protégrines isolées des leucocytes de porc (Kokryakov *et al.*, 1993 ; Basir *et al.*, 2000 ; Brogden, 2005).

Le troisième groupe, très hétérogène, rassemble des peptides dont la composition est dominée par certains types d'acides aminés : les bacténécines d'insectes, enrichies en proline (33-49%) et en arginine (13-33%), la prophénine de porc, riche en proline (57%) et en phénylalanine (19%), l'indolicidine bovine, enrichie en tryptophane, et les histatines humaines riches en histidine (Gennaro et Zanetti, 2000 ; Otvos, 2002 ; Brogden, 2005 ; Hancock et Sahl, 2006).

Le dernier groupe rassemble quelques peptides originaux dans leur structure, car constitués d'acides aminés modifiés, comme la lanthionine. Ce sont des peptides d'origine bactérienne, désignés sous le terme de lantibiotiques, comme la nisine, produite par *Lactococcus lactis*, et la mersacidine produite par *Bacillus* sp (Reddy *et al.*, 2004 ; Hancock et Sahl, 2006).

3-2-2-1-2 Mode d'action des PCAs

Même si les mécanismes par lesquels agissent les PCAs demeurent complexes et ne sont pas entièrement élucidés, il est communément admis que ces molécules agissent préférentiellement au niveau de la membrane cellulaire. Le caractère amphiphile des PCAs semble jouer un rôle important dans les interactions qu'ils établissent au niveau membranaire. En effet, leur charge nette positive assure leur ancrage à la surface membranaire microbienne polyanionique et leur caractère hydrophobe facilite leur passage à travers les phospholipides membranaires. Après leur insertion dans la bicouche lipidique, ils peuvent agir de deux

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

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les altérations induites par les PCAs au niveau membranaire (Brogden, 2005 ; Hancock et Sahl, 2006). Les interactions, établies entre ces PCAs et les phospholipides membranaires, conduisent à la formation de pores, qui peuvent être de type toroïdal ou en forme de tonneau, comme cela a pu être observé pour l'alaméthicine (Yang *et al.*, 2001) et la protégrine I de porc (Yamagushi *et al.*, 2002). L'intégrité de la membrane est alors altérée et la perméabilité membranaire modifiée. Ces événements conduisent rapidement à la mort du microorganisme cible. Ainsi, la défensine A de l'insecte *Phormia terranova* déstabilise instantanément la membrane cytoplasmique de *Micrococcus luteus*, entraînant une fuite du potassium, une diminution de la concentration intracellulaire en ATP et une inhibition de la respiration cellulaire (Cociancich *et al.*, 1993). La magainine II provoque les mêmes effets sur les membranes, externe et interne, d'*E. coli* (Matzusaki *et al.*, 1997). Les PCAs qui agissent par un effet de type détergent, s'accablent parallèlement à la surface membranaire, puis se réorientent à l'intérieur de la bicouche pour former des agrégats de type peptides-lipides ou des micelles. Ce mécanisme est « concentration-dépendant » puisque des concentrations élevées en PCAs entraînent la lyse immédiate des cellules microbiennes par rupture de leur membrane (Oren et Shai, 1998 ; Shai, 1999 ; Verdon *et al.*, 2009).

Il apparaît toutefois que la formation de pores transmembranaires et la perméabilisation de la membrane ne soient pas les seuls mécanismes impliqués dans le processus de mort cellulaire (fig. 18). En fait, plusieurs observations suggèrent que la translocation des PCAs à travers la membrane cytoplasmique altère également la formation des septa de division (Salomon et Farias, 1992 ; Shi *et al.*, 1996), inhiber les activités enzymatiques (Bierbaum et Sahl, 1987) et les activités métaboliques de synthèse de la paroi cellulaire (Brotz *et al.*, 1998), des acides nucléiques et des protéines (Sahl *et al.*, 2005).

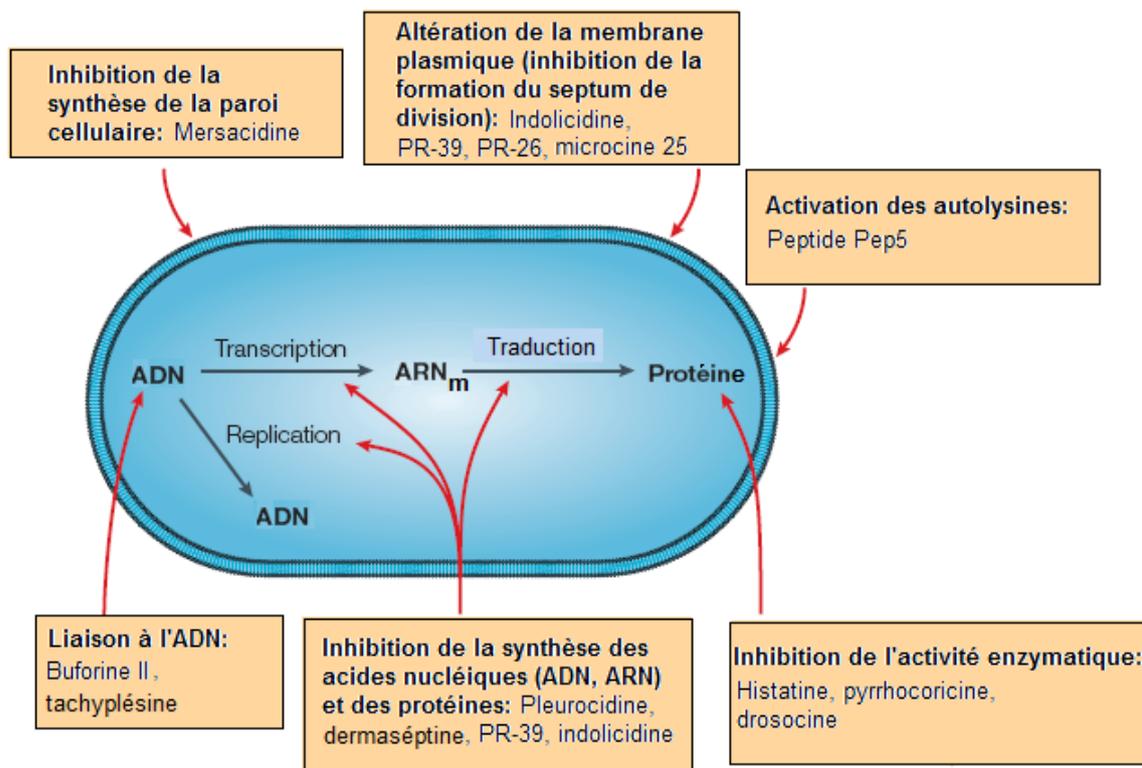


Figure 18 : Mode d'action des peptides antimicrobiens (adapté de Brogden, 2005)

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

3-2-2-2 *Les peptides anioniques antimicrobiens*

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

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

3-2-2-3 *Les peptides antimicrobiens en développement clinique*

Plusieurs peptides antimicrobiens, ou analogues, sont en cours de développement clinique, essentiellement sous forme de crèmes pour application locale (topiques). Le premier peptide antimicrobien, développé dans les années 1990, est un dérivé de la magainine, le Pexiganane. Dans une étude clinique de phase III, ce peptide, incorporé dans une crème, s'est révélé aussi efficace qu'une antibiothérapie orale par ofloxacine, dans le traitement d'ulcérations cutanées surinfectées chez des patients diabétiques (Brogden, 2005). Parmi les autres peptides antimicrobiens en développement avancé, il convient de citer le dérivé de la protégrine I, l'Iseganane®, qui est en étude de phase III dans le traitement des mucites chimio-induites, sous forme de bains de bouche, et l'Omiganane®, analogue de l'indolicidine, également en cours d'étude de phase III dans le cadre de la prévention des infections cutanées, associées à

la pose de cathéters (Brogden, 2005 ; Fritsche *et al.*, 2008). Les premiers candidats médicaments sont actuellement confrontés à l'établissement de la preuve de concept de leur valeur thérapeutique, surtout pour le traitement des infections systémiques. Leur labilité à l'action des protéases est un paramètre à prendre en compte pour une utilisation *in vivo*, car elle peut générer des interactions pharmacocinétiques défavorables. Par ailleurs, même si ces peptides semblent présenter une affinité spécifique pour les membranes microbiennes polyanioniques, l'absence de toxicité contre les cellules humaines n'est pas à exclure.

L'atout majeur des peptides antimicrobiens est leur grande diversité structurale et fonctionnelle, qui leur permet de concentrer plusieurs activités antibactériennes sur une seule et même molécule, comme cela a pu être observé dans le cas des lantibiotiques. Leur accessibilité à plusieurs cibles cellulaires est un avantage conséquent pour lutter contre le développement des résistances bactériennes. En effet, la spécificité d'action vis-à-vis d'une seule et même cible que présentent certaines molécules, comme les antibiotiques conventionnels, favorise la mise en place et la sélection de souches résistantes. Une activité modérée, s'exerçant sur plusieurs cibles, semble donc être une condition favorable à la limitation des résistances. La majorité des ressources naturelles, incluant les plantes, semble d'ailleurs avoir développé cette stratégie pour lutter contre les infections causées par les pathogènes.

3-2-3 Les plantes

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

3-2-3-1 Les plantes, source naturelle d'antimicrobiens

La rareté des maladies chez les plantes sauvages s'explique par l'élaboration d'un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes. Pour se protéger contre les bactéries, les champignons et les virus, les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons, 2008). L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites (Murphy Cowan, 1999 ; Gibbons, 2008). Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives.

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules (MM < 500 Da) dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Tegos *et al.*; 2002 ; Lewis et Ausubel, 2006). Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées pour les molécules isolées de plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 µg/mL et 1 000 µg/mL. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI, variant de 0,01 µg/mL à 10 µg/mL, suffisent à générer une activité inhibitrice (Tegos *et al.*, 2002).

Le spectre d'action des antimicrobiens produits par les plantes est plus restreint que celui généré par les antibiotiques conventionnels. En effet, ces derniers possèdent une haute activité contre les bactéries Gram positives, mais demeurent peu actifs contre les bactéries Gram négatives et les levures (Lewis, 2001). L'une des rares exceptions concerne l'acide 3-farnesyl-2-hydroxy benzoïque (fig. 19), isolé de la plante *Piper multiplinervium*. Ce composé démontre une activité antibactérienne (CMI comprises entre 6,25 µg/mL et 37,5 µg/mL) contre *Helicobacter pylori*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, qui demeurent, à l'heure actuelle, les bactéries Gram négatives les plus difficiles à traiter cliniquement (Rüegg *et al.*, 2006).

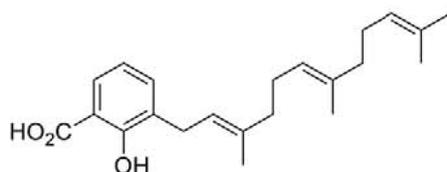


Figure 19 : L'acide 3-farnesyl-2-hydroxy benzoïque (Gibbons, 2008)

Avec une CMI de 12,5 µg/mL, l'acide 3-farnesyl-2-hydroxy benzoïque est également actif contre la bactérie Gram positive *S. aureus* (Rüegg *et al.*, 2006). De nombreux autres antibactériens, démontrant une activité contre *S. aureus* et des variants résistants aux antibiotiques, ont été répertoriés dans la littérature (Gibbons, 2008). La xanthone, molécule géranylée, isolée des plantes *Garcinia cambodgiae*, présente une haute activité anti-staphylococcique avec des CMI comprises entre 0,3 µg/mL et 1,25 µg/mL (Inuma *et al.*, 1998). Récemment, les travaux de Chomnawang *et al.* (2009) ont conduit à l'identification d'un dérivé prénylé de la xanthone, l' α -mangostine, actif contre un isolat clinique SARM (CMI égale à 1,95 µg/mL). L'hyperforine, produite par *Hypericum perforatum*, démontre une activité encore plus élevée (CMI comprises entre 0,1 µg/mL et 1 µg/mL) contre des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline et à la pénicilline (Schempp *et al.*, 1999).

3-2-3-2 Les plantes, source naturelle d'inhibiteurs de l'efflux bactérien

Les plantes ont développé plusieurs stratégies pour contrôler les infections bactériennes. La synthèse d'un grand nombre de molécules faiblement actives, plutôt que de puissants antibiotiques, en fait partie. Elle semble d'ailleurs utilisée pour diminuer la pression sélective, qui favorise le développement des résistances. Toutefois, l'activité de ces antibactériens peut être potentialisée lorsqu'ils agissent en synergie avec d'autres molécules. La preuve en a été fournie par les interactions établies entre deux composés produits par les plantes *Berberis* sp : la berbérine et la 5'-méthoxyhydnocarpine (5'-MHC).

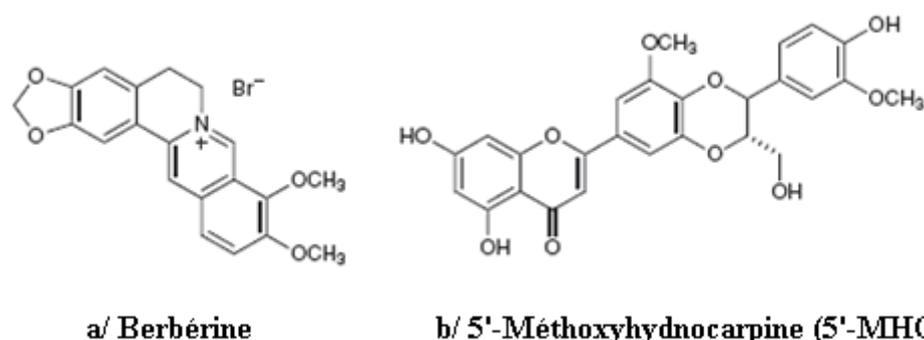


Figure 20 : Structures chimiques de la berbérine (a) et de l'inhibiteur des pompes MFS, la 5'-méthoxyhydnocarpine (b), isolés des plantes *Berberis fremontii* (Stermitz *et al.*, 2000a)

La berbérine est un alcaloïde ayant pour cible cellulaire l'ADN (Amin *et al.*, 1969). Ce cation hydrophobe (fig. 20a) est aussi un substrat des pompes d'efflux exprimées à la surface membranaire. Le rejet de la berbérine, hors de la cellule, limite son accumulation intracellulaire et, en l'empêchant d'accéder à sa cible, diminue son activité antibactérienne. Pour compenser cette faible activité, les plantes *Berberis* sp synthétisent une flavonoligane, la 5'-MHC (fig. 20b), qui, en bloquant les pompes bactériennes d'efflux, potentialise les effets de la berbérine. La combinaison « 5'-MHC/berbérine » agit donc comme un puissant antibactérien. Sur *S. aureus*, l'inhibition des pompes d'efflux NorA par la 5'-MHC augmente l'activité anti-staphylococcique de la berbérine d'un facteur 16 (Stermitz *et al.*, 2000a). D'autres flavonoliganes, comme la porphyrine phéophorbide a (fig 21a), extraite des plantes *Berberis* sp (Stermitz *et al.*, 2000b) ou la silybine, un mélange de diastéréoisomères isolé de *Sylibum marianum* (fig. 21b) (Stermitz *et al.*, 2001), interagissent de façon similaire avec la berbérine.

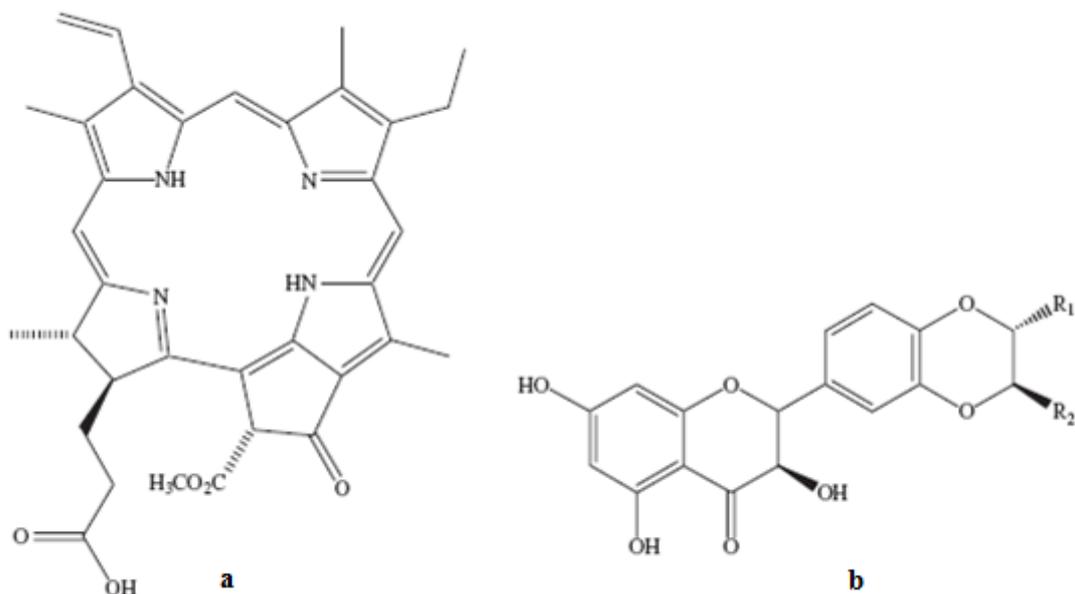


Figure 21 : Structures chimiques de la phéophorbide a (a) et de la silybine (b), deux inhibiteurs des pompes d'efflux NorA (Stavri *et al.*, 2007)

De nombreux autres inhibiteurs de l'efflux bactérien, isolés de plantes, ont été décrits dans la littérature (Stavri *et al.*, 2007 ; Gibbons, 2008 ; Hemaiswarya *et al.*, 2008). L'ensemble de ces EPIs permet de restaurer, sur des souches résistantes à leur action, l'activité de différentes classes d'antibiotiques, incluant les β -lactames (Fujita, 2005), les tétracyclines (Gibbons et

Udo, 2000 ; Fujita *et al.*, 2005), les fluoroquinolones (Schmitz *et al.*, 1998) et les macrolides (Gibbons *et al.*, 2003). Toutefois, les effets de ces EPIs s'exercent exclusivement sur les pompes MFS et/ou MATE des bactéries Gram positives (Lewis et Ausubel, 2006 ; Stavri *et al.*, 2007). En effet, aucun inhibiteur des pompes RND, qui représentent la principale cause de résistance par efflux chez les bactéries Gram négatives, n'a encore été découvert (Lewis et Ausubel, 2006). Les plantes semblent néanmoins avoir développé des mécanismes de protection efficaces contre les bactéries Gram négatives, qui constituent les principaux agents phytopathogènes.

3-2-3-3 Les plantes, productrices d'analogues des N-acylhomosérine-lactones (AHLs)

La production de substances, capables d'interférer avec la voie du quorum sensing, semble être une autre stratégie employée par les plantes pour lutter contre les infections causées par les bactéries Gram négatives. De récentes études ont démontré que les plantes *Pisum sativum* (Teplitski *et al.*, 2000 ; Bauer et Mathesius, 2004) et *Medicago truncatula* (Gao *et al.*, 2003) synthétisent des analogues des AHLs, molécules impliquées dans la régulation du QS de ces bactéries. Ces composés, mimétiques de l'action des AHLs, perturbent la communication intercellulaire bactérienne, en activant ou en inhibant certaines voies de la régulation du QS (Bauer et Mathesius, 2004).

Même si ces composés n'ont pas encore été identifiés et que les mécanismes par lesquels ils agissent restent à élucider, ils offrent des perspectives intéressantes pour la compréhension des relations « hôte-bactérie » et des comportements bactériens, notamment ceux impliqués dans l'expression de la virulence.

3-2-4 Les huiles essentielles

Les molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes. Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices d'huiles essentielles. L'exploration des huiles essentielles pour la recherche de molécules à activité antibiotique semble donc être une voie intéressante.

3-2-4-1 Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydrodistillation ou par expression mécanique (Kalemba et Kunicka, 2003). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits (Burt, 2004), mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. L'hydrodistillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales (Burt, 2004). Les métabolites secondaires sont extraits des plantes par un entraînement à la vapeur d'eau. Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison (Gonny *et al.*, 2004). Les huiles essentielles peuvent aussi être obtenues par expression à froid, comme pour les agrumes. De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression (Santoyo *et al.*, 2005) ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Kimbaris *et al.*, 2006).

3-2-4-2 Les activités biologiques des huiles essentielles

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

De nombreuses huiles essentielles, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir anti-oxydant (Mantle *et al.*, 1998 ; Karioti *et al.*, 2006).

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani *et al.*, 1999), ou, plus récemment, pour l'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* (Dordevic *et al.*, 2007), qui est capable d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat.

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé (Burt, 2004) ont été décrites. L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima* (Barel *et al.*, 1991), *A. setacea*, *A. teretifolia* (Unlu *et al.*, 2002) et *A. millefolium* (Candan *et al.*, 2003), contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence.

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées

cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (Mbarek *et al.*, 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa *et al.*, 2004).

D'autres applications médicales sont étudiées. Les travaux de Jafri *et al.*, (2001) ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de cardamome à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol (Jafri *et al.*, 2001). Il a également été démontré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'oestradiol (Monti *et al.*, 2002). Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement (Umezu, 1999) ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues, comme la nicotine (Zhao *et al.*, 2005).

3-2-4-3 Les activités antibactériennes des huiles essentielles

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004).

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Wan *et al.*, 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn *et al.*, 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (Dorman et Deans, 2000).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (May *et al.*, 2000 ;

Tohidpour *et al.*, 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Fisher et Phillips, 2009). Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* et *S. aureus* (Shin et Kim, 2005).

3-2-4-4 La composition des huiles essentielles

3-2-4-4-1 La composition chimique des huiles essentielles

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis *et al.*, 2002 ; Gonny *et al.*, 2004 ; Burt, 2004). L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Salzer, 1977). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Tomi *et al.*, 1995). Les principaux constituants des huiles essentielles, connues pour leur activité antibactérienne, sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les principaux constituants des huiles essentielles (HEs) à activité antibactérienne
(Burt, 2004)

Nom commun des plantes	Nom latin des plantes	Composés majoritaires des HEs	Composition (%)
coriandre	<i>Coriandrum sativum</i> (feuilles immatures)	linalol	26%
		(E)-2-décanal	20%
	<i>Coriandrum sativum</i> (graines)	linalol	70%
cannelle	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	<i>trans</i> -cinnamaldéhyde	65%
origan	<i>Origanum vulgare</i>	carvacrol	traces à 80%
		thymol	traces à 64%
		γ -terpinène	2 à 52%
		<i>p</i> -cymène	traces à 52%
romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pinène	2 à 25%
		acétate de bornyle	0 à 17%
		camphre	2 à 14%
		1,8-cinéole	3 à 89%
sauge	<i>Salvia officinalis</i> L.	camphre	6 à 15%
		α -pinène	4 à 5%
		β -pinène	2 à 10%
		1,8-cinéole	6 à 14%
		α -thujone	20 à 42%
clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugénol	75 à 85%
		acétate d'eugényle	8 à 15%
thym	<i>Thymus officinalis</i>	thymol	10 à 64%
		carvacrol	2 à 11%
		γ -terpinène	2 à 31%
		<i>p</i> -cymène	10 à 56%

Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% de l'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces (Senatore, 1996).

3-2-4-4-2 Les constituants des huiles essentielles

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes (Buchanan *et al.*, 2000).

La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C₅), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C₁₀) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesqui-terpénoïdes (C₁₅) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les mono- et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles.

Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle.

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées. Une liste, visant à classer les constituants des huiles essentielles en fonction de l'intensité de leur activité, a d'ailleurs été établie (Kalemba et Kunicka, 2003). Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol (fig. 22a, 22b et 22c), sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, d'origan et de clou de girofle, démontrent les plus hautes activités antibactériennes.

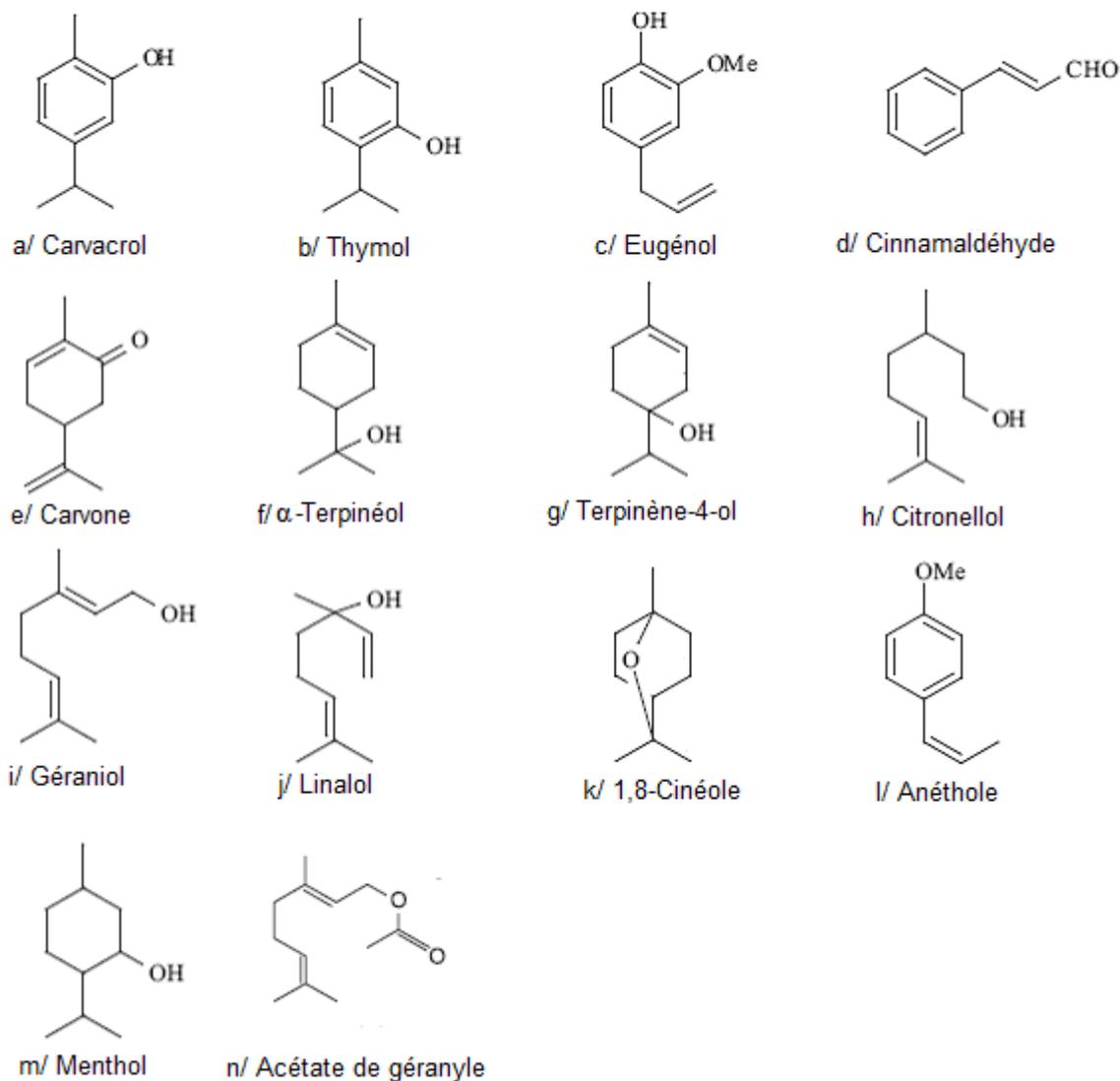


Figure 22 : Composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles
(Kalemba et Kunicka, 2003)

Les composés carbonylés, appartenant aux familles chimiques des aldéhydes et des cétones, sont également décrits comme très actifs. Le cinnamaldehyde (fig. 22d), principal constituant de l'huile essentielle de cannelle, et la carvone (fig. 22e), qui entre dans la composition de l'huile de menthe poivrée, font partie de ce groupe.

De nombreuses huiles essentielles présentent une forte teneur en alcools, comme l'huile de l'arbre à thé, riche en α -terpinéol et en terpinène-4-ol (fig. 22f et 22g), l'huile de géranium, dont les principaux constituants sont le citronellol et le géraniol (fig. 22h et 22i), ou l'huile de lavande, à dominante linalol (fig. 22j). Les alcools sont légèrement moins actifs que les composés phénoliques et carbonylés. Leur activité antibactérienne est toutefois plus élevée

que celle générée par les éthers, comme le 1,8 cinéole ou l'anéthole (fig. 22k et 22l), et les molécules hydrocarbonées.

La structure chimique des constituants des huiles essentielles influence directement leur activité. Une étude, menée par Ultee *et al.* (2002), a ainsi mis en évidence l'importance du noyau benzénique, en démontrant le manque d'activité du menthol (fig. 18m) comparée à celle du carvacrol. Le rôle fondamental du groupement hydroxyle dans l'action des phénols a également été confirmé (Dorman et Deans, 2000 ; Ultee *et al.*, 2002) et sa position relative sur le noyau benzénique influence peu le degré d'activité. Ainsi, le thymol et le carvacrol, qui ne diffèrent que par la position ortho/méta du substituant hydroxyle, présentent une activité comparable sur des souches de *Bacillus cereus*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002). D'autres groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes. L'acétate de géranyle (fig. 18n) est plus actif que le géraniol contre un grand nombre de bactéries Gram positives et Gram négatives (Dorman et Deans, 2000). La nature des groupements alkyles peut également influencer cette activité : les substituants alkényles sont plus actifs que les substituants alkyles. Ainsi, le limonène (fig. 23a), qui est substitué par un groupement isopropylène en position 4, présente une plus haute activité que son homologue le *p*-cymène (fig. 23b), substitué par un groupement isopropyle (Dorman et Deans, 2000).

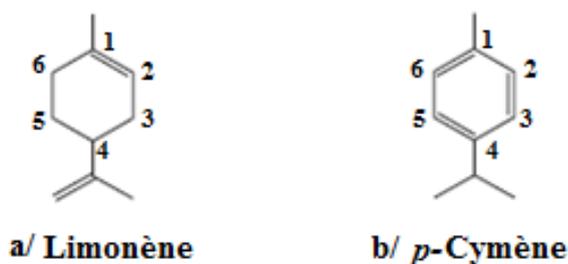


Figure 23 : Structures chimiques du limonène (a) et du *p*-cymène (b) (Burt, 2004)

Les interactions entre les constituants des huiles essentielles peuvent également affecter leur activité. Par exemple, l'efficacité de l'huile essentielle de thym contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* est due à une synergie entre ses principaux constituants : le carvacrol et le thymol (Lambert *et al.*, 2001). Une autre interaction synergique a été mise en évidence entre

le carvacrol et son précurseur, le p-cymène, sur *B. cereus*. Le p-cymène semblerait faciliter la pénétration intracellulaire du carvacrol en potentialisant ainsi son action (Ultee *et al.*, 2002). Des effets antagonistes, conduisant à une réduction de l'activité antibactérienne, ont également été signalés. Ils se produisent généralement entre les molécules actives et les composés non oxygénés, qui réduisent leur solubilité et donc leur efficacité. Par exemple, la solubilité du terpinène-4-ol est réduite par le γ -terpinène (Cox *et al.*, 2001).

3-2-4-5 Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (fig. 24).

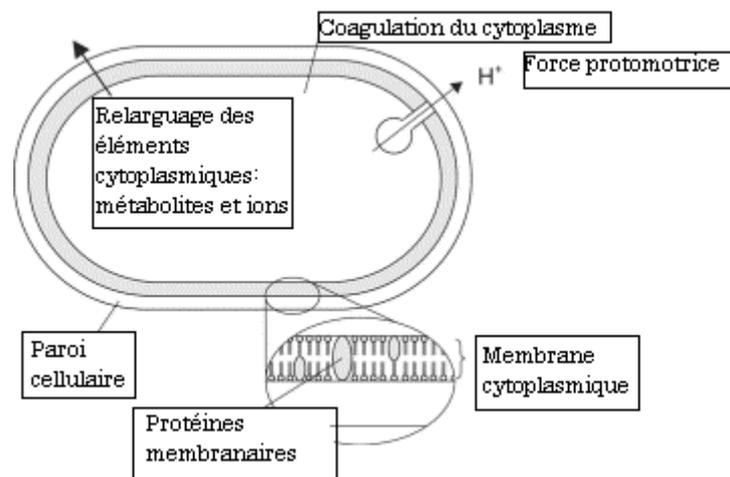


Figure 24 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema *et al.*, 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Carson *et al.*, 2002 ; Ultee *et al.*, 2002). Si la perte de matériel est trop importante ou si les

éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert *et al.*, 2001). En détruisant la membrane externe des bactéries Gram négatives, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (Helander *et al.*, 1998). Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *B. cereus*. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. Chez les bactéries exposées au carvacrol, on observe une diminution de l'ATP intracellulaire, mais aussi une diminution du potentiel membranaire. Ainsi, le carvacrol, en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, n'entraîne pas une fuite d'ATP mais une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et, donc, de la synthèse d'ATP. Cette information est confirmée par la mesure du gradient de pH à travers la membrane plasmique. Le carvacrol formerait des canaux dans la membrane permettant la fuite des ions (Ultee *et al.*, 2002). En plus de limiter la croissance, le carvacrol est capable d'inhiber la production de toxines chez *B. cereus*. Deux hypothèses ont été présentées : soit l'exportation active des toxines hors de la cellule n'est plus possible à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force protomotrice, soit le faible taux d'ATP restant dans la cellule est utilisé par la bactérie pour survivre (Ultee et Smid, 2001).

L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles (Trombetta *et al.*, 2005). Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. De plus, après avoir traversé la membrane, il peut interagir avec des sites intracellulaires. Des cellules de *L. monocytogenes*, exposées à des huiles essentielles de thym, ont été observées en microscopie électronique à transmission (Rasooli *et al.*, 2006). Le thymol entraîne une diminution de la taille des bactéries, moyen probablement employé pour survivre (fig. 25b), une altération de la paroi bactérienne (fig. 25b, 25c et 25d), une agrégation du cytoplasme (fig. 25c) et un rapprochement des cellules (fig. 25b et 25c).

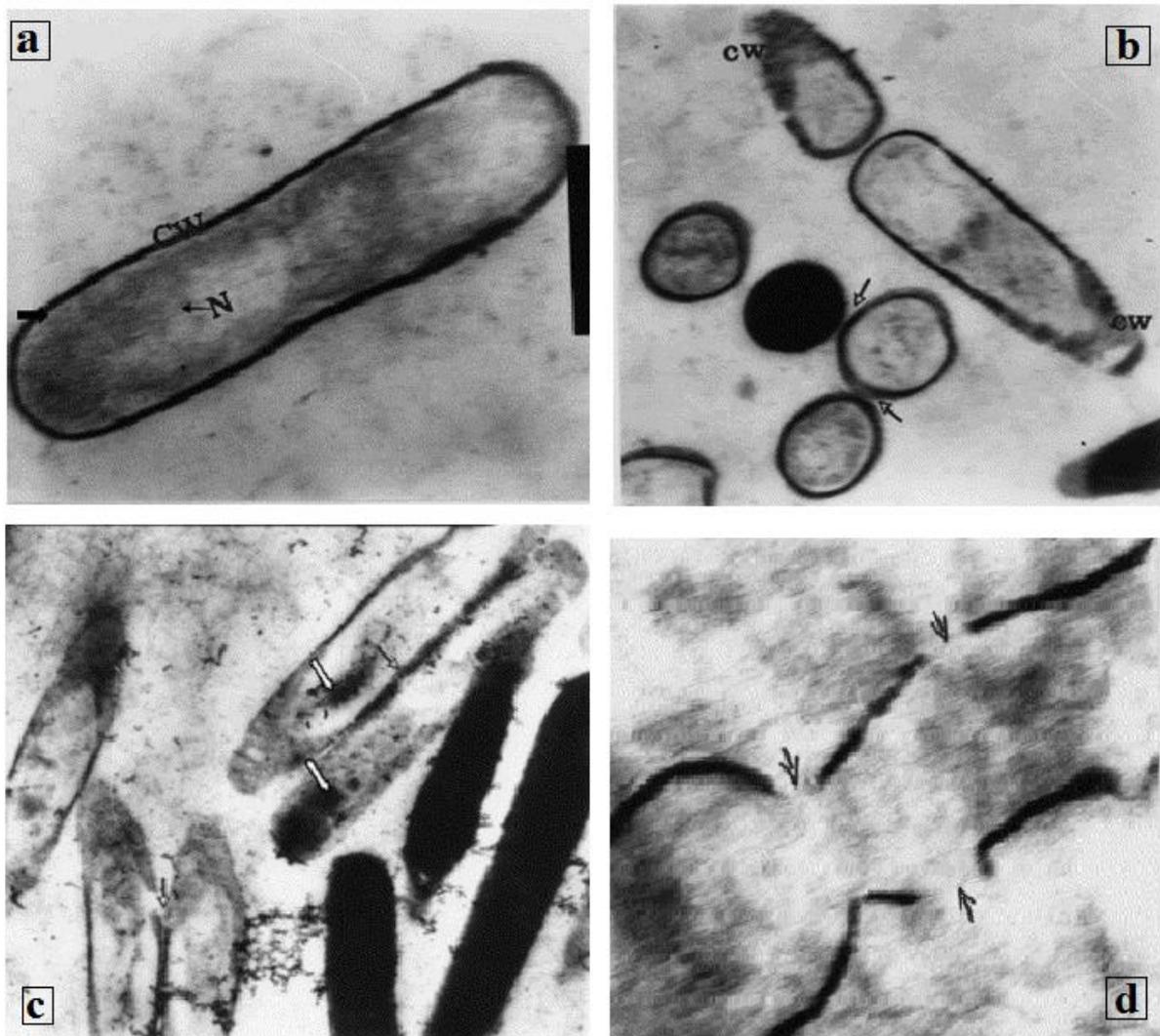


Figure 25 : Observation en microscopie électronique à transmission de *Listeria monocytogenes* (Rasooli *et al.*, 2006). (a) contrôle ($\times 50\ 000$) avec N: chromosome, CW: paroi cellulaire. (b à d) : bactéries exposées à l'huile essentielle (b : $\times 80\ 000$, c : $\times 30\ 000$, d : $\times 80\ 000$)

Le cinnamaldéhyde est le principal constituant de l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*). Ce composé est très actif contre de nombreuses bactéries Gram positives et Gram négatives (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* sp). Il inhibe les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire (Gill et Holley, 2004 et 2006). Chez *E. aerogenes*, le cinnamaldéhyde semble pouvoir se fixer aux protéines intracytoplasmiques par une inactivation des aminoacides décarboxylases (Wendakoon et Sakaguchi, 1995), ou interférer avec les mécanismes de régulation du quorum-sensing (Niu *et al.*, 2006). Des observations en microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur *B. cereus* et *S. aureus* (Kwon *et al.*, 2003). Chez

B. cereus, le cinnamaldéhyde empêche la formation complète des *septa* de division et entraîne une modification de la morphologie cellulaire. Les *B. cereus* traitées avec le cinnamaldéhyde apparaissent plus allongées (fig. 26b) que les cellules non traitées (fig. 26a). Chez *S. aureus*, il n'y a aucune modification de la morphologie cellulaire (fig. 26c et 26d) mais un relarguage des protéines cytoplasmiques, qui se traduit par une forte diminution de la densité cellulaire.

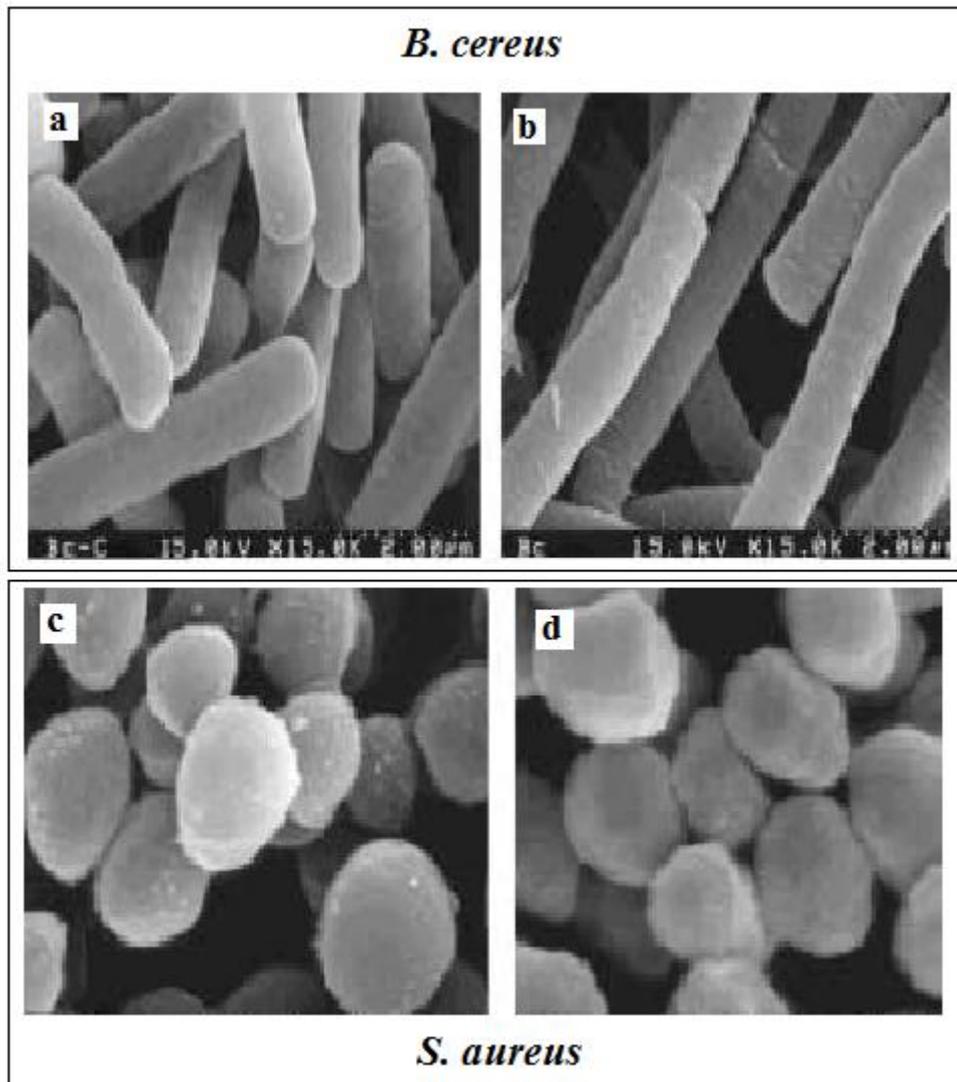


Figure 26 : Micrographies électroniques à balayage de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Kwon *et al.*, 2003). (a et c) : témoins, (b et d) : traitement au cinnamaldéhyde

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

Le spectre d'action de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé) est très étendu. Cette huile agit sur de nombreuses espèces bactériennes, comprenant des bactéries Gram positives et Gram négatives, et se révèle très efficace contre les infections aux SARMs. Cette activité est attribuée au terpinène-4-ol, qui est le composé majoritaire de l'huile (Hammer *et al.*, 1996). L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* perméabilise des liposomes modèles (Cox *et al.*, 2000). Ainsi, cette huile serait capable de perméabiliser les membranes plasmiques, entraînant chez *S. aureus* une perte d'ions potassium (Cox *et al.*, 2000) et de matériel absorbant à 260 nm (Carson *et al.*, 2002). L'huile essentielle ne lyse pas les bactéries comme cela a été démontré par mesure de l'absorbance à 260 nm des filtrats bactériens (Carson *et al.*, 2002) et observé en microscopie électronique (Reichling *et al.*, 2002). Une perte de matériel cytoplasmique et la formation de structures ressemblant à des mésosomes (fig. 27), structures retrouvées après un traitement à la vancomycine, sont observées avec le terpinène-4-ol (Carson *et al.*, 2002). De plus, cette huile est plus efficace sur les bactéries en phase exponentielle de croissance que sur les bactéries en phase stationnaire (Gustafson *et al.*, 1998), suggérant l'implication d'autres cibles que la membrane.

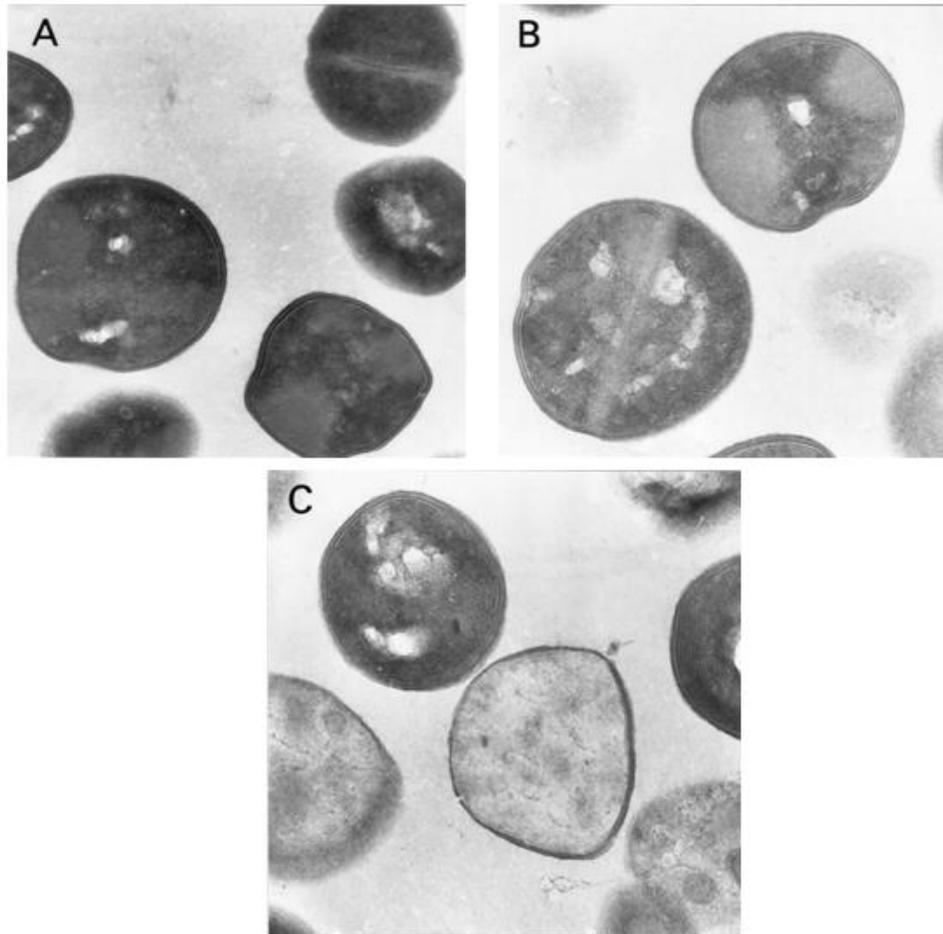


Figure 27: Micrographies en microscopie à transmission de *Staphylococcus. aureus* contrastés à l'acétate d'uranyle (Carson *et al.*, 2002). (A) : sans traitement, (B et C) : après traitement avec 0,3 % de terpinène-4-ol. Grossissements : $\times 11\ 500$ (A) et $\times 14\ 200$ (B et C)

Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène biologique que la médecine aura du mal à faire disparaître. L'évolution permettra toujours aux bactéries de s'adapter. Une meilleure utilisation des antibiotiques ne pourra que ralentir l'extension des résistances et la découverte de nouvelles molécules actives reste une nécessité. Les huiles essentielles présentent une très grande richesse de molécules, tant en nombre qu'en variété. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

MATERIEL ET METHODES

1- Matériel

1-1 Les souches bactériennes

Les souches de *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* (*S. aureus* CIP 53156), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes* CIP 55.143), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* CIP 76.117), *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes* CIP 60.86), *Bacillus cereus* (*B. cereus* CIP 78.3) et *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni* NCTC 11168), sont fournies par l'Institut Pasteur (Collection de l'Institut Pasteur, CIP). Leur croissance est réalisée à 37°C en milieu liquide Müeller-Hinton Broth (MHB, Oxoid) et sur gélose Müeller-Hinton Agar (MHA bioMérieux), en milieu solide. Pour *C. jejuni*, la culture en milieu solide est réalisée sur gélose MHA supplémentée de 5% de sang de mouton.

La souche *E. aerogenes* EA289 dérive de l'isolat clinique multi-drogue résistant (MDR) EA27 (Mallea *et al.*, 1998). EA289 est sensible à la kanamycine (kan^s) et surexprime les pompes d'efflux AcrAB-TolC.

1-2 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles de *Santolina corsica* et de *Crithmum maritimum* ont été isolées des parties aériennes (feuilles) des plantes par hydrodistillation. L'extraction a été réalisée au Laboratoire « Chimie-Biomasse » de l'Université de Corse.

Les huiles essentielles d'*Inula graveolens*, *Cistus ladaniferus*, *Citrus sinensis*, *Mentha aquatica*, *Citrus reticulata*, *Juniperus communis*, *Melaleuca alternifolia*, et *Helichrysum italicum* proviennent d'unités commerciales (Distilleries « U Mandriolu » et « Phytosun »). Leur solubilisation a été réalisée dans du Tween 80 (Sigma-Aldrich) ou dans du sulfoxyde de diméthyle (DMSO, Sigma-Aldrich). L'activité antibactérienne de ces solvants a été préalablement testée : aux concentrations utilisées, ils sont sans effet sur la croissance bactérienne.

1-3 Les antibiotiques

Les disques d'antibiotiques, utilisés pour les essais de diffusion par disque, sont la pénicilline G, l'érythromycine et le choramphénicol (bioMérieux). Les antibiotiques, utilisés pour la réalisation des gammes de dilution, sont l'érythromycine et le chloramphénicol (Sigma-Aldrich). Leur solubilisation est respectivement effectuée dans du méthanol et de

l'éthanol. L'activité antibactérienne de ces solvants a été préalablement testée : aux concentrations utilisées, ils sont sans effet sur la croissance bactérienne.

2- Méthodes

2-1 Méthodes microbiologiques

2-1-1 Activité antibactérienne

2-1-1-1 Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque

Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'une huile essentielle. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique utilisée est une modification de la méthode de Hayes et Markovic (2002). Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile essentielle, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, est ainsi déterminé (fig. 28).

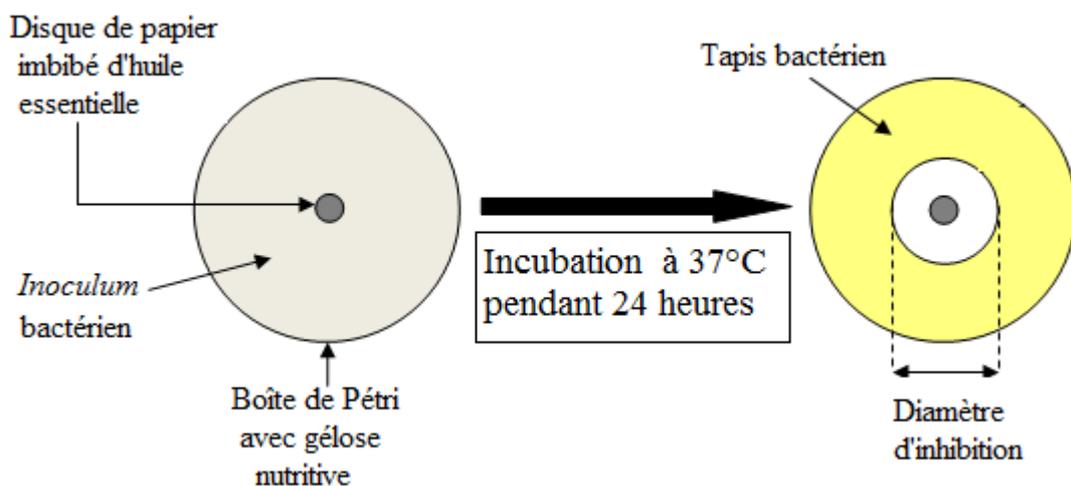


Figure 28 : Principe de la méthode de diffusion par disque

Une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (10^8 UFC.mL⁻¹) est préparée puis diluée au 1/100. 20 mL de milieu gélosé MHA sont coulés par boîte de Pétri. Deux mL d'*inoculum* sont déposés sur chaque boîte. Après une imprégnation de 5 minutes, l'excédent d'*inoculum* est éliminé par aspiration. A la surface de chaque boîte, quatre disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre (bioMérieux) sont déposés. Deux essais sont réalisés : un disque imbibé avec 15 µL d'huile essentielle et un second avec 15 µL d'huile essentielle supplémentée de 10% de DMSO. Deux témoins sont réalisés : un témoin négatif avec 15 µL d'eau distillée stérile en présence de 10 % de DMSO et un disque d'antibiotique comme témoin positif. Les boîtes sont laissées 1 heure à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres, disque inclus. Chaque test est réalisé trois fois au cours de trois expériences successives.

2-1-1-2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

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

2-1-1-2-1 Technique de macrodilution en milieu liquide

400 μL de l'huile essentielle à tester sont placés dans un tube stérile contenant 4,6 mL de milieu MHB, supplémenté en Tween 80 (0,01 %, v/v). Une dilution en cascade est effectuée dans du milieu MHB-Tween 80 (0,01 %, v/v), de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et 0,3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (fig. 29a).

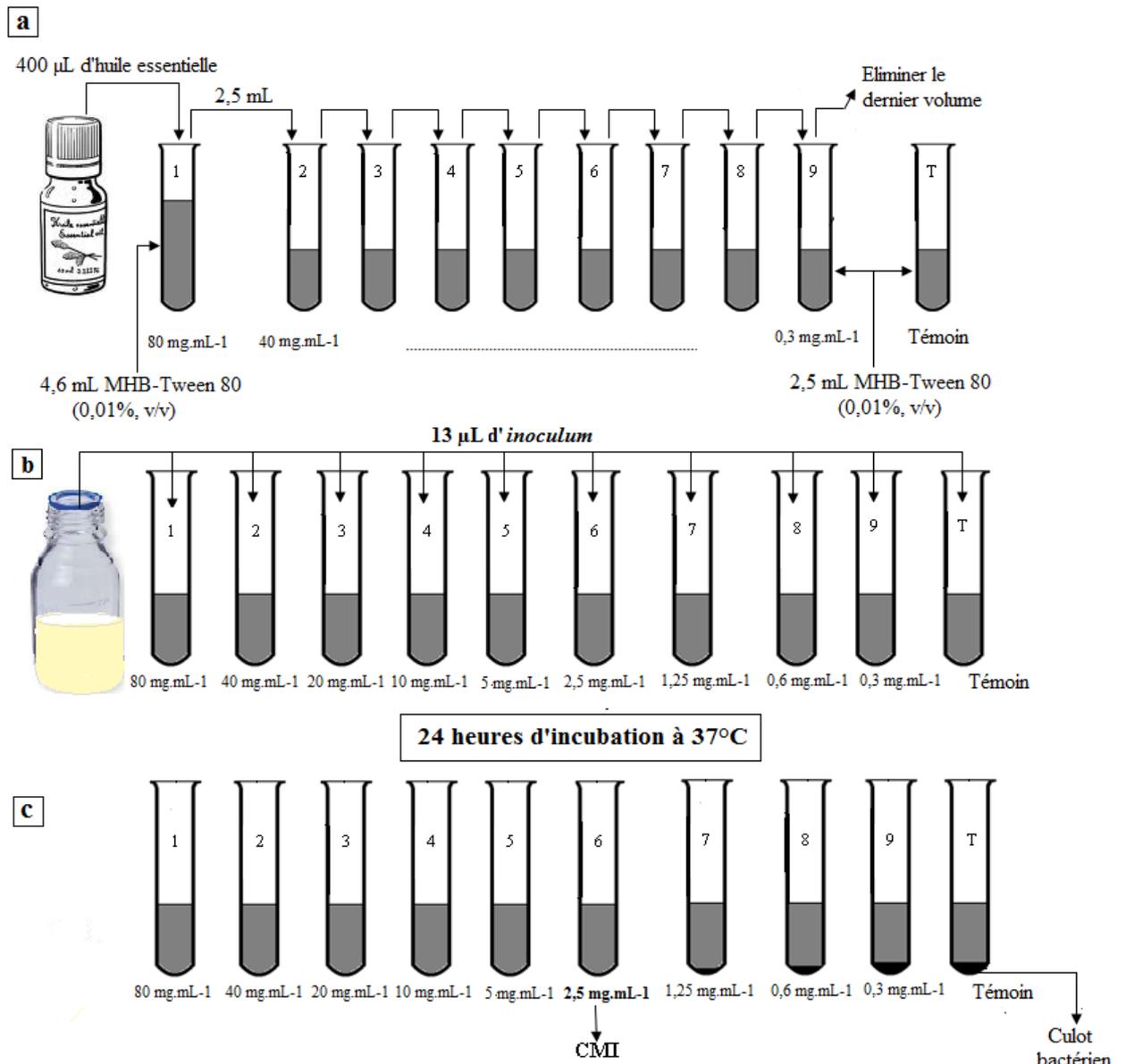


Figure 29 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide

13 μL d'un *inoculum* bactérien, de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (10^8 UFC.mL^{-1}), sont déposés dans chacun des tubes de la gamme, lesquels sont ensuite placés à 37°C , sous agitation, pendant 24 heures (fig. 29b). Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 13 μL de l'*inoculum* standardisé ont été déposés dans du milieu MHB-Tween 80 (0,01 %, v/v), est également réalisé.

Après incubation, les tubes sont centrifugés à 5 000g, pendant 5 minutes, à 20°C . La CMI (% v/v) de l'huile essentielle testée est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvu de croissance bactérienne (fig. 29c). Chaque expérience est répétée trois fois au cours de trois expériences successives.

2-1-1-2-2 Technique de microdilution en milieu liquide

L'huile essentielle à tester est dissoute dans des microtubes stériles, contenant du DMSO, de manière à générer une gamme de dilution de base 2. La gamme de concentration est alors reproduite dans une microplaque à 96 puits (Greiner, VWR). 10 μL de chaque dilution sont transférés dans les puits de la microplaque, qui contiennent chacun 190 μL de milieu MHB inoculé avec 10^6 UFC.mL^{-1} . Les concentrations finales de la gamme ainsi générée sont comprises entre 50 et 0,1 mg.mL^{-1} . L'érythromycine et le chloramphénicol sont utilisés comme contrôles positifs, le DMSO comme contrôle négatif. Après 18 heures d'incubation à 37°C , la CMI de l'huile essentielle est déduite à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance bactérienne. La lecture est effectuée après l'ajout de 50 μL de chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT, Sigma-Aldrich). La présence de bactéries vivantes est détectée par la coloration en rose de l'INT. Chaque test est réalisé trois fois au cours de trois expériences successives.

2-1-1-2-3 Technique de macrodilution en milieu solide

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) pour évaluer la sensibilité des bactéries microaérophiles aux agents antibactériens. Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution standard sur milieu gélosé MHA, supplémenté avec 5% de sang de mouton.

Une gamme de dilution de base 2 est réalisée, dans du DMSO, à partir de 50 μL de l'huile essentielle à tester. 30 μL de chacune des dilutions de la gamme sont ajoutés dans des tubes stériles contenant 15 mL de milieu gélosé MHA, maintenu en surfusion dans un bain

thermostaté à 55°C. La gamme de concentrations ainsi générée est comprise entre 1 et 0,03 mg.mL⁻¹. Le contenu de chaque tube est immédiatement versé dans une boîte de Pétri stérile après une agitation de 15 secondes. Des spots de 2 µL d'un *inoculum* standardisé à 10⁸ UFC.mL⁻¹ (soit 2.10⁵ UFC par spot) sont déposés sur les boîtes de gélose. L'érythromycine est utilisée comme contrôle positif, le DMSO comme contrôle négatif. Les boîtes sont incubées dans une jarre anaérobie, pendant 24 h à 37°C, sous atmosphère microaérophile, générée par un sachet « GENbox anaer » (bioMérieux). La CMI de l'huile essentielle est définie à partir de la première boîte de la gamme dépourvue de croissance bactérienne. Chaque expérience est répétée trois fois au cours de trois expériences successives.

2-1-1-3 Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide

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

La même gamme de concentration, réalisée par la technique de macrodilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'huile essentielle à tester (fig. 30). Des prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés « en strie » sur gélose MHA. Les boîtesensemencées sont incubées 24 heures à 37°C.

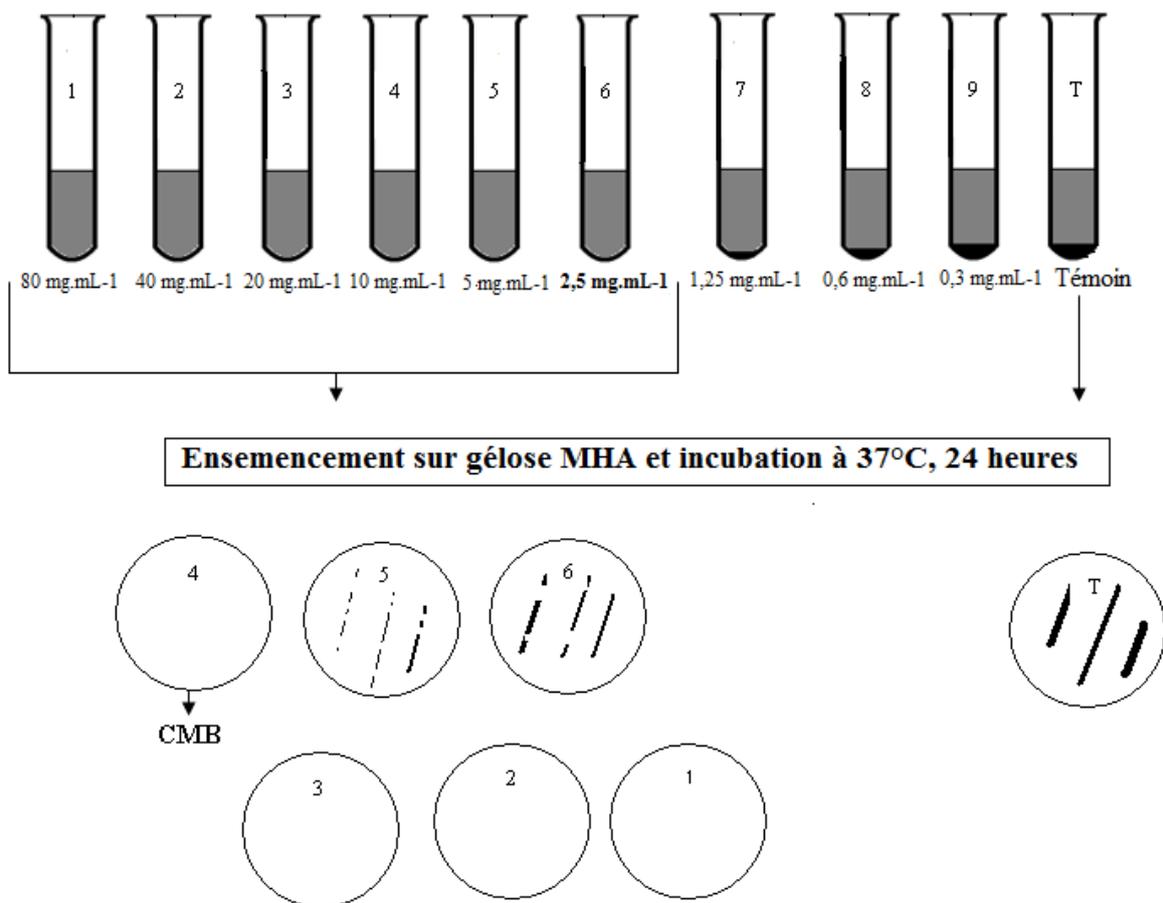


Figure 30 : Détermination de la CMB en milieu solide

La CMB (% v/v) de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Chaque expérience est réalisée trois fois au cours de trois expériences successives.

2-1-2 Dynamique d'action des huiles essentielles par mesure de la décroissance bactérienne (Time-kill assay)

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

Trois à cinq colonies bactériennes, ensemencées la veille au soir sur une gélose au sang, sont prélevées à l'aide d'une boucle d'inoculation et déposées dans 2 mL de NaCl à 0,85 %. La suspension obtenue est standardisée de manière à ce que sa concentration soit comprise

entre 10^6 et 5.10^6 UFC.mL⁻¹. Pour cela, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (Analytik Jena Specord 205) à 620 nm, ajustée au standard 0,5 de Mac Farland et diluée au 1/20. Un mL de cet *inoculum* est déposé dans 9 mL de MHB-Tween 80 (0,01%, v/v) en absence (témoin de croissance) ou en présence d'une concentration en huile essentielle correspondant à la CMI en milieu liquide. Les suspensions ainsi obtenues contiennent environ 5.10^5 UFC.mL⁻¹ et sont maintenues sous agitation à 37°C. 100 µL de suspension sont prélevés à différents temps (0, 2, 4, 6, 8 et 24 heures) afin de procéder à un dénombrement sur gélose MHA après une incubation à 37°C pendant 24 heures. La quantification du nombre de colonies bactériennes est limitée à la valeur seuil de 10^2 UFC.mL⁻¹. Chaque expérience est réalisée deux fois.

2-1-3 Expérience de lyse cellulaire

Cette méthode permet de déterminer une éventuelle action bactériolytique des huiles essentielles par mesure de l'absorbance à 620 nm. En effet, une bactérie non lysée absorbe à 620 nm, il y aura donc bactériolyse si l'absorbance à 620 nm diminue au cours du temps (Carson *et al.*, 2002).

Deux colonies bactériennes, ensemencées la veille au soir sur une gélose au sang, servent à inoculer 400 mL de milieu MHB. La culture est incubée à 37 °C, pendant 18 heures, sous agitation. Les bactéries sont ensuite séparées du milieu de culture par centrifugation à 10 000g, pendant 12 minutes, à 4°C. Le culot bactérien est lavé 2 fois avec du tampon phosphate de sodium (PBS) puis remis en suspension dans du PBS-Tween 80 (0,01%, v/v). La suspension bactérienne obtenue est standardisée à 3.10^{10} UFC.mL⁻¹, déposée dans un tube stérile en absence (contrôle négatif de bactériolyse) ou en présence d'huile essentielle à deux concentrations, l'une correspondant à la CMI et l'autre à huit fois la CMI (8 CMI) en milieu liquide. Les suspensions obtenues sont soumises à agitation. Aux temps 0 s, 30 s, 30 min, 60 min, 90 min et 120 min, elles sont homogénéisées pendant 20 secondes, diluées au 1/100 et leur absorbance est mesurée à 620 nm (Analytik Jena Specord 205). Chaque expérience est réalisée deux fois.

2-1-4 Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Cette technique est utilisée pour observer les effets d'une huile essentielle au niveau cellulaire. Elle est particulièrement adaptée pour visualiser les altérations de la paroi ainsi que la perte du contenu cytoplasmique. La méthode employée pour la préparation des cellules bactériennes en MET est une adaptation du protocole défini par Rasooli et *al.*, 2006.

5mL d'une suspension bactérienne à 10^7 UFC.mL⁻¹ sont incubés en absence (contrôle négatif) ou en présence d'une concentration en huile essentielle correspondant à la CMI. Les suspensions bactériennes sont ensuite centrifugées à 1 300g pendant 10 minutes à température ambiante. Les culots sont lavés avec 200 mM de tampon cacodylate de sodium à pH 7,2 et centrifugés à 1 300g, pendant 10 minutes, à température ambiante. Les culots sont mis en suspension dans 2 mL de solution de fixation de glutaraldéhyde à 2,5 % dans 200 mM de tampon cacodylate de sodium (pH 7,2). Ils sont ensuite transférés dans des microtubes stériles, puis stockés une heure à température ambiante.

Les culots fixés sont remis en suspension, centrifugés à 1 300g, pendant 5 minutes, à température ambiante, puis lavés trois fois, dans 3 bains, de 10 minutes chacun, de tampon cacodylate de sodium (200 mM) à pH 7,2. Une post-fixation des culots est alors réalisée avec du tétraoxyde d'osmium à 2 % dans 200 mM de tampon cacodylate de sodium (pH 7,2) pendant une heure. Les culots post-fixés sont rincés rapidement à l'eau distillée stérile, puis déshydratés dans 6 bains successifs, de 10 minutes chacun, d'alcool éthylique de concentration croissante : 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 %, 100 %. Les culots sont alors placés dans un mélange d'alcool éthylique pur et d'oxyde de propylène (50/50, v/v), pendant 10 minutes, puis soumis à 2 bains d'oxyde de propylène pur de 15 minutes chacun. Plusieurs substitutions, d'une heure chacune, sont pratiquées dans des mélanges Spurr ou Epoxy /oxyde de propylène, utilisés dans les proportions suivantes : 1v/2v ; 1v/1v ; 2v/1v.

Une imprégnation d'une nuit, suivie de deux imprégnations de 4 heures chacune, sont réalisées dans de la résine Spurr ou Epoxy pure, avant de procéder à l'inclusion en gélules. Les gélules de résine sont alors mises à polymériser à 45°C pendant 24 heures.

Des coupes de 80 nm sont effectuées à l'ultra-microtome et déposées sur grilles de cuivre. Les coupes sont ensuite contrastées à l'acétate d'uranyle à 7% dans de l'éthanol à 50 %, pendant 10 minutes, puis lavées dans trois bains successifs d'eau distillée stérile. Après une heure de séchage, les coupes sont post-contrastées avec du citrate de plomb à pH 12, pendant 6 minutes, puis lavées dans trois bains successifs d'eau distillée stérile. Après séchage à température ambiante, elles sont observées au microscope électronique à transmission (Hitachi H-600, voltage : 75kV ou Philips CM120, voltage : 80kV).

2-2 Méthodes chimiques

2-2-1 Chromatographie sur colonne de silice (CC)

Les chromatographies sur colonne de silice de type « flash » sont réalisées avec de la silice ICN 200-500 μm , 60Å. Deux solvants sont utilisés pour réaliser les différentes éluions : un solvant apolaire, le pentane (Rectapur, VWR) et un solvant polaire, l'éther diéthylique anhydre (Rectapur, VWR). L'éther diéthylique anhydre est préparé par passage sur alumine basique et conservé sur tamis moléculaire (Merck, 04 nm en perle de 2 mm).

2-2-2 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe (Perkin Elmer Clarus 500), équipé d'un injecteur diviseur, de deux détecteurs à ionisation de flamme et de deux colonnes capillaires (50 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 μm). L'une de ces colonnes est polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et l'autre est apolaire (BP-1, polydiméthyl-siloxane). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur et exerce une pression en tête de colonne de 20 psi (débit : 0.8 mL.min⁻¹). La température de l'injecteur et des détecteurs est de 250 °C. Le four de l'appareil est programmé en température, de 60 à 220 °C, avec une élévation de 2°C/min, puis un palier de 20 minutes à 220°C. 50 μL de l'échantillon à analyser sont dilués dans 350 μL de CCl₄. 0,5 μL de ce mélange est injecté en mode split avec un rapport de division de 1/60. Les composés sont repérés sur les chromatogrammes, grâce à leurs indices de rétention sur colonne apolaire (IR_a) et polaire (IR_p), ce qui permet leur quantification.

2-2-3 Résonance magnétique nucléaire (¹³C RMN)

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un spectromètre (Bruker 400 AVANCE, 9,4 Tesla) opérant à 400,132 MHz pour le proton et à 100,623 MHz pour le carbone-13. Les spectres ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm. Le solvant est le chloroforme deutéré (CDCl₃) additionné de tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne.

Les spectres de RMN du carbone-13 ont été enregistrés avec les paramètres suivants : durée de l'impulsion = 4 μs (angle d'impulsion 45°); temps d'acquisition = 2,73 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 25 000 Hz

(environ 250 ppm) ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Pour l'enregistrement des spectres des huiles essentielles ou des fractions de chromatographie, une masse de 40 à 50 mg de mélange est dissoute dans 0,5 ml de CDCl_3 .

2-2-4 Identification des composés

L'identification des composés est basée sur la combinaison d'une technique chromatographique (CPG-IR) et d'une technique spectroscopique (^{13}C RMN). Les composés sont identifiés : i) par comparaison de leurs indices de rétention, sur colonnes apolaire et polaire, avec ceux de composés de référence. Les indices de rétention sont préalablement déterminés par rapport au temps de rétention d'une série de *n*-alcane avec interpolation linéaire (Logiciel « Target compounds » de Perkin-Elmer) ; ii) par ^{13}C RMN, selon une méthode informatisée, mise au point et développée par les membres de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse. Le principe repose sur l'attribution directe, dans le spectre du mélange, des différentes raies de résonance d'un composé donné, en les comparant avec celles des spectres de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres, élaborées au laboratoire (Tomi *et al.*, 1995; Tomi et Casanova, 2006). Cette méthode a été appliquée à l'analyse de l'huile essentielle et des fractions de chromatographie.

CHAPITRE 1

ÉTUDE DU MODE D'ACTION D'HUILES ESSENTIELLES A ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Ce travail porte sur la caractérisation du mode d'action d'huiles essentielles à activité antibactérienne.

L'action des huiles essentielles s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives. La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles (Burt, 2004). Pour entreprendre cette étude, la bactérie Gram positive *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* a été choisie comme modèle. Commensal de la flore cutanée humaine, *S. aureus* est aussi un pathogène opportuniste. Sa grande capacité d'adaptation lui a permis de développer des résistances contre la plupart des traitements antibiotiques. Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARMs) sont d'ailleurs devenues une préoccupation majeure dans le domaine de la santé car elles sont responsables d'infections nosocomiales sévères, associées à des taux de mortalité et à des frais de soins élevés. La mortalité, imputable aux bactériémies causées par les SARMs, est de 36,4% (Cosgrove et Carmeli, 2003) et le coût du traitement d'un patient atteint d'une telle infection est estimé à 10 000 euros (Cosgrove *et al.*, 2005). L'apparition des premiers *S. aureus* résistants à la vancomycine (SARVs), en 2003, n'a fait qu'aggraver la situation car la vancomycine était jusqu'alors le seul antibiotique efficace contre les infections à SARMs.

Le choix des huiles essentielles, candidates à l'étude, a été orienté à l'issue d'un test préliminaire visant à sélectionner les huiles les plus actives contre *S. aureus*. Basé sur la méthode de diffusion par disque, ce test permet d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles à partir des diamètres d'inhibition qu'elles génèrent sur un *inoculum* bactérien standardisé. Parmi les huiles essentielles criblées, celles présentant la plus haute activité ont été sélectionnées en vue d'étudier leur mode d'action sur *S. aureus*.

1- RESULTATS

1-1 Criblage de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur *Staphylococcus aureus*

L'activité anti-staphylococcique des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Cistus ladaniferus*, *Crithmum maritimum*, *Juniperus communis*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha aquatica*, *Santolina corsica*, *Helichrysum italicum* et *Inula graveolens* a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats du criblage sont présentés dans la figure 31. Les barres d'erreurs, figurées en rouge, représentent les écarts types à la moyenne pour chaque test.

La pénicilline G est utilisée comme antibiotique de contrôle. La classification des souches bactériennes en catégories « Sensible, (S) » ou « Résistante, (R) » aux antibiotiques est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010). Les valeurs de référence, fournies par le CA-SFM, indiquent que les souches de *Staphylococcus* sp sont sensibles à la pénicilline G si les zones d'inhibition produites par l'antibiotique sont supérieures ou égales à 29 mm. Avec des diamètres d'inhibition moyens de 36 mm, la souche *S. aureus* CIP 53.156 est donc sensible à l'action de la pénicilline G.

Le sulfoxyde de diméthyle (DMSO) est un solvant utilisé pour améliorer la solubilisation des huiles essentielles. Le mélange eau distillée/DMSO (10%, v/v) sert de contrôle négatif interne. Avec un diamètre d'inhibition égal à celui du disque stérile non imprégné (6 mm), le DMSO est sans effet sur *S. aureus* à la concentration utilisée.

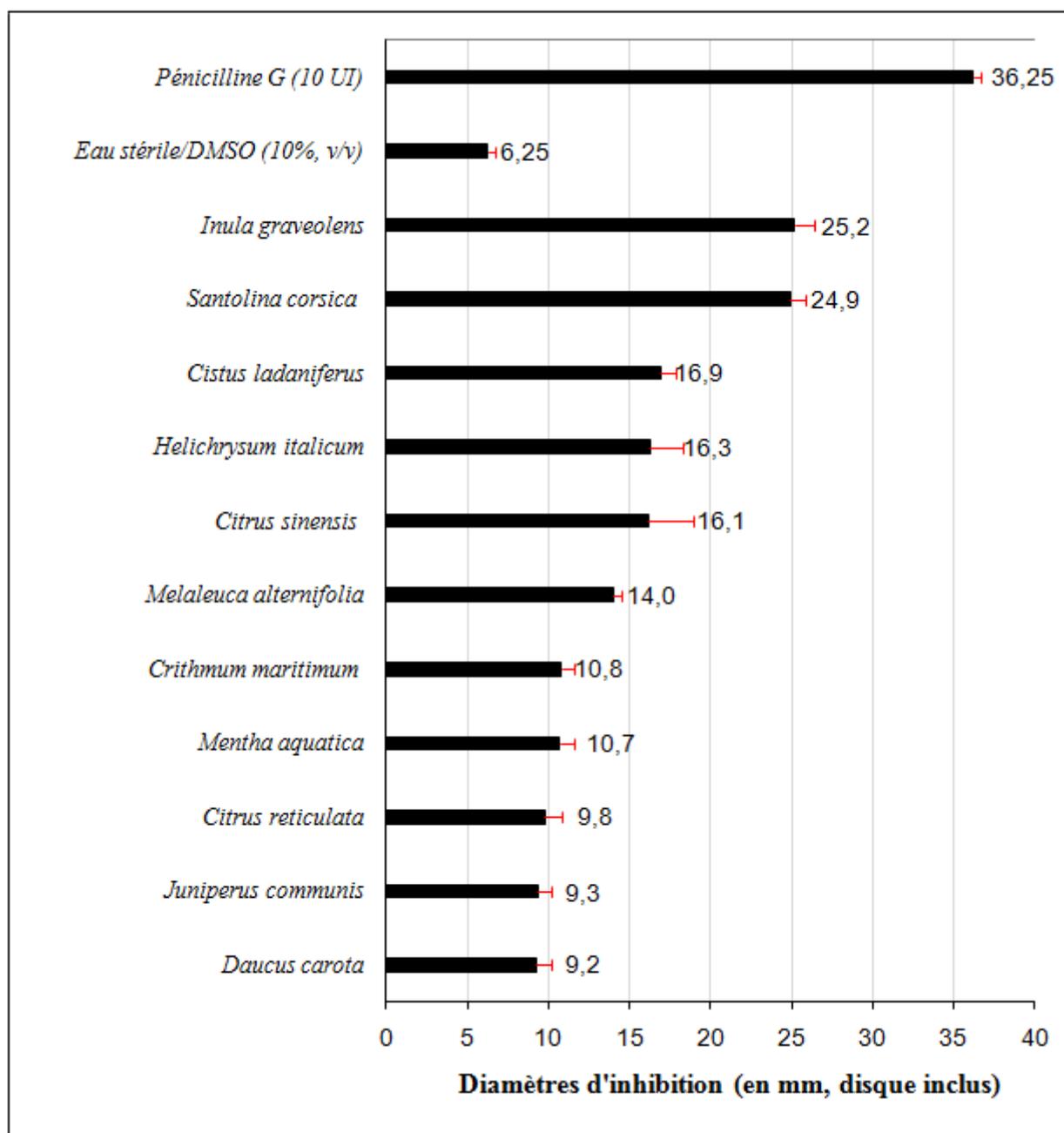


Figure 31 : Activité anti-staphylococcique de 11 huiles essentielles évaluée par la méthode de diffusion par disque

Les diamètres d'inhibition, générés par les huiles essentielles, sont très nettement inférieurs à ceux produits par la pénicilline G et très variables selon l'huile utilisée. L'activité antibactérienne des huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes de molécules, est généralement inférieure à celle exercée par les molécules antibiotiques, isolées des micro-organismes. Aussi, elles sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 15 mm (Rossi *et al.*, 2007a). Avec des diamètres d'inhibition inférieurs à 15 mm, les huiles essentielles de *D. carota*, *J. communis*,

M. aquatica, *C. maritimum* et *M. alternifolia* sont peu actives. En revanche, les huiles de *C. sinensis*, *C. ladaniferus*, *S. corsica*, *H. italicum* et *I. graveolens* inhibent fortement la croissance de *S. aureus*.

Avec des diamètres respectifs de 25,2 mm et de 24,9 mm, les huiles d'*I. graveolens* et de *S. corsica* et démontrent la plus haute activité anti-staphylococcique. Sur la base de cette activité, ces deux huiles essentielles ont été sélectionnées en vue de caractériser leur mode d'action sur *S. aureus*.

1-2 Caractérisation du mode d'action des huiles essentielles d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica* sur *Staphylococcus aureus*

Des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été réalisés afin de préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide des deux huiles essentielles sélectionnées. Des expériences de mort cellulaire et de bactériolyse ont ensuite été pratiquées pour mesurer les effets induits par des traitements temps- et dose- dépendants sur la viabilité cellulaire. Des observations en microscopie électronique à transmission (MET) ont finalement permis de visualiser les conséquences de ces traitements sur la morphologie et l'ultrastructure bactériennes.

1-2-1 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrice (CMI) et Bactéricide (CMB) des huiles essentielles d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica*

La CMI des huiles essentielles d'*I. graveolens* et de *S. corsica* est de 5 mg. mL⁻¹.

La CMB de l'huile essentielle d'*I. graveolens* est de 8 mg. mL⁻¹ et celle de *S. corsica* est de 10 mg. mL⁻¹ (tableau 3).

Tableau 3 : Tests de détermination de la CMI et de la CMB des huiles essentielles d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica* sur *Staphylococcus aureus*

Huiles essentielles	CMI (mg. mL ⁻¹)	CMB (mg. mL ⁻¹)	CMB/CMI
<i>Inula graveolens</i>	5	10	2
<i>Santolina corsica</i>	5	8	1,6

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile est considérée comme bactéricide. Les rapports CMB/CMI des huiles d'*I. graveolens* et de *S. corsica* sont respectivement égaux à 2 et à 1,6. Les deux huiles essentielles étudiées semblent donc exercer une action bactéricide contre *S. aureus*.

1-2-2 Dynamique d'action des huiles essentielles d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica* : expérience de mort cellulaire

La croissance bactérienne d'une population de *S. aureus*, non exposée aux huiles essentielles, est mesurée sur une période de 24 heures. Les effets, générés par les huiles d'*I. graveolens* et de *S. corsica* sur *S. aureus*, sont déterminés par mesure de la décroissance bactérienne au cours de la même période. Les courbes de mort cellulaire, obtenues pour des concentrations en huile essentielle égales à la CMI, et la courbe de croissance de la population témoin sont présentées dans la figure 32.

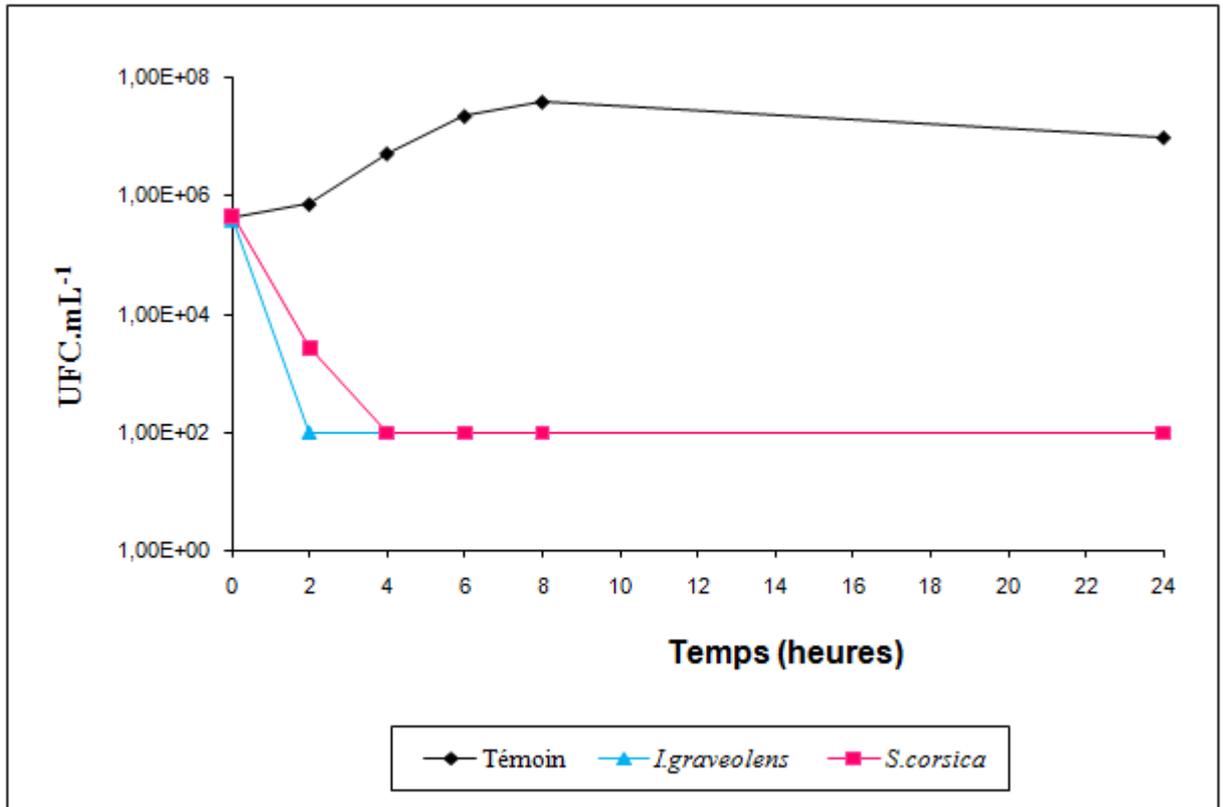


Figure 32 : Courbes de mort cellulaire sur 24 heures de *Staphylococcus aureus* traités avec une concentration en huile essentielle d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica* égale à la CMI et courbe de croissance d'une population non traitée (témoin)

La population témoin présente une courbe de croissance classique avec une phase exponentielle de croissance débutant dans les deux premières heures. La phase stationnaire et le début de la phase de déclin se déroulent entre 8 et 24 heures.

En deux heures de traitement, la concentration de la population, traitée avec une concentration en huile essentielle d'*I. graveolens* égale à la CMI (5 mg.mL⁻¹), chute rapidement (plus de 3 log₁₀) pour atteindre le seuil de détection (10² UFC.mL⁻¹). Pour la population soumise à la CMI (5 mg.mL⁻¹) de l'huile essentielle de *S. corsica*, le seuil de détection est atteint au bout de 4 heures de traitement.

Pour évaluer les effets des deux huiles essentielles durant les deux premières heures d'action, la décroissance bactérienne a été mesurée à des intervalles de temps plus restreints (0 s, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min et 120 min) sur une durée totale de 120 minutes (fig. 33).

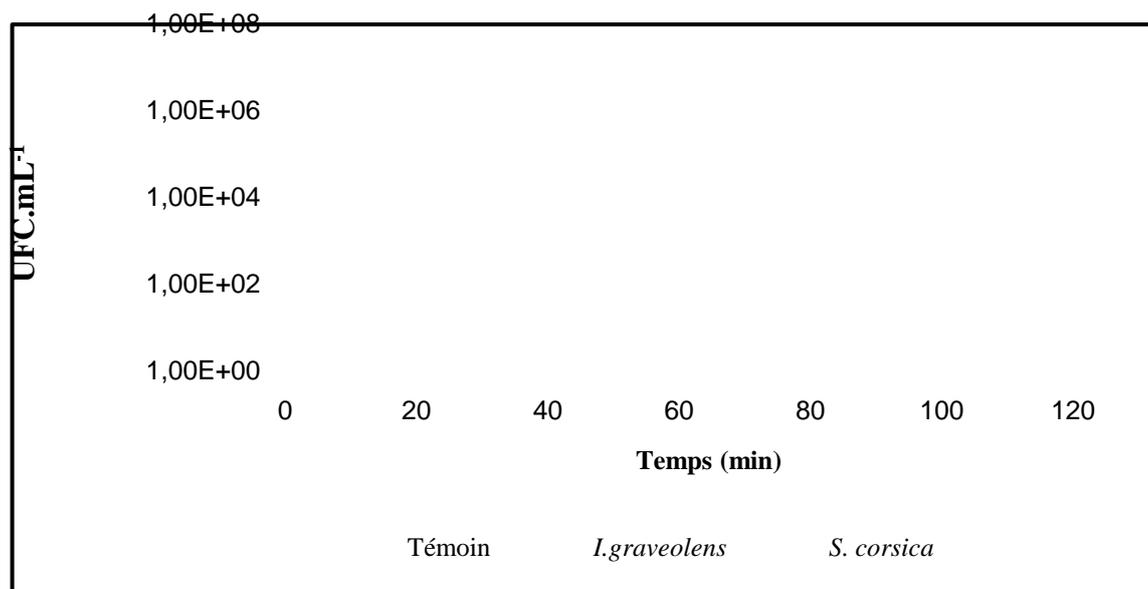


Figure 33 : Courbes de mort cellulaire sur 2 heures de *Staphylococcus aureus* traités avec une concentration en huile essentielle d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica* égale à la CMI et courbe de croissance d'une population non traitée (témoin)

L'action de l'huile essentielle d'*I. graveolens*, utilisée à la CMI, est immédiate. Durant les dix premières minutes, la concentration bactérienne diminue d'un \log_{10} et le seuil de détection est atteint au bout de 60 minutes.

L'huile essentielle de *S. corsica*, utilisée dans les mêmes conditions, agit plus lentement. Aucun effet n'est observable durant les premières minutes de traitement. Après dix minutes d'action, la population bactérienne de départ décroît de manière continue et, en moins de deux heures de traitement, le nombre d'unités formant colonies (UFC) chute de 5.10^5 UFC.mL⁻¹ (suspension initiale) à moins de 10^4 UFC.mL⁻¹.

1-2-3 Détermination de l'action lytique des huiles essentielles d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica*

La recherche des effets bactériolytiques se base sur une mesure de l'absorbance à 620 nm de suspensions de *S. aureus* traitées avec des concentrations croissantes en huiles essentielle d'*I. graveolens* et de *S. corsica* (fig. 34). La perte d'absorbance pour chaque temps est évaluée en fonction de l'absorbance initiale. Les résultats sont donc exprimés comme le rapport de l'absorbance mesurée au temps T sur l'absorbance à 620 nm mesurée au temps zéro

($A_{620}(T) / A_{620}(T_0)$, en pourcentages). Les barres d'erreurs, figurées en noir, représentent les écarts types à la moyenne pour chaque test.

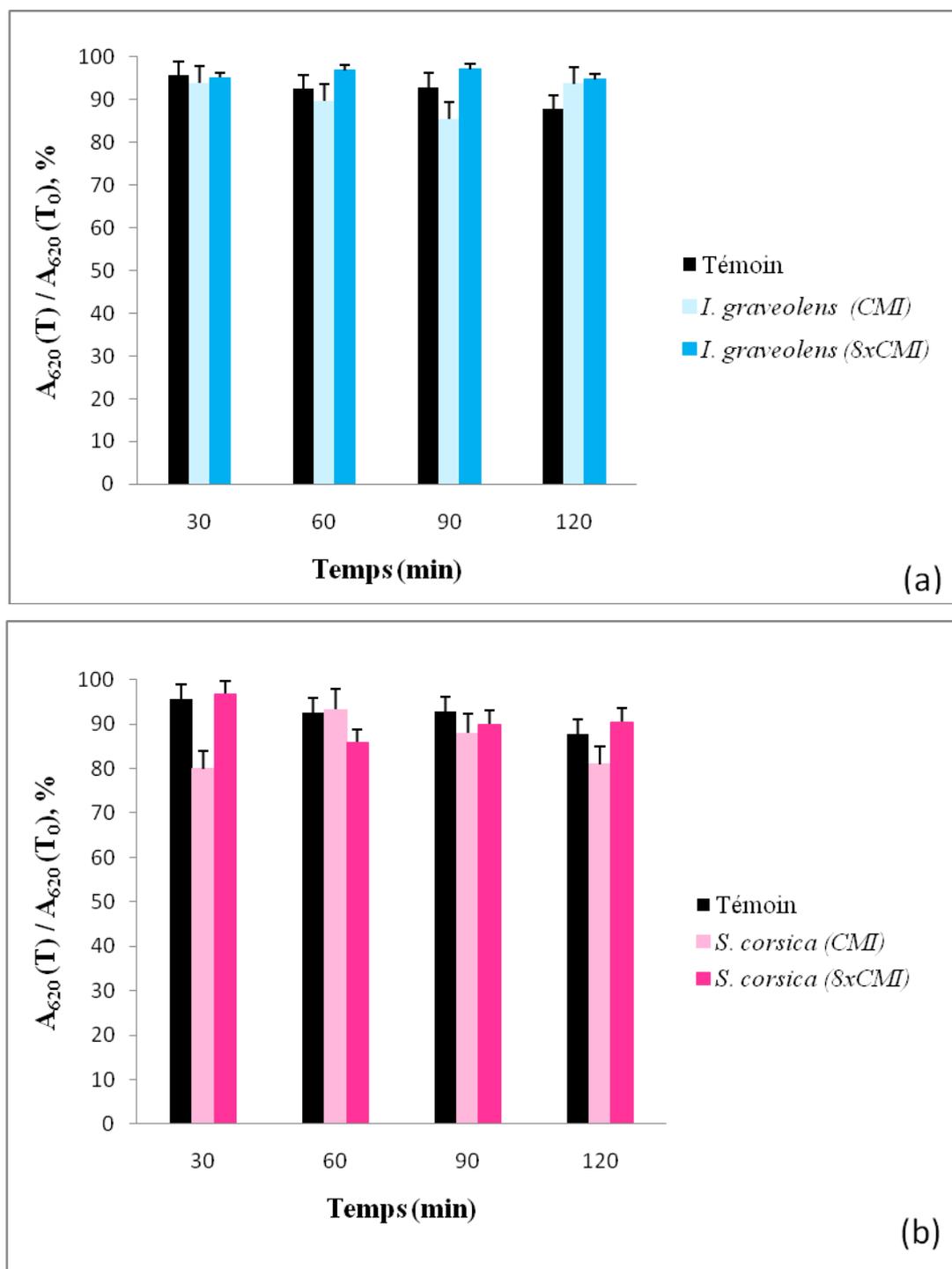


Figure 34 : Variations au cours du temps de l'absorbance à 620 nm de suspensions de *Staphylococcus aureus* non traitées et traitées avec des concentrations en huile essentielle d'*Inula graveolens* (a) et de *Santolina corsica* (b) égales à la CMI et à huit fois la CMI

Les *S. aureus* non traités correspondent au témoin négatif de bactériolyse. L'absorbance à 620 nm, mesurée à intervalles de temps réguliers, varie entre 88% et 97%. A 120 minutes, l'absorbance du témoin représente 93% de l'absorbance initiale.

L'absorbance des suspensions bactériennes, traitées avec des concentrations en huile essentielle d'*I. graveolens* égale à la CMI et à huit fois la CMI, ne varie pas de manière significative par rapport au témoin. Les mesures d'absorbance, effectuées durant les deux heures de traitement, sont comprises entre 91% et 97%.

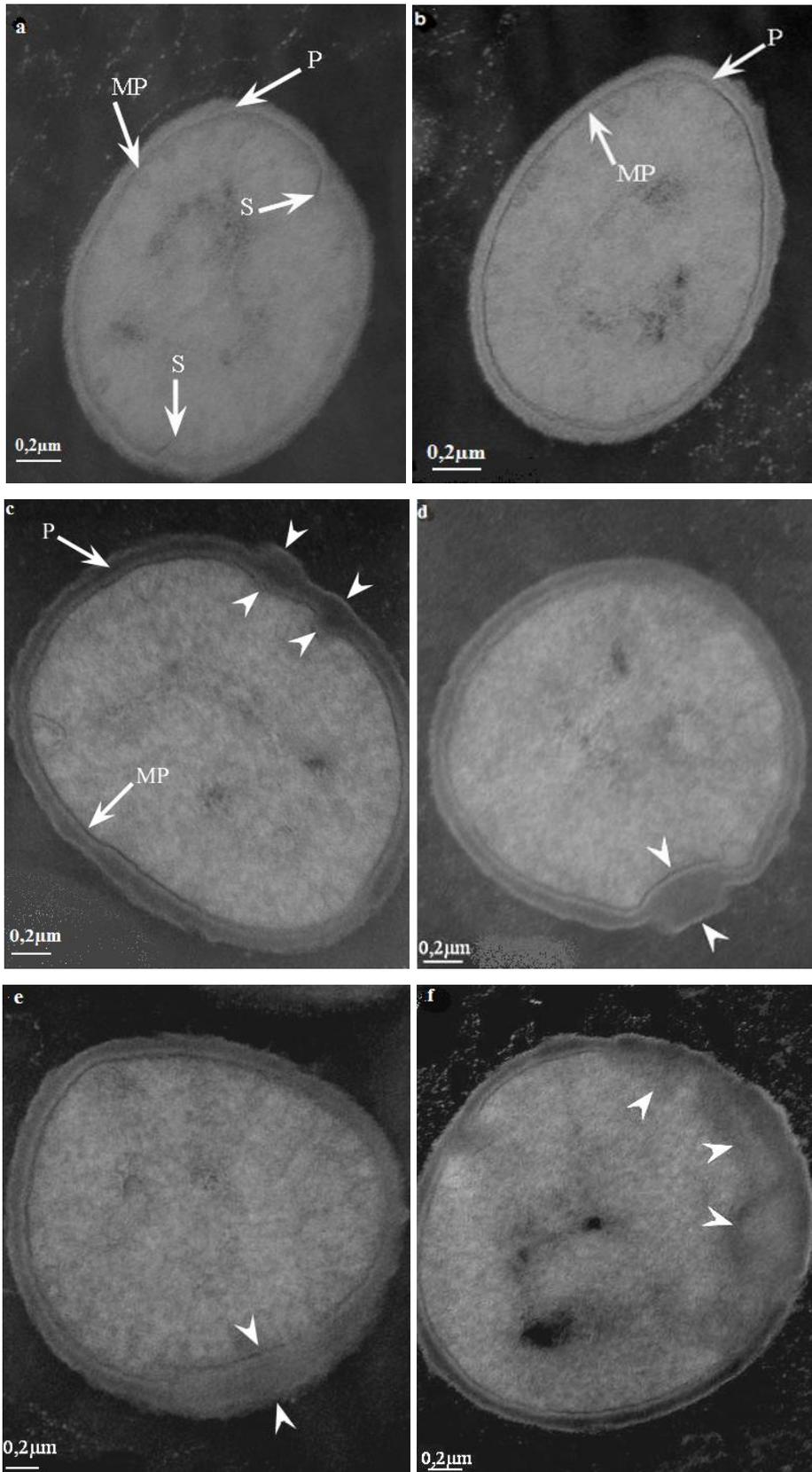
L'absorbance des suspensions bactériennes, traitées avec l'huile essentielle de *S. corsica* dans les mêmes conditions, diminue légèrement. Les variations relevées sont comprises entre 86% et 91%.

1-2-4 Observation des effets cellulaires générés par les huiles essentielles d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica* en Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Les micrographies des cellules de *S. aureus* non traitées (témoins) et traitées avec l'huile essentielle d'*I. graveolens* et de *S. corsica* sont présentées dans la figure 35.

La paroi et la membrane plasmique des *S. aureus* témoins sont régulières (fig. 35a et 35b). Le contenu cytoplasmique est homogène. Un début de division cellulaire est également visible sur la figure 5a où le septum de division commence à se former.

La membrane plasmique des *S. aureus*, traités avec l'huile essentielle d'*I. graveolens* à la CMI, laisse apparaître une (fig. 35d) ou plusieurs invaginations (fig. 35c), au niveau desquelles la paroi présente un épaissement inhabituel. Ces désorganisations localisées semblent pouvoir s'étendre sur une surface plus importante (fig. 35e). Enfin, sur la dernière micrographie, la membrane plasmique et le cytoplasme sont altérés (fig. 35f). La distribution du matériel cytoplasmique, qui forme des agrégats près de la paroi cellulaire, n'est plus homogène.



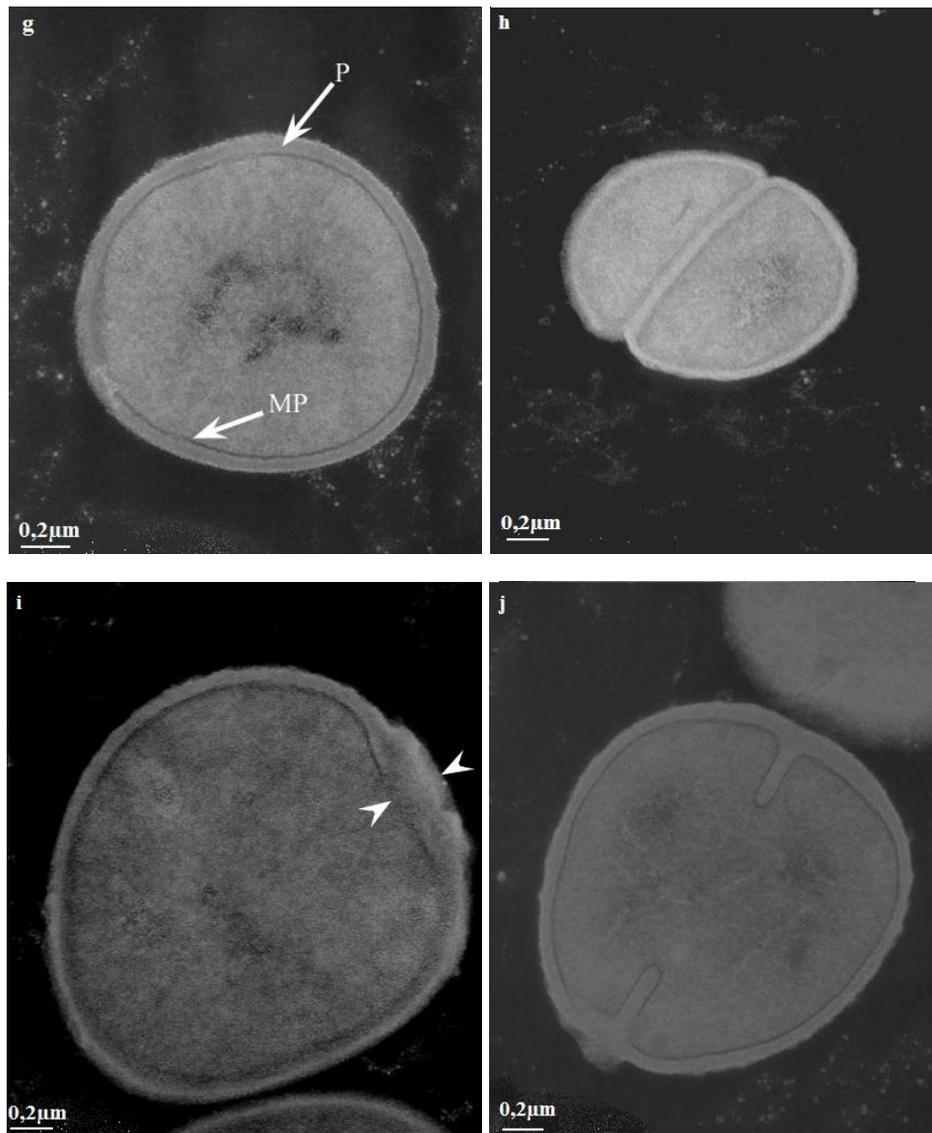


Figure 35 : Micrographies électroniques à transmission de cellules de *Staphylococcus aureus*. (a) et (b) : témoins ; (c) à (f) : cellules traitées avec l'huile essentielle d'*Inula graveolens* à la CMI ; (g) à (j) : cellules traitées avec l'huile essentielle de *Santolina corsica* à la CMI. Avec MP = Membrane Plasmique, P = Paroi cellulaire, S = Septum de division

Les bactéries traitées avec l'huile de *S. corsica* semblent proches des bactéries témoins. On peut observer une phase avancée (fig. 35j) et la fin d'une division bactérienne (fig. 35h). Des altérations semblables à celles générées par l'huile essentielle d'*I. graveolens*, à savoir un épaissement de la paroi et une invagination de la membrane plasmique, sont toutefois observables sur la micrographie 35i.

2- DISCUSSION

2-1 Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica*

Les plantes, appartenant aux genres *Inula* et *Santolina*, sont très répandues sur les pourtours du bassin méditerranéen.

Le genre *Inula* comprend plus de 90 espèces, dont les plus représentées sont *I. viscosa* L., *I. hélénium* L. et *I. graveolens* L., également dénommée *Dittrichia graveolens* (Desf.) Greuter. Les extraits, produits par les plantes du genre *Inula*, se caractérisent par la présence de flavonoïdes, de composés aromatiques et de lactones sesquiterpéniques (Grande *et al.*, 1992a et 1992b). Des sesquiterpènes, démontrant des activités anti-inflammatoire, anti-pyrétique, antifongique, antibactérienne et cytotoxique, ont d'ailleurs été identifiés dans des extraits d'*I. graveolens* (Topçu *et al.*, 1993, Abou-Douh, 2008). Si les propriétés antibactériennes des extraits d'*I. graveolens* ont déjà été signalées dans la littérature, celles des huiles essentielles, isolées des mêmes plantes, n'ont pas encore été rapportées. Seules quelques études, portant sur la caractérisation chimique de ces huiles, ont été publiées (Mirza et Ahmadi, 2000 ; Blanc *et al.*, 2004 ; Petropoulou *et al.*, 2004 ; Ghosn *et al.*, 2006). La composition des huiles essentielles d'*I. graveolens*, originaires de Corse, a été décrite par Blanc *et al.*, (2004). Celles-ci sont dominées par la présence de deux composés : l'acétate de bornyle et le bornéol. L'huile essentielle d'*I. graveolens*, utilisée dans mon travail, est également à chémotype acétate de bornyle (43,3%) et bornéol (26,2%). Avec un diamètre d'inhibition moyen de 25,2 mm, elle démontre la plus haute activité antibactérienne contre *S. aureus*.

Le genre *Santolina* est représenté par plus de 10 espèces, parmi lesquelles figurent *S. viridis* W., *S. pectinata* Lag. et *S. chamaecyparissus* L. *S. corsica* Jordan et Fourr. est une espèce endémique à la Corse et à la Sardaigne (Arrigoni, 1979). Très peu de travaux ont été effectués sur les extraits et huiles essentielles de cette plante. La caractérisation chimique d'un extrait éthanolique, isolé des racines de *S. corsica*, a conduit à l'identification de plusieurs composés, incluant des triterpènes et des dérivés acétyléniques (Ferrari *et al.*, 2005). Concernant les huiles essentielles de *S. corsica*, des différences de composition ont été établies entre les huiles extraites de plantes, originaires de Sardaigne, et celles provenant de Corse (Poli *et al.*, 1997). Les huiles essentielles sardes se caractérisent par la présence de camphre (18,5%), d'artémisia cétone (12,9%) et de bornéol (7,4%) alors que les huiles corses se composent d'artémisia cétone (20,0%), de β -phéllandrène (14,4%), de myrcène (11,7%) et

de santolina triène (8,2%). L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *S. corsica*, à chémotype myrcène (34,6%), santolina triène (13,5%) et β -phéllandène (11,7%) a déjà été mise en évidence, lors de précédents travaux, réalisés au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal et menés en collaboration avec l'équipe « Chimie-Biomasse » (Liu *et al.*, 2007). Cette huile essentielle inhibe la croissance de *C. jejuni* et de *S. aureus*. Dans le cadre de la nouvelle étude que j'ai entreprise, sur la caractérisation du mode d'action d'huiles essentielles à activité anti-staphylococcique, j'ai intégré cette huile essentielle dans mes essais de criblage. Avec un diamètre d'inhibition moyen de 24,9 mm, l'huile essentielle de *S. corsica* est active contre *S. aureus*.

2-2 Caractérisation du mode d'action des huiles essentielles d'*Inula graveolens* et de *Santolina corsica*

Avec des concentrations minimales bactéricides proches des concentrations minimales inhibitrices, les huiles essentielles de *S. corsica* et d'*I. graveolens* inhibent la croissance de *S. aureus* par une action de type bactéricide (Prescott *et al.*, 2002 ; Hammer *et al.*, 1996). L'effet bactéricide des deux huiles essentielles est dépendant du temps. A la CMI, l'huile d'*I. graveolens* réduit considérablement la viabilité cellulaire avec un effet létal obtenu au bout de deux heures d'action. L'huile de *S. corsica* semble agir plus lentement. Utilisée dans les mêmes conditions, elle induit une forte diminution de la croissance bactérienne et conduit à la mort cellulaire au bout de quatre heures de traitement. Cette différence suggère que les deux huiles essentielles agissent soit sur des cibles cellulaires distinctes, soit sur les mêmes cibles mais que les molécules actives n'ont pas la même efficacité.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (Dormans et Deans, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003). La composition chimique de l'huile essentielle d'*I. graveolens*, utilisée dans cette étude, est dominée par la présence de molécules oxygénées. Les deux principaux constituants, l'acétate de bornyle et le bornéol, représentent environ 70% de l'huile totale. Ils appartiennent à des classes chimiques différentes : l'acétate de bornyle est un composé carbonylé alors que le bornéol est un alcool. Leurs structures chimiques sont très proches. Ils possèdent le même squelette carboné et ne diffèrent que par la présence d'un groupement fonctionnel, qui est un acétate pour l'acétate de bornyle et un hydroxyle pour le bornéol. Dorman et Deans (2000) ont

démonstré que les groupements acétates contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes. L'acétate de géranyle est ainsi plus actif que le géraniol, qui exerce lui-même une haute activité contre un grand nombre de bactéries Gram positives et Gram négatives. Les huiles essentielles, riches en alcools, possèdent généralement un fort pouvoir antibactérien. Les alcools sont d'ailleurs reconnus pour exercer un effet plutôt bactéricide que bactériostatique (Dorman et Deans, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003). La forte teneur en bornéol de l'huile essentielle d'*I. graveolens* pourrait expliquer l'effet bactéricide généré sur *S. aureus*.

La composition chimique de l'huile essentielle de *S. corsica*, utilisée dans ce travail, est dominée par la présence de trois monoterpènes hydrocarbonés. Les relations, corrélant l'activité antibactérienne des huiles essentielles à leurs principaux constituants, ne sont pas applicables à l'huile de *S. corsica* car les composés hydrocarbonés sont généralement peu, voire pas, actifs (Kalemba et Kunicka, 2003). Ils peuvent toutefois interagir avec d'autres molécules actives comme cela a été décrit pour le *p*-cymène, qui, en facilitant la pénétration intracellulaire du carvacrol, potentialise les effets de ce composé sur *B. cereus* (Ultee *et al.*, 2002). Des synergies du même ordre pourraient être impliquées dans l'action de *S. corsica*. L'effet bactéricide observé serait alors attribuable à une ou plusieurs molécules actives, présentes en faible proportion dans l'huile. A côté des principaux constituants de l'huile essentielle de *S. corsica*, se distingue le lyratol, un monoterpène oxygéné, dont la teneur dans l'huile avoisine les 6%. Lors de nos précédents travaux, menés sur l'huile essentielle de *S. corsica* (Liu *et al.* 2007), ce composé a été désigné comme le principal responsable de l'activité anti-staphylococcique de l'huile.

Certains agents antimicrobiens détruisent la membrane plasmique de manière irréversible conduisant ainsi à la mort cellulaire par un processus lytique (Denyer et Hugo, 1991 ; Hamouda et Baker, 2000 ; Song et Kim, 2003 ; Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2006). Les huiles essentielles d'origan, de bois de rose et de thym génèrent des effets similaires sur *Streptococcus pneumoniae* (Horne *et al.*, 2001). Les huiles essentielles d'*I. graveolens* et de *S. corsica* agissent, quant à elles, différemment. En effet, le traitement des *S. aureus* avec des concentrations égales à la CMI et à huit fois la CMI n'entraîne pas de chute importante de l'absorbance à 620 nm, même après deux heures d'action. Les deux huiles essentielles n'exercent donc pas d'effet lytique sur *S. aureus*. Ceci est par ailleurs conforté par les micrographies, réalisées en MET, sur lesquelles aucune des cellules traitées n'est lysée. La structure de leur membrane plasmique, qui présente des invaginations, est toutefois altérée.

Les mêmes désorganisations cellulaires ont été décrites par Carson *et al.* (2002) pour des *S. aureus* exposés à l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* et/ou à ses principaux constituants. Ces agents ne lysent pas les cellules bactériennes mais compromettent l'intégrité structurale de la membrane plasmique et induisent une perte du matériel cytoplasmique (Carson *et al.*, 2002 ; Reichling *et al.*, 2002).

La distribution du contenu cytoplasmique de certaines cellules traitées avec l'huile d'*I. graveolens* semble également avoir été modifiée. Le cytoplasme paraît moins dense et hétérogène. Des agrégats de matériel intracellulaire ont d'ailleurs pu être observés à proximité de la paroi cellulaire, qui apparaît déstructurée. En effet, des épaisissements anormaux de la paroi cellulaire des *S. aureus* traités avec les deux huiles essentielles ont pu être mis en évidence par la MET. L'huile essentielle de thym, extraite de la plante *Thymus x-porlock*, génère des effets similaires sur la paroi cellulaire de *Listeria monocytogenes* (Rasooli *et al.*, 2006). Sous l'action de l'huile de thym, la surface des cellules s'épaissit, devient plus rugueuse et perd de son uniformité.

En général, le premier site d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique. Ceci est directement lié à l'hydrophobicité des molécules qui entrent dans la composition des huiles essentielles. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Il s'ensuit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires (Sikkema *et al.*, 1994; Cox *et al.*, 2000 ; Ultee *et al.*, 2002 ; Carson *et al.*, 2006). En plus des altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (Cristani *et al.*, 2007). Compte tenu de la diversité moléculaire des huiles essentielles, il semble plus probable que leur activité antibactérienne résulte de l'association de plusieurs mécanismes, qui s'exercent sur différentes cibles cellulaires (Burt, 2004). Les huiles essentielles d'*I. graveolens* et de *S. corsica* semblent agir simultanément sur la paroi cellulaire et la membrane plasmique.

CHAPITRE 2

**MOLECULES IMPLIQUEES DANS L'ACTIVITE
ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE
*CISTUS LADANIFERUS***

L'identification de nouveaux antibactériens se base sur la recherche de molécules capables d'induire la mort cellulaire, en agissant simultanément sur plusieurs cibles bactériennes ou en développant de nouveaux mécanismes d'action. La complexité et la diversité moléculaire des huiles essentielles font de ces dernières des candidates privilégiées pour entreprendre de telles recherches.

Les plantes du genre *Cistus* L. (*Cistaceae*) comptent de très nombreuses espèces, parmi lesquelles figurent *C. ladaniferus*. Ce sont de petits arbustes odorants, qui poussent à l'état sauvage en Méditerranée occidentale (Portugal, Espagne, France (sud), Italie, Algérie, Maroc). Ils secrètent une oléorésine, le labdanum, très utilisée en parfumerie pour ses notes ambrées. Les huiles essentielles, isolées des parties aériennes des plantes (huile essentielle de *C. ladaniferus*) ou de l'oléorésine (huile essentielle de labdanum), présentent une très grande variabilité chimique (Lawrence, 1999). Les extraits de *C. ladaniferus* sont reconnus pour leurs propriétés anti-tumorale (Andrade *et al.*, 2009), anti-oxydante (Amensour *et al.*, 2010 ; Guimaraes *et al.*, 2010) et antifongique (Mrabet *et al.*, 1999). En revanche, les propriétés biologiques des huiles essentielles de *C. ladaniferus* sont peu connues. Récemment, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, extraite des feuilles de *C. ladaniferus* var. *albiflorus*, a été signalée par Greche *et al.*, (2009). Lors de précédents travaux, réalisés au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal, Rossi *et al.*, (2007a) ont souligné l'activité anti-staphylococcique de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*, extraite de plantes cultivées en Corse. Cependant, sa composition chimique, dominée par la présence de monoterpènes hydrocarbonés, ne permet pas d'expliquer l'activité observée. L' α -pinène, alors identifié comme le composé majoritaire (47,1%) de l'huile, est, en effet, connu pour être peu, voire pas, actif (Dorman et Deans, 2000 ; Santoyo *et al.*, 2005). Il ne peut donc être responsable des effets générés par l'huile essentielle sur *S. aureus*.

Pour approfondir cette étude, j'ai entrepris de rechercher les molécules impliquées dans l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*. J'ai par ailleurs étendu cette analyse à plusieurs souches, parmi lesquelles figurent quatre bactéries Gram positives (*S. aureus* CIP 53.156, *Bacillus cereus* CIP 78.3, *Enterococcus faecalis* CIP 76.117 et *Listeria monocytogenes* CIP 55.143), deux bactéries Gram négatives (*Campylobacter jejuni* NCTC 11168 et *Enterobacter aerogenes* CIP 60.86) ainsi qu'une bactérie Gram négative multi-résistante aux antibiotiques (*Enterobacter aerogenes* EA289).

1- RESULTATS

1-1 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

La première phase de ce travail a consisté à réévaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* sur les souches testées. Cette étape préliminaire est indispensable, dans la mesure où l'activité d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique, qui peut varier d'un échantillon à l'autre et évoluer au cours du temps (Burt, 2004). Pour ces mêmes raisons, des analyses chimiques, réalisées par l'équipe « Chimie-Biomasse », ont été entreprises en vue d'établir la composition de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* utilisée dans cette étude.

1-1-1 Analyses microbiologiques de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* a été réévaluée par des essais basés sur la méthode de diffusion par disque et par des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice.

*1-1-1-1 Criblage de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* par la méthode de diffusion par disque*

Les diamètres d'inhibition moyens, générés par l'huile essentielle de *C. ladaniferus* sur les différentes souches bactériennes testées, sont présentés dans la figure 36. Les barres d'erreurs, figurées en rouge, représentent les écarts types à la moyenne pour chaque test.

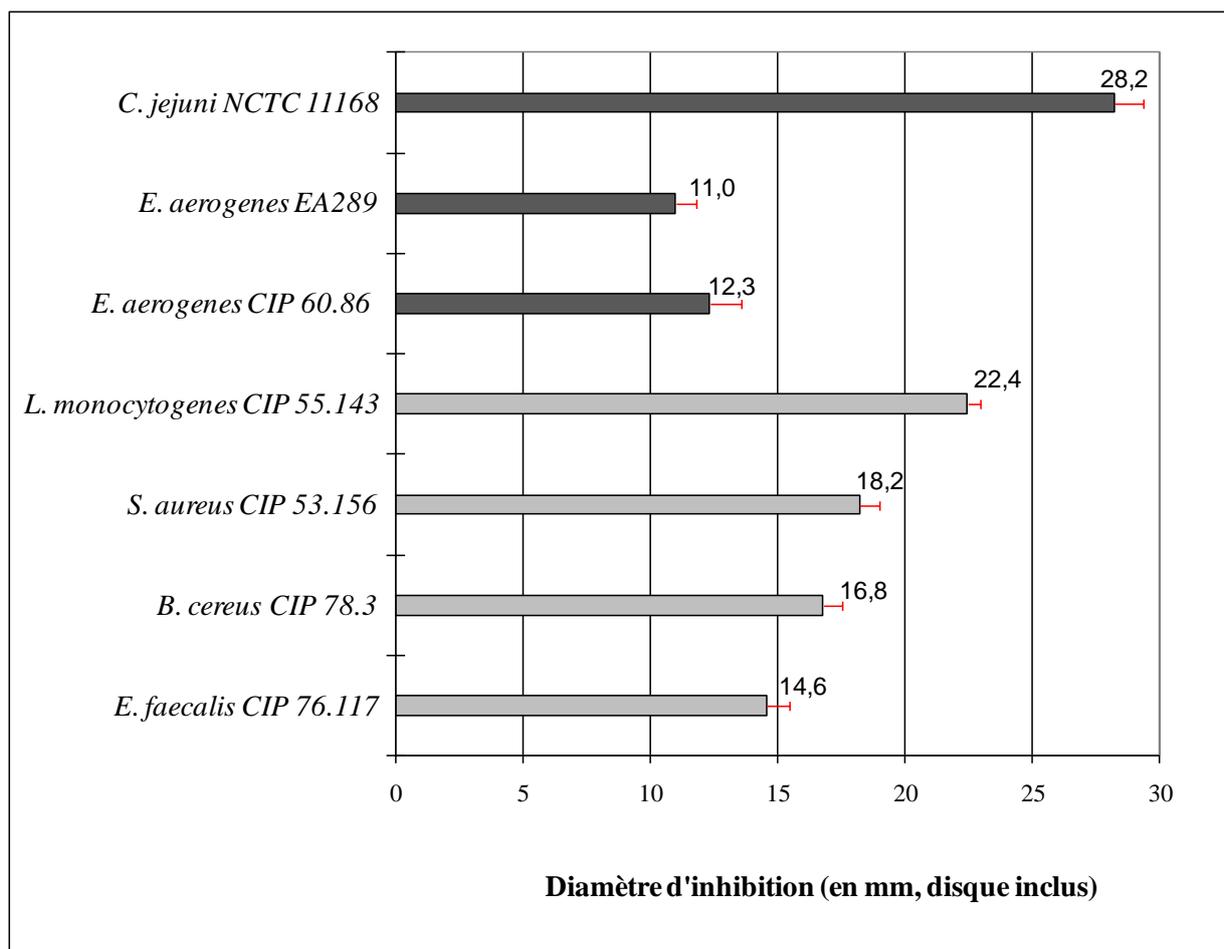


Figure 36 : Diamètres d'inhibition générés par l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* sur plusieurs bactéries Gram négatives (■) et Gram positives (▣)

Avec des diamètres d'inhibition compris entre 14,6 mm et 22,4 mm, les bactéries Gram positives sont plus sensibles à l'action de l'huile essentielle que les bactéries Gram négatives, à l'exception de *C. jejuni*. En générant un diamètre d'inhibition de 28,2 mm, l'huile de *C. ladaniferus* présente la plus forte activité contre cette bactérie. Sur les autres bactéries Gram négatives, *E. aerogenes* CIP 60.86 et EA289, ses effets sont plus modérés. Elle produit des diamètres d'inhibition respectivement égaux à 12,3 mm et 11,0 mm. L'inhibition de la croissance de la souche multi-résistante EA289 est toutefois du même ordre que celle générée sur la souche de référence CIP 60.86. Parmi les bactéries Gram positives, les plus fortes inhibitions sont observées sur *L. monocytogenes* (22,4 mm) et sur *S. aureus* (18,2 mm).

Des disques antibiotiques de contrôle ont été intégrés lors de chaque essai. Le chloramphénicol a été testé sur les entérobactéries du genre *Enterobacter* sp, la pénicilline G sur *S. aureus* et l'érythromycine sur *C. jejuni*, *B. cereus* et *E. faecalis*. Toutes les souches sont sensibles aux antibiotiques utilisés, à l'exception d'*E. aerogenes* EA289, qui est résistante au

chloramphénicol. Les valeurs de référence, fournies par le CA-SFM, indiquent que les souches d'*Enterobacter* sp sont résistantes au chloramphénicol si les zones d'inhibition produites par l'antibiotique ont un diamètre inférieur à 19 mm. Les diamètres d'inhibition (7 mm), obtenus lors des tests de contrôle, indiquent que la souche *E. aerogenes* EA289 est résistante à l'action de cet antibiotique. La résistance d'*E. aerogenes* EA289 au chloramphénicol est une des caractéristiques de cette souche (Mallea *et al.*, 1998 ; Lorenzi *et al.*, 2009).

1-1-1-2 Tests de détermination de la CMI de l'huile essentielle de Cistus ladaniferus

L'huile essentielle de *C. ladaniferus* inhibe la croissance de toutes les souches bactériennes utilisées dans cette étude. Afin de mesurer son potentiel d'inhibition, j'ai procédé à des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur chacune des souches bactériennes étudiées (tableau 4). Ces tests ont été réalisés par la technique de microdilution en milieu liquide, excepté sur *C. jejuni*, souche pour laquelle la technique de dilution en milieu solide a été privilégiée.

Tableau 4 : CMI (mg.mL⁻¹) de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* sur plusieurs bactéries

Gram positives et Gram négatives

	Souches bactériennes	Huile essentielle de <i>C. ladaniferus</i>
Bactéries Gram positives	<i>S. aureus</i> CIP 53.156	0,2
	<i>B. cereus</i> CIP 78.3	0,8
	<i>L. monocytogenes</i> CIP 55.143	1,5
	<i>E. faecalis</i> CIP 76.117	6,25
Bactéries Gram négatives	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	0,5
	<i>E. aerogenes</i> CIP 60.86	25
	<i>E. aerogenes</i> EA289	50

Sur les bactéries Gram positives, les valeurs de la CMI de l'huile sont comprises entre 0,2 mg.mL⁻¹ et 6,25 mg.mL⁻¹. La bactérie Gram positive la plus sensible à son action est *S. aureus*.

Sur les bactéries Gram négatives, la CMI de l'huile est très variable selon la souche testée. Avec une CMI égale à 0,5 mg.mL⁻¹, l'huile de *C. ladaniferus* inhibe fortement la croissance de *C. jejuni*. En revanche, sur les entérobactéries *E. aerogenes* CIP 60.86 et EA289, les CMIs générées par l'huile (respectivement 25 mg.mL⁻¹ et 50 mg.mL⁻¹) sont très élevées.

Les valeurs de la CMI, obtenues pour les antibiotiques de contrôle, sont de l'ordre du micromolaire. La CMI de l'érythromycine est de 0,5 µg.mL⁻¹ sur *C. jejuni* et de 1 µg.mL⁻¹ sur *B. cereus* et *E. faecalis*. Les valeurs de référence, fournies par le CA-SFM, indiquent qu'une souche bactérienne est résistante à l'érythromycine pour des CMIs supérieures ou égales à 4 µg.mL⁻¹. Les souches testées sont donc sensibles à cet antibiotique. La CMI du chloramphénicol est égale à 1 µg.mL⁻¹ sur *S. aureus* et à 16 µg.mL⁻¹ sur *E. aerogenes* CIP 60.86. Sur *E. aerogenes* EA289, cette CMI est plus élevée et égale à 512 µg.mL⁻¹. Selon le CA-SFM, une bactérie est considérée comme résistante au chloramphénicol si la CMI de cet antibiotique est strictement supérieure à 16 µg.mL⁻¹. La souche MDR *E. aerogenes* EA289 est résistante au chloramphénicol alors que la souche de référence *E. aerogenes* CIP 60.86 et *S. aureus* sont sensibles à cet antibiotique.

1-1-2 Analyses chimiques de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

La composition chimique de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, couplée aux indices de rétention [CPG-(IR)], et par résonance magnétique du carbone-13 (¹³C RMN). L'ordre d'élution des constituants et leur proportion (%) dans l'huile sont donnés sur colonne apolaire. Les composés signalés par un astérisque ont été co-élus sur colonne apolaire. L'ordre d'élution et la proportion de ces constituants (%) dans l'huile ont donc été donnés sur colonne polaire (tableau 5).

Les analyses chimiques de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* ont conduit à l'identification de 31 molécules. Sa composition chimique est dominée par la présence de monoterpènes et de sesquiterpènes hydrocarbonés. Le principal représentant des monoterpènes, l' α -pinène, est également le composé majoritaire (52,6%) de l'huile essentielle. Les autres monoterpènes, abondants dans l'huile, sont le camphène (4,9%) et le *p*-cymène (3,2%). La teneur en sesquiterpènes, parmi lesquels figurent l'allo-aromadendrène (1,8%) et le lédène (1,1%), est également appréciable.

Les molécules oxygénées sont présentes en plus faibles proportions. Elles sont majoritairement représentées par des sesquiterpénols, comme le viridiflorol (6,7%) et le lédol (2,2%), et par des monoterpènes oxygénés, tels que le *trans*-pinocarvéol (3,2%) et l'acétate de bornyle (2,2%).

Tableau 5 : Composition chimique de l'huile essentielle (HE) de *Cistus ladaniferus*

N°	Constituant	IRa	IRp	% HE
1	tricyclène	918	1026	0,8
2	α -thujène	920	1026	0,3
3	α -pinène	930	1026	52,6
4	camphène	941	1068	4,9
5	verbénène	944	1126	0,7
6	sabinène	962	1121	0,5
7	β -pinène	967	1111	0,7
8	<i>p</i> -cymène	1009	1271	3,2
9	2,2,6 triméthyle cyclohexanone	1011	1318	1,5
10	limonène*	1018	1200	1,8
11	cinéole*	1018	1209	0,3
12	acétophénone	1033	1671	0,1
13	γ -terpinène	1045	1244	0,5
14	α -campholénal	1101	1487	0,9
15	<i>trans</i> -pinocarvéol	1120	1650	3,2
16	pinocarvone	1135	1565	1,7
17	bornéol	1148	1695	0,6
18	<i>iso</i> -pinocamphone	1158	1542	1,0
19	terpinène-4-ol	1165	1596	0,8
20	myrténal	1168	1624	0,1
21	myrténol	1176	1785	0,1
22	α -campholénol	1202	1782	0,2
23	acétate de bornyle	1265	1576	2,2
24	acétate de myrtényle	1301	1683	0,2
25	allo-aromadendrène	1453	1641	1,8
26	lédène	1486	1691	1,1
27	δ -cadinène	1509	1752	0,5
28	spathulénol	1158	2112	0,2
29	viridiflorol	1577	2074	6,7
30	lédol*	1588	2018	2,2
31	copabornéol*	1588	2167	0,2

IRa et IRp: indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20) respectivement

1-2 Molécules impliquées dans l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

La première phase de tests, a permis, d'une part, de confirmer que l'huile essentielle de *C. ladaniferus* est active contre *S. aureus* et d'autre part, de montrer que cette activité s'exerce sur plusieurs bactéries Gram positives et Gram négatives. La composition chimique de l'huile utilisée dans cette étude est proche de celle précédemment testée par Rossi *et al.*, (2007a). Elle se caractérise par une forte teneur α -pinène, qui représente, à lui seul, plus de la moitié de l'huile totale. Les effets induits par l'huile essentielle de *C. ladaniferus*, sur les différentes souches bactériennes testées, semblent donc être attribuables à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans l'huile. La deuxième phase de mon travail a donc été consacrée à la recherche des molécules impliquées dans cette activité. Pour cela, l'huile essentielle de *C. ladaniferus* a été fractionnée par chromatographies successives. Les fractions récupérées ont été analysées chimiquement, en vue d'établir leurs compositions, avant d'être testées pour leur activité antibactérienne contre les souches étudiées.

1-2-1 Chromatographie sur colonne de silice de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

La composition chimique de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*, qui a été préalablement établie (tableau 3), a permis d'orienter et de mettre au point le protocole de fractionnement.

La première étape a consisté à séparer les deux grandes familles de molécules, qui composent l'huile, à savoir les molécules hydrocarbonées et les molécules oxygénées. Pour cela, nous avons réalisé une chromatographie sur colonne de silice de l'huile essentielle. Cette technique a pour but de séparer les constituants d'un mélange, par entraînement, au moyen d'une phase mobile, le long d'une phase stationnaire, représentée ici par la silice. La phase mobile est un mélange de solvants de polarité distincte. Les propriétés adsorbantes de la silice favorisent la rétention des composés polaires sur la colonne. Aussi, après avoir élué les composés apolaires, la polarité de l'éluant doit être augmentée afin de récupérer les composés polaires.

Nous avons utilisé deux types de solvants pour procéder aux différentes éluions : un solvant apolaire, le pentane, et un solvant polaire, l'éther diéthylique anhydre. Le fractionnement de 12,5 g d'huile essentielle de *C. ladaniferus* a permis de récupérer deux fractions : la fraction FH (m= 6,3 g), éluée avec le pentane (800 mL), et la fraction FO (m= 4,6 g), éluée avec l'éther diéthylique anhydre (900 mL). L'affinité des molécules hydrocarbonées pour les solvants apolaires devrait favoriser leur élution avec le pentane et

inversement pour les molécules oxygénées. Les molécules hydrocarbonées devraient donc se répartir dans la première fraction chromatographique (FH) et les molécules oxygénées dans la deuxième fraction (FO). Pour vérifier cela, les fractions récupérées ont été soumises à des analyses chimiques.

1-2-1-1 Analyses chimiques des fractions chromatographiques FH et FO de l'huile essentielle de Cistus ladaniferus

La composition chimique des fractions FH et FO a été déterminée par CPG-(IR) et par ^{13}C RMN. L'ordre d'élution des constituants et leur proportion (%) dans les fractions sont donnés sur colonne apolaire, à l'exception des composés signalés par un astérisque (tableau 6).

Tableau 6 : Compositions des fractions chromatographiques FH et FO de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

N°	Constituant	IRa	IRp	% FH	% FO
1	tricyclène	918	1026	0,8	
2	α -thujène	920	1026	0,3	
3	α -pinène	930	1026	56,7	
4	camphène	941	1068	6,3	
5	verbénène	944	1126	0,9	
6	sabinène	962	1121	0,6	
7	β -pinène	967	1111	1,1	
8	<i>p</i> -cymène	1009	1271	4,1	
9	2,2,6 triméthyle cyclohexanone	1011	1318		2,1
10	limonène	1018	1200	4,3	
11	cinéole	1018	1209		0,3
12	acétophénone	1033	1671		0,1
13	γ -terpinène	1045	1244	2,2	
14	α -campholénal	1101	1487		3,4
15	<i>trans</i> -pinocarvéol	1120	1650		11,4
16	pinocarvone	1135	1565		4,1
17	bornéol	1148	1695		3,3
18	<i>iso</i> -pinocamphone	1158	1542		2,1
19	terpinène-4-ol	1165	1596		3,6
20	myrténal	1168	1624		2,4
21	myrténol	1176	1785		0,5
22	α -campholénol	1202	1782		0,7
23	acétate de bornyle	1265	1576		8,0
24	acétate de myrtényle	1301	1683		0,8
25	allo-aromadendrène	1453	1641	5,6	
26	lédène	1486	1691	3,6	
27	δ -cadinène	1509	1752	1,5	
28	spathuléol	1158	2112		1,0
29	viridiflorol	1577	2074		30,3
30	lédol*	1588	2018		10,0
31	copabornéol*	1588	2167		1,1

IRa et IRp: indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20) respectivement

La séparation chromatographique de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* a permis de concentrer la totalité des 31 constituants, préalablement identifiés (tableau 5), dans leurs fractions respectives.

La fraction FH regroupe l'ensemble des molécules hydrocarbonées. Treize monoterpènes et sesquiterpènes, qui représentent 88% de la fraction, entrent dans sa composition. Le principal représentant des monoterpènes est l' α -pinène (56,7%), suivi par le camphène (4,9%). Le sesquiterpène majoritaire de la fraction est l'allo-aromadendrène (5,6%).

La fraction FO se compose de 18 molécules oxygénées, qui représentent 85,2% de la fraction. Elle est dominée par la présence du viridiflorol (30,3%), du *trans*-pinocarvéol (11,4%) et du lédol (10,0%). A côté de ces alcools terpéniques, l'acétate de bornyle (8%) occupe une part non négligeable dans la fraction.

1-2-1-2 Détermination de la CMI des fractions chromatographiques FH et FO de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

Les CMIs des fractions FH et FO ont été déterminées pour chacune des souches bactériennes étudiées. Elles sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : CMIs (mg.mL^{-1}) des fractions chromatographiques FH et FO, isolées de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

	Souches bactériennes	FH	FO
Bactéries Gram positives	<i>S. aureus</i> CIP 53.156	50	0,05
	<i>B. cereus</i> CIP 78.3	50	0,1
	<i>L. monocytogenes</i> CIP 55.143	>50	0,1
	<i>E. faecalis</i> CIP 76.117	50	0,8
Bactéries Gram	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	>1	0,06
	<i>E. aerogenes</i> CIP 60.86	>50	3
	<i>E. aerogenes</i> EA289	>50	6,25

Pour tester la capacité de ces fractions à inhiber la croissance bactérienne des souches étudiées, elles ont été incorporées dans des gammes de dilution comprises entre 50 mg.mL^{-1} et $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, excepté pour *C. jejuni* pour lesquelles elles sont comprises entre 1 mg.mL^{-1} et $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$.

La fraction hydrocarbonée FH semble être sans effet sur la croissance bactérienne car, pour toutes les souches testées, ses concentrations minimales inhibitrices sont situées en dehors des gammes de dilution. Les valeurs de la CMI de cette fraction sont, par ailleurs, très nettement supérieures à celles obtenues avec l'huile totale (tableau 4). La fraction hydrocarbonée FH ne peut donc être responsable de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*.

La fraction oxygénée FO exerce, quant à elle, une importante activité antibactérienne. Avec des CMIs respectives de 0,05 mg.mL⁻¹ et 0,06 mg.mL⁻¹, *S. aureus* et *C. jejuni* sont les plus sensibles à son action. La croissance d'*E. faecalis*, de *L. monocytogenes* et de *B. cereus* est également inhibée par la fraction FO. Sur ces bactéries, sa CMI est comprise entre 0,1 mg.mL⁻¹ et 0,8 mg.mL⁻¹. Sur *E. aerogenes* CIP 60.86 et EA289, les CMIs obtenues sont plus élevées et respectivement égales à 3 mg.mL⁻¹ et 6,25 mg.mL⁻¹.

1-2-2 Chromatographie sur colonne de silice de la fraction oxygénée de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

La fraction FO, isolée de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*, inhibe la croissance de toutes les souches bactériennes testées, y compris celle de la souche multi-résistante aux antibiotiques *E. aerogenes* EA289. Il semble donc que les molécules oxygénées, qui entrent dans sa composition, soient impliquées dans l'activité antibactérienne observée. Afin d'identifier la ou les classe(s) de molécule(s) oxygénée(s) active(s) de cette fraction, j'ai procédé à la séparation chromatographique de la fraction oxygénée FO. Cette chromatographie a été réalisée sur colonne de silice et constitue la deuxième étape du protocole de fractionnement réalisé dans cette étude.

D'après la composition chimique de la fraction FO (tableau 6), les molécules oxygénées qui la constituent, peuvent être subdivisées en deux grandes classes. La première regroupe des composés carbonylés, qui sont des molécules moyennement polaires. Ils sont représentés par les aldéhydes (α -campholénal, myrténal), les esters (acétates de bornyle et de myrtényle), les cétones (pinocarvone, 2,2,6 triméthyle cyclohexanone, *iso*-pinocamphone...) et les oxydes (cinéole). La deuxième classe se compose de molécules polaires, dont les principaux représentants sont des alcools mono- (*trans*-pinocarvéol) et sesqui-terpéniques (viridiflorol, ledol). Afin de séparer ces deux classes de molécules, aux polarités chimiques très proches, nous avons réalisé un gradient d'élution, en conservant le pentane et l'éther diéthylique anhydre comme solvants. Pour récupérer les molécules moyennement polaires, nous avons

utilisé le gradient de solvants dans les proportions 95 % de pentane et 5% d'éther diéthylique anhydre. Les molécules les plus polaires, ont été éluées avec 100 % d'éther diéthylique anhydre.

La séparation chromatographique de 4,6 g de fraction FO a permis de récupérer deux fractions oxygénées : la fraction FO_A (m = 0,8 g), éluée avec le gradient de solvants pentane/éther diéthylique anhydre (950 mL), et la fraction FO_B (m = 3,1 g), éluée avec l'éther diéthylique anhydre (550 mL). Ces fractions ont été à analysées chimiquement en vue de déterminer leurs compositions.

1-2-2-1 Analyses chimiques des fractions chromatographiques FO_A et FO_B, isolées de la fraction oxygénée FO

La composition chimique des fractions FO_A et FO_B a été déterminée par CPG-(IR) et par ¹³C RMN. L'ordre d'éluition des constituants et leur proportion (%) dans les fractions sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés signalés par un astérisque (tableau 8).

Tableau 8 : Compositions chimiques des fractions chromatographiques FO_A et FO_B isolées de la fraction oxygénée FO

Constituant	RI _a	RI _p	% FO _A	% FO _B
2,2,6 triméthyle cyclohexanone	1011	1318	9,0	
cinéole	1018	1209	1,5	
acétophénone	1033	1671	0,7	
α-campholénal	1101	1487	6,3	
<i>trans</i> -pinocarvéol	1120	1650		18,5
pinocarvone	1135	1565	8,9	
bornéol	1148	1695		5,4
<i>iso</i> -pinocamphone	1158	1542	2,7	
terpinène-4-ol	1165	1596		5,8
myrténal	1168	1624	3,9	
myrténol	1176	1785		1,6
α-campholénol	1202	1782		0,7
acétate de bornyle	1265	1576	30,4	
acétate de myrtényle	1301	1683	2,6	
spathuléol	1158	2112		1,1
viridiflorol	1577	2074		38,0
lédol*	1588	2018		12,0
copabornéol*	1588	2167		1,1

IR_a et IR_p: indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20) respectivement

Les 18 molécules constitutives de la fraction oxygénée FO (tableau 6) se répartissent entre les fractions FO_A et FO_B. La fraction FO_A concentre les composés carbonylés dont le principal représentant est l'acétate de bornyle (30,4%), suivi par la 2,2,6 triméthyle cyclohexanone (9,0%) et la pinocarvone (8,9%). Tous les alcools mono- et sesqui-terpéniques se retrouvent dans la fraction FO_B. Le viridiflorol (38,0%), le *trans*-pinocarvéol (18,5%) et le lédol (12,0%) sont les composés majoritaires de cette fraction.

Le protocole d'élution, appliqué à la fraction oxygénée FO, a donc permis de séparer les molécules moyennement polaires des molécules polaires, qui la constituent. La première classe de molécules, représentée par les composés carbonylés, se concentre dans la fraction FO_A alors que la deuxième classe de molécules, représentée par les alcools terpéniques, se retrouve dans la fraction FO_B. Dans le but d'identifier la classe de molécules actives de la

fraction oxygénée FO, les fractions FO_A et FO_B ont été testées pour leur activité antibactérienne.

1-2-2-2 Détermination de la CMI des fractions chromatographiques FO_A et FO_B de la fraction oxygénée FO

Les CMIs des fractions FO_A et FO_B ont été déterminées sur toutes les souches bactériennes étudiées. Elles sont présentées le tableau 9, dans lequel figurent également les CMIs de la fraction oxygénée FO.

Tableau 9 : CMIs (mg.mL⁻¹) des fractions chromatographiques FO_A et FO_B isolées de la fraction oxygénée FO

		Souches bactériennes	FO	FO _A	FO _B
Bactéries Gram positives		<i>S. aureus</i> CIP 53.156	0,05	0,2	0,05
		<i>B. cereus</i> CIP 78.3	0,1	0,8	0,1
		<i>L. monocytogenes</i> CIP 55.143	0,1	0,4	0,1
		<i>E. faecalis</i> CIP 76.117	0,8	6,25	0,4
Bactéries Gram négatives		<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	0,06	0,5	0,03
		<i>E. aerogenes</i> CIP 60.86	3	25	0,4
		<i>E. aerogenes</i> EA289	6,25	25	0,8

Sur toutes les souches testées, les CMIs de la fraction FO_A, sont quatre à huit fois plus élevées que celles obtenues avec la fraction FO. La fraction FO_A est donc moins active que la fraction FO, dont elle extraite.

Les CMIs, obtenues avec la fraction FO_B sont égales ou quasiment égales (à un facteur 2 près) à celles produites par la fraction FO. Les seules exceptions concernent les entérobactéries *E. aerogenes* CIP 60.86 et EA289, pour lesquelles les valeurs de la CMI de la fraction FO_B sont nettement plus basses (respectivement égales à 0,4 mg.mL⁻¹ et 0,8 mg.mL⁻¹) que celles obtenues avec la fraction FO. Sur ces bactéries, l'activité de la fraction FO_B permet d'abaisser la CMI d'un facteur 8 par rapport à la fraction FO.

1-2-3 Bilan

1-2-3-1 Protocole de fractionnement

L'huile essentielle de *C. ladaniferus*, utilisée dans cette étude, est à chémotype α -pinène (52,6%), viridiflorol (6,7%) et camphène (4,9%). Le fractionnement chromatographique de l'huile s'est déroulé en deux étapes (fig.37). Il a permis de récupérer quatre fractions : une fraction hydrocarbonée (FH) et trois fractions oxygénées (FO, FO_A et FO_B).

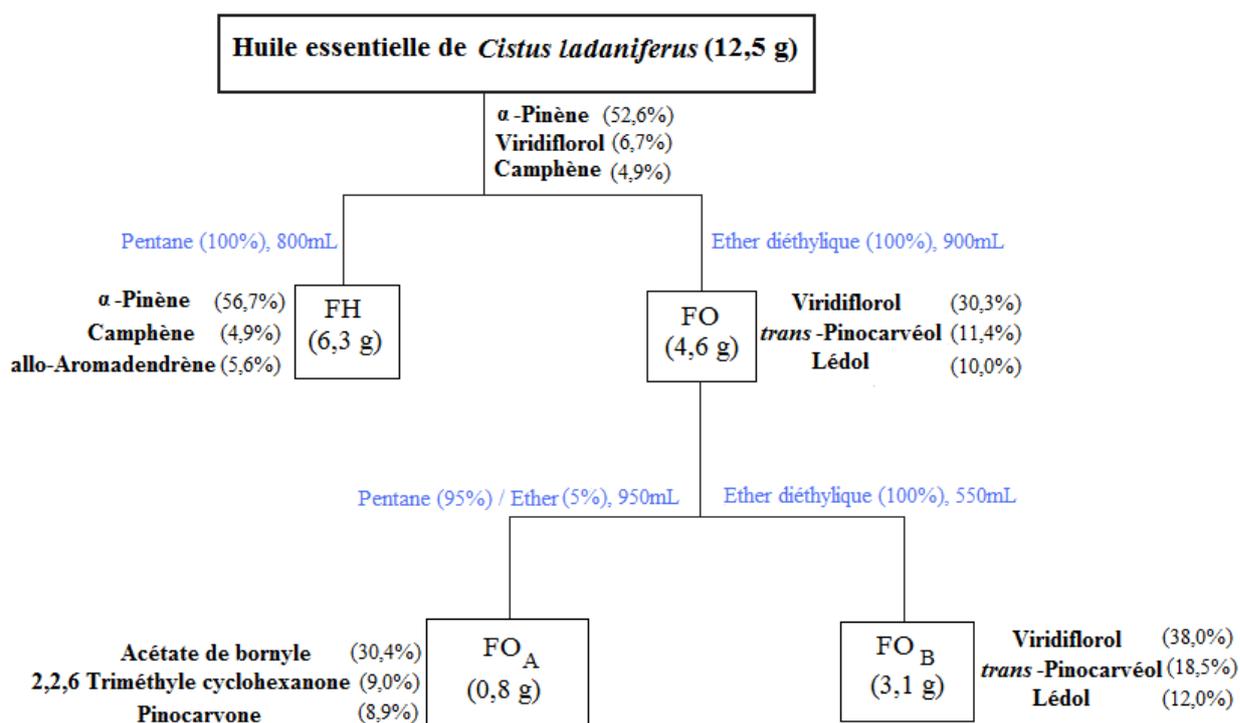


Figure 37 : Fractionnement chromatographique de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

Le protocole d'éluion, mis en œuvre dans cette étude, a permis de répartir les différentes familles et classes chimiques de *C. ladaniferus*, dans leurs fractions respectives. Les molécules hydrocarbonées de l'huile essentielle se concentrent dans la fraction FH alors que les molécules oxygénées s'accumulent dans la fraction FO. Le principal constituant de la fraction FH, l' α -pinène (56,7%), est aussi le composé majoritaire de l'huile. La fraction FO est dominée par la présence d'alcools terpéniques, dont les principaux représentants sont le viridiflorol (30,3%), le *trans*-pinocarvéol (11,4%) et le lédol (10,0%). Des composés carbonylés, comme l'acétate de bornyle, la 2,2,6 triméthyle cyclohexanone et la pinocarvone, entrent également dans sa composition. La séparation chromatographique de la fraction FO a

permis de répartir ces deux classes de molécules, dans deux fractions distinctes. La fraction FO_A regroupe les molécules moyennement polaires, que sont les composés carbonylés, alors que la fraction FO_B concentre les molécules les plus polaires, à savoir les alcools terpéniques. Les composés majoritaires de la fraction FO_A sont l'acétate de bornyle (30,4%), la 2,2,6 triméthyle cyclohexanone (9,0%) et la pinocarvone (8,9%). Le viridiflorol (38,0%), le *trans*-pinocarvéol (18,5%) et le lédol (12,0%) sont prédominants dans la fraction FO_B. La teneur en viridiflorol, *trans*-pinocarvéol et lédol, dans les fractions FO et FO_B, est d'ailleurs très proche.

1-2-3-2 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* et de ses fractions chromatographiques

Les CMI de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* et de ses différentes fractions, obtenues sur les bactéries Gram positives et Gram négatives de cette étude, sont indiquées dans le tableau 10.

Tableau 10 : CMI (mg.mL⁻¹) de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* et de ses fractions chromatographiques

Souches bactériennes	CMI (mg.mL ⁻¹)				
	HE	FH	FO	FO _A	FO _B
<i>S. aureus</i> CIP 53.156	0,2	50	0,05	0,2	0,05
<i>B. cereus</i> CIP 78.3	0,8	50	0,1	0,8	0,1
<i>L. monocytogenes</i> CIP 55.143	1,5	> 50	0,1	0,4	0,1
<i>E. faecalis</i> CIP 76.117	6,25	50	0,8	6,25	0,4
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	0,5	>1	0,06	0,5	0,03
<i>E. aerogenes</i> CIP 60.86	25	> 50	3	25	0,4
<i>E. aerogenes</i> EA289	50	> 50	6,25	25	0,8

L'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* exerce une activité antibactérienne contre toutes les souches testées. Les bactéries les plus sensibles à son action sont la bactérie Gram positive *S. aureus* et la bactérie Gram négative *C. jejuni*. Les entérobactéries du genre *Enterobacter* sp sont moins sensibles aux effets générés par l'huile.

Les CMI de la fraction hydrocarbonée FH sont très élevées et se situent, pour la plupart, en dehors des gammes des concentrations. La fraction FH est donc inactive. La fraction oxygénée FO est, quant à elle, quatre à huit fois plus active que l'huile totale, selon les souches testées. Sur *L. monocytogenes*, ce gain est encore plus important puisque il s'élève à un facteur 15. Les molécules oxygénées semblent donc être responsables de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*.

Les fractions FO_A et FO_B, isolées de la fraction oxygénée FO, ne possèdent pas les mêmes activités antibactériennes. L'enrichissement de la fraction FO_A en composés carbonylés a conduit à une baisse de l'activité de cette même fraction. En effet, sur toutes les souches testées, les CMI de la fraction FO_A sont supérieures à celles obtenues avec la fraction FO. Les composés carbonylés ne semblent donc pas être impliqués dans les activités antibactériennes observées.

Les valeurs de la CMI des fractions FO et FO_B sont très proches. Au regard de la composition chimique de ces deux fractions, peu de différence les séparent tant au niveau de la nature que de la proportion de leurs principaux constituants. Cette similarité chimique semble être une explication aux effets qu'elles génèrent et qui s'exercent avec la même intensité sur la quasi-totalité des souches étudiées. Sur *E. aerogenes* CIP 60.86 et EA289, la fraction FO_B est huit fois plus active que la fraction FO. Par rapport à l'huile totale, ce gain est beaucoup plus conséquent puisqu'il s'élève à un facteur 60. Les activités antibactériennes de la fraction FO et de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* semblent donc être attribuables à la fraction FO_B et aux alcools terpéniques qu'elle renferme.

1-2-4 Observation en MET des effets cellulaires induits par l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* et sa fraction oxygénée FO_B sur *E. aerogenes* EA 289

Le plus fort gain en activité, entre l'huile essentielle de *C. ladaniferus* et sa fraction oxygénée FO_B, a été obtenu sur la souche multi-résistante aux antibiotiques *E. aerogenes* EA289. Afin de visualiser les effets générés par ces deux traitements sur l'ultrastructure bactérienne d'*E. aerogenes* EA289, j'ai procédé à des observations en microscopie électronique à transmission. Les micrographies des cellules d'*E. aerogenes* EA289, non traitées (témoins) et traitées avec l'huile essentielle de *C. ladaniferus* et sa fractions oxygénée FO_B, sont présentées dans la figure 38.

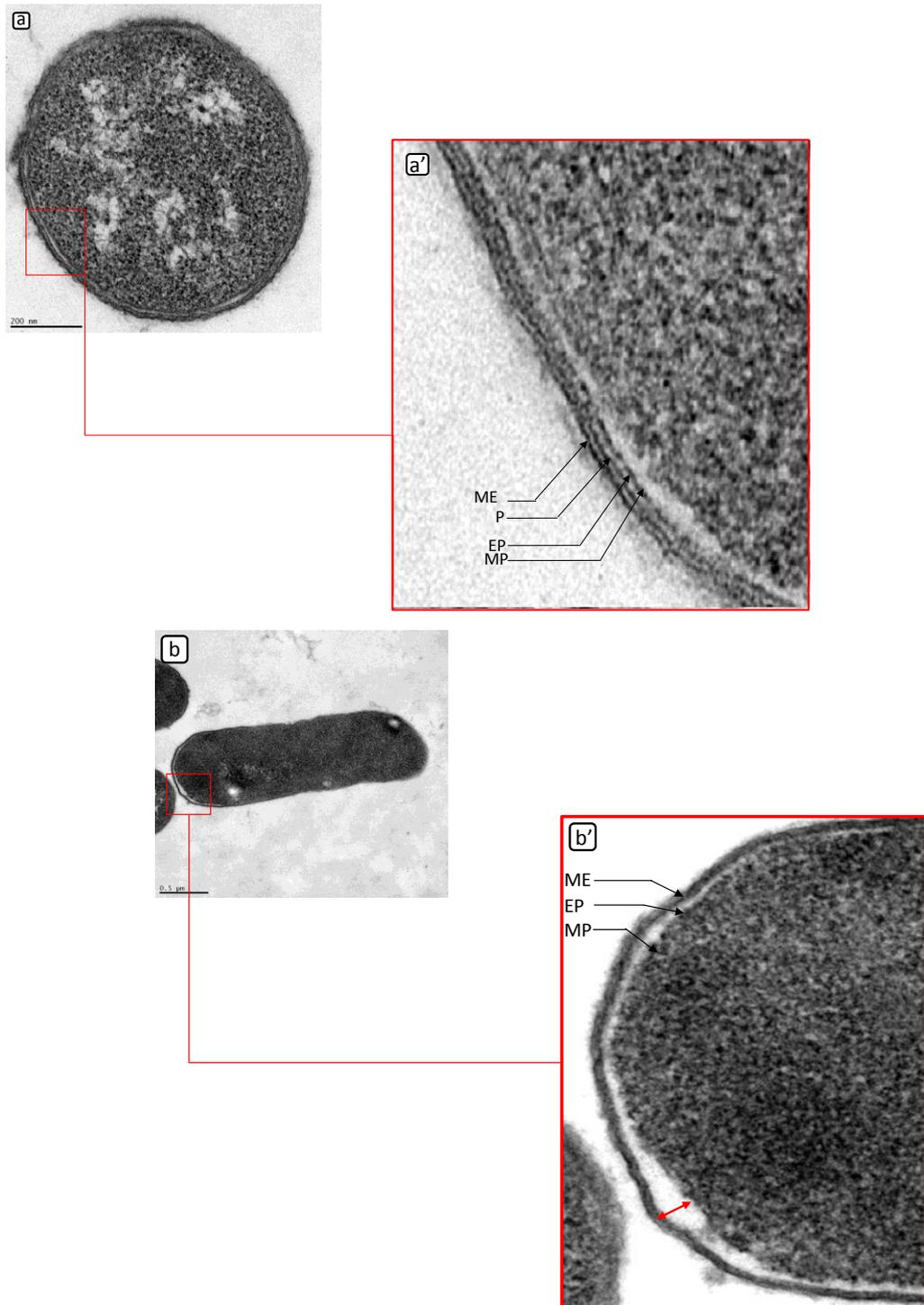
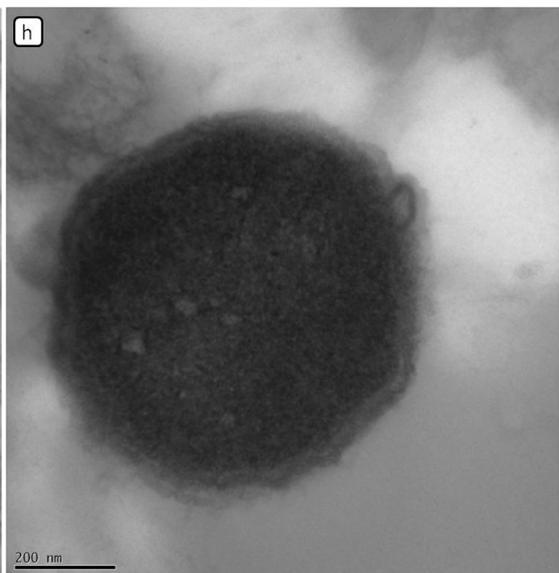
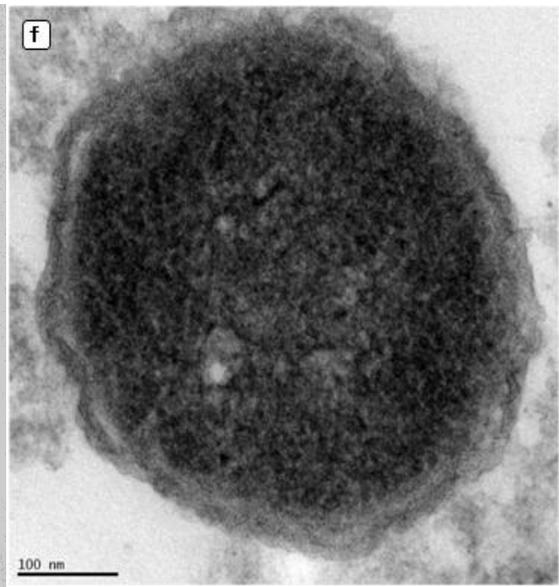
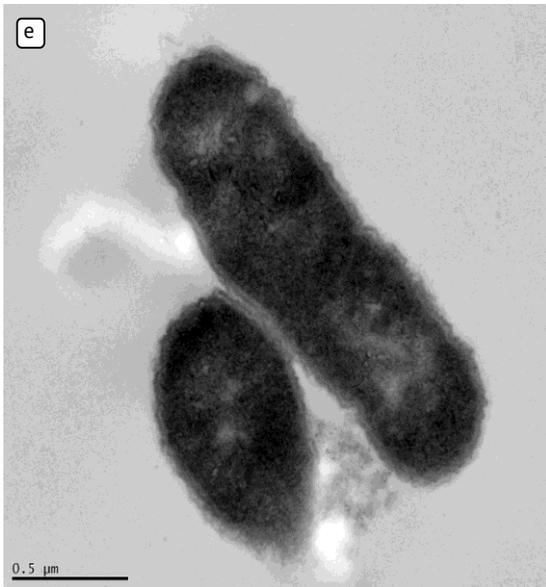
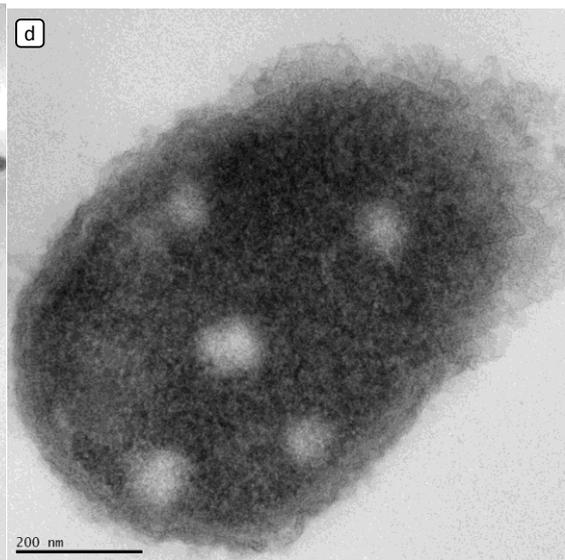
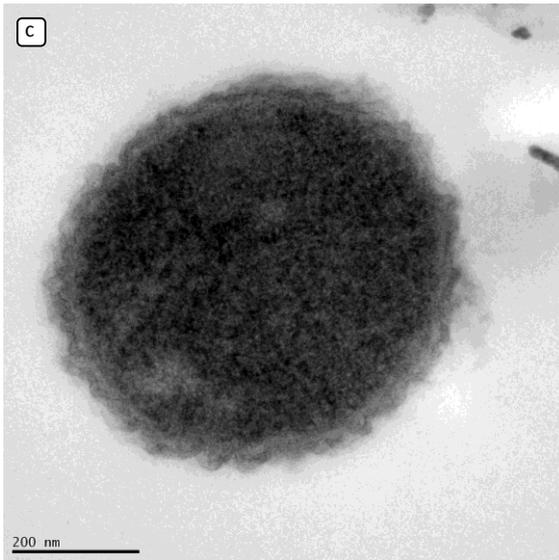


Figure 38 : Micrographies électroniques à transmission de cellules d'*E. aerogenes* EA289. (a) et (a') : témoins ; (b) et (b') cellules traitées avec l'huile de *C. ladaniferus* à la CMI ; (c) à (h) cellules traitées avec la fraction FO_B à la CMI. Avec ME : Membrane Externe, P : Peptidoglycane, EP : Espace Périplasmique, MP : Membrane Plasmique. Les décollements de la membrane externe sont signalés par des flèches rouges.



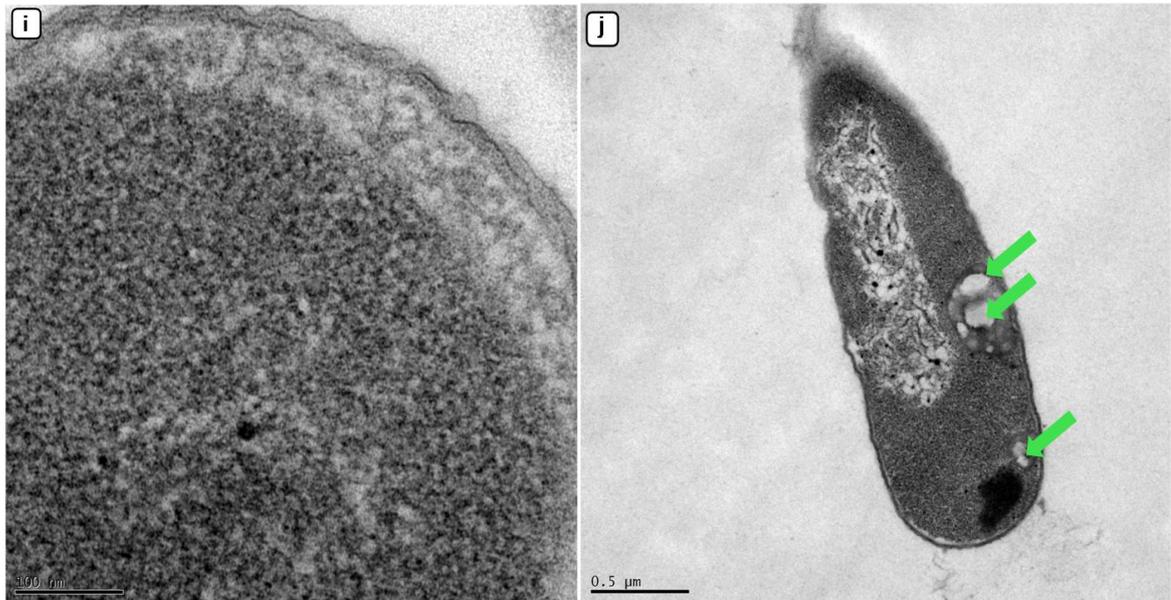


Figure 38 (suite) : Micrographies électroniques (MET) de cellules d'*E. aerogenes* EA289.

(i) à (j) cellules traitées avec la fraction FO_B à la CMI. Les agrégats vacuolaires cytoplasmiques par des flèches vertes.

La morphologie et le contenu cytoplasmique des cellules témoins sont homogènes. La membrane plasmique et la paroi cellulaire sont régulières (fig. 38a). La structure de la paroi est très nettement visible sur la micrographie 38a'. La membrane interne cytoplasmique est séparée de la membrane externe, par un espace périplasmique dans lequel se trouve une fine couche de peptidoglycane.

Les bactéries, traitées avec la CMI de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*, sont semblables aux bactéries témoins. Un décollement de la membrane externe, situé à l'une des deux extrémités de la cellule, est toutefois observable sur les micrographies 38b et 38b'.

Sous l'action de la fraction FO_B, utilisée à sa CMI, la paroi cellulaire apparaît fortement altérée (fig. 38c et 38d). La membrane externe, en se détachant de la membrane plasmique interne à laquelle elle était rattachée, forme des évaginations à la surface des cellules, qui présentent un aspect « gondolé » (fig. 38e et 38f). Ces désorganisations localisées (fig. 38g et 38h) semblent pouvoir s'étendre à une surface plus importante (fig. 38i). La répartition du matériel cytoplasmique, qui forme des agrégats vacuolaires, n'est plus homogène (fig. 38j).

2- DISCUSSION

2-1 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

D'après les zones d'inhibition, générées par l'huile essentielle de *C. ladaniferus*, les bactéries les plus sensibles à son action sont *C. jejuni*, *S. aureus* et *L. monocytogenes*. Cette activité est plus modérée sur les entérobactéries, appartenant aux genres *Enterococcus* sp et *Enterobacter* sp. Le potentiel inhibiteur de l'huile de *C. ladaniferus* est confirmé par les tests de détermination de la CMI. La plus faible CMI ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) est obtenue sur *S. aureus*. La sensibilité de cette bactérie à différents extraits de ciste, isolés des feuilles de *C. villosus* et *C. monspeliensis*, a déjà été mise en évidence par Bouamama *et al.* (2006). Avec des CMIs comprises entre $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ et $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$, ces extraits induisent une inhibition de la croissance de *S. aureus*. Leur activité anti-staphylococcique est toutefois moins importante que celle exercée par l'huile essentielle de *C. ladaniferus*. Les huiles essentielles, produites à partir des plantes du genre *Cistus* L., semblent d'ailleurs être plus actives que les extraits isolés des mêmes plantes. Des activités, similaires à celles exercées par l'huile de *C. ladaniferus*, ont en effet été décrites pour les huiles essentielles de *C. salvifolius*, dont les CMIs sur *S. aureus* varient de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ à plus de $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Demetzos *et al.*, 2002). La composition chimique des extraits de plantes peut être influencée par de multiples facteurs, incluant l'espèce à laquelle appartient la plante prélevée, le matériel végétal (feuilles, fleurs, rameaux, fruits...) utilisé pour produire les extraits, ainsi que le procédé employé pour réaliser l'extraction (Burt, 2004). La combinaison de ces divers paramètres semble être une explication aux différences d'activité anti-staphylococcique, observées entre les huiles essentielles et les extraits de *Cistus* sp.

A l'exception de *C. jejuni*, les bactéries les plus sensibles à l'action de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* sont des bactéries Gram positives. En effet, les CMIs obtenues sur *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* et *E. faecalis* ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ à $6,25 \text{ mg.mL}^{-1}$) sont nettement plus basses que celles produites sur les bactéries Gram négatives, *E. aerogenes* CIP 60.86 et EA289 (25 mg.mL^{-1} à 50 mg.mL^{-1}). L'organisation architecturale de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives est moins complexe que celle des bactéries Gram négatives. Cette différence structurale les rend plus sensibles à l'action des huiles essentielles et autres extraits de plantes (Kalemba et Kunicka, 2003). Toutefois, certaines bactéries Gram négatives, comme *C. jejuni*, sont reconnues pour être particulièrement sensibles à leur action (Wannissorn *et al.*, 2005, Rossi *et al.*, 2007b). L'activité, générée par l'huile de *C. ladaniferus* sur *C. jejuni* (CMI

égale à 0,5 mg.mL⁻¹), est d'ailleurs très proche de celle exercée contre *S. aureus* (CMI égale à 0,2 mg.mL⁻¹), la bactérie Gram positive la plus sensible à son action. Les bactéries Gram négatives *E. aerogenes* CIP 60.86 et *E. aerogenes* EA289 sont moins sensibles aux effets générés par l'huile essentielle de *C. ladaniferus*. Sur ces entérobactéries, les CMI de l'huile sont du même ordre que celle obtenue avec un extrait méthanolique de *C. monspeliensis* sur *P. aeruginosa* (Bouamama *et al.*, 2006). Les bactéries du genre *Enterobacter* sp font partie, avec *P. aeruginosa*, des germes les plus difficiles à traiter cliniquement. Leur résistance intrinsèque aux antibiotiques les rend peu vulnérables à l'action de la plupart des agents antibactériens, d'origine naturelle ou synthétique. Les extraits naturels de plantes sont d'ailleurs reconnus pour être 1000 fois moins efficaces sur les bactéries Gram négatives que sur les bactéries Gram positives (Lomovskaya *et al.*, 2007). Sur *E. aerogenes* CIP 60.86 et *E. aerogenes* EA289, l'huile essentielle de *C. ladaniferus* est 125 à 250 fois moins active que sur *S. aureus*.

2-2 Molécules impliquées dans l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus*

Les huiles essentielles, extraites des plantes du genre *Cistus* sp, sont reconnues pour la complexité de leur composition chimique et la diversité de leurs constituants. Elles renferment un très grand nombre de molécules, souvent présentes à l'état de trace et de polarité chimique très proche. Ces deux caractéristiques compliquent la séparation et l'identification de ces mêmes molécules (Weyersthal *et al.*, 1998). Aussi, la part de composés non identifiés dans les huiles essentielles de *Cistus* sp, est généralement non négligeable. Le recours à des méthodes analytiques, basées sur le couplage de techniques chromatographiques à des techniques spectroscopiques, facilitent l'identification des molécules, qui entrent dans la composition de ces huiles essentielles (Weyersthal *et al.*, 1998). Les analyses chimiques de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*, utilisée dans ce travail, ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse, combinée aux indices de rétention [CPG-(IR)] et par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (¹³C RMN). Elles ont conduit à l'identification de 31 molécules, qui représentent 91,6% de l'huile totale. Seuls 8,4% des constituants, dont la teneur n'excède pas 1% dans l'huile, demeurent non identifiés. La composition chimique de l'huile est à chémotype α -pinène (52,6%), viridiflorol (6,7%) et camphène (4,9%). Ces constituants sont communs à la plupart des huiles essentielles de *C. ladaniferus* (Mariotti *et al.*, 1997).

Les molécules oxygénées, qui entrent dans la composition des huiles essentielles, sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées, connues pour leurs faibles propriétés antibactériennes (Kalemba et Kunicka, 2003). Les terpènes hydrocarbonés de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* sont d'ailleurs inactifs. En revanche, les molécules oxygénées inhibent la croissance de toutes les souches bactériennes testées, y compris la souche multi-résistante aux antibiotiques *E. aerogenes* EA289. L'activité des molécules oxygénées des huiles essentielles dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels (Kalemba et Kunicka, 2003). Les molécules appartenant à des classes chimiques différentes ne produiront donc pas les mêmes effets selon les souches bactériennes testées. Les phénols, sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, décrits comme les composés les plus actifs. Les composés carbonylés, fonctionnalisés par des groupements aldéhydiques ou cétoniques, et les alcools sont également reconnus pour leurs propriétés antibactériennes (Kalemba et Kunicka, 2003). Ces deux classes de molécules entrent dans la composition chimique de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*. Toutefois, seule la classe des alcools terpéniques, concentrée dans la fraction FO_B, s'est révélée être active. Les bactéries Gram négatives du genre *Enterobacter* sp sont d'ailleurs très sensibles à l'action de cette classe de molécules. La proportion de viridiflorol (38,0%), de *trans*-pinocarvéol (18,5%) et de lédol (12,0%) dans la fraction FO_B suggère que ces composés sont en grande partie responsables de cette activité.

2-3 Effets cellulaires induits par les alcools terpéniques de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* sur la bactérie multi-résistante *Enterobacter aerogenes* EA289

Alors qu'elle paraît peu sensible à l'action de l'huile essentielle de *C. ladaniferus*, la souche MDR *E. aerogenes* EA289 démontre une sensibilité accrue à la fraction oxygénée FO_B. Les altérations, causées par ces deux traitements sur l'ultrastructure bactérienne, ont été observées en microscopie électronique à transmission. Si les effets induits par l'huile essentielle sont effectivement très modérés, ceux produits par la fraction oxygénée semblent irréversibles. Le traitement avec l'huile essentielle de *C. ladaniferus* n'entraîne pas de modification de la morphologie cellulaire. En revanche, les bactéries traitées avec la fraction FO_B présentent d'importantes altérations morphologiques et structurales. Les évaginations de la membrane externe conduisent à une déstructuration de la paroi cellulaire, qui semble s'effriter. Des désorganisations similaires ont été décrites par Hammer *et al.* (2010) pour des cellules d'*E. coli*, traitées avec le peptide cationique antimicrobien NK-2. La haute affinité du

peptide NK-2 pour le LPS, présent à la surface de la paroi des bactéries Gram négatives, permet sa solubilisation dans la membrane externe d'*E. coli*. Les lésions occasionnées se traduisent par des évaginations externes et internes des membranes constitutives de la paroi, qui se détachent progressivement l'une de l'autre. La modification de la perméabilité membranaire, qui en résulte, conduit à une perte des éléments cytoplasmiques. Le cytoplasme des cellules traitées avec la fraction oxygénée FO_B est également endommagé. Le matériel intracellulaire forme des agrégats, qui présentent un aspect vacuolaire. Des extraits éthanoliques de *Quercus infectoria* génèrent les mêmes effets sur des cellules d'*E. coli* O157 : H7, productrices de la Shiga toxine. La formation de vacuoles intracytoplasmiques survient à proximité des points de rupture, générés au niveau de la paroi (Suwalak *et al.*, 2009).

La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives les rend moins sensibles à l'action des huiles essentielles. La présence d'une membrane externe, hautement hydrophile, constitue une barrière aux macromolécules hydrophobes et amphiphiles, qui entrent dans la composition de ces huiles. Associée à la membrane plasmique, qui limite le passage des molécules hydrophiles, la pénétration intracellulaire de tous ces composés est considérablement restreinte chez ce type de bactéries (Lewis et Ausubel, 2006). Cette spécificité structurale confère aux bactéries Gram négatives une résistance intrinsèque à la plupart des molécules antibactériennes, incluant les antibiotiques. En altérant la paroi cellulaire de la bactérie MDR *E. aerogenes* EA289, les alcools terpéniques de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* semblent pouvoir contrecarrer cette résistance.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le but de cette étude a été de caractériser le mode d'action des huiles essentielles à activité antibactérienne et de rechercher les molécules impliquées dans cette activité.

Tout d'abord, dans la phase de caractérisation, j'ai ciblé mon étude sur une bactérie pathogène reconnue pour son impact clinique, sanitaire et économique : *S. aureus*. Le choix de ce staphylocoque à Gram positif, comme modèle, a également été guidé par le fait que les huiles essentielles sont, généralement, plus actives contre ce type de bactéries. Les activités antibactériennes de 11 huiles essentielles ont été évaluées contre *S. aureus*. Les huiles les plus actives ont été sélectionnées en vue de poursuivre cette étude. J'ai ainsi procédé à la caractérisation du mode d'action des huiles essentielles d'*I. graveolens* et de *S. corsica*. Ces deux huiles présentent une activité bactéricide contre *S. aureus*. La décroissance bactérienne, de populations traitées avec l'huile essentielle d'*I. graveolens*, est plus rapide que celle de populations traitées avec l'huile de *S. corsica*. Les activités anti-staphylococciques de ces deux huiles essentielles n'entraînent pas de lyse bactérienne. Cependant, l'observation en microscopie électronique à transmission, de cellules traitées par ces huiles, révèle des altérations au niveau de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire.

Dans la deuxième phase de ce travail, l'huile essentielle de *C. ladaniferus* a été sélectionnée en vue de rechercher les molécules impliquées dans son activité antibactérienne. Le choix de l'huile candidate à l'étude, a été orienté par le fait qu'elle inhibe la croissance de *S. aureus*, alors que ses principaux constituants sont connus pour être peu actifs. Le deuxième critère pris en compte et qui justifie cette sélection, est la complexité et la diversité des molécules qui entrent dans la composition chimique de cette huile. La recherche des molécules actives de l'huile essentielle de *C. ladaniferus* a été réalisée après avoir mis en évidence son activité antibactérienne contre plusieurs bactéries, Gram positives et Gram négatives. Les molécules responsables de cette activité appartiennent à la classe des alcools terpéniques. La souche multi-résistante aux antibiotiques *E. aerogenes* EA289 est particulièrement sensible (CMI égale à 0,8 mg.mL⁻¹) à leur action, qui semble être dirigée contre la paroi cellulaire.

Les différents travaux, réalisés au cours de cette thèse, ont permis de mettre en avant les propriétés antibactériennes des huiles essentielles et de leurs constituants à l'égard de plusieurs bactéries pathogènes. Leurs sites d'action préférentiels sont la paroi et la membrane plasmique. Les huiles essentielles d'*I. graveolens* et de *S. corsica* semblent d'ailleurs agir simultanément sur ces deux cibles cellulaires. L'huile de *C. ladaniferus* exerce, quant à elle, ses effets sur la paroi et présente des similarités d'action avec le peptide antimicrobien NK-2.

Toutes ces informations témoignent du potentiel que présentent les huiles essentielles pour la recherche de molécules antibactériennes innovantes dans leur mode d'action.

Afin de poursuivre cette étude, les molécules actives, qui entrent dans la composition de l'huile essentielle d'*I. graveolens* devront être identifiées. Des tests préliminaires ont permis de discriminer les effets du bornéol et de l'acétate bornyle sur la croissance de *S. aureus*. Seule une fraction oxygénée, contenant 75,4% de bornéol, s'est révélée active contre cette bactérie. Même si l'activité antibactérienne de ce composé a déjà été signalée (Cha *et al.*, 2007), aucune étude visant à caractériser son mode d'action n'a encore été entreprise. Le viridiflorol, le *trans*-pinocarvéol et le lédol n'ont, quant à eux, jamais été décrits comme antibactériens dans la littérature.

Pour améliorer la compréhension des altérations cellulaires observées, un travail plus approfondi, impliquant les molécules actives des huiles essentielles d'*I. graveolens*, de *S. corsica* et de *C. ladaniferus*, devra être entrepris. L'observation des effets produits sur l'ultrastructure bactérienne sera réalisée en microscopie électronique à transmission. Des tests, comme le suivi de la concentration en ATP intra- et extracellulaire, la mesure de la fuite des ions K⁺ et la perte du matériel absorbant à 620 nm, permettront de compléter l'analyse, en précisant les modifications engendrées au niveau de la perméabilité membranaire.

Les molécules actives pourront être testées contre d'autres souches multi-résistantes aux antibiotiques, incluant des bactéries Gram négatives, comme les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), et des bactéries Gram positives, comme les staphylocoques résistants à la méthicilline (SARM), à la vancomycine (SARV) ou de sensibilité réduite aux glycopeptides (GISA).

La cytotoxicité de ces molécules devra également être explorée sur cultures cellulaires, avant d'être évaluée *in vivo*.

Après ces nombreux tests, en particulier la mesure de la cytotoxicité, les molécules à activité antibactérienne des huiles essentielles pourront servir de base au développement de nouveaux antibiotiques.

Parallèlement aux travaux consacrés à la recherche de nouvelles molécules à activité antibactérienne, un deuxième axe d'étude s'est récemment développé au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal. Il se base sur la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'efflux bactérien (EPIs). Initié par une étude, ayant abouti à l'identification du géraniol, une molécule anti-efflux, isolée de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum*, ce projet a pour vocation de déterminer les motifs structuraux indispensables à l'activité de cet EPI, en vue d'améliorer sa solubilité et son efficacité. Dans ce but, des essais, réalisés avec

plusieurs molécules naturelles et synthétiques, dérivant du géraniol, ont été entrepris. Les premiers résultats ont conduit à l'identification d'une molécule de synthèse, capable de restaurer l'activité de plusieurs classes d'antibiotiques sur diverses souches Gram négatives multi-résistantes, dont *E. aerogenes* EA 289.

Ainsi, la combinaison de ces deux stratégies de recherche devrait contribuer à élargir l'arsenal thérapeutique dont nous disposons pour lutter contre le problème récurrent de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aberg V, Sellstedt M, Hedenstöm M, Pinkner JS, Hultgren SJ, Almqvist F (2006) Design, synthetics and evaluation of peptidomimetics based on substituted bicyclic 2-pyridiones targeting virulence of uropathogenic *E. coli*. *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 7563-7581
- Abou-Douh AM (2008) New eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from the epigeal parts of *Dittrichia graveolens*. *Chem. Pharm. Bull.* **56**: 1535-1545
- Abraham EP, Chain E (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* **146**: 837
- Afset JE, Maeland JA (2001) [Erythromycin and ciprofloxacin resistant *Campylobacter jejuni*]. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* **121**: 2152-2154
- Alekshun MN, Levy SB (2007) Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* **128**: 1037-1050
- Amensour M, Sendra E, Pérez-Alvarez JA, Skali-Senhaji N, Abrini J, Fernández-López J (2010) Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plants Foods Hum. Nutr.* **65**: 170-178
- Amin AH, Subbaiah TV, Abbasi KM (1969) Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can. J. Microbiol.* **15**: 1067-1076
- Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte AP (2009) Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind. Crops Prod.* **30**: 165-167
- Arrigoni PV (1979) Le genre *Santolina* L. en Italie. *Webbia.* **34**: 257-264
- Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Braunstein JB, Silvestri C, Mocchegiani F, Saba V, Scalise G (2007) Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum sensing inhibitor RIP. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 2226-2229
- Bals R (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Resp. Res.* **1**: 141-150
- Barel S, Segal R, Yashphe J (1991) The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *J. Ethnopharmacol.* **33**: 187-191
- Basir YJ, Knoop FC, Dulka J, Conlon JM (2000) Multiple antimicrobial peptides and peptides related to bradykini and neuromedin N isolated from skin secretions of the pickerel frog, *Rana palustris*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1543**: 95-105
- Bauer WD, Mathesius U (2004) Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 429-433

- Bebrone C, Lassaux P, Vercheval L, Sohier JS, Jehaes A, Sauvage E, Galleni M (2010) Current challenges in antimicrobial chemotherapy: focus on beta-lactamase inhibition. *Drugs*. **70**: 651-679
- Bierbaum G, Sahl HG (1987) Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J. Bacteriol.* **169**: 5452-5458
- Biskri L, Mazel D (2003) Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3326-3331
- Blanc MC, Muselli A, Bradesi P, Casanova J (2004) Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica. *Flavour Fragr. J.* **19**: 314-319
- Bohnert JA, Kern WV (2005) Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 849-852
- Bolhuis H, van Veen HW, Molenaar D, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN (1996) Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *Embo. J.* **15**: 4239-4245
- Boras A, Bozinovic D, Tenover FC, Popovic T (2001) First report of *Neisseria meningitidis* intermediately resistant to penicillin in Croatia. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 823
- Bouamama H, Noël T, Villard J, Benharref A, Jana M (2006) Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *J. Ethnopharmacol.* **104**: 104-107
- Boyle W (1955) Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfumer Essent. Oil Rev.* **66**: 25-28
- Bradley KA, Young JA (2003) Anthrax toxin receptor proteins. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 309-314
- Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J, Elliott S (1996) Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 412-416
- Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Tack BF (2003) Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**: 465-478
- Brogden K (2005) Antimicrobial peptides: pores formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature.* **3**: 238-250

- Brotz H, Bierbaum G, Leopold K, Reynolds PE, Sahl HG (1998) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 154-160
- Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA (1999) The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol. Microbiol.* **31**: 394-395
- Brussow H (2005) Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology.* **151**: 2133-2140
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists: Rockville, MA, p 1367
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223-253
- Butaye P, Cloeckert A, Schwarz S (2003) Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**: 205-210
- CA-SFM (2010). Comité de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. Edition de Janvier 2010, p1-49
- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA (2003) Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **87**: 215-220
- Carson CF, Mee BJ, Riley TV (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1914-1920
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006) *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 50-62
- Cha JD, Jung EK, Kil BS, Lee KY (2007) Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Artemisia feddei*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 2061-2065
- Chastre J, Fagon JY, Bornet-Lecso M, Calvat S, Dombret MC, al Khani R, Basset F, Gibert C (1995) Evaluation of bronchoscopic techniques for the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**: 231-240
- Chapon-Herve V, Akrim M, Latifi A, Williams P, Lazdunski A, Bally M (1997) Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **24**: 1169-1178

- Chen Z, Moayeri M, Zhou YH, Leppla S, Emerson S, Sebrell A, Yu F, Svitel J, Schuck P, St Claire M, Purcell R (2006) Efficient neutralization of anthrax toxin by chimpanzee monoclonal antibodies against protective antigen. *J. Infect. Dis.* **193**: 625-633
- Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A, Mallea M, Barbe J, Pagès JM (2004) Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1043-1046
- Chomnawang MT, Surassmo S, Wongsariya K, Bunyaphatsara N (2009) Antibacterial activity of Thai medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* **80**: 102-104
- Chow JW, Shlaes DM (1991) Imipenem resistance associated with the loss of a 40kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**: 499-504
- Christensen LD, Moser C, Jensen PO, Rasmussen TB, Christophersen L, Kjelleberg S, Kumar N, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2007) Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an *in vivo* intraperitoneal foreign-body infection model. *Microbiology.* **153**: 2 312-2 320
- CLSI (2007) *Clinical and Laboratory Standards Institute-Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests methods for antimicrobial susceptibility testing for bacteria isolated from animals-Approved standard- Third edition – CLSI document M11-A7-* Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA
- Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependant channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**: 19239-19245
- Cosgrove SE, Carmeli, Y (2003) The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin. Infect. Dis.* **36**: 1433-1437
- Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y (2005) The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **26**: 166-174
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**: 1318-1322
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 170-175

Cox SD, Mann CM, Markham JL (2001) Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 492-497

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

Cronan JE, Gennis RB, Maloy SM (1987) *Cytoplasmic membrane. In Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. American Society for Microbiology: Washington, DC, p 31-55

Crum NF (2005) The emergence of severe, community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Scand. J. Infect. Dis.* **37**: 651-656

Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, Kim MN, Ploy MC, El-Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K (2003) Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5-14

Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* **74**: 101-109

Demetzos C, Angelopoulou P, Perdetzoglou P (2002) A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* **30**: 651-665

Denyer SP, Hugo WB (1991) *Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, p 171-187

De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR (2004) *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**: 677-681

Dong YH, Zang LH (2005) Quorum-sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol.* **43**: 101-109

Dordevic S, Petrovic S, Dobric S, Milenkovic M, Vucicevic D, Zizic S, Kukic J (2007) Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* **109**: 458-463

Dorman HJ, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 308-316

- Dortu C, Thonart P (2009) Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**: 143-154
- Drawz SM, Bonomo RA (2010) Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Reviews.* **23**: 160-201
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 7687-7692
- Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Gibert C (1996) Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 538-542
- Falconer SB, Brown ED (2009) New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 497-504
- Ferrari B, Tomi F, Richomme P, Casanova J (2005) Two new irregular acyclic sesquiterpene aldehydes from *Santolina corsica* essential oil. *Magn. Reson. Chem.* **43**: 73-74
- Fischetti VA (2005) Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* **13**: 491-496
- Fischetti VA (2008) Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 393-400
- Fisher K, Phillips C (2009) In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J. Biomed. Sci.* **66**: 180-185
- Flynn ER, Bradley KN, Muir TC, McCarron JG (2001) Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **276**: 36411-36418
- Frias MJ, Melo-Cristino J, Ramirez M (2009) The autolysin LytA contributes to efficient bacteriophage progeny release in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **191**: 5428-5440
- Fritsche TR, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN (2008) Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride tested against contemporary bacterial pathogens commonly responsible for catheter-associated infections. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* **61**: 1092-1098
- Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T, Tsuchiya T (2005) Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **49**: 391-396

- Gambello MJ, Iglewski BH (1991) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* **173**: 3000-3009
- Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH (1993) LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of *exotoxin A* expression. *Infect. Immun.* **61**: 1180-1184
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* **3**: 710-720
- Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD (2003) Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant Microbe Inter.* **16**: 827-834
- Gennaro R, Zanetti M (2000) Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers.* **55**: 31-49
- George EA, Novick PR, Muir WT (2008) Cyclic peptide inhibitors of staphylococcal virulence prepared by Fmoc-based thiolactone peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **130**: 4914-4924
- George EA, Muir TW (2007) Molecular mechanisms of *agr* quorum sensing in virulent staphylococci. *ChemBiochem.* **8**: 847-855
- German N, Wei P, Kaatz GW, Kerns RJ (2008) Synthesis and evaluation of fluoroquinolone derivatives as substrate-based inhibitors of bacterial efflux pumps. *Eur. J. Med. Chem.* **43**: 2453-2463
- Ghosn MW, Chemali CB, Zaknoun FI, Saliba NA (2006) Chemical profile of the *Dittrichia graveolens* (Desf.) Greuter essential oil of Lebanese origin. *J. Essent. Oil Res.* **18**: 443-444
- Gibbons S, Udo EE (2000) The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the Tet(K) determinant. *Phytoter. Res.* **14**: 139-140
- Gibbons S, Oluwatuyi M, Veitch NC, Gray AI (2003) Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Phytochemistry.* **62**: 83-87
- Gibbons S (2008) Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* **74**: 594-602

Gill AO, Holley RA (2004) Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5750-5755

Gill AO, Holley RA (2006) Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* **111**: 170-174

Gonny M, Bradesi P, Casanova J (2004) Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragr. J.* **19**: 424-433

Goossens H, Guillemot D, Ferech M, Schlemmer B, Costers M, van Breda M, Baker LJ, Cars O, Davey PG (2006) National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **62**: 373-379

Grande M, Bellido IS, Torres P, Piera F (1992a) 9-hydroxynerolidol esters and bicyclic sesquiterpenoids from *Dittrichia-viscosa* J. *Nat. Prod.* **55**: 1074-1083

Grande M, Torres P, Piera F, Bellido IS (1992b) Triterpenes from *Dittrichia-vicosa* *Phytochemistry.* **31**: 1826-1828

Greche H, Mrabet N, Zrira S, Ismaili-Alaoui M, Benjilali B, Boukir A (2009) The volatiles of the leaf oil of *Cistus ladanifer* L. var. *albiflorus* and Labdanum extracts of Moroccan origin and their antimicrobial activities. *J Essent. Oil Res.* **21**: 166-173

Grinius L, Dreguniene G, Goldberg EB, Liao CH, Projan SJ (1992) A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. *Plasmid.* **27**: 119-129

Guengerich FP (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 611-650

Guerrier-Takada C, Salvati R, Altman S (1997) Phenotypic conversion of drug-resistant bacteria to drug sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 8468-8472

Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham J, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR (1998) Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 194-198

Guimaraes R, Sousa MJ, Ferreira ICFR (2010) Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Ind. Crops Prod.* **32**: 152-156

Hagens S, Blasi U (2003) Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 318-323

- Hagens S, Habel A, von Ashen U, von Gabain A, Blasi U (2004) Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3817-3822
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1996) Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Am. J. Infect. Control.* **24**: 186-189
- Hammer MU, Brauser AM, Olak C, Brezesinski G, Goldmann T, Gutschmann T, Andrä J (2010) Lipopolysaccharide interaction is decisive for the activity of the antimicrobial peptide NK-2 against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.* **427**: 477-488
- Hamouda T, Baker JR (2000) Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *J. Applied Microbiol.* **89**: 397-403
- Hancock REW (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* **1**: 156-164
- Hancock REW, Sahl HG (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotech.* **24**: 1551-1557
- Harraghy N, Kerdudou S, Herrmann M (2007) Quorum-sensing systems in staphylococci as therapeutic targets. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**: 437-444
- Harris F, Dennison SR, Phoenix, RA (2009) Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* **10**: 585-606
- Hayes AJ, Markovic B (2002) Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem Toxicol.* **40**: 535-543
- Hedge DD, Strain JD, Heins, JR, Farver DK (2008) New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI). *Ther. Clin. Risk Manag.* **4**: 949-964
- Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N (2000) Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44** : 1075-1077
- Helander IM, Kilpelainen I, Vaara M (1994) Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a ³¹P-NMR study. *Mol. Microbiol.* **11**: 481-487

- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, von Wright A (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 3590-3595
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine.* **15**: 639-652
- Hermoso JA, García JL, García P (2007) Taking aim on bacterial pathogens: from phages therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 461-472
- Horne DS, Holm M, Oberg C, Chao S, Young DG (2001) Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. *J. Essent. Oil Res.* **13**: 387-392
- Inuma M, Ito T, Miyake R, Tosa H, Tanaka T, Chelladurai V (1998) A xanthone from *Garcinia cambodgiae*. *Phytochemistry.* **47**: 1169-1170
- Jafri MA, Farah, Javed K, Singh S (2001) Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb). *J. Ethnopharmacol.* **75**: 89-94
- Juliano RL, Ling VA (1976) Surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **455**: 152-162
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature.* **444**: 323-329
- Kalemba D, Kunicka A (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev. Microbiol.* **2**: 123-140
- Karginov VA, Nestorovich EM, Moayeri M, Leppla SH, Bezrukov SM (2005) Blocking anthrax lethal toxin at the protective antigen channel by using structure-inspired drug design. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **102**: 15075-15080
- Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou-Litina D, Skaltsa H (2006) Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* **72**: 1330-1334
- Kimbaris AC, Siatis NG, Daferera DJ, Tarantilis PA, Pappas CS, Polissiou MG (2006) Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem.* **13**: 54-60

Kokryakov VN, Harwig SS, Panyutich EA, Shevchenko AA, Aleshina GM, Shamova OV, Korneva HA, Lehrer RI (1993) Protegrins: leucocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* **327**: 231-236

Kumar A, Schweizer HP (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 1486-1513

Kursepa A, Dąbrowska K, Skaradziński G, Górski A (2009) Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy. *Clin. Exp. Med.* **9**: 93-100

Kwon JA, Yu CB, Park HD (2003) Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 61-65

Lambert PA (2005) Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 1471-1485

Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 453-462

Lane MC, Mobley HL (2007) Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* **72**: 19-25

Laub GR (1986) Discovery of the sulfa drugs. *South Med. J.* **79**: 782

Lawrence BM (1999) Progress in Essentials Oils. *Perfumer & Flavorist.* **24**: 41-50

Lehrer RI, Ganz T (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 23-27

Levy SB, McMurry L (1978) Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature.* **276**: 90-92

Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**: 122-129

Lewis K (2001) In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 247-254

Lewis K, Ausubel FM (2006) Prospects for plant derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* **24**: 1504-1507

- Liu K, Rossi PG, Ferrari B, Berti L, Casanova J, Tomi F (2007) Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica* Jordan et Fourr. *Phytochemistry*. **68**: 1698-1705
- Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA (2001) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*. **294**: 2170-2172
- Loessner MJ (2005) Bacteriophage endolysins-current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 480-487
- Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau TE, Léger R, Hecker SJ, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ (2001) Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 105-116
- Lomovskaya O, Bostian KA (2006) Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. *Biochem. Pharmacol.* **71**: 910-918
- Lomovskaya O, Zgurskaya HI, Totrov M, Watkins WJ (2007) Waltzing transporters and ‘the dance macabre’ between humans and bacteria. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**: 56-65
- Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pagès JM, Amaral L, Bolla JM (2009) Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-Negative species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 2209-2211
- Lynch AS (2006) Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochem. Pharmacol.* **71**: 949-956
- Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**: 45-55
- Mallea M, Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Brouant P, Barbe J, Pagès JM (2003) Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. *Biochem. J.* **376**: 801-805
- Mallea M, Chevalier J, Bornet C, Eyraud A, Davin-Regli A, Bollet C, Pagès JM (1998) Porin alteration and active efflux : two *in vivo* drugs strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2640-2643
- Maltezou HC, Giamarellou H (2006) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **27**: 87-96

- Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH (2005) Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **40**: 1058-1060
- Mantle D, Anderton JG, Falkous G, Barnes M, Jones P, Perry EK (1998) Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **121**: 385-391
- Maragakis LL, Perencevich EN, Cosgrove SE (2008) Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **6**: 751-763
- Markham PN, Neyfakh AA (2001) Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 509-514
- Mariotti JP, Tomi F, Casanova J, Costa J, Bernardini AF (1997) Composition of the essential oil of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France). *Flavour Fragr. J.* **12**: 147-151
- Marty FM, Yeh WW, Wennersten CB, Venkataraman L, Albano E, Alyea EP, Gold HS, Baden LR, Pillai SK (2006) Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 595-597
- Masterton R, Drusano G, Paterson DL, Park G (2003) Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections-the clinical challenges. *J. Hosp. Infect.* **11**: 1-12
- Matsuda T, Freeman TA, Hilbert DW, Duff M, Fuortes M, Stapleton PP, Daly JM (2005) Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model. *Surgery.* **137**: 639-646
- Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, Fuji N, Miyajima K (1997) Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1327**: 119-130
- Matzusaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S (2005) Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* **11**: 211-219
- May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL (2000) Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 639-643
- Mbarek LA, Mouse HA, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Zyad A (2007) Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Anti-tumor effect of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**: 839-847

- Mirza M, Ahmadi L (2000) Composition of the essential oil of *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter. *J. Essent. Oil Res.* **12**: 507-508
- Moayeri M, Wiggins JF, Lindeman RE, Leppla SH (2006) Cisplatin inhibition of anthrax lethal toxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 2658-2665
- Monti D, Chetoni P, Buralassi S, Najarro M, Saetton MF, Boldrini E (2002) Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* **237**: 209-214
- Morita Y, Kodama K, Shiota S, Mine T, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T (1998) NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1778-1782
- Mrabet N, Lahlou H, Benjilali B (1999) Effect of Moroccan *Cistus ladaniferus* L. (rockrose) extracts on the growth of four fungi. *Cryptogamie Mycol.* **20**: 23-33
- Müh U, Schuster M, Heim R, Singh A, Olson ER, Greenberg EP (2006) Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3674-3679
- Murphy Cowan M (1999) Plants as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 564-582
- Nakayama K, Ishida Y, Ohtsuka M, Kawato H, Yoshida K, Yokomizo Y, Hosono S, Ohta T, Hoshino K, Ishida H, Yoshida K, Renau TE, Léger R, Zhang JZ, Lee VJ, Watkins WJ (2003a) MexAB–OprM-specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 1: discovery and early strategies for lead optimisation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 4201-4204
- Nakayama K, Ishida Y, Ohtsuka M, Kawato H, Yoshida K, Yokomizo Y, Ohta T, Hoshino K, Otani T, Kurosaka Y, Yoshida K, Ishida H, Lee VJ, Renau TE, Watkins WJ (2003b) MexAB–OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 2: achieving activity in vivo through the use of alternative scaffolds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 4205-4208
- Nelson D, Loomis L, Fischetti VA (2001) Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 4107-4112
- Nelson ML, Park BH, Andrews JS, Georgian VA, Thomas RC, Levy SB (1993) Inhibition of the tetracycline efflux antiport protein by 13-thio-substituted 5-hydroxy-6-deoxytetracyclines. *J. Med. Chem.* **36**: 370-377
- Nelson ML, Park BH, Levy SB (1994) Molecular requirements for the inhibition of the tetracycline antiport protein and the effect of potent inhibitors on the growth of tetracycline resistant bacteria. *J. Med. Chem.* **37**: 1355-1361

- Nelson ML, Levy SB (1999) Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1719-1724
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **66**: 1022-1037
- Neyfakh AA, Bidnenko VE, Cen LB (1991) Efflux mediated multi-drug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **88**: 4781-4785
- Nikaido H (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 593-656
- Nikaido H, Rosenberg EY (1981) Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Physiol.* **77**: 121-135
- Niu C, Afre S, Gilbert ES (2006) Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Let. Appl. Microbiol.* **43**: 489-494
- Njoroge J, Sperandio V (2009) Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases *EMBO Mol. Med.* **1**: 201-210
- Noble WC, Virani Z, Cree RG (1992) Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**: 195-198
- Normak HB, Normak S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* **252**: 91-106
- Novick RP, Geisinger E (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 541-564
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* **66**: 86-92
- Oren Z, Shai Y (1998) Mode of action of linear amphiphatic α helical antimicrobial peptides. *Biopolymers.* **47**: 451-463
- Otvos LJr (2002) The short proline-rich antibacterial family. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1138-1150
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH (1998) Major facilitator. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1-34

- Pagès JM, Amaral L (2009) Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**: 826-833
- Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC (2000) Structure-activity analysis of buforinII, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 8245-8250
- Park J, Jagasia R, Kaufmann FG, Mathison CJ, Ruiz ID, Moss AJ, Meijler MM, Ulevitch JR, Janda DK (2007) Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem. Biol.* **14**: 1119-1127
- Paulsen IT, Skurray RA, Tam R, Saier MH, Turner RJ, Weiner JH, Goldberg EB, Grinius LL (1996) The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* **19**: 1167-1175
- Peterson MM, Mack JL, Hall PR, Alsup AA, Alexander SM, Sully EK, Sawires YS, Cheung AL, Otto M, Gresham HD (2008) Apolipoprotein B is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe.* **4**: 555-566
- Petropoulou A, Tzakou O, Verykokidou E (2004) Volatile constituents of *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter from Greece. *J. Essent. Oil Res.* **16**: 400-401
- Pinkner SJ, Remaut H, Buelens F, Miller E, Aberg V, Pemberton N, Hedenström M, Larsson A, Seed P, Waksman G, Hultgren SJ, Almquist F (2006) Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 17897-17902
- Poli F, Bonsignore L, Loy G, Sacchetti G, Ballero M (1997) Comparison between the essential oils of *Santolina insularis* (Genn. ex Fiori) Arrigoni and *Santolina corsica* Jord. et Fourr. from the island of Sardinia (Italy). *J. Ethnopharmacol.* **56**: 201-208
- Poole K (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**: 12-26
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA (1995) *Microbiologie*. De Boeck ed. p 1014
- Proft T, Baker EN (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 613-635
- Rasko DA, Sperandio V (2010) Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**: 117-128

Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, Christophersen C, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M (2000) How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*. **146**: 3237-3244

Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps RK, Christensen KB, Jensen PO, Andersen JB, Koch B, Larsen TO, Hentzer M, Eberl L, Hoiby N, Givskov M (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*. **151**: 1321-1325

Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A (2006) Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.* **10**: 236-241

Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi MK, Kawachi M, Eslamifar A, Schmidt OJ, Schmidt A, Allameh A, Yoshinari T (2006) Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacids^{®plus}, on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon*. **48**: 1075-1082

Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **24**: 536-547

Reichling J, Weseler A, Landvatter U, Saller R (2002) Bioactive essential oils used in phytomedicine as anti-infective agents: Australian tea tree oil and manuka oil. *Act. Pythoter.* **1**: 26-32

Renau TE, Léger R, Flamme EM, Sangalang J, She MW, Yen R, Gannon CL, Griffith D, Chamberland S, Lomovskaya O, Hecker SJ, Lee VJ, Ohta T, Nakayama K (1999) Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *J. Med. Chem.* **42**: 4928-4993

Renau TE, Léger R, Flamme EM, She MW, Gannon CL, Mathias KM, Lomovskaya O, Chamberland S, Lee VJ, Ohta T, Nakayama K, Ishida Y (2001) Addressing the stability of C capped dipeptide efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**: 663-667

Renau TE, Léger R, Yen R, She MW, Flamme EM, Sangalang J, Gannon CL, Chamberland S, Lomovskaya O, Lee VJ (2002) Peptidomimetics of efflux pump inhibitors potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**: 763-766

Renau TE, Léger R, Filonova L, Flamme EM, Wang M, Yen R, Madsen D, Griffith D, Chamberland S, Dudley MN, Lee VJ, Lomovskaya O, Watkins WJ, Ohta T, Nakayama K, Ishida Y (2003) Conformationally-restricted analogues of efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 2755-2758

- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Méjean V, Foglino M (2000) Two-components systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* **8**: 498-504
- Rossi PG, Berti L, Panighi J, Maury J, Muselli A, de Rocca Serra D, Gonny M, Bolla JM (2007a) Antibacterial action of essential oils from Corsica. *J. Essent. Oil Res.* **19**: 176-182
- Rossi PG, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, Casanova J, Bolla JM, Berti L (2007b) (E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7332-7336
- Rüegg T, Calderón AI, Queiroz EF, Solís PN, Marston A, Rivas F, Ortega-Barría E, Hostettmann K, Gupta MP (2006) 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti *Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. *J. Ethnopharmacol.* **103**: 461-467
- Ruimy R, Andremont A (2004) Quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*: mecanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation.* **13**: 176-184
- Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A (2005) Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J. Leukoc. Biol.* **77**: 466-475
- Salomon RA, Farias RN (1992) Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 7428-7435
- Salzer UJ (1977) The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings – a critical review. *C.R.C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **9**: 345-373
- Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food Prot.* **68**: 790-795
- Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC (1999) Antibacterial activity from St John's wort against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet.* **353**: 2129
- Schiavo G, van der Goot FG (2001) The bacterial toxin toolkit. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 530-537
- Schitteck B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* **2**: 1133-1137
- Schmidt FR (2004) The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 335-343

Schmitz F, Fluit A, Luckefahr M, Engler B, Hofmann B, Verhoef J, Heiz HP, Hadding U, Jones M (1998) The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the *in vitro* activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**: 807-810

Scobie HM, Thomas D, Marlett JM, Destito G, Wigelsworth DJ, Collier RJ, Young JA, Manchester M (2005) A soluble receptor decoy protects rats against anthrax lethal toxin challenge. *J. Infect. Dis.* **192**: 1047-1051

Seed PC, Passador L, Iglewski BH. (1995) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* **177**: 654-659

Senatore F (1996) Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food. Chem.* **44**: 1327-1332

Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**: 55-70

Shi J, Ross CR, Chengappa MM, SylteMJ, McVey DS, Blecha F (1996) Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 115-121

Shin S, Kim JH (2005) In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.* **28**: 897-901

Shoop WL, Xiong Y, Wiltsie J, Woods A, Guo J, Pivnichny JV, Felcetto T, Michael BF, Bansal A, Cummings RT, Cunningham BR, Friedlander AM, Douglas CM, Patel SB, Wisniewski D, Scapin G, Salowe SP, Zaller DM, Chapman KT, Scolnick EM, Schmatz DM, Bartizal K, MacCoss M, Hermes JD (2005) Anthrax lethal factor inhibition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **102**: 7958-7963

Shrivastava R, Miller JF (2009) Virulence factor secretion and translocation by *Bordetella* species. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 88-93

Siani AC, Ramos MF, Menezes-de-Lima OJr, Ribeiro-dos-Santos R, Fernandez-Ferreira E, Soares RO, Rosas EC, Susunaga GS, Guimaraes AC, Zoghbi MG, Henriques MG (1999) Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.* **66**: 57-69

Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022-8028

Singh SB, Barrett JF (2006) Empirical antibacterial drug discovery – foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* **71**: 1006-1015

Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* **407**: 762-764

Skurnik M, Strauch E (2006) Phage therapy: facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 5-14

Smith KM, Bu Y, Suga H (2003a) Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chem. Biol.* **10**: 563-571

Smith KM, Bu Y, Suga H (2003b) Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem. Biol.* **10**: 81-89

Song MJ, Kim NM (2003) Antimicrobial action of *p*-hydroxyphenyl acrylate. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* **52**: 107-113

Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S (2007) Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**: 1247-1260

Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Lauren A, Zenewicz L, Lewis K (2000a) Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnicarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 1433-1437

Stermitz FR, Tawara-Matsuda J, Lorenz P, Mueller P, Zenewicz L, Lewis K (2000b) 5'-Methoxyhydnicarpin-D and pheophorbide A: *Berberis* species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* **63**: 1146-1149

Stermitz FR, Beeson TD, Mueller PJ, Hsiang J, Lewis K (2001) *Staphylococcus aureus* MDR efflux pump inhibitors from a *Berberis* and a *Mahonia (sensu strictu)* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **29**: 793-798

Suwalak S, Voravuthikunchai SP (2009) Morphological and ultrastructural changes in the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 following treatment with *Quercus infectoria* nut galls. *J. Electron. Microsc.* **58**: 315-320

Svensson A, Svensson A, Larsson A, Emtenas H, Hedenstrom M, Fex T, Hultgren SJ, Pinkner JS, Almquist F, Kihlberg J (2001) Design and evaluation of pilicides: potential novel antibacterial agents directed against uropathogenic *Escherichia coli*. *Chembiochem.* **2**: 915-918

- Tan YT, Darren J (2000) Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol. Med. Today.* **6**: 309-314
- Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3133-3141
- Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol. Plant Microbe Inter.* **13**: 637-648
- Thoroski J, Blank G, Biliaderis C (1999) Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* **52**: 399-403
- Toder DS, Gambello MJ, Iglewski BH (1991) *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol. Microbiol.* **5**: 2003-2010
- Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J (2010) Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Phytomedicine.* **17**: 142-145
- Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J (1995) Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* **1**: 25-34
- Tomi F, Casanova J (2006) ¹³C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from *Labiatae* – a review. *Acta Hort.* **723**: 185-192
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G (2005) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2474-2478
- Topçu G, Öksüz S, Shieh HL, Cordell GA, Pezzuto JM, Bozok-Johansson C (1993) Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Inula graveolens*. *Phytochemistry.* **33**: 407-410
- Ugorakova J, Bukovska G (2003) Lysins and holins: tools of phage-induced lysis. *Biologia.* **58**: 327-334
- Ultee A, Smid EJ (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**: 373-378
- Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1561-1568

Umezū T (1999) Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **64**: 35-40

UNEP-WCMC, *Biodiversity data sourcebook* (2002) United nation environment programme-World conservation monitoring center, Cambridge, England.

Unlu M, Daferera D, Donmez E, Polissiou M, Tepe B, Sokmen A (2002) Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae) *J. Ethnopharmacol.* **83**: 117-121

Van Veen HW, Konings WN (1998) The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1365**: 31-36

Verdon J, Falge M, Maier, E Bruhn H, Steinert M, Faber C, Benz R, Héchard Y (2009) Detergent-like activity and α helical structure of warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. *Biophys. J.* **97**: 1933-1940

Viljoen A, Van Vuuren S, Ernst E, Klepser M, Demirci B, Baser H, Van Wyk BE (2003) *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *J. Ethnopharmacol.* **88**: 137-143

Vizioli J, Salzet M (2002) Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 494-496

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P (2005) Metallo- β -lactamase: the quiet before the storm. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 306-325

Wan J, Wilcock A, Coventry MJ (1998) The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 152-158

Wang IN, Smith DL, Young R (2000) Holins: the proteins clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 799-825

Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S (2005) Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia.* **76**: 233-236

Wendakoon CN, Sakaguchi M (1995) Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot.* **58**: 280-283

Weyerstahl P, Marschall H, Weirauch M, Thefeld K, Surburg H (1998) Constituents of commercial Labdanum oil. *Flavour Fragr. J.* **13**: 295-318

- Willmott CJ, Maxwell A (1993) A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 126-127
- Wright GD (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 1451-1470
- Wright KJ, Hultgren SJ (2006) Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiol.* **1**: 75-87
- Yagupsky P (2006) Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**: 974-976
- Yamagushi S, Hong T, Waring A, Lehrer RI, Hong M (2002) Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry.* **41**: 9852-9862
- Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81**:1475-1485
- Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **55**: 27-55
- Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M (1990) Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* **172**: 6942-6949
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* **415**: 389-395
- Zhao RJ, Koo BS, Kim GW, Jang EY, Lee JR, Kim MR, Kim SC, Kwon YK, Kim KJ, Huh TL, Kim DH, Shim I, Yang CH (2005) The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 2323-2326