



HAL
open science

**Contribution à l'étude du traitement de bactéries
multi-résistantes : Associations de composants
aromatiques d'huiles essentiels nano-encapsulés avec des
antibiotiques**

Chantal Valcourt

► **To cite this version:**

Chantal Valcourt. Contribution à l'étude du traitement de bactéries multi-résistantes : Associations de composants aromatiques d'huiles essentiels nano-encapsulés avec des antibiotiques. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2016. Français. NNT : 2016ANGE0001 . tel-02003403

HAL Id: tel-02003403

<https://theses.hal.science/tel-02003403>

Submitted on 1 Feb 2019

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.

Thèse de Doctorat

Chantal VALCOURT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : Pharmacologie expérimentale et clinique

Spécialité : *Bactériologie*

Unité de recherche : Inserm UMR_S 1066

Soutenue le 29 Janvier 2016

Thèse N° : (10)

Contribution à l'étude du traitement de bactéries multirésistantes

**Associations de composants aromatiques d'huiles essentielles nano-
encapsulés avec des antibiotiques**

JURY

Rapporteurs : **Juan Manuel IRACHE** Professeur, Université de Navarre (Espagne)
Pierre-Yves DONNIO, PU-PH, CHU Rennes

Examineurs : **Matthieu EVEILLARD**, PU-PH, CHU Angers
Jacques SAMARUT, PU-PH, Eydo Pharma

Invité: **Elisabeth ROSSINES**, Fondatrice d'Eydo Pharma

Directeur de Thèse : **Patrick SAULNIER**, PU-PH, Université d'Angers

Co-directeur de Thèse : **Marie Laure JOLY-GUILLOU**, PU-PH, CHU Angers

Voyageur, il n'y a pas de chemin. Le chemin se fait en marchant

Antonio Machado

REMERCIEMENTS

-Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur **Jean Pierre BENOIT** de m'avoir accueillie au sein du laboratoire MINT (INSERM U1066)

-Je voudrai remercier aussi les rapporteurs d'avoir pris le temps de lire et de corriger cette thèse ainsi qu'aux membres du jury d'être présents et de juger ce travail.

-**Patrick Saulnier** Je vous remercie énormément pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et de m'avoir encadré tous ces années. Merci pour vos conseils et votre enthousiasme en ce qui concernait les expériences physico-chimiques. Même avec un agenda si rempli vous avez toujours trouvé du temps à m'accorder surtout pendant les dures périodes de rédaction. Je garde aussi un bon souvenir de nos conversations sur les voyages, les randonnées et le Pays Basque.

-**Marie Laure Joly Guillou**, co-directrice de cette thèse, je vous exprime ma reconnaissance pour votre temps et vos conseils concernant la bactériologie et la recherche en générale qui ont été très utiles pour moi. Je vous souhaite la plus agréable des retraites.

-**Elisabeth Rossines et Eydo pharma**. Cette thèse n'aurait jamais été possible sans la confiance que vous m'avez accordée.

-**Anita Umerska**, merci beaucoup pour ton aide et ton implication. Travailler avec toi a été un grand plaisir. Tu as toujours été à mon écoute et tu m'as accordé énormément de temps, même si à la base nous n'étions pas censées travailler ensemble. Merci énormément, je sais que sans toi, je n'aurai pas pu avancer autant.

-**Les membres du service de bactériologie du CHU** (Angers). Je voudrais remercier d'une manière spéciale Cyriëlle Le Breton et Angélique Godefroy pour leur implication et leur savoir-faire dans les manips *in-vivo* ainsi que Marie-Pierre Zanelli pour toutes les fois que j'ai pu compter sur elles pour réaliser les cinétiques. Sans oublier les conseils et l'aide de Viviane Cassisa tout au long de ma thèse.

Un grand merci pour leur soutien aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan personnel à :

-Guillaume Bastiat, je vous remercie le temps que vous m'avez accordé et d'avoir pu compter sur vos connaissances sur la méthode Ohshima.

-Jérémy Riou, merci beaucoup pour ton implication et tes connaissances sur le logiciel R, que tu as mis à ma disposition pour la rédaction de la revue.

-Romain Mallet et Florence Manero, merci pour votre temps et implication dans ce projet. Pour l'incomptable nombre de fois que vous avez traité mes échantillons pour la microscopie électronique. Je vous remercie aussi pour avoir su créer une ambiance sympathique et détendue pendant les longues heures de manips.

-Thomas Cordonnier, merci beaucoup pour lire et relire mon (mauvais) anglais et me donner ton avis et tes conseils. Même si nous ne travaillons pas sur le même sujet tu n'as jamais hésité à m'accorder un peu de ton temps.

Je voudrais aussi remercier mes collègues de bureau ; Emilie, Hélène, Anita, Thomas C., Jean-Michel pour créer cette bonne ambiance, pour les pains au chocolat du vendredi matin et pour tous les bons conseils que vous m'avez donné. Même avec les problèmes de température, c'était un plaisir de partager ces 15m² avec vous.

Sans oublier mon tout premier bureau au 2^{ème} étage où le nombre de personnes rencontrées est important.

Un grand merci très spécial pour toutes les personnes du labo et en dehors avec lesquelles j'ai partagé ces trois dernières années. Mes amis, des plus anciens aux plus récents:

-Marta, Adrián, Koldo, Lara, María y Nadia, nos conocimos en el colegio y 15 años después aquí seguimos, aunque no podemos vernos todos los días, seguís siendo una de mis principales razones para volver a Vitoria. Vuestro apoyo durante estos años ha sido muy importante para mí. Gracias por todo. Si es que al final, y como decía Nadia, "sólo estamos a un whatsapp de distancia".

-Mayte (Techu), mil gracias por tu apoyo, tus mensajes, nuestras risas y todo lo que hemos compartido no sólo estos tres años de tesis si no desde que nos conocimos hace ya...casi 10 años. Sos un dulce!!

-Mes anciens et actuels colocs: Dimitri, Claudia, Clémentine, Charlotte, J-B, Lise-Marie, Mathieu, Laura, Emilie, Chouquette, Enrika et Chacha, vous avez été très nombreux mais chacun à votre manière vous avez fait partie de ma vie et de ma routine angevine et je garde un très bon souvenir de vous tous.

-Emilie André, nous avons démarré la thèse au même temps, nous avons vécu plein de bons moments et nous nous sommes soutenu quand les choses ne marchaient pas. Tu as été plus qu'une collègue et plus qu'une simple coloc, tu es une vraie amie et je garderai toujours de très bons souvenirs de nos folles années de thèse.

-Lisa et Swann (el trio maravilla) vous êtes vraiment géniaux!! Je suis sûr que mon passage dans ce laboratoire aurait été très différent sans vous. Merci énormément pour votre soutien et votre amitié, pour les repas au Resto, les diners du trio et tous les bons moments passés ensemble. Bon courage pour la fin de vos thèses, (promis) je serai là pour fêter ça avec vous.

-Thomas B., Thomas C., Marion, Raquel, Lousineh, Amin, Gabriela, Alejandro, Nada, Guiovanna, Margaux (Gosia), Lina, Juan merci pour votre amitié et votre bonne humeur, les soirées, les BBQs et les pauses café. Sans oublier votre aide à chaque fois que j'ai eu besoin. Je vous souhaite, toute la réussite du monde, vous la méritez vraiment.

-Amélie, Kévin, Mathieu (Bono), Camille, Irene, Nicolas (et tous les autres que j'oublie de citer) pour tout le temps qu'on a partagé, les restos, les verres et tous nos souvenirs. Grâce à vous, j'ai appris à aimer Angers et à me sentir comme chez moi. Merci beaucoup.

-Sans oublier les filles du James (Blandine, Laura, Julie, Sophie et Diane) et les mecs du volley (Malik, JB, Sènan, Mario, Vincent, Charles et Kinou) merci pour toutes ces soirées et ces weekends à la mer, vous avez été une très belle découverte.

Antoine (Momo), merci pour ton soutien et ta bonne humeur. Grâce à toi, ma thèse a été beaucoup moins dure. J'ai hâte de commencer cette nouvelle aventure avec toi.

Mama, Patrick y Neus, gracias por todo el apoyo y el amor que me habéis dado desde el principio. Siempre habéis creído en mí, incluso cuando yo no me sentía capaz de llegar hasta final.

Papa, aunque te fuiste demasiado pronto, nunca has dejado de estar aquí, gracias

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

1. Les antibiotiques et la résistance bactérienne.....	11
1.1 Contexte historique.....	11
1.2 Problématique des antibiotiques.....	11
1.3 Mécanismes d'action : Cibles bactériennes.....	14
1.4 La résistance bactérienne.....	19
1.5 L'avenir de l'antibiothérapie.....	27
2. Composants des huiles essentielles.....	28
2.1 Composition chimique des huiles essentielles.....	30
2.2 Mode d'action des composants majoritaires des HE.....	33
3. La vectorisation et association majoritaires des huiles essentielles.....	35
3.1 Objectifs de la vectorisation. « Le vecteur idéal ».....	35
3.2 Les différents types de nanovecteurs.....	36
3.3 Les nanocapsules lipidiques.....	37
4. Objectifs de la thèse.....	40

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Revue bibliographique.....	42
1.2 Conclusions.....	75

TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. Conception et caractérisation des LNCs.....	76
1.1 Introduction.....	77
1.2 Matériels et méthodes	78
1.3 Résultats et discussion.....	87
1.4 Conclusion	94
2. Efficacité in-vitro et association avec des antibiotiques.....	95
2.1 Introduction.....	95
2.2 Matériels et méthodes.....	103

2.3 Résultats et discussions.....	107
2.4 Article n°1.....	123
2.5 Conclusion et perspectives.....	150
3. Efficacité in-vivo de l'association AT98a-Doxycycline.....	151
3.1 Introduction.....	151
3.2 Matériels et méthodes.....	152
3.3 Résultat et discussion.....	158
3.4 Conclusion.....	164
4. Etude des interactions entre les NCLs et les bactéries.....	165
4.1 Introduction.....	165
4.2 Matériels et méthodes.....	170
4.3 Résultat et discussions.....	176
4.4 Conclusion.....	186
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
1. Conclusions.....	187
2. Perspectives.....	194
BIBLIOGRAPHIE.....	195
ANNEXES.....	217

LISTE DE FIGURES

- Figure 1** : Evolution des découvertes des principaux antibiotiques d'origine naturelle (vert) et d'origine synthétique (orange) (Image inspirée de Singh and Barrett 2006).
- Figure 2** : Consommation communautaire d'antibiotiques en 2004 (Goossens et al 2007)
- Figure 3** : Taux de résistance en Europe de *S.pneumoniae* pour la pénicilline G (gauche) et pour *S.aureus* pour la méthicilline (droite). EARSS données 2007.
- Figure 4** : Principes d'acquisition des bactéries (Levy and Marshall 2004).
- Figure 5** : Schéma des principaux mécanismes de résistance des bactéries
- Figure 6** : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif et négatif
- Figure 7** : Formule chimique de l'isoprène (unité principal des terpènes) (2-méthyl butadiène)
- Figure 8** : Synthèse de l'eugénol et du cinnamaldéhyde à partir de l'acide shikimique
- Figure 9** : Structure chimique du carvacrol (1), du cinnamaldéhyde (2) et de l'eugénol (3)
- Figure 10** : Schéma des mécanismes d'action des huiles essentielles.
- Figure 11**: Formule chimique du polyéthylène glycol
- Figure 12** : Plages de conductivité de solutions aqueuses et des émulsions.
- Figure 13** : Représentation schématique des cycles de température pour la formulation des NCL blanches.
- Figure 14** : Image schématique des phénomènes d'instabilité (Coalescence, Mûrissement d'Ostwald et Flocculation) qui peuvent subir les NCL.
- Figure 15** : Procédé de dosage des NCL par ultra-centrifugation et analyse par HPLC
- Figure 16** : Graphe de conductivité de NCL blanches avec la zone d'inversion de phase (ZIP).
- Figure 17** : Conductivité vs température pour la détermination e la ZIP du système après ajout de carvacrol, d'eugénol et de cinnamaldéhyde.
- Figure 18** : Mesures de taille, Z-Average et potentiel zêta à J0 pour les formulations : NCL blanches, NCL eugénol-cinnamaldéhyde, NCL cinnamaldéhyde, AT98a et AT101.
- Figure 19** : Evolution de la taille (nm) (bleu) et du potentiel zêta (mV) (rouge) pendant 30 jours pour la formulation Eugénol/Cinnamaldéhyde (n=3) (a) et pour la formulation AT98a (n=3) (b).
- Figure 20** : Temps de rétention pour le cinnamaldéhyde, l'eugénol et le carvacrol déterminée
- Figure 21** : Courbes d'étalonnage pour le cinnamaldéhyde(a), l'eugénol(b) et le carvacrol(c).
- Figure 22** : Images d'AT98a obtenues par microscopie électronique à balayage (résolution x40000).
- Figure 23** : Structure chimique de la Rifampicine
- Figure 24** : Structure chimique du Méropénème
- Figure 25** : Structure chimique de la Vancomycine
- Figure 26** : Structure chimique de la Doxycycline

- Figure 27** : Différents types d'interaction en cinétique de bactéricidie
- Figure 28**: Graphical abstract pour la publication « Synergistic interaction between doxycycline and terpenics components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against gram negative bacteria”.
- Figure 29** : Plaque 96 puits pour la lecture de la CMI
- Figure 30** : Protocole de la méthode de cinétique de bactéricidie pour l'étude des associations NCL/ATB.
- Figure 31** : Résultats de cinétique de bactéricide sur la souche *A.baumannii* RCH.
 - a : NCL cinnamaldéhyde 80µg/mL associé à la Rifampicine 2µg/mL
 - b : NCL cinnamaldéhyde 160µg/mL associé à la Rifampicine 2µg/mL
- Figure 32** : Résultats de la cinétique de bactéricide sur la souche *A.baumannii* RCH.
 - a : NCL AT98A 425µg/mL associé au Méropénème 2µg/mL
 - b : NCL cinnamaldéhyde 160µg/mL associé au Méropénème 2µg/mL
- Figure 33** : Résultats de la cinétique de bactéricide sur la souche *A.baumannii* SAN.
 - AT98a a 425µg/mL et Méropénème à 1µg/mL
- Figure 34** : Résultats de la cinétique de bactéricide sur la souche *A.baumannii* RCH.
 - a : NCL carvacrol-cinnamaldéhyde (50/50) 160µg/mL associé à la Vancomycine 10µg/mL
 - b : NCL cinnamaldéhyde 160µg/mL associé à la Vancomycine 10µg/mL
 - c : AT98a 425µg/mL associé à la Vancomycine 10µg/mL
- Figure 35** : Schéma du mécanisme d'action de l'association AT98a-Vancomycine
- Figure 36**: Images en MEB de la bactérie *Acinetobacter baumannii* SAN traité avec la Vancomycine, AT98a, des NCL d'eugénol, des NCL de cinnamaldéhyde et leurs respectives associations avec la Vancomycine.
- Figure 37** : Images de MEB de la bactérie *Klebsiella pneumoniae* traitée avec la Vancomycine, AT98a et l'association de deux.
- Figure 38** : Images de MEB de la bactérie *Klebsiella pneumoniae* traitée avec la Vancomycine, AT98a et leur association.
- Figure 39** : Images en microscopie électronique à transmission de la bactérie *A.baumannii* après 6heures d'incubation, sans aucun traitement (Témoin) et traitées avec AT98a à une concentration de 250µg/mL (AT98a)
- Figure 40** : Coupe transversale d'*A.baumannii* observée par MET, avec le cytoplasme (rouge) et la membrane bactérienne (bleu), à une échelle de 100nm.
- Figure 41** : Formule chimique de l'isoflurane (agent anesthésique)
- Figure 42** : Procédure d'intubation intra-trachéale.
- Figure 43** : Procédure d'administration IP en expérimentation animale chez la souris
- Figure 44** : Time-line du protocole du modèle de pneumopathie murine établie par le CHU d'Angers.
- Figure 45**: Evolution du pourcentage d'hémolyse par rapport à la concentration en mg/mL pour les NCL blanches (bleu), AT98a (rouge), la Doxycycline (vert) et l'association (violet).
- Figure 46** : Evolution en pourcentage de la perte de poids des 4 groupes de souris par rapport à leur poids d'origine. Aucune souris survivante dans le groupe témoin à 72 heures

-**Figure 47** : Evolution des scores cliniques pour les témoins, les souris traitées avec les NCL, la doxycycline et l'association pendant 4 jours

-**Figure 48** : Evolution de la survie des souris sur 4 jours

-**Figure 49** : Hypothèses sur le comportement des NCL vis-à-vis des bactéries
1: Les NCL recouvrent la surface de la bactérie sans pénétrer à l'intérieur(a). Elles libèrent au fur et à mesure les actifs qui traversent la membrane bactérienne(b).
2: Les NCL pénètrent à l'intérieur de la bactérie (a) à l'intérieur, elles libèrent leurs actifs (b)

-**Figure 50** : Représentation schématique des paramètres de ZN et $1/\lambda$ des LNC dans une suspension ionique des NCL (image extraite de l'article de Vonarbourg et al. 2005)

-**Figure 51** : Equation de Young pour la mesure de l'angle de contact et schéma des forces de surface

-**Figure 52** : Spectre de fluorescence et molécule du Nile-Red

-**Figure 53** : Spectre de fluorescence et molécule du FITC

-**Figure 54** : Schéma de la préparation des lames pour la mesure de l'angle de contact

- **Figure 55** : Schéma de la préparation des lames (Bactéries + LNC) pour la mesure de l'angle de contact

-**Figure 56** : Schéma de l'acquisition grâce à une caméra pour la détermination de l'angle de contact.

-**Figure 57**: Mobilité électrophorétique et spectres de potential zêta pour les NCL seuls, les bactéries et les deux ensembles

-**Figure 58** : Représentation schématique de ZN et $1/\lambda$ dans une suspension bactérienne (gauche) et dans une suspension contenant des bactéries et des NCL (droite)

-**Figure 59** Evolution de la mobilité électrophorétique des bactéries avec des différentes concentrations de LNC (inférieures et supérieures à sa CMI). A droite, l'équivalence de la concentration de NCL en $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'actif.

-**Figure 60** : Evolution de la mobilité électrophorétique des bactéries (mortes et vivants) avec des NCL

-**Figure 61** : Comparaison de la mobilité électrophorétique des NCL blanches et des NCL chargées avec des bactéries

-**Figure 62** : Comparaison de la mobilité électrophorétique de la bactérie A.baumannii SAN et A.baumannii RCH.

-**Figure 63** : Graphique montrant l'évolution des paramètres γ^+ et γ^- pour la bactérie A.baumannii SAN008, en phase exponentielle et en phase stationnaire.

-**Figure 64**: Graphique montrant l'évolution des paramètres γ^+ et γ^- pour la bactérie A.baumannii SAN008 avec les NCLs, en phase exponentielle et en phase stationnaire.

-**Figure 65** : Images de microscopie confocale, A gauche avec le filtre pour le FITC (les bactéries marquées), le même échantillon avec le filtre pour le Nile red (Les NCL marquées). A droite, image séquentielle avec les deux filtres (Les deux images sont un peu décalées)

-**Figure 66**: A gauche, images de microscopie confocale avec un filtre FITC (vert) marquage des bactéries, et avec un filtre Nile Red (rouge) marquage des NCL. A droite, l'image séquentielle avec le filtre FITC (vert) et Nile Red (rouge) ou les deux se superposent (jaune).

-Figure 67 : Devenir de médicament dès qu'il est administré jusqu'à qu'il arrive à la circulation générale.

-Figure 68 : Code de marquage international pour expérimentation animale chez la souris.

LISTE DE TABLEAUX

- Tableau 1** : Types de β -lactamases d'après la classification d'Amblar
- Tableau 2** : Quantités théoriques des excipients à ajouter dans la formulation des NCL.
- Tableau 3** : Quantités des actifs (Huiles essentielles ou composants de ces huiles) utilisés dans chaque formulation.
- Tableau 4** : Mesures de taille, Z-Average et potentiel zêta à J0 pour les formulations : NCL blanches, NCL eugénol-cinnamaldéhyde, NCL cinnamaldéhyde, AT98a et AT101.
- Tableau 5** : Rendement d'encapsulation (%) de chaque actif pour chaque NCL (Fraction encapsulée)
- Tableau 6** : Rendement d'encapsulation (%) de chaque actif pour chaque NCL (Fraction non encapsulée)
- Tableau 7** : Concentrations de chaque actif utilisé pour chaque bactérie pour la technique de microscopie électronique.
- Tableau 8** : Résultats de CMI pour les NCL et les antibiotiques *vis-à-vis* des souches d'*Acinetobacter baumannii* SAN et RCH. Les résultats de CMI sont exprimés en $\mu\text{g/mL}$
- Tableau 9** : Indice FIC (vert : synergique, orange : indifférent) pour les associations des NCL avec la rifampicine, le méropénème et la vancomycine sur deux souche d'*A.baumannii*.
- Tableau 10** : Image et principales caractéristiques de la souris C3H/HeN.
- Tableau 11** : Différents scores cliniques et leurs valeurs.
- Tableau 12** : Doses de chaque composant terpénique utilisé en chaque injection.
- Tableau 13** : Mortalité journalière des souris après l'inoculation des bactéries (J0). En beige le nombre de souris mortes dans les jours précédents. Dans la dernière colonne, pourcentage de survie à la fin de l'étude. Entre parenthèses, nombre de souris dans chaque groupe.
- Tableau 14** : Quantité, concentration en actif ($\mu\text{g/mL}$) et CMI de chaque NCL utilisée dans l'expérience
- Tableau 15** : Valeurs de γ_L , γ_L^d , γ_L^+ et γ_L^- des trois liquides de référence utilisés lors de cette étude.
- **Tableau 16** : Détermination des paramètres $1/\lambda$ (μ) et ZN pour les NCL seules, les bactéries et les deux ensembles.
- Tableau 17** : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN pour les bactéries avec des différentes concentrations de NCL.
- Tableau 18** : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN pour les bactéries (mortes et vivantes) avec des différentes concentrations de NCL
- Tableau 19** : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN des NCL blanches et des NCL chargées avec des bactéries.
- Tableau 20** : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN *A.baumannii* SAN et *A.baumannii* RCH.
- Tableau 21** : Détermination de l'angle de contact pour *A.baumannii* et *A.baumannii* avec des NCL en phase exponentielle et en phase stationnaire pendant 0,3 et 6 heures.

- Tableau 22** : Posologie indicative des huiles essentielles susceptibles d'une utilisation en diffusion.
- Tableau 23**: Composition chimique des huiles essentielles d'origan *O.scabrum* et *O.microphyllum* (Aligiannis et al. 2001).
- Tableau 24** : interactions Antibiotique-HE (Revue bibliographique)

ABREVIATIONS

A

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR: Association française de normalisation.

ARN : Acide ribonucléique

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ARNm: Acide ribonucleique messenger

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosine triphosphate

AT98a: Nanocapsules lipidiques d'eugenol-carvacrol-cinnamaldéhyde (1/3-1/3-1/3)

AT101: Nanocapsules lipidiques d'huile de clou de girofle, d'huile d'origan et d'huile de cannelle (1/3-1/3-1/3)

B

BHI: Brain-Heart Infusion Broth

BLSE: β -lactamase à spectre étendu

BMR : bactérie multi-résistant

C

C-CLIN : Comité de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMC : Concentration micellaire critique

C3G : céphalosporine de 3^{ème} génération

D

DDSA: 2-Dodecenyyl succinic anhydride

DMAE: Diméthylaminoéthanol

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

E

EO: Essential oils (voir HE)

F

FBC index: Fractional bactericidal concentration index

FDA: Food and drug administration

FIC index: Fractional inhibitory concentration index

FITC : Fluorescein isothiocyanate

G

GEIHP: Groupe d'études des interactions hôte-pathogènes.

GRAS: Generally regarded as safe

H

HE: Huiles essentiels

HMDS : Hexamethyldisilazane

I

IP : Intrapéritonéale

IV : Intraveineux

L

LNC: Lipidic nanocapsule (voir NCL)

LPS : Lipopolysaccharides

M

MBC: Minimum bactericidal concentration (voir CMB)

ME : Mobilité électrophorétique.

MIC: Minimum inhibitory concentration (voir CMI)

MID: Minimum inhibitory dose

MINT: Micro et Nanomédicines biomimétiques

MEB: Microscopie électronique à balayage

MET: Microscopie électronique à transmission

N

NCL: Nanocapsule lipidique

NCL EU : Nanocapsules lipidiques d'eugénol

NCL CN: Nanocapsules lipidiques de cinnamaldéhyde

NCL EU-CN : Nanocapsules lipidiques d'eugénol-cinnamaldéhyde (proportion 50/50)

NMA : Nadic Methyl anhydride

P

PBS : phosphate buffered saline

PDI: Polydispersity index

PEG: Polyéthylène glycol

PG: Peptidoglycan

PLP: protéine liant la pénicilline

S

SARM: Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

SC: Score clinique

SCIAM: Service commun d'Imageries et d'analyses microscopiques

SEM : Scanning electron microscopy

T

TIP : Température d'inversion de phase

U

UFC: Unités formant colonies

Z

ZIP : Zone d'inversion de phase

INTRODUCTION GENERALE

1. LES ANTIBIOTIQUES ET LA RESISTANCE BACTERIENNE

1.1 Contexte historique

Les bactéries sont des organismes unicellulaires dont les dimensions varient entre 1 et 10µm. C'est en 1665, qu'Antoine Van Leeuwenhoek (Gest 2004 ; Van Zuylen 1980), drapier à Delft (Hollande), fabrique le premier microscope en superposant des lentilles dans le but d'observer des textiles. Il observe des structures particulières provenant de la surface de sa peau, de sa bouche ou de ses dents et les dessine. Il découvre ainsi le monde microbien.

En 1866, Haeckel crée le terme de protistes (Dougherty and Allen 1958) pour désigner, entre le monde animal et le monde végétal, les êtres unicellulaires et les êtres pluricellulaires sans tissus différenciés. Les protistes sont classés en deux catégories :

- Les eucaryotes qui possèdent, entre autre, un noyau entouré d'une membrane, des chromosomes, un appareil de mitose et une structure cellulaire complexe (mitochondries notamment) comme les cellules animales ou végétales.
- Les procaryotes qui ont un chromosome unique sans membrane nucléaire et sans appareil de mitose, et une structure cellulaire élémentaire (pas de mitochondries).

Les bactéries font partie des protistes procaryotes, terme utilisé pour la première fois par le naturaliste et zoologiste allemand Christian Gottfried Ehrenberg (Siesser, 1981).

C'est grâce à Louis Pasteur que le lien entre les maladies et la présence des microorganismes, s'établit.

1.2 Problématique des antibiotiques

Depuis que les bactéries ont été découvertes, plusieurs scientifiques ont remarqué que certains microorganismes étaient capables d'en inhiber d'autres. La découverte fortuite de la pénicilline par Fleming en 1928 fait partie des travaux qui ont contribué aux progrès de la microbiologie (Fleming 1929).

Au début, les maladies infectieuses ont été traitées de façon empirique, à partir d'extraits de plantes. Les premiers agents thérapeutiques identifiés sur le plan chimique étaient la quinine et l'émétine. En 1942 Waksman crée le terme « antibiotique » pour faire référence à tous

INTRODUCTION GENERALE

les dérivés produits par le métabolisme des micro-organismes possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte (Bryskier 2005)

A partir de 1945, les recherches chimiques dans l'antibiothérapie concernent :

- les agents antibactériens de synthèse non retrouvés dans la nature,
- les antibiotiques extraits de la fermentation des moisissures ou d'autres genres bactériens.

Aujourd'hui, les antibiotiques synthétiques sont une minorité. On en retrouve principalement 3 classes ; les sulfamides, les quinolones (ou fluoroquinolones) et les oxazolidinones (Singh and Barrett 2006). Cependant la recherche des nouveaux antibiotiques s'essouffle et seuls quelques antibiotiques ont pu être mis sur le marché au cours de ces 10 dernières années (Guinoiseau 2011).

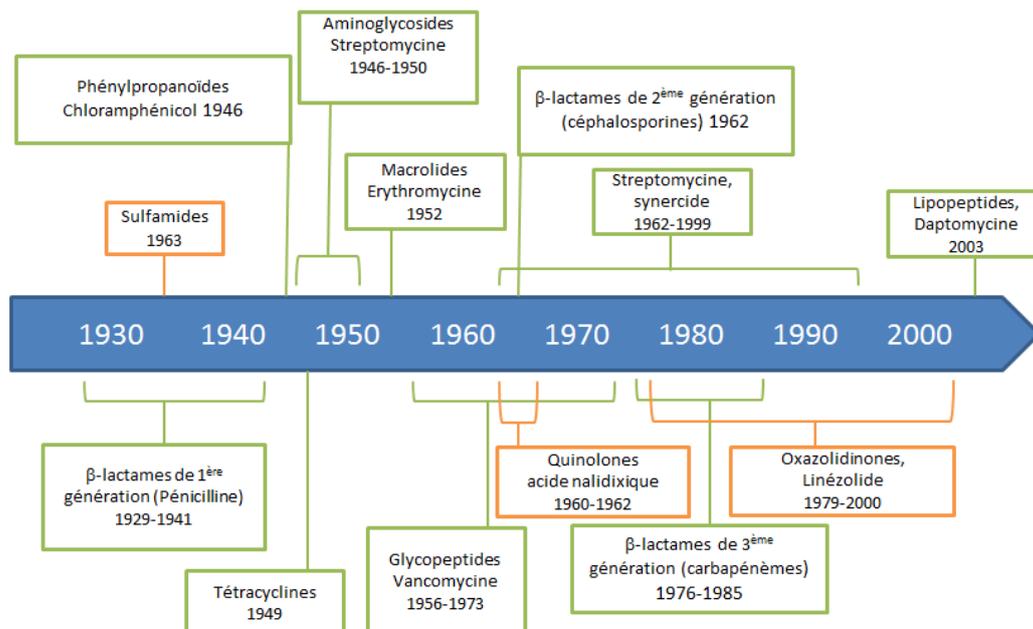


Figure 1 : Evolution des découvertes des principaux antibiotiques d'origine naturelle (vert) et d'origine synthétique (orange) (Image inspirée de Singh and Barrett 2006)

En lien avec la consommation débridée d'antibiotiques et du fait de la grande plasticité du génome bactérien, l'apparition des résistances a très vite été un problème majeur. Les premières alertes liées à des souches résistantes sont apparues en 1961 avec l'apparition de la résistance du staphylocoque à la méticilline. Depuis cette époque, la résistance aux antibiotiques a eu des conséquences considérables :

- l'augmentation de la morbidité et dans certains cas de la mortalité,
- l'augmentation des coûts du système sanitaire,

-la perte de moyens efficaces pour combattre les infections.

Il ne fait aucun doute que la problématique à laquelle nous devons faire face aujourd'hui a été provoquée par un mauvais usage des antibiotiques. Néanmoins, il existe des mesures que nous pouvons appliquer pour ralentir l'apparition de résistances :

1- Réduire les prescriptions non nécessaires, (Cohen 2006), souvent favorisées par « l'autodiagnostic » de la part du patient, sachant que les **infections virales** (rhino-pharyngite, bronchite aiguë, grippe, rhume,...) et les **infections bactériennes** (tuberculose, cystite, pneumonie,...) présentent des symptômes souvent similaires (fièvre, toux, troubles digestifs, courbatures) mais ne doivent pas être traitées de la même manière. Il faut éduquer la population dans un usage prudent et responsable des antibiotiques. Selon une étude de 2004 sur la consommation communautaire d'antibiotiques, la France était placée en 2^{ème} position avec une moyenne supérieure à celle de l'Europe (Figure 2).

2- Utiliser des kits de diagnostic rapide (ex : détection du virus influenza) (Bonner et al. 2003) permettant un traitement adapté.

3- Promouvoir des programmes de vaccination (Neuzil et al., 2000 ; Dagan et al., 2001) .

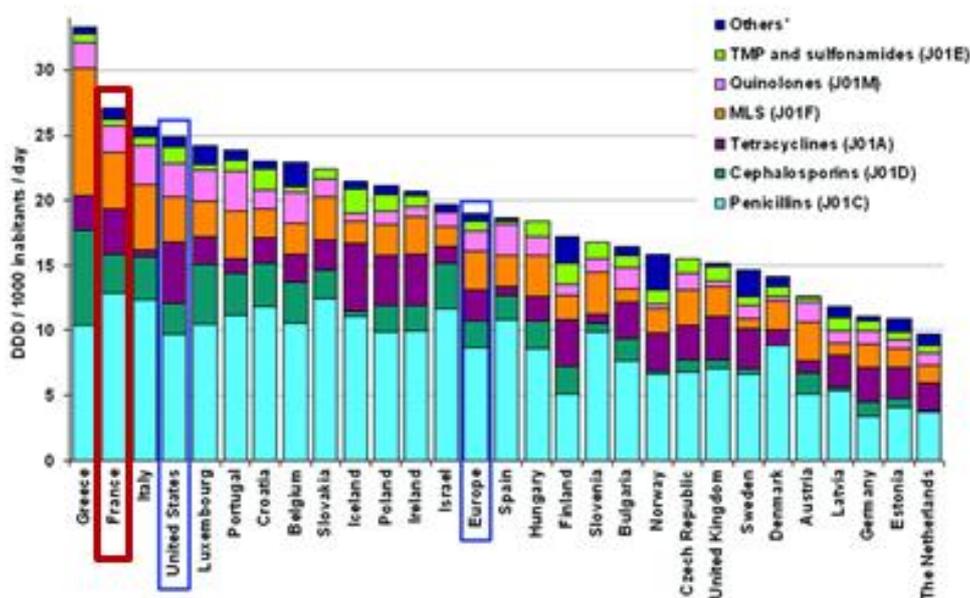


Figure 2 : Consommation communautaire d'antibiotiques en 2004 (Goossens et al 2007)

1.3 Mécanismes d'action des antibiotiques : Les cibles bactériennes

Une antibiothérapie efficace est la résultante d'une large réflexion (Kumar et al. 2010). Les antibiotiques ne doivent pas être choisis au hasard. Le choix des antibiotiques se fait par rapport à la bactérie qu'il faut traiter. Tous les antibiotiques ne sont pas efficaces contre toutes les bactéries. Différents familles d'antibiotiques, présentent différents mécanismes d'action.

Les antibiotiques peuvent se classer par rapport à leurs cibles :

- actifs contre la paroi bactérienne cytoplasmique : les β -lactamines, les glycopeptides et la Fosfomycine,
- actifs contre la membrane : les polymyxines et les lipopeptides,
- actifs contre la synthèse des protéines (ribosomes) : les aminosides, les macrolides, les ketolides, les lincosamides, les tetracyclines l'acide fusidique ou les oxazolidinones,
- actifs contre l'ADN : les quinolones, les rifamycines, les nitroimidazoles et les sulfamides.

Pour qu'un antibiotique puisse exercer son action, il faut qu'il soit capable d'atteindre sa cible. Suivant le cas, il doit pénétrer la membrane externe des bactéries à Gram négatif, échapper aux protéines liant la pénicilline, traverser la paroi bactérienne et la membrane cytoplasmique. Il faut aussi qu'il arrive sur sa cible à des concentrations suffisantes pour avoir une action significative (Archambaud, 2009). Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'antibiotique sera inefficace.

Antibiotiques actifs contre la paroi bactérienne

Les antibiotiques qui agissent sur la paroi sont essentiellement des inhibiteurs de la synthèse de peptidoglycane (PG), qui confèrent à la bactérie sa forme et sa rigidité. Le PG permet à la bactérie de résister à la forte pression osmotique intra-cytoplasmique. De la structure de cette paroi bactérienne, dépend la classification bactérienne en Gram positif ou Gram négatif.

Structure de la paroi des bactéries à Gram positif

La paroi des bactéries à Gram positif est généralement assez épaisse (20 à 80nm). Elle est constituée en majeure partie par le PG qui contient d'autres constituants, les acides teichoïques et teichuroniques. Ces acides interviennent dans le métabolisme bactérien en

assurant l'adsorption des ions Mg^{2+} provenant des milieux ambiants, puis le transfert de ces cations à un deuxième acide teichoïque situé plus en profondeur dans le PG et associé à la membrane cytoplasmique.

Il semblerait que ces acides soient fortement impliqués dans l'activité bactéricide des β -lactamines par leur rôle important dans le phénomène de lyse bactérienne.

Parmi les autres éléments, il faut noter la présence d'une capsule externe de structure polysaccharidique chez certaines bactéries à Gram positif, cette dernière étant un facteur de virulence.

Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif

Celle-ci est plus fine et plus complexe. De l'extérieur vers l'intérieur on distingue successivement une membrane externe, le PG qui est beaucoup plus fin que chez les Gram positif (2,5nm), l'espace périplasmique et la membrane cytoplasmique. En fait, on désigne par espace périplasmique l'espace situé entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique.

La membrane externe présente une structure trilamellaire classique, phospholipidique. Elle est constituée principalement de phospholipides (avec une plus faible quantité par rapport à la membrane cytoplasmique), de protéines et de lipopolysaccharides (ou endotoxines). Ces dernières sont responsables du choc endotoxinique des infections à bactéries à Gram négatif.

La membrane externe comporte des protéines qui forment des canaux (porines) permettant le passage de substances de l'extérieur vers l'intérieur des bactéries. Ces porines permettent le passage de certains antibiotiques dont la taille moléculaire est compatible avec le diamètre des canaux.

L'espace périplasmique est l'espace situé entre les deux membranes. Il est composé de PG, et de nombreuses enzymes (particulièrement les β -lactamases) sont présentes dans cet espace.

La membrane cytoplasmique est la structure la plus interne de la paroi bactérienne. C'est elle qui définit l'espace intra-cellulaire, elle a une épaisseur de 60 à 125nm et est constituée d'une couche bimoléculaire de lipides. La composition en lipides est identique à celle de la membrane externe, seules les proportions varient. On distingue 2 types de protéines dans la membrane :

INTRODUCTION GENERALE

- des protéines intrinsèques qui sont essentiellement des enzymes hydrophobes et des enzymes de la respiration. Elles permettent la synthèse des acides gras et des phospholipides ainsi que de l'ATPase membranaire.
- des protéines extrinsèques qui sont hydrophiles, périplasmiques ou juxta-cytoplasmiques.

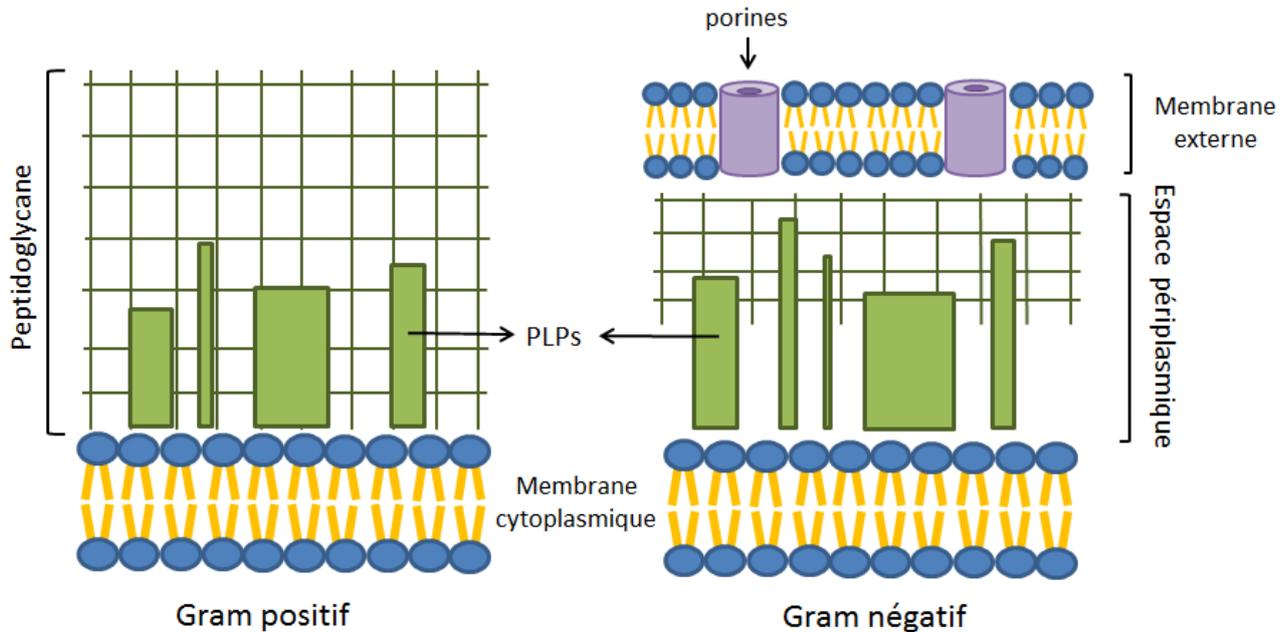


Figure 6 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif et négatif (image inspirée du livre « De l'antibiogramme à la prescription » Thevenot et al. 2004)

Le PG possède une structure tridimensionnelle. C'est un polymère naturel constitué de plusieurs chaînes linéaires, constituées elles-mêmes de l'alternance de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique (20 à 100 molécules). Les chaînes polysaccharidiques sont reliées entre elles par de courtes chaînes peptidiques, les tétrapeptides. Ces tétrapeptides sont formés d'une séquence L-R1 + D-Glu + L-R3 + D-Ala (L-R1 et L-R3 sont des acides aminés variables).

La composition en acides aminés de ce pont peptidique est très variable et il peut même ne pas exister. La liaison entre les 2 tétrapeptides est alors directe. En fonction de la composition du pont peptidique, on distingue 4 chémotypes parmi les bactéries. Le peptidoglycane forme ainsi un réseau entourant la bactérie. Le degré de résistance de ce réseau est fonction de sa compacité, laquelle est elle-même fonction de la longueur des chaînes polysaccharidiques, du nombre de ponts peptidiques et d'éventuelles liaisons hydrogène pouvant se former dans le peptidoglycane.

INTRODUCTION GENERALE

Il existe deux mécanismes principaux pour l'inhibition de la synthèse du PG :

- l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant les pénicillines (PLP), ce qui aboutit à l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques responsables de la structure réticulée de la paroi. Ceci provoque la synthèse de formes atypiques (rondes et filamenteuses) qui provoquent la lyse bactérienne. Ce type de mécanisme est caractéristique des β -lactamines, des céphalosporines ou des pénèmes. L'analogie structurale entre ces molécules et le dipeptide d'alanine provoque une inhibition de type compétitif (Archambaud 2009).
- le blocage de la polymérisation du peptidoglycane. Ce mécanisme d'action est propre aux glycopeptides, grâce à leur structure chimique, essentiellement sur le peptide. La configuration dans l'espace des acides aminés est importante quant à la liaison avec le D-Ala, D-Ala terminal.

Antibiotiques actifs contre la membrane cytoplasmique

Il s'agit d'une barrière qui isole la bactérie du milieu extérieur tout en permettant des échanges par transport passif ou actif. Certains antibiotiques modifient la membrane déjà constituée, d'autres perturbent sa synthèse. La membrane a un rôle métabolique très important pour la bactérie. Elle est non seulement responsable de la perméabilité et du transport de substances, mais aussi de la fonction respiratoire et de l'excrétion d'enzymes hydrolytiques.

- La polymyxine et la colistine sont des antibiotiques qui altèrent la membrane plasmique en formant des pores (sortie de phosphate vers le milieu extérieur). Ces antibiotiques agissent comme des agents tensio-actifs. Ils ont la capacité de se fixer sur les phospholipides provoquant la rupture des barrières osmotiques.

Antibiotiques actifs contre la synthèse de protéines.

Le cytoplasme des bactéries est particulièrement riche en ARN ribosomal. Les ribosomes constituent 40% du poids sec de la bactérie et 90% de l'ensemble de l'ARN. Le ribosome est divisé en 2 sous-unités ; la sous-unité 30S contenant l'ARN r16S (cible d'aminosides et de cyclines) et la sous-unité 50S contenant l'ARNr23S (cible du groupe MLS et des phénicolés). Le ribosome est considéré comme l'unité centrale de la synthèse protéique de la bactérie (Di Giambattista and Cocito 1988)

Les antibiotiques sont capables d'inhiber la synthèse protéique par des mécanismes d'action et des cibles différentes. Grâce à leur structure chimique, ils vont agir sur les différentes unités du ribosome

Actifs sur la sous-unité 30S du ribosome

- Ils agissent sur l'unité 30S du ribosome, au niveau de la protéine S12 (Bryskier 2005). Ils provoquent des erreurs de lecture du code génétique lors de la traduction des protéines. Ce mécanisme est caractéristique des aminosides. Par inhibition de la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique, ils empêchent la fixation de l'aminocyl-ARNt (Chopra et al. 2001) en agissant sur la sous-unité 30S du ribosome. Ce mécanisme d'action propre aux tetracyclines est très lié à sa structure chimique (Dax 1997 ; Mitscher 1978 ; Rogalski 1985). Son efficacité dépend aussi bien de son affinité pour sa cible que de son aptitude à franchir les barrières structurelles de la bactérie (Bryskier, 2005).

Actifs sur la sous-unité 50S du ribosome

- Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation, en agissant au niveau de la peptidyl transférase (Porse and Garrett 1999 ; Hansen et al. 2002) qui se trouve dans l'ARNr 23S (composant de la sous-unité 50S du ribosome) (Tenson et al., 2003). Ceci correspond au mécanisme d'action des Macrolides, Lincosamides et Streptogramines. Des modifications dans la sous-unité 23S, comme la méthylation « A2058 », sont les responsables de l'apparition de résistance dans ce groupe d'antibiotiques. (Weisblum 1995).
- Ils peuvent inhiber la réaction de peptidation. Par exemple, les Phénicolés réduisent l'activité catalytique de la peptidyltransferase.

Antibiotiques actifs sur les acides nucléiques

Comme tous les procaryotes, les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui contient toute l'information génétique de la bactérie. Il se réplique selon le schéma de Watson et Crick : chaque chaîne assurant la réplication de la chaîne complémentaire selon un mode semi-conservatif. L'ADN chromosomique est constitué d'une double hélice d'ADN circulaire, surenroulée grâce à l'action des topo isomérases.

La bactérie peut contenir aussi des éléments génétiques de petite taille. Ces éléments, appelés plasmides ne sont pas indispensables pour la bactérie en conditions normales. Les plasmides les plus connus sont le facteur sexuel (facteur F) et les plasmides de résistance aux antibiotiques (Facteur R).

Les constituants de l'appareil nucléaire sont la cible d'action de plusieurs antibiotiques :

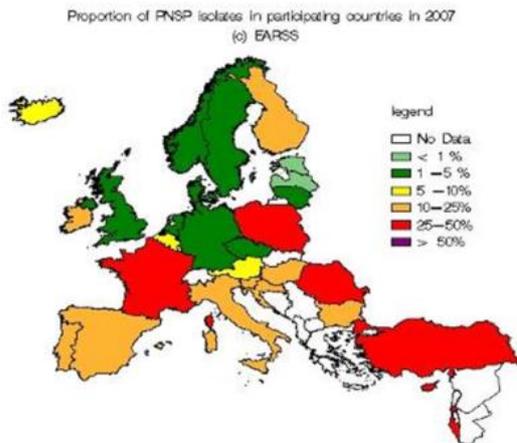
- action sur deux enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Cette inhibition est caractéristique des Quinolones et Fluoroquinolones.
- l'inhibition de la transcription de l'ADN en ARN messager par inhibition de l'ARN polymérase. Cette inhibition représente le mécanisme d'action des antibiotiques appartenant à la famille des Rifamycines.
- l'altération de l'ADN (coupures et substitution de bases). Les Nitrofuranes ont la capacité d'agir directement sur l'ADN.

1.4 Résistance bactérienne

Lorsque les antibiotiques sont apparus, le monde scientifique a pensé que les maladies infectieuses pouvaient être complètement maîtrisées. « L'ère d'or » des antibiotiques a duré moins d'un demi-siècle (1936-1962) (Guinoiseau 2011 ; Trémolières et al. 2006). Très vite, de nombreuses souches bactériennes sont devenues insensibles à un ou plusieurs antibiotiques. Ces résistances à des doses thérapeutiques apparaissent plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie (Bryskier 2005).

Pour citer quelques exemples, la résistance à la pénicilline qui est apparue pour la première fois en 1940 a été suivie par la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* dans les années 60 (Gallucci et al. 2006). *S.aureus* a été la première et la plus commune des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (Figure 3) (Campana et al. 2004).

S. pneumoniae et pénicilline G



S. aureus et méthicilline

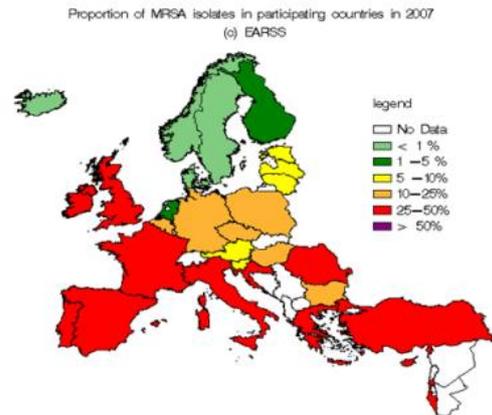


Figure 3 : Taux de résistance en Europe de *S.pneumoniae* pour la pénicilline G (gauche) et pour *S.aureus* pour la méticilline (droite). EARSS données 2007.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel et inévitable, qui s'accélère avec l'usage excessif et/ou inadapté des antibiotiques. Victimes de leur succès, les antibiotiques ont été utilisés pendant des années sans restriction, en pensant que si l'antibiotique n'était pas utile, au moins il ne serait pas nocif (Trémolières et al. 2006).

Parallèlement, les animaux d'élevage sont aussi des gros consommateurs d'antibiotiques. Cette consommation excessive, associé à l'usage vétérinaire et à l'usage humain, est responsable de l'apparition des résistances. Ainsi, les bactéries devenues multirésistantes chez l'animal peuvent se transmettre à l'homme par contact direct ou par voie alimentaire (Wegener et al. 2003) et transmettre leurs gènes de résistance aux souches d'origine humaine. Plusieurs études menées en Europe ont trouvé des taux relativement élevés d'entérocoques résistants aux glycopeptides chez l'homme sain (McDonald et al. 1997 ; Descheemaeker et al. 2000). Ce dernier s'est révélé un très important problème de santé publique aux USA.

1.4.1 Types de résistance

On peut distinguer deux types différents de résistance :

La résistance intrinsèque ou naturelle

Certaines bactéries sont naturellement résistantes à certains antibiotiques. Cette résistance peut être due à plusieurs causes : cibles absentes (mycoplasmes et β -lactamines), peu accessibles (bacilles à gram négatif et macrolides) ou non affines (bactéries à Gram positif et quinolones) (Lavigne 2007). Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques (Courvalin 2007).

La résistance acquise

Cette résistance apparaît chez des bactéries jusqu'alors sensibles aux antibiotiques, elle ne concerne que quelques souches d'une même espèce (Lavigne 2007) mais elle a la capacité de se propager très rapidement (Lozniewski and Rabaud 2010). Elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie par mutations (dûes au hasard) ou par acquisition de gènes (plasmides ou transposons) provenant d'autres bactéries (Davies and Davies 2010). Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (Levy and Marshall 2004) (Figure 4).

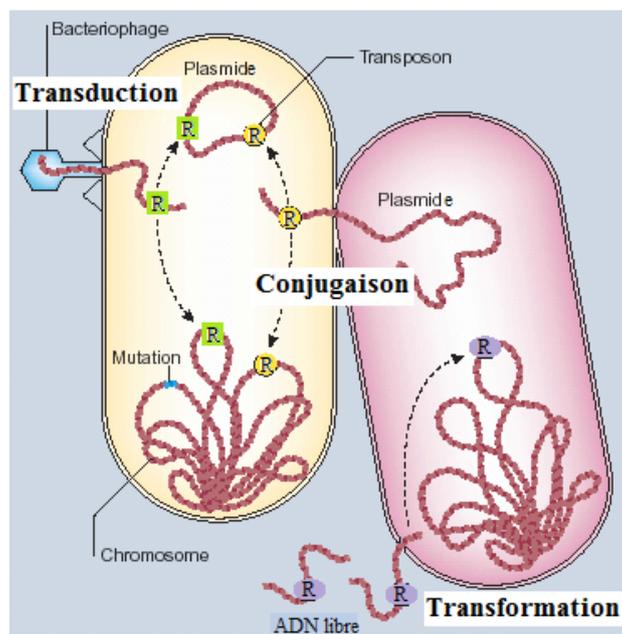


Figure 4: Principes d'acquisition génétique des bactéries (Levy and Marshall 2004).

1.4.2 Mécanismes de résistance

Il existe plusieurs mécanismes (Figure 5) permettant à la bactérie d'échapper à l'action de l'antibiotique :

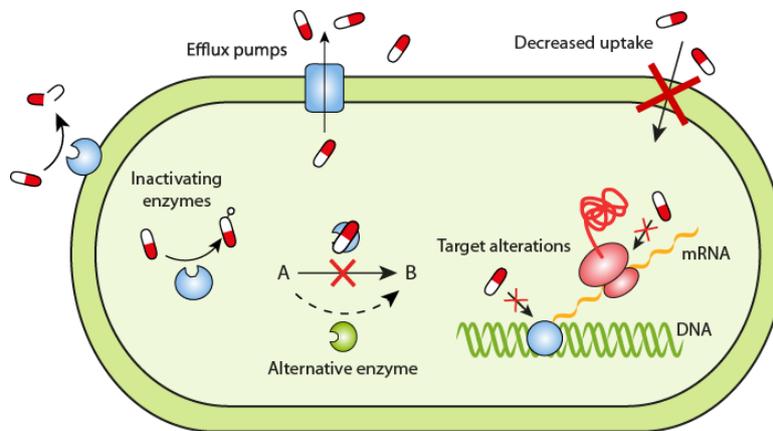


Figure 5 : Schéma des principaux mécanismes de résistance des bactéries

Altération des cibles des antibiotiques :

Avec une modification de leur structure, elles se rendent insensibles à l'action de l'antibiotique. C'est un des principaux mécanismes de résistance à la streptomycine, un des premiers antibiotiques utilisés pour le traitement de la tuberculose (Rabarijaona et al. 1999). Certaines bactéries ont développé la capacité de modifier ses PLPs, les souches de *S.aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont résistantes à l'ensemble des β -lactamines sont classées dans les BMR.

L'altération des membranes bactériennes :

La perméabilité des canaux membranaires par lesquels l'antibiotique pénètre dans la bactérie est altérée. Ce type de résistance peut apparaître aussi par diminution du diamètre des porines chez les bacilles à Gram négatif (Courvalin 2007). Il existe beaucoup moins de porines chez *A.baumannii* que chez *E.coli* ce qui rend *A.baumannii* 100 fois moins perméable qu'*E.coli* (Decré 2012). La membrane externe des bactéries à Gram négatif présente une face interne constituée de phospholipides et une face externe, constituée de Lipopolysaccharides (LPS) (Cronan et al. 1987) qui représentent 75% de la surface totale de la membrane externe. Les LPS ont une forte charge négative qui facilite le passage des antibiotiques cationiques. Certaines bactéries ont développé des mécanismes de résistance qui réduisent la charge négative nette des LPS (Helander et al. 1998).

INTRODUCTION GENERALE

L'inactivation enzymatique

La bactérie peut synthétiser des enzymes qui inactivent l'antibiotique. En 1940, a été publié le premier article sur la découverte d'une enzyme d'inactivation de type pénicillase chez *Bactérium coli* (Abraham and Chain 1940).

C'est le mode de résistance le plus répandu. On peut citer en particulier la production de β -lactamases (Hamouche and Sarkis 2012). Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation capables d'hydrolyser le cycle β -lactame en formant un complexe enzyme-substrat. Le produit final de la réaction aboutit à la formation de composés acides tels que l'acide pénicilloïque ou céphalosporoïque. Pour certaines bactéries comme *P.aeruginosa*, certaines de ces enzymes comme les céphalosporinases sont produites sur un mode inductible. Ainsi leur production augmente en présence de β -lactamines, puis diminue lorsque l'antibiotique est moins présent (Picard), contrairement à *A.baumannii* (Bou and Martinez-Beltran 2000).

β -lactamases de classe A	β -lactamases de classe B	β -lactamases de classe C	β -lactamases de classe D
↓	↓	↓	↓
Pénicillinase inhibée par l'acide clavulanique	Carbapénémases métallo enzyme inhibées par EDTA	Céphalosporinase inhibée par cloxacilline	Oxacillinases
↓	↓	↓	↓
Pénicillinase de <i>S.aureus</i>	Carbapénémases métallo enzyme inhibées par EDTA	Produite ou hyperproduite	Peu inhibée par l'ac.clavulanique
↓	↓	↓	↓
Pénicillinase de large spectre ¹ BGN (entérobactéries, aérobies strictes...)	Type NdM, VIM, IMP PSA <i>Acinetobacter</i> Entérobactéries	↓	Oxacillinases spectre étroit <i>Acinetobacter</i> PSA
BLSE ² BGN (entérobactéries, aérobies strictes..)		<u>Type AmpC</u> -Constitutif : <i>E.coli</i> , <i>Acinetobacter</i> -Inductible: Entérobactéries III PSA -Plasmidique : <i>Klebsiella</i>	Oxacillinases spectre large ou carbapénémases <i>Enterobactéries</i> (OXA 48) <i>Acinetobacter</i> PSA
Carbapénémases type KPC (entérobactéries...)			
-----	-----	-----	-----
Naturelle chromosomique ¹ <i>Klebsiella</i> (TEM) ² <i>Kluyvera</i> (CTX-M15)	Naturelle chrom. <i>St.maltophilia</i> (L2)	Naturelle chrom. Entérobactéries I, III PSA	

Tableau 1 : Types de β -lactamases d'après la classification d'Amblar

Il existe aujourd'hui des centaines de β -lactamases identifiées. Elles sont classées en 4 types de β -lactamases selon la classification d'Ambler (Tableau 1).

Les derniers β -lactamases identifiés sont carbapénemases qui présentent un très large spectre et sont capables d'inactiver les carbapénèmes, ainsi que la majorité des autres betalactamases.

Mise à part les β -lactamases, il existe d'autres enzymes comme les acétylases, les adénylases ou phosphorylases (fréquemment rencontrées chez *A.baumannii*) qui sont responsables de la résistance aux aminosides (gentamicine, amikacine ou tobramycine parmi d'autres) (Decré 2012)

Il existe néanmoins des molécules capables d'inhiber ces enzymes. L'acide clavulanique par exemple, est produit par *Streptomyces clavuligerus* (Brown et al. 1976) et est associé à l'amoxicilline pour donner l'Augmentin®, un des antibiotiques les plus vendus au monde (Grange et al. 1990 ; Stapleton et al. 1995). Le tazobactam (acide sulfone triazolylméthyl pénicillanique) (Aronoff et al. 1984) est associé avec la piperacilline (Bush et al. 1993).

L'excrétion active :

L'efflux d'antibiotiques a été observé pour la première fois avec la tétracycline à la fin des années 1970 (Levy and McMurry, 1978). Une fois entré dans la cellule bactérienne, l'antibiotique subit l'effet d'une pompe membranaire (de type transporteur) qui le rejette tel quel dans le milieu extérieur. Ce mécanisme est un des principaux mécanismes de résistance de *P.aeruginosa*. Il peut être exprimé par des nombreuses bactéries à Gram négatif ou à Gram positif dont des souches de *Staphylococcus* ou de *Streptococcus*.

Ce type de résistance est typique chez les macrolides et les tétracyclines. A la différence des bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif possèdent un nombre important de « transporteurs » d'antibiotiques, dont la plupart ont un spectre large (ce qui peut affecter à un grand nombre d'antibiotiques) (Mesaros et al. 2007).

Ainsi la surexpression de la pompe AdeABC présente dans 80% des souches d'*A.baumannii* (Nemec et al. 2004) implique une diminution de la sensibilité aux β -lactamases, aux aminoglycosides, aux fluoroquinolones, aux tétracyclines, à la tigécycline et au chloramphénicol (Magnet et al. 2001).

1.4.3 Les bactéries multi-résistantes (BMR)

Le terme « multi résistance », fait référence à une bactérie qui, du fait de l'accumulation de résistances naturelles ou acquises, n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques, et présente une résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques (Lozniewski and Rabaud 2010). Ces bactéries sont référencées par certains organismes comme le RIPIN (Réseau Inter-hospitalier de Prévention des Infections Nosocomiales), le C-CLIN (Comité de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales). Elles représentent 20 à 30% des infections nosocomiales (Godreuil et al.2007).

Les bactéries multirésistantes (BMR) concernent principalement les infections hospitalières. L'absence de BMR est un indicateur de qualité des établissements de santé (Secrétariat d'Etat à la Santé et à l'action sociale 1999). Les BMR peuvent aussi concerner les infections communautaires (Chen et al. 2009). L'association de plusieurs mécanismes de résistance a transformé des bactéries peu pathogènes en BMR comme *P.aeruginosa* ou *A.baumannii* (Hamouche et Sarkis 2012).

Parmi les BMR impliquées dans les infections nosocomiales nous avons sélectionnée quelques-unes qui ont fait l'étude de cette thèse, et qui font partie des quatre bacilles à Gram négatif les plus rencontrés en milieu hospitalier (Mulvey and Simor2009) :

Pseudomonas aeruginosa

Bactérie saprophyte présente en milieu aqueux. Ce bacille à Gram négatif est généralement une bactérie peu agressive mais peut devenir pathogène dans certains cas, surtout chez les patients immunodéprimés. Cette bactérie a la capacité de devenir très résistante aux antibiotiques.

Cette bactérie est responsable d'infections cutanées, iatrogènes, oculaires, ou digestives. On peut citer aussi les bronchopneumopathies (fréquentes chez les patients atteints de mucoviscidose, cancer ou leucémie). En cas d'infection grave ou multirésistante, le traitement de cette bactérie implique l'utilisation d'une bithérapie en associant une β -lactamine avec des carbapénèmes, aminosides ou fluoroquinolones.

Pseudomonas, a aussi la capacité de produire des pigments, ce qui l'a fait connaître sous le nom de bacille pyocyanique (« pus bleus »). Ces pigments sont des sidérophores (transporteurs de fer) (Neilands 1995), qui récupèrent le fer de l'environnement pour le

mettre à disposition de la bactérie, ce qui favorise la prolifération bactérienne (Guillot et al. 2000 ; Neilands 1995). Ces pigments peuvent promouvoir la production de radicaux libres d'oxygène par les globules blancs polynucléaires (éosinophile, neutrophile et basophile) (Guillot et al. 2000)

Entérobactéries

- *Escherichia coli* :

Bactéries commensales dont le chef de file est *E.coli*. *E.coli* est un bacille à Gram négatif de la flore intestinal de l'être humain. Si la plupart des souches d'*E.coli* sont inoffensives et sensibles à la plupart des antibiotiques, certaines peuvent être pathogènes et responsables de sévères infections urinaires, de gastro-entérites ou de septicémies. *E.coli* est naturellement sensible à la plupart des antibiotiques (Vu-Thien 1998). Néanmoins pour un grand nombre de souches *E.coli*, on observe des résistances aux pénicillines (De Mouy et al. 1996), aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), à l'amoxicilline + acide clavulanique et au céfixime (Goldstein et al. 1997). De nombreuses études ont montré que le mécanisme de résistance le plus souvent rencontré chez *E.coli* est la présence d'une pénicillinase plasmidique (De Mouy et al. 1996 ; Nguyen et al.1994 ; Weber et al. 1995 ; Stapleton et al. 1995).

- *Klebsiella pneumoniae*

Elle est surtout responsable d'infections des voies respiratoires. Elle s'est, dans les années 80-90, avérées résistantes à plusieurs antibiotiques comme les céphalosporines de 3^{ème} génération ou les aminosides, par acquisition de plasmide, mais restait sensible aux carbapénèmes. Dans les années 90 et concernant *Klebsiella*, 14% des souches étaient productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Ce taux est variable selon les pays et peut attendre des valeurs très élevées (Chen et al. 2009). Aujourd'hui, l'émergence de *Klebsiella* productrice de carbapénemases représente un danger de santé publique par le risque de dissémination de ces souches totorésistantes.

Acinetobacter baumannii

Il s'agit d'une bactérie opportuniste (Bergogne-Berezin et al. 1987 ; Bouvet and Grimont 1986 ; Glew et al. 1997) responsable d'infections nosocomiales, plus particulièrement dans

les services de réanimation (Drault et al. 2001) acquises essentiellement par transmission croisée.

Dans les années 70, *A.baumannii* était une bactérie peu pathogène et sensible à la plupart des antibiotiques. A partir des années 90, des souches résistantes ont été responsables de véritables problèmes épidémiques (Bergogne-Berezin et al. 1996 ; Bergogne-Berezin 1995 ; Bouvet and Joly-Guillou 2000).

Grâce à son grand pouvoir d'adaptation, *A.baumannii* a développé une grande diversité de mécanismes de résistance (enzymes d'inactivation, pompes à efflux ou imperméabilité parmi d'autres). L'étude de son génome a beaucoup apporté à la connaissance de ces mécanismes de résistance (Decré 2012). Ainsi, par exemple, cette bactérie possède dans son génome des gènes codant pour la production de β -lactamases (Decré 2012) qui ne s'exprime pas toujours (céphalosporinase, oxacillinase).

A.baumannii a développé des résistances aux antibiotiques par acquisition des gènes d'espèces plus ou moins proches ou des mutations. L'imipénème reste la β -lactamine de référence pour le traitement des infections à *Acinetobacter*.

Cependant, aujourd'hui de nombreuses souches sont résistantes aux carbapénèmes par production de carbapénémases. *A.baumannii* a développé aussi des résistances aux aminosides (mécanismes d'inactivation enzymatique ou d'efflux), aux fluoroquinolones (mutations au niveau des gènes à l'origine de l'ADN gyrase et la topoisomérase IV) ou à la rifampicine (systèmes d'efflux et gènes de résistance).

1.5 L'avenir de l'antibiothérapie

La résistance bactérienne aux antibiotiques représente l'un des plus importants problèmes rencontrés en thérapeutique hospitalière. Le nombre d'antibiotiques actifs se réduit et la résistance aux antibiotiques est donc devenu un problème de santé publique. L'idée de qu'il existera toujours des nouveaux antibiotiques commence à disparaître dans les années 90. Comme le déclare le microbiologiste Stuart Levy, « Il pourrait arriver un jour où les antibiotiques ne seront plus qu'un fait d'intérêt historique » (Levy, 1992).

L'industrie pharmaceutique s'est peu à peu désengagée de la recherche en antibiothérapie car peu rentable économiquement et peu de molécules nouvelles sont mis sur le marché depuis quelques années.

Une des questions que nous pouvons nous poser est de savoir si nous sommes capables de prévoir les résistances du futur, ce que nous n'avons pas su faire depuis l'apparition des antibiotiques.

Sommes-nous capables aujourd'hui de valoriser une molécule dont nous aurons besoin dans quelques années ? La recherche et le développement des nouveaux antibiotiques sont très coûteux et risqués. Il faut au minimum 10 ans d'investigation et plusieurs centaines de millions d'euros d'investissement avant la commercialisation d'un nouvel antibiotique (Trémolières et al. 2006, Cohen 2006).

Plusieurs chercheurs ont consacré des études à la recherche de nouvelles molécules d'origine végétale qui possèderait des propriétés antibactériennes. Des plantes utilisées dans la médecine ancienne, commencent à attirer l'intérêt des scientifiques qui trouvent dans leurs molécules chimiques, une nouvelle opportunité de lutter contre les bactéries.

2. LES COMPOSANTS DES HUILES ESSENTIELLES

Comme alternative aux antibiotiques conventionnels nous avons travaillé avec les composants aromatiques majoritaires des 3 huiles essentielles, le clou de girofle (l'eugénol), la cannelle (le cinnamaldéhyde), et l'origan (le carvacrol). Ces HE ont été sélectionnées par l'entreprise Eydo pharma.

Les HE sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires, volatiles, (Kalemba and Kunicka, 2003), complexes et variables. Les HE sont connues pour leurs propriétés antiseptiques (bactéricide, virucide, fongicide, antiparasitaire), anti-inflammatoires, analgésiques, localement anesthésiantes, spasmolytiques, anticongestives, antihistaminiques, anticonvulsivantes, anticancérogènes, anti-mutagéniques, anti-oxydantes) (Yoo et al. 2005, Bakkali et al.2008).

Certaines huiles essentielles semblent également avoir un effet virucide même si elles ne sont applicables qu'à un nombre réduit de souches virales (Degryse et al. 2008).

En général, leur activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Tegos et al. 2002 ; Lewis and Ausubel, 2006), raison pour laquelle les concentrations nécessaires pour exercer une action bactérienne sont plus élevées. Entre 100µg/mL et 1000µg/mL pour les huiles essentielles et de 0.01µg/mL 10µg/mL pour les antibiotiques (Guinoiseau 2011 ; Tegos et al. 2002).

Elles sont présentes dans tout le règne végétal, néanmoins elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : conifères, rutacées, ombellifères, myrtacées et labres.

Dans la plante, les huiles essentielles ont des rôles bien particuliers (attraction des insectes pollinisateurs, action répulsive dur les prédateurs, inhibitions de la germination ou même communication entre végétaux par émission de signaux chimiques), permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement.

Même si les huiles essentielles ont été déjà utilisées par les Grecs ou les Egyptiens dans l'antiquité, c'est à partir des années 60 que l'industrie commence à s'y intéresser surtout pour la parfumerie ou même des produits alimentaires.

Selon la définition de la norme française NF T75-006 (AFNOR, 1980) (Association Française de NORmalisation), l'huile essentielle est « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche » (Pibiri. 2005). Cette définition exclut les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants ou par des autres procédés (Bruneton 2005) La norme NF T75-002 définit les règles générales d'étiquetage et de marquage pour les récipients contenant les HE.

Les HE peuvent être extraites de tous les organes de la plante ; des sommités fleuries, des racines ou rhizomes, des écorces, du bois, des fruits, des graines ou des feuilles. La plante élabore les huiles essentielles au sein du cytoplasme de certaines cellules, elles se séparent par synérèse (séparation du liquide d'un gel) sous forme des petites gouttelettes et elles sont stockées dans des structures spécialisées (cellules à huile essentielle, cellules à poils excréteurs ou canaux excréteurs).

L'entraînement à la vapeur

C'est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, elle repose sur le principe de la distillation, les plantes sont mises dans une cuve remplie d'eau et portée à ébullition. (Bruneton 2005). Les vapeurs sont condensées et les huiles séparées par différence de densité.

Pression à froid

Très utilisée pour extraire l'huile essentielle des agrumes, les fruits sont pressés à froid et l'huile essentielle est séparée du jus par centrifugation

2.1 Composition chimique des HE

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de parfois plus de 100 molécules qui peuvent être des composants aliphatiques de faibles poids moléculaires (alcane, alcène, aldéhyde, cétone...), monoterpènes, sesquiterpènes et phénylpropanes. Le nombre des molécules chimiques distinctes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, c'est-à-dire, composés d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de rose) (Bauer et al. 2001) (Burt. 2004). Les HE sont homogènes ou hétérogènes dans leur composition au regard de la structure chimique des composés.

Du point de vue chimique les huiles essentielles peuvent se classer en fonction de leur nombre d'atomes de carbone :

Monoterpènes (C10) et sesquiterpènes (C15)

Les terpènes sont des hydrocarbures d'origine naturelle, formés à partir d'unités l'isoprène (C_5H_8) (2-méthylbutadiène) (Figure 7), la grande majorité des terpènes proviennent du règne végétal, mais on peut aussi les retrouver chez les animaux sous la forme de phéromones ou hormones chez certains insectes.

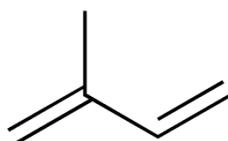


Figure 7 : Formule chimique de l'isoprène (unité principal des terpènes) (2-méthylbutadiène)

Les monoterpènes sont les constituants les plus simples des terpènes. Ils sont formés à partir du couplage de deux unités d'isoprène. Le carvacrol est classé dans les groupes des monoterpènes de la même manière que d'autres substances comme le géraniol ou le menthol.

Ces molécules sont des terpènes de 10 à 15 atomes de carbone dérivés synthétiquement du geranylpyrophosphate (GPP) pour les monoterpènes et du farnesylpyrophosphate (FPP) pour les sesquiterpènes (Martinez 2001). Ils sont classés aussi par rapport au nombre de leurs cycles présents dans leurs structures (acycliques, monocycliques, bicyclique, etc.).

Les monoterpènes et en général tous les composés terpéniques naturels, se biosynthétisent à partir de l'acetylCoA à travers d'un intermédiaire commun qui est l'acide mévalonique (Mcgarvey and Croteau 1995). Néanmoins, récemment il a été montré que certains terpènes se synthétisent pas une voie différente qui implique le pyruvate, le glyceraldéhyde-3-phosphate et un intermédiaire de 5 atomes de carbone : 1-désoxy-xylulose-5-phosphate (Adam and Zapp 1998).

Phénilpropènes

A ce groupe, appartiennent des molécules comme le cinnamaldéhyde ou l'eugénol. Ces molécules se caractérisent par un benzène attaché à une chaîne de trois carbones et qui dérivent de l'acide shikimique (Figure 8), isolé pour la première fois de la plante asiatique Illicium.

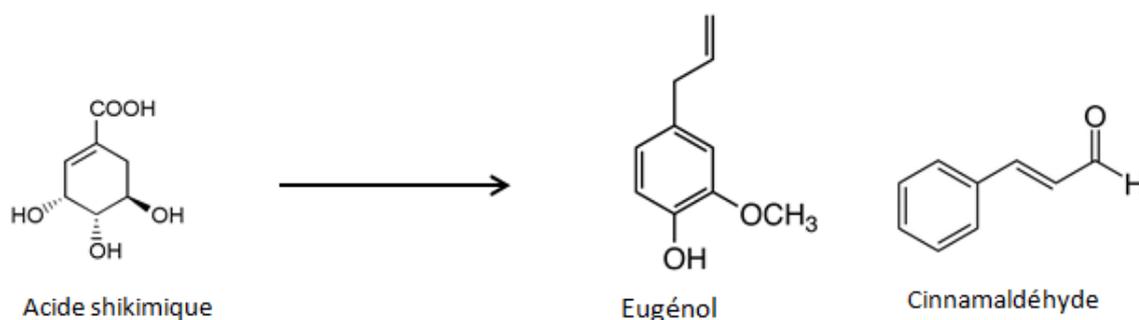


Figure 8 : Synthèse de l'eugénol et du cinnamaldéhyde à partir de l'acide shikimique

Cette chaîne peut se présenter dans des différents états d'oxydation. Dans notre cas, nous avons un groupe méthyle avec une insaturation pour l'eugénol et un aldéhyde pour le cinnamaldéhyde.

Le cycle aromatique peut être substitué dans les carbones 3, 4 et 5 (comme dans le cas de l'eugénol qui présente un groupement hydroxyle dans le C4 (para) et un groupement méthoxy dans le C3 (méta)).

Le carvacrol (5-isopropyl-2-méthylphénol) est un composé phénolique (Edwin et al. 2006) appartenant à la famille des monoterpènes. L'eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol) fait partie

des dérivés du phénylpropane. Les phénols sont des composés chimiques aromatiques portant une fonction hydroxyle. Ce sont des acides faibles ($pK_a \approx 10$). Leur mésomérie, due au cycle aromatique, leur confère une grande stabilité. Ce même cycle possède une forte électronégativité due à l'environnement trigonal du carbone de la liaison R-OH (Organique BCPST 1&2, des biomolécules aux médicaments, 2011).

Le cinnamaldéhyde ((*2E*)-3-phenylprop-2-enal) appartient à la famille des phénylpropanes, qui se caractérisent par un cycle aromatique lié à une chaîne de 3C, toutes ces molécules dérivent de l'acide shikimique

L'huile essentielle de cannelle contient du cinnamaldéhyde et de l'eugénol (Ross 1976 ; Angmor et al. 1972). Elle contient aussi des résines cyanogéniques et de l'acide hydrocyanique qui possèdent des propriétés antibactériennes. Le cinnamaldéhyde est très actif contre de nombreuses bactéries à Gram négatif et Gram positif ;

Le composé possède de nombreuses propriétés : anti-microbien, anti-infectieux intestinal, anti-parasitaire antifongique, stimulant de l'activité cardiaque et de la motricité gastro-intestinale. C'est aussi un anti-infectieux urinaire.

Le cinnamaldéhyde, lorsqu'il est concentré, irrite la peau et peut s'avérer toxique s'il est présent en grandes quantités, mais il ne semble pas cancérigène.

Ce composé fait partie des aldéhydes et dérive du phénylpropane. L'atome de carbone de la double liaison C=O (délocalisation des électrons de la liaison π sur l'oxygène) est électrophile et réagit avec les donneurs d'électrons (Chimie Organique BCPST 1&2, des biomolécules aux médicaments, 2011).

Chez *E.aerogenes*, le cinnamaldéhyde a la capacité de se fixer aux protéines intracytoplasmiques par une inactivation des aminoacides décarboxylases (Wendakoon et Sakaguchi, 1995) et d'interférer avec les mécanismes de régulation du quorum-sensing (Niu et al., 2006). Ce *quorum-sensing* correspond à l'ensemble des mécanismes régulateurs qui contrôlent l'expression de certaines bactéries au sein d'une même population (Miller and Bassler 2001).

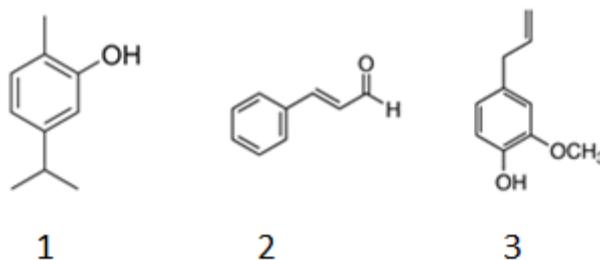


Figure 9 : Structure chimique du carvacrol (1), du cinnamaldéhyde (2) et de l'eugénol (3)

2.2 Mode d'action des huiles essentielles

Même si les propriétés antibactériennes des huiles essentielles ont été très largement utilisées dans le passé, les mécanismes d'action n'ont pas été complètement élucidés.

L'action bactéricide des huiles essentielles, tient autant de leur structure chimique que de leurs composants, que de leur proportion ou des interactions qui peuvent exister entre eux (Burt. 2004). Etant donné la grande variabilité de structure chimique des composants majoritaires des huiles essentielles, il est probable que leur activité antibactérienne résulte de l'association de plusieurs mécanismes, qui s'exercent sur différents cibles cellulaires (Burt. 2004). Les principaux mécanismes antimicrobiens sont :

La perméabilisation de la membrane plasmique

Grâce à sa nature lipophile, une huile essentielle a la capacité de s'insérer dans les acides gras de la membrane des bactéries, en perturbant leurs fonctions vitales (Carson et al. 2006 ; Sikkema et al. 1994). Le carvacrol semble augmenter la perméabilité membranaire (Lambert et al. 2001) en détruisant aussi la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Helander et al. 1998).

Les pertes ioniques

L'altération de la membrane bactérienne peut aussi avoir des conséquences sur le bilan ionique de la bactérie, la fixation aux protéines et enzymes membranaires peut conduire à l'inhibition des enzymes catalytiques de la membrane (chaîne respiratoire) et des pompes à efflux (mécanismes de résistance). La fuite de protons provoque donc une chute de la force motrice ce qui entraîne une diminution de la synthèse d'ATP intracellulaire (Ultee et

Smid 2001). Ce mécanisme est caractéristique du cinnamaldéhyde, du carvacrol ou de l'eugénol (Gill and Holley 2004, 2006)

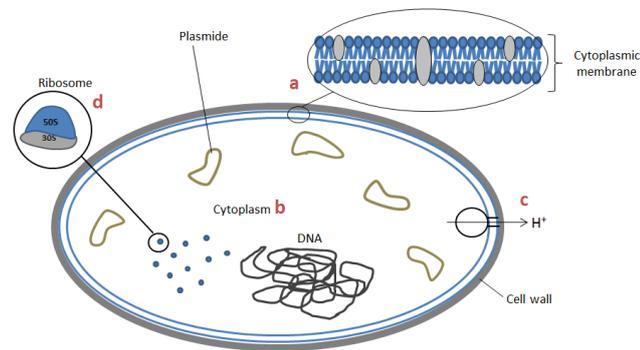


Figure 10 : Schéma des mécanismes d'action des huiles essentielles

Le carvacrol

Malgré les études menées ces dernières années, les mécanismes d'action du carvacrol n'ont pas complètement été élucidés (Veldhuizen et al. 2006). Son hydrophobicité favorise son interaction avec la membrane bactérienne.

Il a été montré une capacité à altérer la membrane de la bactérie en affectant à la fois, la force motrice des protons et le gradient de pH et le flux d'électrons à travers la membrane (Ultee et al. 2002 ; Helander et al. 1998).

Le cinnamaldéhyde

Le mécanisme d'action du cinnamaldéhyde a été décrit pour la première fois par Wendakoon et Sakaguchi en 1995, où le groupement carbonyle du cinnamaldéhyde se fixe aux protéines bactériennes ce qui empêche l'action des acides aminés décarboxylase (Wendakoon et Sakaguchi. 1995).

Des nombreuses études ont prouvé qu'il existe un effet synergique entre le cinnamaldéhyde et d'autres terpènes présents dans les huiles essentielles, telles que le thymol, le carvacrol ou l'eugénol. Dans une étude menée par Moleyar et son équipe, un effet synergique entre le cinnamaldéhyde (250µg/mL) et l'eugénol (500µg/mL) a été observé chez *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* et *Enterococcus* (Moleyar et al. 1992). L'équipe de Zhou a montré que l'utilisation combinée du cinnamaldéhyde avec le thymol et/ou le carvacrol avait un fort effet synergique (Zhou et al. 2007). Le thymol et le carvacrol vont désintégrer la membrane

des bactéries à gram négatif, libérer les lipopolysaccharides (LPS) et augmenter la perméabilité de la membrane cytoplasmique pour l'ATP (Lambert et al. 2001).

Le thymol et le carvacrol semblent faciliter le passage du cinnamaldéhyde à travers la bactérie. De plus le thymol et le carvacrol pourraient augmenter le nombre, la taille et la durée d'existence des pores créés par la liaison du cinnamaldéhyde aux protéines de la membrane bactérienne (Zhou et al. 2007)

3. LA NANOENCAPSULATION

Les nouvelles techniques de formulation innovante travaillent dans le développement des systèmes colloïdaux, et parmi eux, la nanotechnologie commence à prendre de l'ampleur. De nos jours des laboratoires pharmaceutiques ou cosmétologiques s'intéressent aux nanotechnologies dans le but de délivrer d'une manière plus ciblée leur principe actif.

Dans cette thèse nous avons utilisé des systèmes nanoparticulaires dans le but de protéger nos composants terpéniques et permettre leur administration par voie intraveineuse. Etant donné les caractéristiques lipophiles de ces composants, nous avons fait le choix de les nano encapsuler. Grâce à une action plus ciblée, les nano-vecteurs ont pour objectif une meilleure efficacité thérapeutique tout en réduisant la dose de médicaments utilisés pour réduire les effets secondaires.

3.1 Objectifs de la vectorisation. « Le vecteur idéal »

Lorsqu'un nanovecteur est administré dans l'organisme, il doit franchir différentes barrières pour pouvoir exercer son effet.

Un des rôles principaux de l'encapsulation est de protéger le principe actif avant qu'il n'arrive à sa cible. Le principe actif, des huiles essentielles dans notre cas, est encapsulé à l'intérieur de ces vecteurs afin d'éviter sa dégradation et en raison de son caractère lipophile, pour pouvoir l'administrer dans le corps humain.

Une fois que les vecteurs ont pénétré dans l'organisme, ils peuvent être pris en compte par le système immunitaire (notamment les macrophages).

Les macrophages sont des cellules sanguines responsables de la protection de l'organisme en détruisant les agents pathogènes ou étrangers. Ces derniers activent ainsi le système

immunitaire, raison pour laquelle les nanocapsules doivent être furtives à fin de prolonger leur temps de circulation dans le sang.

La phagocytose est le mécanisme par lequel certaines cellules sanguines comme les monocytes ou les macrophages, englobent et digèrent les corps étrangers (bactéries, déchets cellulaires, particules, etc.). Ces cellules possèdent des récepteurs pouvant reconnaître des particules comme étrangères (Socha 2007)

De façon usuelle, une des manières de rendre furtif un nanovecteur est la pégylation. La pégylation consiste à recouvrir la surface de la nanocapsule avec des chaînes de polyéthylène glycol (PEG). Le polyéthylène glycol (Figure 11) est un polymère hydrophile. Dans notre cas, les chaînes d'oxyde d'éthylène (provenant de la molécule tensioactive : hydroxy stéarate de PEG 660) sont déjà présentes à la surface de la nanocapsule et sont capables de rendre furtive la nanocapsule vis-à-vis des macrophages comme cela a pu être montré dans plusieurs études, *in-vivo* et *in-vitro* (Perrier et al. 2010 ; Morille et al. 2010)

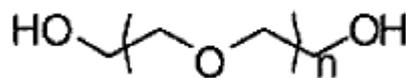


Figure 11: Formule chimique du polyéthylène glycol

Le « vecteur idéal » doit permettre :

- de protéger le principe actif encapsulé de la dégradation,
- d'être furtif afin d'éviter son élimination par le système immunitaire,
- d'atteindre la cible,
- de délivrer le principe actif intact afin de permettre une action thérapeutique.

3.2 Les différents types de nanovecteurs

Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques (Bangham et al. 1965 ; Lorin et al. 2004) avec un cœur aqueux (Perrier 2010). Les liposomes peuvent être classés selon leur taille et leur structure. Les liposomes sont relativement aisés à préparer et ils sont utilisés dans l'industrie cosmétologique et

pharmacologique en tant que vecteurs, pour la délivrance de principes actifs ou même des vaccins.

Micelles

Les micelles sont des nano-assemblages composés de molécules amphiphiles (avec une tête polaire et une chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur dans le cas d'une phase externe aqueuse). Elles sont capables de s'auto-organiser en formant des structures de topologies variables à partir d'une concentration donnée appelée concentration micellaire critique (CMC). Au-dessus de cette concentration, elles se forment spontanément.

Nanoparticules polymériques

Les nanosphères sont constituées par un cœur polymérique solide, pouvant être cristallin dans le cas de nanoparticules lipidiques solides.

Dendrimères

Il s'agit des polymères ramifiés constitués par des monomères autour d'un cœur central. Après quelques générations, le dendrimère prend une forme sphérique. Ces dendrimères ont des propriétés particulières de solubilité, viscosité et stabilité thermique.

3.3 Les nanocapsules au cœur lipidique

Nous nous sommes spécialement intéressés à la formulation des nanocapsules à cœur lipidique (NCL) développées au début des années 2000, au sein du laboratoire Inserm 1066. Ces nanoparticules présentent plusieurs avantages qui font d'elles un bon choix pour la vectorisation de principes actifs lipophiles tels que les huiles essentielles avec lesquelles nous travaillons.

Elles sont constituées d'un cœur huileux de triglycérides (Labrafac®) et d'une coque rigide hydrophile constituée de lécithine et de chaînes de PEG, le solutol® HS15 (PEG 660 et de l'hydroxystéarate de PEG 660 dans des proportions 30/70).

La lécithine de soja (Lipoïd) est ajoutée en tant que co-tensioactif pour rigidifier la coque (Allard 2008).

Le NaCl a un rôle sur la température d'inversion de phase qui permet de les formuler: plus la quantité de NaCl est élevée, plus la température d'inversion de phase est réduite (Allard 2008)

Ces nanocapsules de tailles monodisperses et contrôlables dans une gamme (20nm, 200 nm) sont fabriquées par la technique d'inversion de phase de systèmes émulsionnés. Ainsi le protocole de fabrication ne comporte pas de solvants organiques et correspond à un procédé de basse énergie non dénaturant pour les actifs quand bien même on réussit à prouver que les huiles supportent les variations thermiques nécessaires à leur encapsulation. Depuis les années 2000, ces objets colloïdaux ont été valorisés par plus de 200 publications et par 6 brevets.

3.3.1 Encapsulation des huiles essentielles

Jusqu'à présent, les huiles essentielles sont classiquement administrées par inhalation à l'aide de diffuseurs (à froid ou chauffants) ou des diffuseurs électriques.

Ces derniers sont dotés d'une pompe qui nébulise les huiles essentielles qui sont alors transformées en microparticules (typiquement 0.5µm) facilement inhalables.

De ce fait, la voie respiratoire reste une des voies les plus favorables pour administrer des huiles essentielles à l'organisme.

La voie cutanée est un autre moyen d'administration très utilisé avec les huiles essentielles, par massage à une concentration de 5-10% (elles ont des propriétés anti-inflammatoires contre les affections musculaires ou tendineuses), elles peuvent être également utilisées dans des bains (pré-diluées dans du gel de douche ou de l'alcool)

L'industrie cosmétique développe de plus en plus des crèmes, avec dans ses composants, des petites quantités d'huiles essentielles pour favoriser la cicatrisation (huile essentielle de lavande) (Vakilian et al. 2011), ralentir le vieillissement de la peau (huile essentielle de *Tagetes erecta*) (Leelapornpisid et al. 2014) ou même traiter la couperose ou l'acné (huile essentielle de citron, de gingembre ou de basilic) (Lertsatitthanakorn et al. 2006).

La voie orale reste une voie assez directe et très utilisée surtout lorsque les huiles essentielles sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire en tant que conservateurs ou antibactériens (Badei et al. 2002 ; Burt 2004 ; Hulin et al. 1998).

INTRODUCTION GENERALE

Un des buts de cette thèse est d'utiliser la voie intraveineuse pour l'administration des huiles essentielles nanoencapsulées. Ce travail n'est pas le premier essai d'encapsulation des huiles essentielles utilisant des nanoparticules sphériques. On peut citer des nanoparticules de zéine (principale protéine du maïs qui possède en plus des propriétés antibactériennes) (Parris et al.2005 ; Carlin et al. 2001).

On peut citer aussi les cyclodextrines, molécules d'origine naturelle permettant d'encapsuler des molécules (Marques 2010) grâce à leur structure en cage. Les cyclodextrines sont capables d'encapsuler des substances hydrophiles et lipophiles en formant des complexes d'inclusion.

On peut citer aussi les procédés d'atomisation (Spray-dried encapsulation) (Beristain et al. 2001) ou micellaires (Donsi et al. 2011 ; Gaysinsky et al. 2005). Finalement on trouve aussi des procédés impliquant des nanoémulsions. (Liang et al. 2012 ; Sakulku et al. 2009) ou des microémulsions (Gaysinsky et al. 2007)

Notre méthode semble une bonne alternative pour l'encapsulation des composants de nature lipidique comme le sont le carvacrol, le cinnamaldehyde ou l'eugénol. Dans le processus d'encapsulation il faut tenir compte du fait que les huiles essentielles sont des substances très sensibles à l'oxydation, la lumière et la chaleur.

Comme le reste des huiles, elles sont insolubles dans l'eau, et dispersibles dans des solvants organiques comme le diméthyl sulfoxyde (DMSO) ou dans d'autres huiles végétales comme le Labrafac® (portion huileux utilisé dans la formulation des NCL).

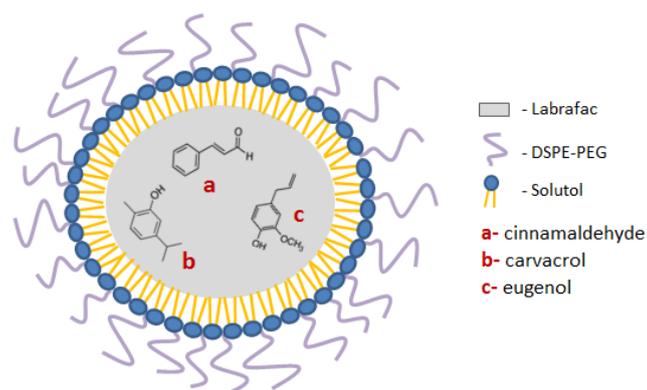


Figure 12: Image schématique d'une nanoparticule lipidique (LNC)

OBJECTIFS DE LA THESE

Eydo pharma, créée en 2004, sous le nom d'Aromatechnologies est une entreprise spécialisée dans l'élaboration de nouveaux modes d'administration médicamenteux (drug delivery system) issus de l'ingénierie du végétal.

Cette entreprise a commencé ses recherches dans le secteur de la nutrition animale (Coopérative des Fermiers de Loué) grâce à des solutions contenant un mélange de trois huiles essentielles (origan, cannelle et clou de girofle) contre les maladies parasitaires des galliformes.

En 2004, Aromatechnologies a mis en place une collaboration avec une unité INSERM (UMR-S 1066 Micro et Nanomédecines Biomimétiques (MINT), Jean-Pierre Benoît et Patrick Saulnier) et le CHU d'Angers (GEIHP Equipe de bactériologie, Marie-Laure Joly-Guillou) qui lui a permis d'opérer dans deux domaines. Le premier est axé sur le biopharmaceutique et les nanomédecines et le deuxième, l'utilisation des huiles essentielles comme alternative aux antibiotiques conventionnelles.

C'est grâce à cette union que 3 thèses doctorales se sont proposées : une première en 2009 avec la doctorante Tram Pham et 2 autres en 2012 menées par Angélique Montagu et moi-même. En 2013, Aromatechnology changera son nom par Eydo et se divisera donc dans 2 grands groupes, Eydo pharma et Eydo ingredients.

Les objectifs de cette thèse qui sont aussi les objectifs d'Eydo pharma, se sont basés sur 4 points principaux :

a) **Développer des nanoparticules pour l'administration des composants terpéniques des huiles essentielles.**

Dans un premier temps nous cherchons à encapsuler des composants terpéniques au cœur des nanocapsules lipidiques, et trouver la formulation la plus stable et efficace avec un ou plusieurs principes actifs (eugénol, carvacrol et cinnamaldéhyde).

Cette partie de la thèse a été commencée par Tram Phan qui travaillait avec une association de trois huiles essentielles (huile de cannelle, huile d'origan ou huile de clou de girofle).

Dès le début de cette thèse, la continuité de ces études ont été menées parallèlement avec Angélique Montagu en travaillant principalement avec les composants purs des huiles

essentielles utilisées par Tram (eugénol, cinnamaldéhyde ou carvacrol). Notre objectif personnel a donc été :

b) Tester *in-vitro* l'efficacité de ces nanocapsules et en étudier la synergie d'action lors de leur association avec des antibiotiques.

Nous avons testé l'efficacité des NCL *in-vitro* par des différentes méthodes comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la cinétique de bactéricidie sur 24 heures, seuls mais aussi en association avec des antibiotiques dans le but de mettre en évidence une alternative vis-à-vis la résistance aux antibiotiques. Avant d'envisager les associations avec les antibiotiques, une revue bibliographique a été réalisée afin de mieux connaître l'état de l'art sur ce sujet

c) Tester *in-vivo* l'association NCL-antibiotiques

Dans un dernier temps, nous testeront *in-vivo* les associations qui se sont avérées synergiques, sur un modèle de sepsis (screening) et dans un modèle de pneumopathie sur la petite souris.

d) Etudier les interactions et les propriétés de surface des nanocapsules et des bactéries.

Grâce à l'utilisation de différentes méthodes comme la mobilité électrophorétique ou l'angle de contact, nous essayons de comprendre les propriétés de surface des bactéries à gram négative surtout lors qu'elle rentre en contact avec nos nanocapsules. Ces études vont nous permettre de mieux connaître le mode d'action des nanocapsules vis-à-vis des bactéries.



TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Revue soumise à : Journal of Medicinal Plants Research

Manuscript number: JMPR/17.11.15/6013

A review of interactions between antibiotics and essential oils: research on synergetic effects using mixed linear regression

Abstract

Essential oils have long been used in traditional medicine due to their antibacterial, anti-inflammatory and analgesic properties. The indiscriminate use of antibiotics and the subsequent rise in resistance constitute a public-health problem. Some essential oils have antibacterial properties and could act synergistically with antibiotics. The combination of antibiotics and essential oils could enhance antibacterial efficacy and limit the emergence of resistance. The aim of this work was to compile and identify combinations proposed in the literature. Then, mixed linear regression was used to identify the best combinations. The results suggest that the most commonly synergistic combinations involve antibiotics with effects on protein synthesis or DNA replication as opposed to effects on the cell wall (OR=0.232, p-value=0.1077); however, the synergistic effects are enhanced when antibiotics active against the cell wall are used in combination with aromatic ethers (*ROR*) (OR=49.979, p-value: 0.1113).

A review of interactions between antibiotics and essential oils: research on synergetic effects using mixed linear regression

Chantal Valcourt^a, Jérémie Riou^{a,d}, Elisabeth Rossines^c, Marie Laure Joly-Guillou^{b,f}, Patrick Saulnier^{a,d,e}

^a INSERM U1066, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, IBS CHU, 4 Rue Larrey, F-49933 Angers, France

^b Department of bacteriology. University Hospital of Angers, 4 Rue Larrey, F-49933 Angers, France

^c Eydo pharma company. 41 rue Noel Ballay, 28000 Chartres

^d LUNAM Université, INSERM UMR-S U1066, MINT, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, 4 Rue Larrey, 49033 Angers, CEDEX 09, France

^e Angers University Hospital, CHU Angers, 4 rue Larrey, 49033 Angers, CEDEX 09, France

^f ATOMyCA CRCNA Inserm U892, 6299 CNRS

Chantal Valcourt: chantal.valcourtsainz@gmail.com, 4 Rue Larrey, F-49933 Angers, France, 00(33) 02.44.68.85.65

List of abbreviations:

ATP: Adenosin triphosphate

CFU: Colony-forming units

EO: Essential oils

EU: European Union

FDA: Food and drug administration

FIC: Fractional inhibitory concentration

GRAS: Generally Regarded As Safe

MIC: Minimum inhibitory concentration

MID: Minimum inhibitory dose

Introduction

Antibiotic resistance is increasing steadily around the world and represents a major public-health challenge. New antimicrobial strategies are needed, but there are few promising options in development. The pharmaceutical industry is producing fewer new antibiotics than in the past, and political action should be taken to better control their use.

The intensive use of antibiotics in the last past 70 years is one of the main drivers of the widespread emergence of bacterial resistance (Barton, 2000; Sengelov et al., 2003).

Resistance to penicillin, first observed in the 1940s, was soon followed by methicillin resistance in *Staphylococcus* in the '60s (Gallucci et al., 2006). The European Union (EU) has banned the use of antibiotics as growth promoters. The animal-feed industry is under increasing consumer pressure to reduce their use as feed additives and to find substitutes (Hertrampf, 2001; Humphrey et al., 2002).

Nevertheless, the development of new analogues of known antibiotics, e. g., oxazolidinones, glycopeptides, quinolones, aminoglycosides, tetracyclines and ketolides (Theuretzbacher, 2011) contributes to selection for antibiotic resistance.

Novel non-antibiotic approaches are needed. Antibiotic resistance involves various complex mechanisms and is common in the environment. It can be natural (intrinsic) or acquired, arising *de novo* through mutation or appearing through the transfer of genetic material (plasmids, integrins) from a resistant bacterium (Hemaiswarya et al., 2008). One of the most important resistance mechanisms is the synthesis of enzymes that selectively target, destroy or modify antibiotics (Hemaiswarya et al., 2008).

The antimicrobial properties of plants have been investigated by researchers around the world, especially in Latin America (Anesini and Perez, 1993).

The use of antibiotics in combination with essential oils could improve their efficacy (Hemaiswarya et al., 2008; Rosato et al., 2008, 2009). For example, recent studies have shown that compounds derived from plants can inhibit efflux pumps, which are involved in antibiotic resistance in many species (Smith et al., 2007). These compounds also limit the ability of the bacteria to form biofilms, which protect bacteria from antibiotics via a physical barrier composed of exopolysaccharides (Lynch and Robertson, 2008).

This review aims to compile studies examining combinations of essential oils and antibiotics to develop novel antibacterial strategies to and combat antibiotic resistance.

Materials and Methods

Essential oils and components

Essential oils (EOs) are complex volatile aromatic mixtures extracted by distillation of plant material that were first developed in medieval Arabia (Bakkali et al., 2008). EOs are known for their antiseptic (bactericidal, virucidal, fungicidal), anti-inflammatory, analgesic, local anesthetic, antispasmodic, anticongestive, antihistamine, anticonvulsant, anti-carcinogenic, anti-mutagenic, and anti-oxidant properties, among others (Bakkali et al., 2008; Yoo et al., 2005).

Essential oils stimulate the digestive system in animal models, increasing the production of digestive enzymes and enhancing liver function (Langhout, 2000; Williams and Losa, 2001).

In nature, essential oils play an important role in protecting plants against grazers, insects and other herbivores. They also may attract other insects to favour the dispersion of pollens and seeds. They can be synthesised by all plant organs (Bakkali et al., 2008).

EOs are liquid, volatile, colourless, soluble in lipids and organic solvents (such as dimethyl sulfoxide) and generally less dense than water (Bakkali et al., 2008). They are usually complex mixtures that may have more than 100 components and often contain 20-60 components in various concentrations (Yap et al., 2013).

Essential oils containing a high percentage of phenolic compounds, such as carvacrol, eugenol or thymol, have the most significant antimicrobial properties. Their mechanism of action is similar to that of other phenolic compounds. They commonly derive their antimicrobial activity from alcohols and aldehydes.

Essential oils are produced through steam distillation or mechanical expression. During distillation, water condensate is separated by gravity, leaving a very small amount of EO (Yap et al., 2013).

Components of plant extracts such as thymol, eugenol and carvacrol mainly act by disrupting the cell membrane, leading to cell lysis and leakage of cell contents (Burt, 2004). Many components also inhibit ATPase activity (Negi, 2012; Raybaudi-Massilia et al., 2009).

EOs are administered orally, topically, or by nebulisation or aerosolisation, depending on the required effect (general or local). As a result, substantial toxicity data are available not only

for the oils but also their individual components, and many are “Generally Regarded As Safe” (GRAS) by the FDA. GRAS status has permitted the use of essential oils in food and as additives to cosmetics, perfumes and cleaning products (Boire et al., 2013).

The components of EOs are grouped in Figure 1 and described below.

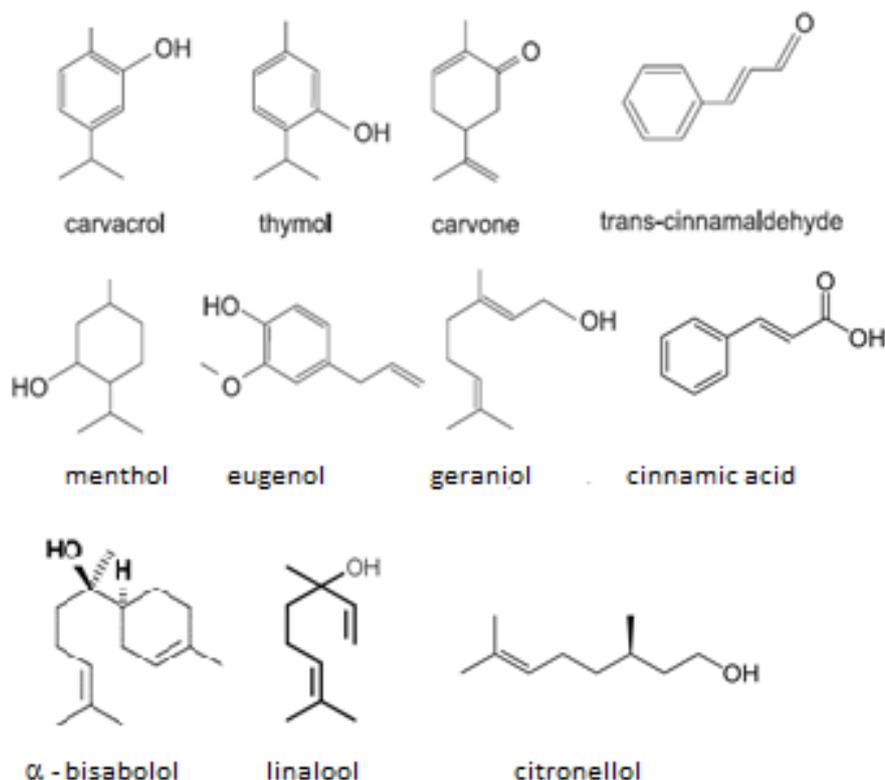


Figure 1 Structural formula of different components of Eos

-Carvacrol is a monoterpene phenol present in essential oregano or thyme oils (Lambert et al., 2001). Carvacrol disrupts the membrane of Gram-negative bacteria, promoting polysaccharide release and increasing the permeability of the membrane to ATP (Burt, 2004; Helander et al., 1998).

-Eugenol is an aromatic phenylpropene. It is the major component of clove oil (approximately 85%) (Farag et al., 1989). The OH group of eugenol permits binding to proteins to interfere with enzyme activity in *E. aerogenes* (Wendakoon and Sakaguchi, 1995).

-Cinnamaldehyde (trans-cinnamaldehyde) is the organic compound responsible for the flavour and smell of cinnamon. It inhibits the growth of *E. coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium*, with effects similar to those of carvacrol and thymol at comparable concentrations. It does not break down the outer membrane or deplete intracellular ATP (Burt, 2004; Helander et al., 1998).

-Thymol, like carvacrol, breaks down the outer membrane of Gram-negative bacteria (Helander et al., 1998). Its structure is very similar to that of carvacrol, though the hydroxyl group is at a different location in the phenolic ring (Lambert et al., 2001). Thymol did not have *in vitro* cytotoxicity at any tested concentration (1.5, 15 and 150 µg/mL) (Fachini-Queiroz et al., 2012).

The combination of some of these components with antibiotics could have synergistic effects, which could revive interest in antibiotics that are no longer effective due to rising resistance. In addition, these combinations can be used to treat infections that are recalcitrant to antibiotic treatment (Aiyegoro et al., 2010; Jouda, 2013).

Methods to define a synergetic interaction

According to Berenbaum (1989), in an additive interaction, the combined effect of “A” and “B” is the sum of their effects.

In an antagonistic interaction, the combined effect is less than the sum of their separate effects (Wagner and Ulrich-Merzenich 2009). In a synergistic interaction, the combined effect is greater than the sum (Figure 2) (Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009).

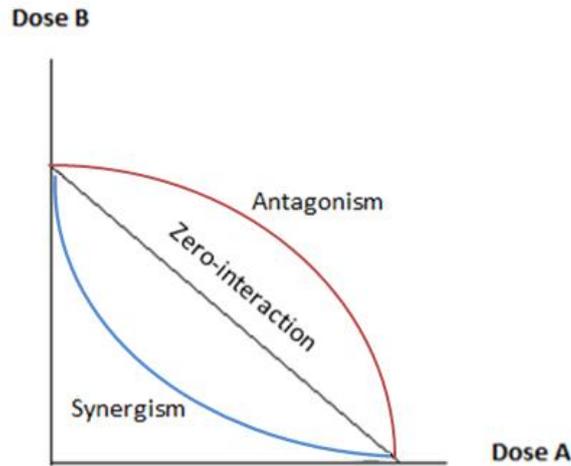


Figure 2 Isoboles for zero interaction, synergy and antagonism (Image inspired by Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009).

The most common methods used to determine the type of interaction between antibiotics and EOs or EO components are described here.

Minimum inhibitory concentration and FIC index

Often, the efficacy of an antimicrobial is measured by the minimal inhibitory concentration, or MIC. In clinical bacteriology, the MIC is defined as the lowest concentration that inhibits visible growth of the organisms (Delaquis et al., 2002; Hammer et al., 1999; Karapinar and Aktug, 1987; Onawunmi, 1989).

To determine the type of interaction between two substances, the Fractional Inhibitory Concentration index (FIC index) is calculated by the method reported by Didry et al. (1994):

$$FIC_I = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

where MIC_A is the MIC of compound A alone and $MIC_{A/B}$ is the MIC of compound A in combination with compound B. MIC_B and $MIC_{B/A}$ are defined in the same manner for compound B.

The associations derived from the FIC index (Fadli et al., 2012; White et al., 1996) are summarised in the following Table (Table 2).

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

Couple	Bacteria	Method	Interaction	Reference
Thymol/carvacrol	<i>S. aureus</i>	--	Additive	Lambert et al. 2001
	<i>P. aeruginosa</i>	--	Additive	Lambert et al. 2001
	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.75	Synergistic	Pei et al. 2009
		FIC index: 4	Antagonistic	Galluci et al. 2009
		--	Additive	Rivas et al. 2010
Thymol/eugenol	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.5	Synergistic	Pei et al. 2009
	<i>B. cereus</i>	FIC index: 0.75	Partially Synergistic	Galluci et al. 2009
Carvacrol/eugenol	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.75	Synergistic	Pei et al. 2009
		FIC index: 4	Antagonistic	Galluci et al. 2009
	<i>S. aureus</i>	FIC index: 4	Antagonistic	Gallucci et al. 2009
Cinnamaldehyde/carvacrol	<i>E. coli</i>	FIC index: 1	Additive	Pei et al. 2009
		FIC index: 0.28	Synergistic	Ye et al. 2013
	<i>S. typhimurium</i>	--	Synergistic	Zhou et al. 2007
	<i>S. aureus</i>	FIC index: 0.28	Synergistic	Ye et al. 2013
	<i>E. cloacae</i>	FIC index: 0.563	Additive	Ye et al. 2013
	<i>S. enteritidis</i>	FIC index: 0.28	Synergistic	Ye et al. 2013
Cinnamaldehyde/eugenol	<i>S. aureus</i>	--	Additive	Moleyar and Narasimham 1992
	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.5	Synergistic	Pei et al. 2010
Cinnamaldehyde/thymol	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.75	Synergistic	Pei et al. 2009
	<i>S. typhimurium</i>	--	Synergistic	Zhou et al. 2007

Table 2 Comparison of synergistic effects arising from the combination of different essential oils.

Time–kill kinetics

A time-kill study characterises a significant bactericidal effect as a decrease by more than 3 log₁₀ CFU/mL (colony-forming units per millilitre) over a 24-hour incubation. An increased effect of more than 2log₁₀ CFU/mL between the combination and the most active single agent (EO or antibiotic) was considered to show synergy. A decreased effect of more than 2

\log_{10} CFU/mL between the combination and the most active single agent was considered to show antagonism. (Singh et al., 2009; Swenson et al., 2007).

Gaseous contact

In this method, petri dishes (chocolate agar, blood agar or MHA) are streaked with bacteria, then placed in an airtight box with a filter paper (9 cm in diameter) soaked with essential oils dissolved in ethyl acetate. As a negative control, a filter paper with ethyl acetate alone was used in the aim to confirm that the solvent does not have antibacterial activity. The boxes were incubated at 37°C overnight to determine the minimum inhibitory dose (MID), expressed in mg/L air (Inouye et al., 2001).

Bauer-Kirby Disk Diffusion

Bauer-Kirby Disk Diffusion is used in antimicrobial-susceptibility testing. A filter paper disk is impregnated with a standard concentration of antibiotic and placed on an agar plate onto which one bacterial strain has been streaked. After a 16 hours incubation, the plates are observed. Large zones of inhibition indicate susceptibility to the antibiotic, while a small or non-existent zone of inhibition indicates resistance. To interpret this test, the results are to the accepted cut-off values for each bacteria/antibiotic pair (Bauer et al., 1986). To examine the interactions between essential oils and antibiotics, a quantity of the essential oil extract was mixed with the agar before the plates were poured. Antibiotic discs were placed on the surface. (Nweze and Eze, 2009).

Mixed linear-regression model

To summarise the results of the articles used in this review, we have developed a mixed regression model with fixed-effects parameters and random effects in a linear predictor calculated by the maximum-likelihood method. A classical logistic regression uses only fixed effects. Mixed models are used when studies are heterogeneous.

Search strategy

Studies were identified from a broader search for data on the associations between antibiotics and essential oils. The databases used were PubMed and, to a lesser extent, ScienceDirect. We searched using different combinations of the key words “synergistic

effect”, “antibiotics”, “essential oils”, “cinnamaldehyde”, “carvacrol”, “eugenol”, “thymol”, “associations” and “bacteria”. Additional papers were identified from the references lists. All searches were limited to articles or review published in English in the last 10 years.

Inclusion criteria

Inclusion criteria were as follows” original research articles published in the last ten years that directly study synergistic, antagonistic or additive associations between essential oils and antibiotics and their effects on yeast and bacteria that are potentially pathogenic to humans. Ultimately, we included 23 studies in our analysis.

The aim of this analysis is to explain the synergy variable (Y), which is a binary criterion (synergy versus no synergy) determined using the methods described above. To explain this variable, we used the type of bacteria, the target of the antibiotic and the chemical group of the essential oil.

The bacteria were classified in three categories (*BACT* variable): Gram-positive bacteria (+), Gram-negative bacteria (-) and yeast or other bacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis* (W).

Essential oils were classified in three categories (*OIL*) according to their principal chemical group: alcohols (*OH*), e. g., eugenol, carvacrol and thymol; aldehydes (*CHO*), e. g., cinnamaldehyde; and aromatic ethers (*ROR*), e. g., cineole (Table 3). Finally, we classed antibiotics in two groups according to their mechanisms of action: activity against the bacterial cell wall (e. g., β -lactams, glycopeptides and phosphono-peptide) and activity against the replication of DNA, protein synthesis. Antifungals were considered in the latter category.

Let us consider the following mixed logistic regression model:

$$\sum \beta_i x_{ij} = \beta_0 + \beta_1 OIL_{ij}(CHO \text{ vs } OH) + \beta_2 OIL_{ij}(ROR \text{ vs } OH) + \beta_3 BACT_{ij}(+ \text{ vs } W) + \beta_4 BACT_{ij}(- \text{ vs } W) + \beta_5 AB_{ij} + \beta_6 OIL_{ij}(CHO \text{ vs } OH)AB_{ij} + \beta_7 OIL_{ij}(ROR \text{ vs } OH)AB_{ij}$$

$$\Pr(Y_{ij} = 1 | x_{ij}, \gamma_{0,i}) = \frac{e^{\sum \beta_i x_{ij} + \gamma_{0,i}}}{1 + e^{\sum \beta_i x_{ij} + \gamma_{0,i}}}, \text{ with } \gamma_{0,i} \sim N(0, \sigma_{\gamma_0}),$$

where β_i are the fixed coefficients of the model and $\gamma_{0,i}$ is the random intercept, which follows a normal distribution. Coefficients are estimated by the maximum likelihood function in R. The *OIL* dummy variable uses the *OH* group as reference, and the *W* group uses the *BACT* dummy variable as a reference.

Results

Intrinsic synergy of essential oils

Although the primary focus of this review is the synergy between antibiotics and essential oils, intrinsic synergy between components of essential oils has been demonstrated. Several authors have studied the synergy between the terpenic components of essential oils such as carvacrol, thymol, eugenol and cinnamaldehyde (Table 2).

In many cases, the antibacterial activity of essential oils is the result of interaction between different classes of compounds (Burt, 2004; Kim et al., 1995; Lambert et al., 2001).

These combinations do not produce the same effects against all bacteria, and the results for any given set of variables may be inconsistent. For example, Gallucci et al. (2009) found that eugenol and carvacrol acted antagonistically against *E. coli* (FIC index: 4), while Pei et al. (2009) found a synergistic effect (FIC index: 0.75) under the same conditions. The data used in our statistical analysis are described below.

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

Couple	Bacteria	Method	Interaction	Reference
Thymol/carvacrol	<i>S. aureus</i>	--	Additive	Lambert et al. 2001
	<i>P. aeruginosa</i>	--	Additive	Lambert et al. 2001
	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.75	Synergistic	Pei et al. 2009
		FIC index: 4	Antagonistic	Galluci et al. 2009
		--	Additive	Rivas et al. 2010
Thymol/eugenol	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.5	Synergistic	Pei et al. 2009
	<i>B. cereus</i>	FIC index: 0.75	Partially Synergistic	Galluci et al. 2009
Carvacrol/eugenol	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.75	Synergistic	Pei et al. 2009
		FIC index: 4	Antagonistic	Galluci et al. 2009
	<i>S. aureus</i>	FIC index: 4	Antagonistic	Gallucci et al. 2009
Cinnamaldehyde/carvacrol	<i>E. coli</i>	FIC index: 1	Additive	Pei et al. 2009
		FIC index: 0.28	Synergistic	Ye et al. 2013
	<i>S. typhimurium</i>	--	Synergistic	Zhou et al. 2007
	<i>S. aureus</i>	FIC index: 0.28	Synergistic	Ye et al. 2013
	<i>E. cloacae</i>	FIC index: 0.563	Additive	Ye et al. 2013
	<i>S. enteritidis</i>	FIC index: 0.28	Synergistic	Ye et al. 2013
Cinnamaldehyde/eugenol	<i>S. aureus</i>	--	Additive	Moleyar and Narasimham 1992
	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.5	Synergistic	Pei et al. 2010
Cinnamaldehyde/thymol	<i>E. coli</i>	FIC index: 0.75	Synergistic	Pei et al. 2009
		<i>S. typhimurium</i>	--	Synergistic

Table 2: Comparison of synergistic effects arising from the combination of different essential oils.

Combination of EOs with antibiotics

The different molecules and essential oils were classed in three groups: alcohols, aldehydes and aromatic ethers. As oils are a mixture of several molecules, we classified them according to their majority components, or in the case of cinnamic acid or carvone, their precursors.

Alcohols

A study combining green-tea extract with levofloxacin showed synergistic effects against *E. coli* 0157 in a gnotobiotic mouse model (Isogai et al., 2001).

Ocimum sanctum oil, the major components of which are linalol (21.84%), methyl chavicol (44.63%) and carvone (6.31%), has antifungal properties used in Ayurvedic medicine (Amber et al., 2010; Sethi et al., 2003). To combat the resistance of *Candida* to fluconazole and ketoconazole (Sanglard et al., 2003), Amber et al. combined these antibiotics with *O. sanctum* oil and tested their activity against several different strains of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*. They observed a synergistic effect against most of the tested strains (Amber et al., 2010).

Ocimum gratissimum oil was used to treat infections of the skin and the urinary and gastrointestinal tracts. This oil was combined with antibiotics such as ciprofloxacin, streptomycin, ampicillin or ketoconazole using an agar-overlay inoculum disc and tested against four clinically significant bacteria and a fungus: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. *Ocimum gratissimum* extract shows good but varying *in vitro* activity against all isolates tested (Table 2) (Nweze and Eze, 2009).

The oil of *Vanillosmopsis arborea* leaves has been used throughout history as an insecticide (Furtado et al., 2005) and an anti-inflammatory (Menezes et al., 1990). It has been recently shown to have gastroprotective activity (Leite et al., 2009). Its major component, α -bisabolol (80.43%), is a sesquiterpene used extensively in cosmetics, in which it has low toxicity (Hernandez-Ceruelos et al., 2002; Villegas et al., 2001) and pro-apoptotic potential (Cavaliere et al., 2004). It is also present in the oil of *Chamomilla recutita* (Jakovlev et al., 1979). In a 2010 study, gentamicin activity against *S. aureus* improved in combination with this essential oil, which also enhances the activity of tetracycline and tobramycin against *S. aureus* and *P. vulgaris* (Santos et al., 2011). This essential oil can interact with the respiratory chain and decrease bacterial fitness (Nicolson et al., 1999) by inhibiting growth.

A 2012 study by Fadli et al. investigated the combined use of *Thymus broussonetti* and *Thymus maroccanus*, the major component of which is carvacrol, with different antibiotics

(ciprofloxacin, gentamicin, cefixime and pristinamicine) against a variety of bacteria. *T. maroccanus* (76.35% carvacrol) and *T. broussonetti* (39.77% carvacrol) showed a synergistic effect with all the antibiotics tested in this study against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The combination of *T. maroccanus* and ciprofloxacin was most effective (Fadli et al., 2012).

The principal components of *Pelargonium graveolens* are geraniol and citronellol. *Pelargonium graveolens* showed strong synergy with norfloxacin against *S. aureus* and *B. cereus* (Rosato et al., 2007). Nevertheless, when geraniol and citronellol were used separately, the combination of geraniol with penicillin against MRSA and *E. coli* did not show a synergistic effect (FIC index=1.1078 and 1.5, respectively), nor did the use of citronellol with penicillin against the same strains (FIC index=1 and 1.13, respectively) (Gallucci et al., 2006).

Geraniol and citronellol (or dihydrogeraniol) are monoterpenoids with alcohol groups.

In this study, norfloxacin belonging to the quinolone class, inhibited topoisomerase to prevent DNA replication. Geraniol and citronellol act on the bacterial cell wall. These different mechanisms of action enable an attack on two fronts, which could be more powerful and reduce the chance that resistance will arise.

Veras et al. (2012) examined the beneficial effects of *Lippia sidoides* oil (Verbenaceae), the major component of which is thymol, used in combination with aminoglycosides. Synergistic activity was evaluated using gaseous contact. This essential oil was also evaluated by Botelho et al. (2007) and Azuma et al. (2003) against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, respectively.

Another study was carried out with the essential oil of *Zataria multiflora* (family Labiatae), the major components of which are thymol (38.7%), carvacrol (15.3%) and p-cymene (10.2%) (Mahboubi and Bidgoli, 2010; Sharififar et al., 2007). Mozaffarian (1996) indicates that it has antiseptic, carminative, diuretic and antispasmodic properties. This plant has been used to treat menstrual pain, asthma and oedema (Zargari, 1990). Other researchers have described immunostimulatory (Shokri et al., 2006), anti-inflammatory (Hosseinzadeh et al., 2000),

antioxydant (Sharififar et al., 2007), antibactérien (Fazeli et al., 2007; Sharififar et al., 2007) et antifongique (Mahboubi et al., 2008) propriétés. Utilisé en combinaison avec la vancomycine contre le méthicilline-résistant *S. aureus* (MRSA), il était associé avec une amélioration de l'activité de la vancomycine (Mahboubi et Bidgoli, 2010).

L'huile d'origan (les principaux composants de laquelle sont le carvacrol et le thymol) est connue pour ses propriétés antifongiques, antibactériennes et antimicrobiennes (Baydar et al., 2004; Bouchra et al., 2003; Vagi et al., 2005). Certains effets antispasmodiques, carminatifs et antiseptiques ont également été démontrés (Nostro et al., 2004).

Si et al. ont montré un effet synergique de la combinaison de l'huile d'origan et de la sarafloxacine, de la lévofloxacine et de la doxycycline et un effet additif de la combinaison de l'huile d'origan et de l'amoxicilline ou de la ceftriaxone (Si et al., 2008). Une étude sur les effets de *Origanum vulgare* en combinaison avec les antibiotiques β -lactames a démontré un effet synergique contre les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives productrices de β -lactamase (Nascimento et al., 2007).

Selon la littérature, le carvacrol est l'un des composants les plus puissants présents dans les huiles essentielles (Burt et al., 2005).

Pol et Smid ont découvert que le carvacrol pouvait améliorer l'action de la nisine (un peptide antibactérien) en augmentant la longévité des pores créés par la nisine ou en augmentant le nombre ou la taille de ces pores. Pol et Smid (1999) ont testé le carvacrol en combinaison avec la nisine contre *B. cereus* et *L. monocytogenes* à 2 températures différentes (8°C et 20°C) et ont observé l'effet synergique à la température la plus basse, ainsi.

Une autre étude coordonnée par Esteban et Palop (2010) a examiné l'utilisation combinée de carvacrol et de nisine contre *Listeria monocytogenes*. Le carvacrol, contrairement à la nisine, a montré un effet inhibiteur dose-dépendant. Lorsque les composants ont été combinés, un effet synergique a été observé. Cet effet a augmenté lorsqu'un prétraitement thermique de 15 min à 55°C a été ajouté au protocole (Esteban et Palop, 2010). Le carvacrol a montré une synergie avec la pénicilline et la tétracycline contre *E. coli* et avec l'ampicilline et la pénicilline contre *S. aureus* (Palaniappan et Holley, 2010). Choi et son équipe ont combiné le carvacrol avec l'acide nalidixique (un quinolone) pour

the treatment of bacteria resistant to nalidixic acid; this combination showed total or partial synergistic activity against the tested strains (Choi et al., 2009).

Synergy with carvacrol (pure or as a component of essential oils) has been widely studied for use against Gram-positive bacteria and some Gram-negative bacteria, *E. coli* in particular.

Carvacrol showed synergy with antibiotics that have different mechanisms of action, such as penicillin or vancomycin, which have activity against the bacterial cell wall, and tetracycline or levofloxacin, which have activity against protein synthesis and replication of DNA, respectively.

The antimicrobial activity associated with the combined use of carvacrol and antibiotics is variable but may be stronger against Gram-positive bacteria.

Carvacrol also showed a synergy when used in combination with components other than antibiotics, such as peptides.

Eugenol is the major component of clove (*Eugenia aromatica* or *Eugenia caryophyllata*) oil and has analgesic, anaesthetic, anti-inflammatory and anti-bacterial properties (Hemaiswarya et al., 2009; Kamatou et al., 2012). In traditional Chinese medicine, clove has been used as a carminative agent, antispasmodic, antibacterial and antiparasitic (Barceloux, 2008; Harbourne and Baxter, 1993).

The combined use of eugenol and ampicillin had a synergistic effect against several oral bacteria such as *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *P. gingivalis* or *P. intermedia*. A similar effect was found for the combination of eugenol and gentamicin used against *S. mutans* (Moon et al., 2011).

In 2010, Eugenol was used in combination with fluconazole for the treatment of candidiasis (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*). It showed a synergistic effect for most *Candida* strains (Ahmad et al., 2010). Hemiswarya and Doble (2009) observed a synergistic effect from the combination of eugenol and vancomycin against Gram-negative bacteria, possible because eugenol destabilises the bacterial membrane, facilitating the action of the antibiotic. Another study focused on urinary-tract infections, the most bacterial agents of which are *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophiticus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Using the single-disc method described by Bauer et al. (1986), Ghaly et al. (2009) found a synergistic effect in the combination of clove

oil with ofloxacin and amikacin; however, the combination of garlic with these two antibiotics was not satisfying (Joyce et al., 2010).

Yadav et al. (2013) studied the combination of the extract of *Eugenia caryophyllata* against *S. pneumoniae* with penicillin in the treatment of otitis media in children, watching the synergistic effect of this combination.

Eugenol, like carvacrol, was used in combination with antibiotics such as gentamicin or amikacin that have activity against the membrane and bacterial ribosomal RNA, causing abnormal protein synthesis. It was used against both Gram-positive or Gram-negative bacteria.

In contrast to other compounds, it was also used against *C. albicans* in combination with antifungal agents such as fluconazole.

Gallucci et al. (2006) observed an antagonistic effect between thymol and penicillin used against *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA). In the same study, they observed a synergistic effect between thymol and penicillin used against a strain of *E. coli*.

Thymol was also used in combination with nisin against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Bacillus subtilis* ATCC 33712. Nisin activity was greatly enhanced by a subinhibitory concentration of thymol (Ettayebi et al., 2000).

Ghaly et al. (2006) studied the effect of thyme in combination with other essential oils and found that the combination of thyme and marjoram oils yielded an inhibition zone of 20-29 mm; a similar result was obtained from the combination of thyme and cinnamon (20-27 mm). The combination of thyme oil with antibiotics had weaker inhibitory effects against all tested bacteria than its combination with other volatile oils.

Pure thymol was rarely used, but thymol was frequently used as a major component of essential oils such as *Thymus glabrescens* or oregano oil. Frequently, it has an additive effect in combination with antibiotics such as amoxicillin, ampicillin or chloramphenicol, but an antagonistic effect was observed when thymol was combined with penicillin against *S. aureus*.

Combined applications of thymol generally show less pronounced synergy or even antagonism. Nevertheless, when thymol was used in combination with other components (e.g., carvacrol and linalool), synergetic effects seem greater. The presence of carvacrol (oil of oregano) and geraniol (oil of *Thymus glabrescens*) are good examples of these effects.

Gallucci et al. (2006) combined terpene components such as carvacrol, citronellol, eugenol, geraniol, menthol and thymol and used them in combination with penicillin to investigate synergistic effects. Eugenol acted synergistically with the penicillin, and carvone (carvacrol precursor) gave promising results.

Aromatic ethers

Eucalyptus is used in traditional medicine around the world, and its medicinal properties have been extensively studied. This family, comprising approximately 900 species and subspecies, (Gilles et al., 2010; Hakki et al., 2010), is an important source of essential oils with a wide spectrum of biological activities such as antibacterial, antifungal, analgesic and anti-inflammatory activities (Mulyaningsih et al., 2010). They are often used against colds, influenza and respiratory symptoms (rhinitis, sinusitis, etc.) (Sadlon and Lamson, 2010). Pereira and colleagues (2014) have focused on *Eucalyptus globulus* oil, the major component of which is 1,8-cineole (eucalyptol), which has broad antibacterial activity (Mulyaningsih et al., 2010; Tohidpour et al., 2010; Tyagi and Malik, 2011), against *Pseudomonas aeruginosa*, a major nosocomial pathogen (Lavoie et al., 2011). This pathogen is resistant to a large number of drugs (El-Solh et al., 2009; Riou et al., 2010). Pereira et al. (2014) combined eucalyptus oil with gentamicin (an aminoglycoside) and tested two eucalyptus oils with different proportions of cineole: A (79% cineole) and B (83% cineole). Oil A had a stronger synergistic effect with gentamicin than oil B; 50% of the strains of *P. aeruginosa* yielded indicated the same results.

According to a study conducted by Yap et al. (2013), synergy between peppermint (*Mentha piperita*) oil, the major components of which are cineole (20.29%), menthol (16.65%) and menthone (16.18%) (Rohloff, 1999), and piperacillin or meropenem was demonstrated against *E. coli*.

Anethol (the major component (94.1%) of *Croton zehntneri*) was examined in a 2009 study. The antibacterial activity of gentamicin against *P. aeruginosa* increased in the presence of this essential oil (Rodrigues et al., 2009).

Aldehyde

In a 2013 study, Yap et al. observed synergy between cinnamon (*Cinnamomun vertu*) oil and piperacillin in activity against *E. coli* (Yap et al., 2013).

The essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*, the major component of which is trans-cinnamaldehyde (67.17%), the most stable isomorph of cinnamic acid (Chen et al. 2011; Turner et al. 1993), caused a reduction in the MIC of clindamycin used against *Clostridium difficile* (Shahverdi et al., 2007). Guerra et al. (2011) showed that the essential oil of *Citrus limon* and *Cinnamon zeylanicum* have synergistic effects with amikacin used against *Acinetobacter* spp.

Cinnamaldehyde seems to act synergistically with antibiotics that affect cell walls (e.g., penicillin, ampicillin or piperacillin) of Gram-positive or Gram-negative bacteria (Yap et al. 2013, Palaniappan and Holley, 2010). Other studies had shown synergy with other antibiotics such as clindamycin (a lincosamide) (Shahverdi et al. 2007), which inhibits the elongation phase of the protein synthesis by binding to ribosomal RNA. Cinnamaldehyde also showed a synergistic effect when used with ampicillin and penicillin against *S. aureus* (Palaniappan and Holley, 2010).

Cinnamic acid is an organic acid obtained from cinnamon extract; this acid has been shown to enhance the activity of certain antibiotics (isoniazid, rifampicin, ofloxacin, amikacin and clofazimine) against *M. avium* and *M. tuberculosis* (Rastogi et al., 1994, 1998). Additionally, the MIC of amikacin used against *E. coli* was reduced when it was combined with cinnamic acid (Hemaiswarya and Doble. Cinnamic acid is quite similar to cinnamaldehyde but has a carboxylic-acid group instead of an aldehyde group (Figure 3).

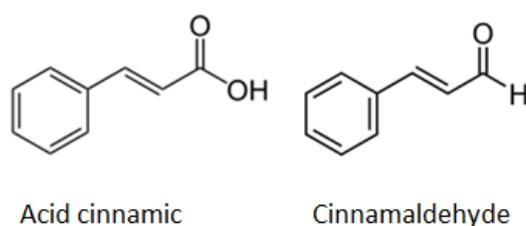


Figure 3: Structures of cinnamaldehyde and cinnamic acid.

Mixed linear regression

This regression was carried out with the R package “lme4”. The results of our analysis are given in Table 4. The variance of the random intercept is significant, allowing us to draw conclusions about inter-study heterogeneity. This finding validates our choice of the mixed statistical model.

The choice of antibiotic

Results from the model suggest that the less frequently synergistic combinations include antibiotics with activity against the bacterial cell wall, such as β -lactamine antibiotics (penicillin or cephalosporin), glycopeptides (vancomycin or teicoplanin for humans and avoparcin or daptomycin for veterinary use) (Table 4), compared to other drugs with different mechanisms of action, such as inhibitors of protein synthesis, including aminosides (amikacin or gentamycin), cyclines (doxycycline, minocycline) macrolides (azithromycin, clarithromycin, spiramycin) lincosamides (clindamycin or lincomycin); or DNA replication inhibitors, such as the quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin...) or fluoroquinolones (OR=0.232, p=0.1077). However, the synergistic effect is strengthened when antibiotics that are active against the cell wall are used in combination with aromatic ethers, such as cineole (*ROR*) (OR=49.979, p=0.1113).

The type of bacteria

The results do not support a significant difference between Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeasts.

Coefficients	OR	Lower CI	Upper CI	P value
Fixed Effects				
<i>Oil (CHO vs OH)</i>	0.816	0.131	6.528	0.8353
<i>Oil (ROR vs OH)</i>	0.114	0.109	0.933	0.1555
<i>AB</i>	0.232	0.176	0.664	0.1077**
<i>BACT (+ vs W)</i>	1.226	0.227	7.120	0.8138
<i>BACT (- vs W)</i>	1.648	0.309	9.477	0.5600
<i>AB :Oil (CHO vs OH)</i>	1.900	0.159	20.209	0.5981
<i>AB : Oil (ROR vs OH)</i>	49.979	2.625	1283.441	0.1113*
Random Effect				
Variance				P value
<i>Intercept</i>	3.168			<0.1001***

Table 4: Results of regression for 23 studies.

*p<0.15; **p<0.11; ***p<0.101

Discussion

A primary factor to consider in this review is publication bias. Scientific journals tend to preferably publish research work with a positive result, which we believe explains why so few results show additive or antagonistic associations. Moreover, researchers do not publish all negative results. Thus, we assume that some negative data are “missing” from our review. Other drawbacks include the multiple ways to measure antimicrobial activity (FIC index, kill-time studies) and variation in authors’ interpretations. (e.g., for some authors, an FIC index between 0.5-0.75 will be considered to represent partial synergy, while others will interpret this result as showing an additive effect). These difficulties impede the compilation of results.

Researchers compared the activity of EOs in combination with antibiotics with different mechanisms of action against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Many other variables remain to be explored.

Multiple factors appear to favour synergy.

The concentration of the major components of the EO

Two essential oils with similar compositions but variations in relative concentrations may have different effects. For example, *T. maroccanus*, which has a higher concentration of carvacrol, is more effective than *T. broussonetti* (Fadli et al., 2012). A similar effect was observed with eucalyptus oil and cineole concentrations (Pereira et al., 2014).

The target of the antibiotic

According to recent studies, most of the tested antibiotics are active against the bacterial cell wall, with a smaller proportion acting on protein synthesis and DNA replication; however, we did not find any synergy between antibiotics active against the cytoplasmic membrane (gramicidins and polymyxins) and essential oils. A combination that attacks different targets might be the most effective; however, most of the authors selected antibiotics that attack the cell wall and essential oils that also destabilise the wall.

Mixed linear-regression results show that the combination of aromatic ethers synergize more effectively with antibiotics than alcohols or aldehydes; this difference could be due to the mechanism of action of *ROR*.

The type of bacteria

Although the nature of the bacteria (Gram-negative or Gram-positive) plays an important role in the action of the antibiotic, we do not have the data necessary to determine the associations that might work best for each type of bacteria.

For Gram-negative bacteria such as *E. coli* or *Pseudomonas aeruginosa*, the use of an essential oil might destabilise the outer membrane.

For Gram-positive bacteria, a good strategy might be to involve glycopeptide antibiotics.

Intrinsic synergies of EO

There is also a synergistic effect among the components of the EOs.

The combinations examined in this work show that certain essential oils or mixtures of EOs have stronger effects in combination with antibiotics compared to their isolated major component used alone.

This synergy may arise because the “two-front” attack is difficult to evade or because of direct potentiation, in which the EO or antibiotic directly facilitates the activity of its partner. Carvacrol, thymol and cinnamaldehyde are the most-studied EOs because they have the most powerful antibacterial properties. Combinations of these molecules have also attracted interest.

These combinations could also be used in the therapeutic setting to treat antibiotic-resistant infections.

Conclusion

The use of mixed linear regression allowed us to identify the conditions most likely to result in synergy of an antibiotic and an essential oil. Our analysis relied on previous work by researchers investigating ways of managing antibiotic resistance, an increasingly urgent public-health problem.

We found that the combinations most likely to show synergy involve antibiotics that affect protein synthesis (aminoglycosides, tetracycline, macrolides etc.) or DNA replication (quinolones and fluoroquinolones). Antibiotics with activity against the bacterial cell wall have good synergy with essential oils containing cyclic ethers (e.g., cineole).

These conditions are not necessarily universal, and other associations may still yield synergistic effects. Our conclusions are based on significant differences revealed by our model.

References

Ahmad, A., Khan, A., Ahmad Khan, L., Manzoor, N., 2010. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. *J. Med. Microbiol.* 59, 1178-1184.

Aiyegoro, O.A., Afolayan, A.J., Okoh, A.I., 2010. Interactions of antibiotics and extracts of *Helichrysum pedunculatum* against bacteria implicated in wound infections. *Folia Microbiol.* 55, 176-180.

Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K.A., Nikhat, M., 2010. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine* 17, 921-925.

Anesini, E., Perez, C., 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 39, 119-128.

Azuma, K., Ito, H., Ippoushi, K., Higashio, H., 2003. *In vitro* antibacterial activity of extracts from four Labiatae herbs against *Helicobacter pylori* and *Streptococcus mutans*. *Bull. Nat. Inst. Veg. Tea Sci.* 2, 83-91.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.

Barceloux, D.G., 2008. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals*. Wiley, Hoboken, NJ.

Barton, D.M., 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 13, 279-299.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. Turk, M., 1986. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493-496.

Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., Karadogan, T., 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15, 169-172.

Berenbaum, M.C., 1989. What is synergy? *Pharmacol. Rev.* 41, 93-141.

Boire, N.A., Riedel, S., Parrish, N.M., 2013. Essential oils and future antibiotics: new weapons against emerging 'superbugs'? *Journal of Ancient Diseases and Preventive Remedies* 1, 1000105.

Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.I.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S., Brito, G.A.C., 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 349-356.

Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M., Hmamouchi, M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botry tiscinerea* Pers:Fr. *J. Ethnopharmacol.* 89, 165-169.

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

Burt S. A., Vlieland R., Haagsman H. P., Veldhuizen E. J. A., 2005. Increase in Activity of Essential Oil Components Carvacrol and Thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by Addition of Food Stabilizers. *Journal of Food Protection.* 5,900-1111, 919-926(8)

Cavaliere, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., Prati, A.C., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L.V., Lauro, G.M., Ciampa, A.R., Suzuki, A.H., 2004. Alpha-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 589-594.

Chen, Y.L., Huang, S.T., Sun, F.M., Chiang, Y.L., Chiang, C.J., Tsai, C.M., Weng, C.J., 2011, Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 43, 188–194

Choi, J.G., Kang, O.H., Lee, Y.S., Oh, Y.C., Chae, Y.C., Chae, H.S., Jang, H.J., Shin, D.W., Know, D.Y., 2009. Antibacterial activity of methyl gallate from *Galla rhois* or carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria. *Molecules* 14, 1773-1780.

Delaquis, P.J., 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.

Didry, N., Dubreil, L., Pinkas, M., 1994. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldéhyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta Helv.* 69, 25-28.

El-Solh, A.A., Amsterdam, D., Alhajhusain, A., Akinnusi, M.E., Saliba, R.G., Lynch, S.V., Wiener-Kronish, J.P., 2009. Matrix metalloproteases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with type III *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Infect.* 59, 49-55.

Esteban, M.D., Palop, A., 2011. Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of heat-treated *Listeria monocytogenes* cells. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 89-95.

Ettayebi, K., El Yamani, J., Rossi-Hassani, B.D., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 191-195.

Fachini-Queiroz, F.C., Kummer, R., Estevão-Silva, C.F., Dalva de Barros Carvalho, M., Cunha, J.M., Grespan, R., Bersani-Amado, C.A., Nakamura Cuman, R.K., 2012. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012, 657026.

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.E., Pagès, J.M., Hassani L., 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19, 464-471.

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., El-Baroty, G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.* 52, 665-667.

Fazeli, M.R., Amin, G.H., Ahmadian Attari, M.M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N., 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-eshirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* 18, 646-649.

Furtado, R.F., De Lima, M.G.A., Neto, M.A., Bezerra, J.N.S., Silva, M.G., 2005. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L. *Neotrop. Entomol.* 34, 843-849.

Gallucci, N., Casero, C., Oliva, M., Zygadlo, J., Demo M., 2006. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Mol. Med. Chem.* 10, 30-32

Gallucci, M.N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., Demo, M., 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr. J.* 24, 348-354.

Ghaly, M.F., 2006. Synergistic effect of volatile oils and antibiotics against some gram positive and negative pathogenic bacteria. *Arab Univ. J. Agric. Sci.* 14, 121-132.

Ghaly, M.F., Shalaby, M.A., Shash, S.M.S., Shehata, M.N., Ayad, A.A., 2009. Synergistic effect of antibiotics and plant extract to control clinical bacterial isolates implicated in urinary tract infections. *J. Appl. Sci. Res.* 5, 1298-1306.

Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S., 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chem.* 119, 731-737.

Guerra, F.Q.S., Mendes, J.M., Pereira de Sousa, J. Morais-Braga, M.F.B., Santos, B.H.C., Countinho, H.D.M., De Oliveira Lima, E., 2011. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Nat. Prod. Res.* 26, 2235-2238.

Hakki, Z., Ca, B., Heskes, A.M., Goodger, J.Q.D., Woodrow, I.E., Williams, S.J., 2010. Synthesis of the monoterpenoid esters cypellocarpin C and cuniloside B and evidence for their widespread occurrence in Eucalyptus. *Carbohydr. Res.* 345, 2079-2084.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, 985-990.

Harborne, J.B., Baxter, H., 1993. *Phytochemical Dictionary*. Taylor and Francis, London.

Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., 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., Doble, M., 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16, 997-1005.

Hemaiswarya, S., Doble, M., Synergistic interaction of cinnamic acid with amikacin against *Escherichia coli* under in vitro conditions. *Adv. Biomed. Research* , 95-98. ISSN: 1790-5125 ISBN: 978-960-474-164-9

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 16, 997-1005.

Hernandez-Ceruelos, A., Madrigal-Bujaidar, E., De Lacruz, C., 2002. Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methane sulfate in mouse bone marrow. *Toxicol. Lett.* 135, 103-110.

Hertrampf, J.W., 2001. Alternative antibacterial performance promoters. *Poult. Int.* 40, 50-52.

Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., Salmani, G.A., 2000. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 73, 379-385.

Humphrey, B.D., Huang, N., Klasing, K.C., 2002. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic like properties when fed to chicks. *J. Nutr.* 132, 1214-1218.

Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 565-573.

Isogai, E., Isogai, H., Hirose, K., Hayashi, S., Oguma, K., 2001. In vivo synergy between green tea extract and levofloxacin against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection. *Curr. Microbiol.* 42, 248-251.

Jakovlev, V., Isaac, O., Thiemer, K., Kunde, R., 1979. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides. *Planta Med.* 35, 125-140.

Jouda, M.M., 2013. Antibacterial effect of some medicinal plant extracts and their Synergistic effect with antibiotic and non-antibiotic drugs. M.Sc. thesis, Faculty of Science, Islamic University, Gaza, Palestine.

Kamatou, G.P., Vermaak, I., Viljoen, A.I., 2012. Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules* 17, 6953-6981.

Karapinar, M., Aktug, S.E., 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *Int. J. Food Microbiol.* 4, 161-166.

Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2839-2845

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

Langhout, P., 2000. New additives for broiler chickens. *World Poult.* 16, 22-27.

Lavoie, E.G., Wangdi, T., Kazmierczak, B.I., 2011. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microb. Infect.* 13, 1133-1145.

Leite, G.O., Penha, A.R., Fernandes, C.N., Souza, H.H.F., Costa, J.G.M., Campos, A.R., 2009. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. *Fitoterapia* 80, 77-80.

Lynch, A.S., Robertson, G.T., 2008. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu. Rev. Med.* 59, 415-428.

Mahboubi, M., Feizabadi, M.M., Safara, M., 2008. Antifungal activity of essential oils from *Zataria multiflora*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas*, *Artemisia sieberi* Besser and *Pelargonium graveolens* against clinical isolates of *Candida albicans*. *Pharmacog. Mag.* 4, 15-18.

Mahboubi, M., Bidgoli, F.G., 2010. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine* 17, 548-550.

Menezes, A.M.S., Almeida, F.R.C., Rao, V.S.N., Matos, M.E.O., 1990. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. *Fitoterapia* 61, 252-254.

Moleyar, V., Narasimham, P., 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.* 16, 337-342.

Moon, S.E., Kim, H.Y., Cha, J.D., 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch. Oral Biol.* 56, 907-916.

Mozaffarian, V., 1996. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Mo'aser, Tehran.

Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M., 2010. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine* 17, 1061-1066.

Nascimento, A.M.A., Brandao, M.G.L., Oliveira, G.B., Fortes, I.C.P., Chartone-Souza, E., 2007. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92, 95-100.

Negi, P. S., 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 7-17.

Nicolson, K., Evans, G., O'Toole, P.W., 1999. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol. Lett.* 179, 233-239.

Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A.S., Alonzo, V., 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 191-195.

Nweze, E.I., Eze, E.E., 2009. Justification for the use of *Ocimum gratissimum* L in herbal medicine and its interaction with disc antibiotics. *BMC Complement. Altern. Med.* 9, 37.

Onawunmi, G.O., 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett. Appl. Microbiol.* 9, 105-108.

Palaniappan, K., Holley, R.A., 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 164-168.

Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P., Xu, J., 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *J. Food Sci.* 74, 379-383.

Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, M.C., Rosa, E., Saavedra, M.J., 2014. Antibacterial activity and Synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Ind. Crops Prod.* 52, 1-7.

Pol, I.E., Smid, E.J., 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 166-170.

Rastogi, N., Goh, K.S., Horgen, L., Barrow, W.W., 1998. Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21, 149-157.

Rastogi, N., Goh, K.S., Wright, E.L., Barrow, W.W., 1994. Potential drug targets for *Mycobacterium avium* defined by radiometric drug-inhibitor combination techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2287-2295.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O., 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 8, 157-180.

Riou, M., Carbonnelle, S., Avrai, L., Mesaro, N., Pirnay, J.P., Bilocq, F., De Vos, D., Simon, A., Pierard, D., Jacobs, F., Dediste, A., Tulkens, P.M., Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., 2010. In vivo development of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the lower respiratory tract of intensive care unit patients with nosocomial pneumonia and receiving antipseudomonal therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, 513-522.

Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S., 2010. Inhibition of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 70-78.

Rodrigues, F., Costa, J., Coutinho, H., 2009. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine* 16, 1052-1055.

Rohloff, J., 1999. Monoterpene composition of essential oil from Peppermint (*Mentha piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3782-3786.

Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., Antonietta Milillo, M., 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine* 14, 727-732.

Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Milillo, M.A., Mallamaci, R., 2008. The inhibition of *Candida* species by selected oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15, 635-638.

Rosato, A., Vitali, C., Piarulli, M., Mazzotta, M., Argentieri, M.P., Mallamaci, R., 2009. In vitro synergistic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* 16, 972-975.

Sadlon, A.E., Lamson, D.W., 2010. Immune-modifying and antimicrobial effects of Eucalyptus oil and simple inhalation devices. *Altern. Med. Rev.* 15, 33-47.

Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., Bille, J., 2003. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2404-2412.

Santos, N.K.A., Coutinho, H.D.M., Viana, G.S.B., Rodrigues, F.F.G., Costa J.G.M., 2011. Chemical characterization and Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. *Med. Chem. Res.* 20, 637-641.

- Sengelov, G., Agerso, Y., Halling-Sorensen, B., Baloda, B.S., Andersen, J.S., Jensen, L.B., 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.* 28, 587-595.
- Sethi, J., Sood, S., Seth, S., Thakur, A., 2003. Protective effect of Tulsi (*Ocimum sanctum*) on lipid peroxidation in stress induced by anemic hypoxia in rabbits. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 47, 115-119.
- Shahverdi, A.R., Monsef-Esfamani, H.R., Tavasoli, F., Zaheri, A., Mirjani, R., 2007. Trans cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. *J. Food Sci.* 72, S055-S058.
- Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M., 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18, 800-805.
- Shokri, H., Asadi, F., Bahonar, A.R., Khosravi, A.R., 2006. The role of *Zataria multiflora* essence (Iranian herb) on innate immunity of animal model. *Iran. J. Immunol.* 3, 164-168.
- Si, H., Hu, J., Liu, Z., Zeng, Z.L., 2008. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 190-194.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Pandey, S.K., Singh, U.K., Singh, R.K., 2002. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytother. Res.* 16, 680-682.
- Smith, E.C.J., Kaatz, G.W., Seo, S.M., Wareham, N., Williamson, E.M., Gibbons, S., 2007. The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4480-4488.
- Theuretzbacher, U., 2011. Resistance drives antibacterial drug development. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 433-438
- 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.
- Turner, L.B., Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1993. Light-induced isomerization and dimerization of cinnamic acid derivatives in cell walls. *Phytochemistry* 33, 791-796.

Tyagi, A.K., Malik, A., 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. Food Chem. 126, 228-235.

Vagi, E., Simandi, B., Suhajda A., Héthelyi, E., 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of Origanum majorana L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Res. Int. 38, 51-57.

Veras, H.N.H., Rodrigues, F.F.G., Colares, A.V., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Botelho, M.A., Costa, J.G.M., 2012. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of Lippia sidoides and thymol. Fitoterapia 83, 508-512.

Villegas, L.F., Marcalo, A., Martin, J., Fernandez, I.D., Maldonado, H., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B., 2001. (+)-epi-alpha-bisabolol is the wound-healing principle of Peperonia galioides: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. J. Nat. Prod. 64, 1357-1359.

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine 16, 97-110.

Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components in spices. J. Food Prot. 58, 280-283.

White, R.L., Burgess, D.S., Manduru, M., Bosso, J.A., 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 1914-1918.

Williams, P., Losa, R., 2001. The use of essential oils and their compounds in poultry nutrition. World Poult. 17, 14-15.

Yadav, M.K., Park, S.W., Chae, S.W., Song, J.J., Kim, H.C., 2013. Antimicrobial activities of Eugenia caryophyllata extract and its major chemical constituent eugenol against Streptococcus pneumoniae. APMIS 121, 1198-1206.

Yap, P.S.X., Lim, H.E., Hu, C.P., Yiap, B.C., 2013. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. Phytomedicine 20, 710-713.

Ye, H., Shen, S., Xu, J., Lin, S., Yuan, Y., Jones, G.S., 2013. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. Food Control 34, 619-623.

Yoo, C.B., Han, K.T., Cho, K.S., Ha, J., Park, H.J., Nam, J.H., Kil, U.H., Lee, K.T., 2005. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* 225, 41-52.

Zargari, A., 1990. *Medicinal Plants*. Tehran University, Tehran.

Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J., Yan, W., 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food-borne pathogen *Salmonella typhimurium*. *J. Food Saf.* 27, 124-133.

1.2 CONCLUSION

Le but de cette revue était d'une part de connaître les différentes études existantes dans la recherche des associations synergiques entre les huiles essentielles et les antibiotiques, et d'autre part, de réaliser une étude statistique (régression linéaire mixte) pour déterminer s'il existe des associations qui montreraient une synergie plus puissante selon le type de bactérie. Grâce à cette revue nous avons pu déterminer qu'il existe différents facteurs qui peuvent influencer la présence ou pas d'un effet synergique.

1) La concentration des composantes majeures de l'HE

Deux huiles essentielles avec des compositions similaires, mais qui présentent des concentrations différentes de l'un des composants majoritaires, peuvent avoir des effets différents. Par exemple, *T. maroccanus*, qui a une concentration plus élevée en carvacrol, est plus efficace que *T. broussonetti* (Fadli et al. 2012). Un effet similaire a été observé avec des concentrations différentes de cinéole dans l'huile d'eucalyptus (Pereira et al. 2014).

2) La cible bactérienne

Selon des études récentes, la plupart des antibiotiques testés appartient au groupe actif contre la paroi de la cellule bactérienne, avec une proportion plus faible agissant sur la synthèse des protéines et la réplication d'ADN. Cependant, nous ne trouvons pas de synergie entre les antibiotiques actifs contre la membrane cytoplasmique (gramicidines et polimyxins) et les huiles essentielles.

3) La structure chimique des HE

Nos résultats obtenus grâce à l'étude de régression linéaire, montrent que l'association des huiles contenant des éthers aromatiques dans leurs molécules majoritaires, est plus efficace que les huiles essentielles qui contiennent des alcools ou des aldéhydes. Néanmoins, nous avons trouvé des synergies intéressantes en travaillant avec des molécules comme le carvacrol ou le cinnamaldéhyde qui contiennent des groupements alcool et aldéhyde.

Après cette étude bibliographique, nous avons décidé de garder les trois actifs (eugénol, carvacrol et cinnamaldéhyde) proposés par l'entreprise Eydo Pharma. Nous avons donc

décidé de tester ces molécules avec différents antibiotiques présentant des mécanismes d'action différents.

Le choix de garder plusieurs actifs aromatiques est renforcé du fait de travaux publiés dans cette revue démontrant des synergies potentielles importantes entre eux.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. CONCEPTION ET CARACTERISATION DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES

1.1 INTRODUCTION

Nous rappelons que les NCL sont formulées grâce à la technique d'inversions de phases induites par effet thermique. Les NCL sont constituées à partir de 2 phases :

-une phase huileuse, Labrafac®(mélange de triglycérides à chaînes moyennes C₈-C₁₀) et un tensioactif non-ionique lipophile, Lipoïd® (lécithine de soja contenant environ 70% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidyléthanolamine) qui aura comme rôle de rigidifier la coque des NCL

- une phase aqueuse (Eau) et un surfactant non-ionique hydrophile, Solutol® (hydroxy-stéarate de PEG 660 et PEG 660 dans des proportions 70/30) (Huynh et al. 2009 ; Allard 2010) qui sera le tensioactif principal formant la coque des NCL (Allard 2010). Le chlorure de sodium présent dans la formulation des NCL modifie la température d'inversion de phase (TIP) de la formulation.

Les NCL ont été brevetées sous le nom de « Lipidic nanocapsules : Preparation process ans use as drug delivery systems » au début des années 2000 (numéro du brevet : WO02688000) (Heurtault et al. 2000).

La méthode de formulation consiste à réaliser plusieurs cycles de température pour passer d'une émulsion huile dans l'eau (H/E) à une émulsion eau dans huile (E/H) (Heurtault et al. 2002). Cette inversion est liée à la déshydratation thermique des têtes polaires du tensioactif nonionique dont les affinités avec l'huile augmentent avec la température. Cette inversion de phase est réversible. Entre les deux systèmes émulsionnés, existe une plage de température appelée « zone d'inversion de phase » (ZIP) qui peut être déterminée par l'aspect visuel du système mais plus précisément par conductivité (Vanpouille-Box 2012). Cette zone correspond à une structuration bicontinue du système ternaire eau-huile-surfactif. C'est à l'intérieur de cette zone, que la structure des NCL est initiée. Grâce à l'ajout d'eau froide (proche de 0°C), la formulation va subir un choc de dilution irréversible permettant la rigidification de la membrane des NCL ainsi que l'individualisation des NCL (Benoit et al. 2007). Les NCL obtenus présentent une distribution de taille monodisperse

(faible PDI : « Poly Dispersity Index) qui peut être choisie dans la gamme 20-100nm en fonction des proportions de Labrafac et Solutol.

Un des buts de cette thèse consistait à formuler des NCL avec des composants terpéniques (seuls ou en mélange) qui restent stables dans le temps et qui conservent une action bactéricide contre les bactéries étudiées *in-vitro* et *in-vivo*.

Ce chapitre est dédié à la formulation et à la caractérisation de la taille et du potentiel zêta des NCL.

1.2 MATERIELS ET METHODES

Mesures de conductivité

Avant de formuler les NCL nous avons dû déterminer par conductivité, la ZIP de la formulation avec les actifs que nous voulons encapsuler. La ZIP est étroitement liée à la composition (Anton et al. 2008). Il est donc nécessaire de la déterminer pour chaque composition et donc pour chaque type d'actif que ce dernier soit introduit au début ou rajouté pendant le procédé de formulation.

La conductimétrie (σ) caractérise les propriétés de conduction ionique d'une solution placée entre deux électrodes.

La conductance (G) d'une portion de solution comprise entre deux électrodes est proportionnelle à l'aire (S) des électrodes et inversement proportionnelle à la distance (L) entre les électrodes.

La conductivité, qui est exprimée en Siemens/mètre (Système international), peut se représenter avec l'équation suivante :

$$G = \sigma \frac{S}{L} \longrightarrow \boxed{\sigma = G \frac{L}{S}} \quad \text{Equation 1}$$

L'image 12, montre les différentes plages de conductivité que l'on retrouve selon la nature de la solution. Nous observons (en vert) que plus l'eau contient des espèces ioniques, plus la conductivité sera élevée. L'eau pure présente une conductivité de 0,05 μ S/cm contrairement à l'eau de mer qui grâce aux sels présente une conductivité beaucoup plus élevée.

L'image montre en orange, les plages de conductivité pour les émulsions E/H et H/E, entre les deux, se trouve la ZIP.

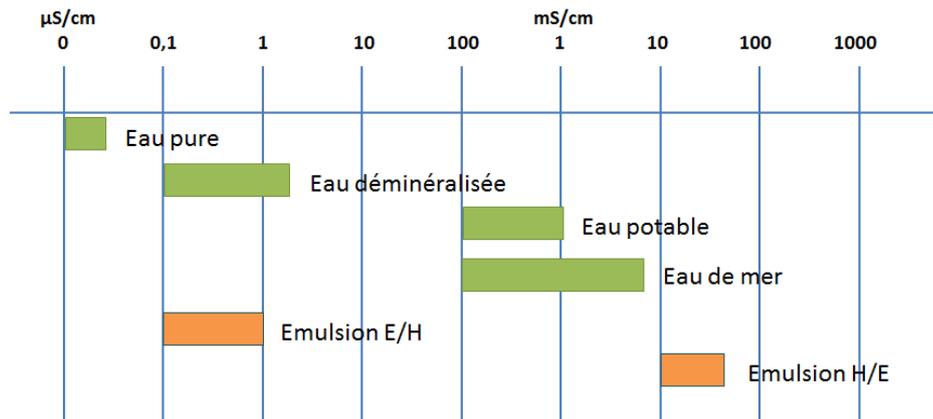


Figure 12 : Plages de conductivité de solutions aqueuses et des émulsions.

Nous avons utilisé le conductimètre (Cond 330i, WTW) pour réaliser les mesures. L'appareil mesure également la température à l'aide d'une sonde de température intégrée dans sa cellule.

Le principe de la méthode consiste à chauffer (et refroidir) les composants impliqués dans la formulation de NCL sous agitation, dans le but de déterminer si on observe une modification de la conductivité (généralement de quelques mS/cm à quelques μS/cm).

Dans cette zone, le système se présente sous la forme d'une solution translucide et homogène, contrairement à l'aspect blanchâtre et une viscosité plus élevée retrouvés dans le cas d'une émulsion eau/huile ou huile/eau. Une conductivité très faible (μS/cm) est caractéristique d'une émulsion E/H par contre, une émulsion H/E présente une conductivité beaucoup plus importante (mS/cm) (Vanpouille-Box 2012 ; Allard 2008).

Formulation des NCLs

Une fois les études de conductivité réalisées et les différents cycles de températures établis pour chaque formulation, nous pouvons établir le protocole de formulation des NCL.

Les NCL sont formulées en ajoutant chaque actif séparément selon la température d'inversion de phase de la formulation. Ainsi, les actifs sont introduits dans l'ordre décroissant des températures d'inversion de phase des mélanges avant leurs introductions. Le premier est introduit dans la ZIP se référant à la composition des NCL blanches. Le second est rajouté dans la nouvelle ZIP modifiée par l'ajout du premier actif, et ainsi de suite. Les quantités théoriques des excipients sont compilées dans le tableau 2.

	Quantités théoriques
Kolliphor HS15 (Solutol)	846,2mg
NaCl 5-3014	89,6mg
Eau MilliQ	2,98g
Lipoïd S75-3	75,2mg
Labrafac lipophile WL1349	1028,2mg
Eau de trempé	12,5mL

Tableau 2 : Quantités théoriques des excipients à ajouter dans la formulation des NCL

NCL blanches

Les NCL blanches correspondent aux NCL sans actifs. Le procédé de formulation est expliqué dans le paragraphe suivant et résumé dans la Figure 13:

Dans un bécher, sous agitation magnétique et à température ambiante, les constituants sont mélangés (Solutol®, NaCl, l'eau MilliQ Lipoïd® et Labrafac®) pendant plusieurs minutes. Trois cycles de température entre 90-60°C (4°C/min) sont réalisés. Au cours du dernier cycle, et pendant la phase de refroidissement dans la ZIP (à 80°C pour nous), une trempé d'eau froide est appliquée sous forte agitation, afin de fixer le système.

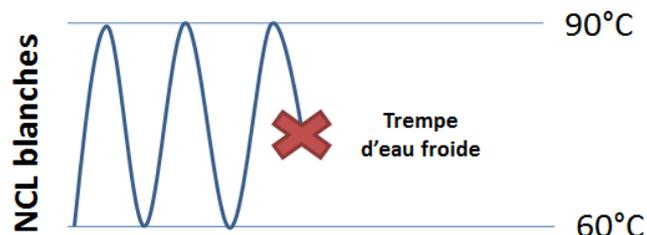


Figure 13 : Représentation schématique des cycles de température pour la formulation des NCL blanches.

NCL chargées

	Eugénol	Cinnamaldéhyde	Carvacrol
NCL EU-CN	260µL	260µL	x
NCL CN	x	520µL	x
NCL EU	520µL	x	x
AT98a*	173,3µL	173,3µL	173,3µL
	Huile clou de girofle	Huile de cannelle	Huile origan
AT101**	173,3µL	173,3µL	173,3µL

Tableau 3 : Quantités des actifs (huiles essentielles ou composants) utilisés dans chaque formulation.

Lors de cette étude nous avons testé plusieurs types de nanocapsules lipidiques (avec des combinaisons d'un ou plusieurs actifs) qui sont compilés dans le tableau suivant (Tableau 3)

Les formulations ont été codées de la façon suivante:

*AT98a : Formulation réalisée avec les trois composants terpéniques (à parts égales) : eugénol, carvacrol et cinnamaldéhyde. Ce sont des actifs purs (molécules issues des produits végétaux).

**AT101 : Nano-encapsulation du mélange AT100. (Le Mélange AT100 correspond à un mélange dans lequel les huiles de clou de girofle, de cannelle et d'origan sont à parts égales.

Les deux premiers cycles de la formulation sont communs à la formulation de NCL blanches comme vu précédemment. Les procédés relatifs aux différents types de NCL testées dans cette thèse sont décrits dans les prochains paragraphes :

a) NCL eugénol/cinnamaldéhyde (50/50)

- Au 3^{ème} cycle, lors de la descente thermique à 82°C, l'eugénol est ajouté et la formulation se refroidit à 60°C.

-Un 4^{ème} cycle de température sera réalisé, (maximum 85°C). Lors de la descente en température le cinnamaldéhyde est ajouté à 73°C (nouvelle ZIP), et la formulation se refroidit jusqu'à 40°C

-Un dernier cycle est réalisé (maximum 80°C). Lors de la descente en température, à 63°C, une trempe d'eau froide est effectuée pour former la suspension de nanocapsules en augmentant la vitesse d'agitation magnétique (agitation pendant 10 minutes à température ambiante).

b) NCL cinnamaldéhyde

- Au 3^{ème} cycle, lors de la descente à 82°C, le cinnamaldéhyde est ajouté et la formulation se refroidit à 40°C.

- Au dernier cycle de température, (température maximum de 85°C). Lors de la descente, en température, une trempe d'eau froide est effectuée à 73°C, en augmentant la vitesse d'agitation magnétique (agitation pendant 10 minutes à température ambiante) pour fixer le système.

c) NCL eugéno

- Au 3^{ème} cycle, lors de la descente à 82°C, l'eugéno est ajouté et la formulation se refroidit à 60°C.

-Un 4^{ème} cycle (maximum 85°C) est réalisé. Lors de la descente à 73°C, une trempe d'eau froide est provoquée en même temps qu'en augmentant la vitesse d'agitation magnétique (agitation pendant 10 minutes à température ambiante) pour fixer le système.

d) AT98a (1/3-1/3-1/3)

- Au 3^{ème} cycle, lors de la descente à 82°C, l'eugéno est ajouté et la formulation se refroidit à 60°C.

-Un 4^{ème} cycle de température est réalisé. Lors de la descente, le carvacrol est ajouté à 76°C et la formulation se refroidit jusqu'à 60°C.

-Un 5^{ème} cycle de température jusqu'à 85°C est réalisé. Lors de la descente, le cinnamaldéhyde est ajouté à 75°C et la formulation se refroidit jusqu'à 40°C.

-Un dernière cycle est enfin réalisé jusqu'à 80°C. Lors de la descente à 55°C, une trempe d'eau froide est provoquée, au même temps qu'en augmentant la vitesse d'agitation magnétique (agitation pendant 10 minutes à température ambiante) pour fixer le système.

e) AT101 (1/3-1/3-1/3)

-Au 3^{ème} cycle, à 50°C, le mélange AT100 est rajouté. La trempe est réalisée juste après pour former la suspension de nanocapsules en augmentant la vitesse d'agitation magnétique (agitation pendant 10 minutes à température ambiante)

Etudes de caractérisation de NCL

Pour caractériser et étudier la stabilité des NCL, nous avons mesuré deux paramètres physico-chimiques :

a) La taille

Les mesures de taille sont réalisées à T0 en sortie de formulation. Elles sont réalisées à l'aide du Nano-sizer Malvern qui s'appuie sur le principe de la diffusion dynamique de la lumière pour mesurer la taille de particules soumises au mouvement brownien. Toutes les mesures ont été répétées trois fois, en diluant la formulation mère (0,05%wt).

b) Le potentiel zêta

Le potentiel zêta est une caractéristique importante qui permet d'appréhender les propriétés électriques de surface des NCL et ainsi leur stabilité. Il correspond à un potentiel électrique (exprimé en volts) mesuré au niveau du plan de cisaillement d'une particule mise en mouvement dans l'eau par électrophorèse (dans notre cas). Les NCL vont donc se déplacer à une vitesse liée à leur potentiel zêta (équation d'Henry). Cette vitesse est mesurée à travers d'un procédé d'interférométrie laser appelé M3-PALS (Phase analysis Light Scattering). L'appareil mesure ainsi la distribution des mobilités électrophorétique pour en déduire la distribution des potentiels zêta

Etudes de stabilité

Nous avons choisi deux catégories de NCL pour réaliser les études de stabilité, les NCL d'eugénol-cinnamaldéhyde et AT98a. Le choix de ces NCL a été surtout influencé pour les résultats d'efficacité *in-vitro* (Chapitre 2). En ce qui concerne les conditions de conservation lors de ces études de stabilité, nous avons stocké les formulations à 4°C à l'abri de la lumière. Les études de stabilité ont été réalisées pendant un mois.

La variation de la taille au cours du temps est un indicateur de l'instabilité des NCL. Dans la déstabilisation, plusieurs phénomènes peuvent avoir lieu, qui se traduit par une augmentation de la taille moyenne ou l'apparition d'une polydispersité importante dans la distribution des tailles.

Les phénomènes le plus fréquents à l'origine de l'instabilité nano-particulaire sont présentés ci-dessous (Figure 14) :

Coalescence

Les NCL fusionnent de façon irréversible pour donner des NCL de taille supérieure. Ce phénomène finit par provoquer une rupture de l'émulsion (déphasage).

Mûrissement d'Oswald

C'est un phénomène (décrit pour la première fois par Wilhelm Ostwald en 1886) qui a lieu lorsque la fraction dispersée est légèrement soluble dans la phase continue.

Ceci entraîne un transfert de matière des petites particules vers les particules plus grandes.

Ce mécanisme se produit du fait que les molécules dispersées possèdent un potentiel chimique plus favorable dans les particules plus grandes.

Floculation (phénomène réversible)

La floculation décrit un phénomène par lequel les NCL peuvent s'agréger entre elles en format des agglomérats (floculats) où existent des faibles interactions inter-particulaires. Souvent, ce phénomène peut initier le phénomène de coalescence qui est une des premières étapes de déstabilisation du système dispersé (déphasage dans le cas d'une émulsion).

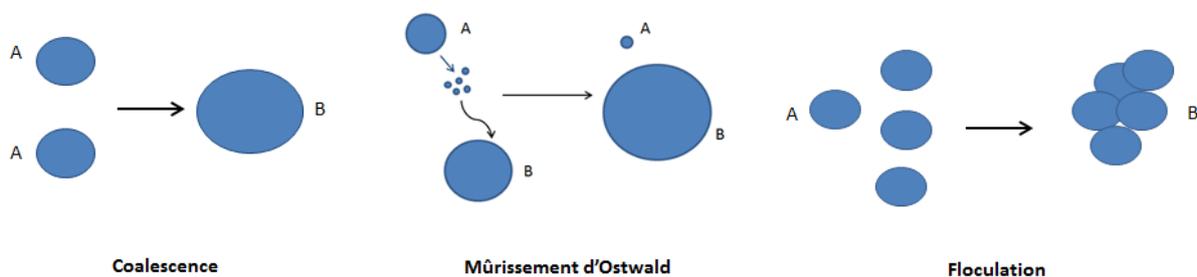


Figure 14 : Image schématique des phénomènes d'instabilité (Coalescence, Mûrissement d'Ostwald et Floculation) que peuvent subir les NCL.

Il existe d'autres phénomènes d'instabilité comme le crémage ou la sédimentation qui peuvent être facilement détectables à l'œil nu, provoqués par une différence de densité entre la phase dispersée et la phase continue.

Le crémage est un processus physique par lequel, les particules en suspension remontent en surface parce que leur densité est plus faible que la phase dispersante. La sédimentation par contre est le processus inverse dans lequel, les particules qui présentent une densité plus élevée que la phase dispersante migrent vers le bas.

Le potentiel zêta est un paramètre très utilisé dans l'étude de la stabilité. Plus le potentiel zêta est élevé, plus les répulsions électrostatiques entre particules sont dominantes face aux forces d'attraction (Rami 2010) généralement interactions de Van Der Waals. Néanmoins, les répulsions électrostatiques ne peuvent expliquer à elles seules la stabilité d'un système colloïdal. Ceci est d'autant plus marqué lorsque peut s'opérer une stabilisation stérique. Ceci est le cas notamment pour les NCL qui sont recouvertes de chaînes PEG (15 unités d'Oxyde d'éthylène en moyenne).

Rendement d'encapsulation

Il existe plusieurs techniques qui permettent de déterminer le rendement et le taux d'encapsulation des actifs dans les NCL. Certaines sont dites directes quand on peut doser l'actif dans toutes les phases où il peut se trouver. Ici il est important de pouvoir retrouver la quantité initiale d'actifs incorporés. D'autres méthodes sont qualifiées d'indirectes lorsqu'on déduit par différence la quantité encapsulée après avoir dosé la partie libre.

Tenant compte que les excipients des NCL (Solutol, labrafac et Lipoïd) ne sont pas des composants volatiles, nous n'avons pas pu déterminer le rendement d'encapsulation par chromatographie en phase gaz CPG. Aussi, nous avons utilisé la méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) pour évaluer le taux d'encapsulation des HE à l'intérieur des NCL.

L'HPLC est une technique de séparation analytique de différentes molécules présentes dans une solution. Pour cela, l'échantillon est poussé par une phase mobile, dans notre cas, la phase mobile sera un mélange d'eau et du méthanol à différents gradients. Le gradient est de 80% d'eau et 20% de méthanol les premiers 15 min. Puis 10min à 65% d'eau et 35% de méthanol, 10 min à 20% d'eau et 80% de méthanol et les dernière 15min à un gradient de 80% d'eau et 20% de méthanol. Cette phase mobile correspond à celle qui entraine les molécules à séparer. Cette séparation permet de comparer les hydrophobies des différents composants aromatiques grâce à leur temps de rétention dans la colonne chromatographique. Les composants les plus polaires sont moins retenus sur la colonne. Les composants aromatiques sont détectés à la sortie de colonne grâce à un détecteur UV ($\lambda=274\text{nm}$) (Rabeau 2009).

Nous avons tout d'abord réalisé une analyse sur les composants seuls (non encapsulés), nous les avons dissous dans du méthanol à une concentration de 1mg/mL pour l'eugénol et le carvacrol et à une concentration de 0,1mg/mL pour le cinnamaldéhyde (Chen et al. 2014)

Nous avons alors centrifugé les différentes suspensions de NCL. 3mL de chaque échantillon de NCL à analyser ont été placés dans des filtres de centrifugation (centrifugal filter units) de 30K. (lot : R4EA66517). Nous avons réalisé une centrifugation à 4000rpm (2057G) pendant 30min à une température de 15°C. Nous avons récupéré d'un côté, le filtre contenant les NCL et d'un autre coté le liquide filtré qui contient les HE qui n'ont pas été encapsulées (Figure 15). Les NCL seront ensuite détruites avec du méthanol et dosées par HPLC. Le filtrat est ainsi analysé pour déterminer la quantité des HE qui n'ont pas été encapsulées.

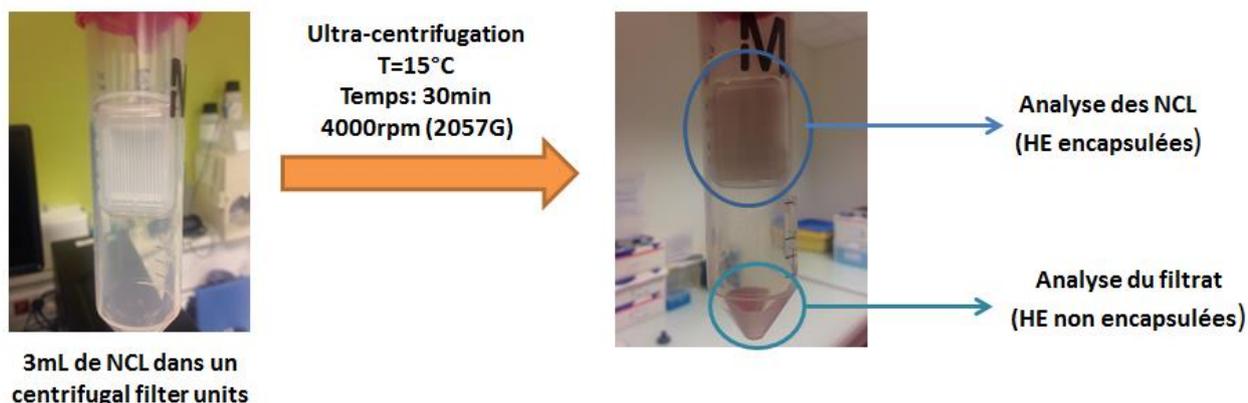


Figure 15 : Procédé de dosage des NCL par ultra-centrifugation et analyse par HPLC

Le calcul du rendement d'encapsulation équivaut à la différence entre la quantité d'actif présent dans les NCL et la quantité théorique d'actif encapsulé. Ces résultats doivent être en concordance avec la quantité d'actif présent dans la fraction non encapsulée.

Imagerie

Nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage (MEB), pour mieux caractériser les NCL.

a) La microscopie électronique à balayage (MEB)

La MEB est une technique permettant d'observer la morphologie externe d'objets micrométriques et nanométriques, utilisant le principe d'interactions préférentielles électrons-matière. Elle permet d'obtenir des informations basiques sur la forme et les caractéristiques de surface des NCL (Benoit et al. 2007).

Ces électrons sont générés par un canon comprenant une source et un champ électrique produit par une différence de potentiel entre la source (cathode) et une anode. Le faisceau d'électrons obtenu possède une longueur d'onde inférieure à celle obtenue pour un microscope optique classique, ceci permet d'obtenir une bien meilleure résolution. Ce faisceau balaie la surface de l'échantillon le mettant dans des conditions particulières de faible pression et de très haute température sous le faisceau. On détecte l'intensité du rayonnement émis par chacun des points soumis au faisceau électronique. La méthode étant très invasive pour imager les NCL, il a donc été nécessaire de mettre en place une méthode spécifique décrite ci-dessous.

Les NCL sont fixées à une lamelle de verre avec du glutaraldéhyde 2% - paraformaldéhyde 2% pendant une nuit sous vide. Une étape post-fixation est ensuite réalisée avec du tétraoxyde d'osmium (OsO_4) 1% pendant 45min. Cette étape est suivie d'une déshydratation avec des concentrations croissantes en éthanol (50%, 70%, 95% et 100%). Une dessiccation est réalisée avec du HMDS (Hexa-méthylidisloxane) jusqu'à son évaporation. Enfin, les NCL sont métallisées avec du platine. Les images ont été obtenues avec un microscope Jeol JSM 6301F.

1.3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Conductivité

Les résultats de conductimétrie des NCL blanches (sans aucun actif) montre une ZIP (zone d'inversion de phase) entre 80°C et 85°C degrés (Figure 16). Le changement (réversible) de la nature de l'émulsion est produit par la variation de température sous légère agitation magnétique (Perrier 2009). C'est dans cette zone de température que la trempe (12,5 mL d'eau à 0°C dans approximativement 5 mL de système initial dans la ZIP) est réalisée afin d'obtenir la suspension mère.

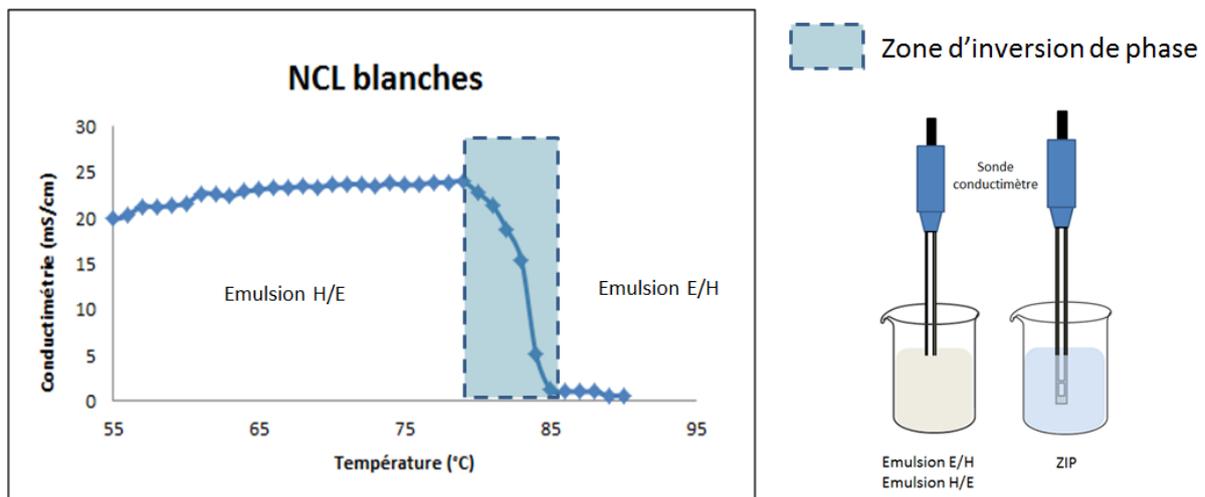


Figure 16 : Graphe de conductivité de NCL blanches avec la zone d'inversion de phase (ZIP).

Nous avons aussi déterminé la ZIP après ajout d'eugénol, de carvacrol, de cinnamaldéhyde et de mélange AT100 pour établir les cycles de température pour chaque formulation. En effet, nous rappelons que l'introduction des actifs modifie la ZIP de la formulation des NCL

blanches. Les résultats de conductivité pour l'ensemble de ces actifs ont été compilés dans la figure 17. Nous avons ajouté directement chacun des actifs (ou des mélanges d'actifs) à la formulation pour laquelle nous avons fait subir les mêmes cycles de température que ceux relatifs aux NCL blanches.

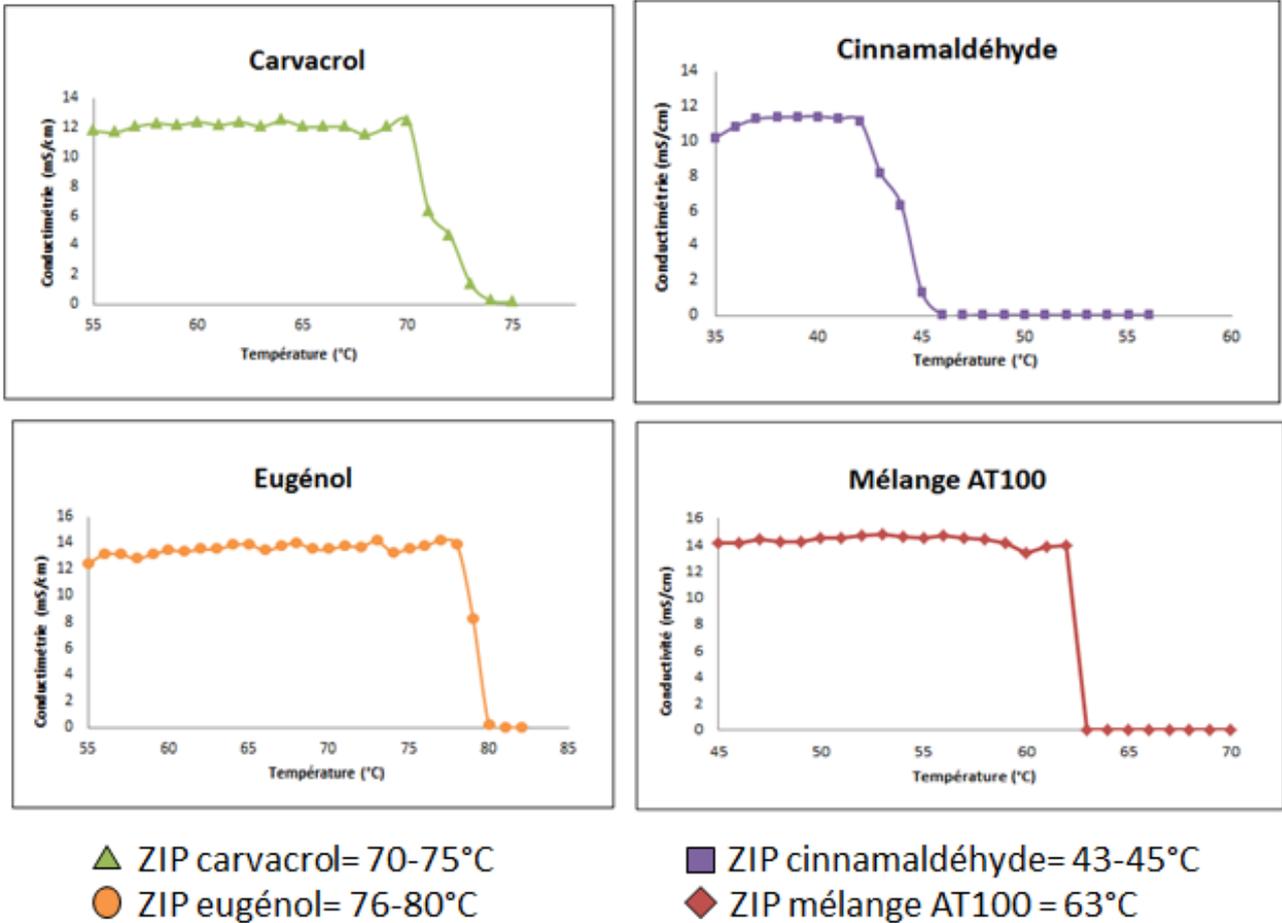


Figure 17 : Conductivité vs température pour la détermination de la ZIP du système après ajout de carvacrol, d'eugénol et de cinnamaldéhyde.

Taille et potentiel zêta

Nous avons compilé dans le tableau suivant (Tableau 4) les tailles (Z-Average, Taille et PDI), ainsi que le potentiel zêta de chaque formulation étudiée :

CHAPITRE 1 : Conception et caractérisation des NCL

	Z-Average (d.nm)	Taille (nm)	PDI	Pot. zêta (mV)
NCL blanches	55,87 ($\pm 1,17$)	49,41 ($\pm 0,78$)	0.066 (± 0.022)	-9,46 (± 2.36)
NCL EU-CN	80,42 ($\pm 3,40$)	67,28 ($\pm 2,68$)	0,128 ($\pm 0,021$)	-18,4 ($\pm 4,72$)
NCL CN	99,19 ($\pm 0,92$)	85,96 ($\pm 1,69$)	0,138 ($\pm 0,05$)	-19,05 (± 1.34)
NCL EU	78,39 ($\pm 3,34$)	69,04 (± 3.35)	0,133 ($\pm 0,06$)	-18,3 ($\pm 2,33$)
AT98a	92,45 ($\pm 1,87$)	78,58 ($\pm 0,80$)	0,132 ($\pm 0,09$)	-17,8 ($\pm 1,96$)
AT101	68,19 ($\pm 5,69$)	56,89 ($\pm 4,70$)	0,131 ($\pm 0,07$)	-9,94 ($\pm 2,73$)

Tableau 4 : Mesures de taille, Z-Average et potentiel zêta à J0 pour les formulations : NCL blanches, NCL eugénol-cinnamaldéhyde, NCL cinnamaldéhyde, AT98a et AT101

Dans la Figure 18 nous pouvons comparer à J0 les différentes tailles et potentiel zêta selon la formulation :

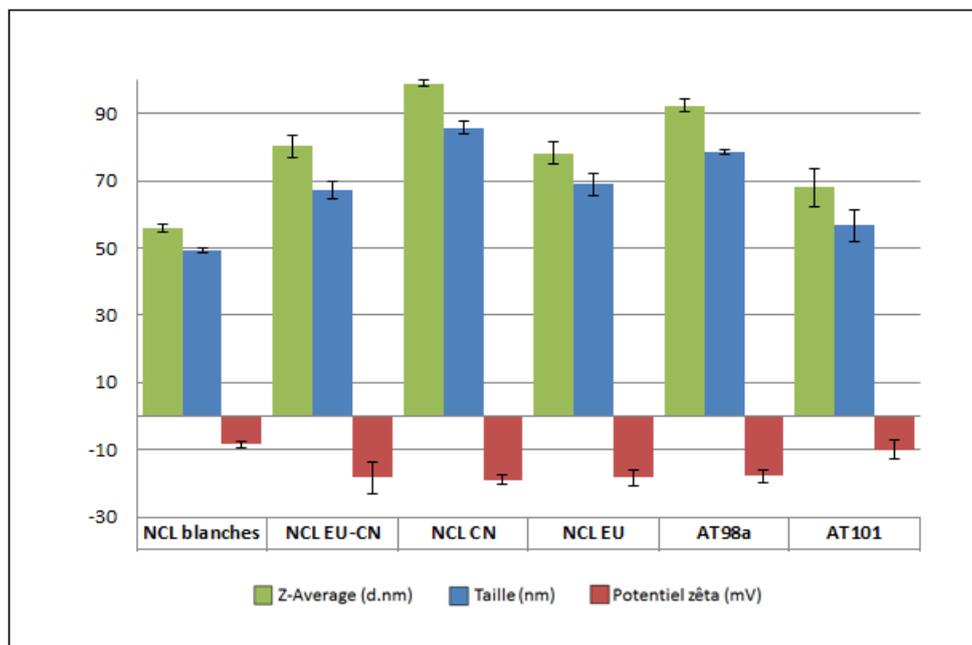


Figure 18 : Mesures de taille, Z-Average et potentiel zêta à J0 pour les formulations : NCL blanches, NCL eugénol-cinnamaldéhyde, NCL cinnamaldéhyde, AT98a et AT101

a) NCL blanches

Elles présentent une petite taille (environ 50nm) avec un PDI faible. Le PDI ou indice de polydispersité, caractérise l'hétérogénéité de la taille des NCL. Généralement, plus cet indice sera petit, plus les NCL présenteront une distribution de taille homogène. Nous considérons une distribution homogène lorsque le PDI a une valeur inférieure à 0,3.

b) NCL chargées

Nous observons une différence significative de taille entre les NCL blanches et les NCL chargées. Ceci est assez logique du fait que les actifs sont à l'intérieur (ou à la surface) de la nanocapsule. Ceci implique une augmentation de la taille hydrodynamique du nano-objet. En ce qui concerne le potentiel zêta, nous n'observons pas une très grande différence sauf pour les NCL élaborées avec le mélange des huiles essentielles (AT101).

Les NCL qui contiennent le cinnamaldéhyde restent celles qui présentent la plus grande taille. Ce résultat peut être dû à la disposition des molécules à l'intérieur des NCL mais aucune étude n'a pu être réalisée pour le prouver.

Stabilité

Dans la Figure 19 a et b, nous pouvons comparer la stabilité (taille et potentiel zêta) de deux formulations : NCL eugénol-cinnamaldéhyde (Figure 19a) et AT98a (Figure 19b) pendant 1 mois.

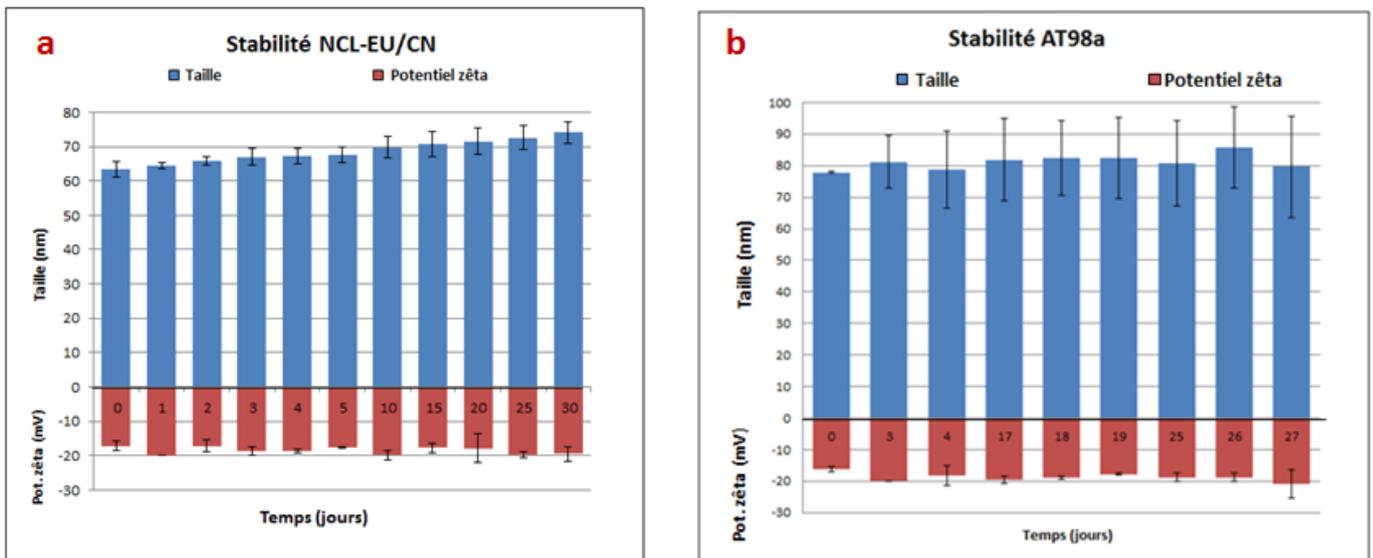


Figure 19 : Evolution de la taille (nm) (bleu) et du potentiel zêta (mV) (rouge) pendant 30 jours pour la formulation Eugénol/Cinnamaldéhyde (n=3) (a) et pour la formulation AT98a(b).

Nous observons que la taille moyenne augmente légèrement au cours du temps mais en restant stable avec des écart-types modérés. Le potentiel zêta reste stable pendant tout le mois.

L'image 18b montre que les NCL restent stables pendant le temps étudié, avec une variation de taille et de potentiel zêta moyenne qui varie moins de 10nm du J0 au J27 pour la taille et

moins de 5mV pour le potentiel zêta. En ce qui concerne la stabilité, nous n'observons pas de phénomènes de coalescence, mûrissement d'Ostwald, crémage ou précipitation.

La taille moyenne au temps J0 de la formulation NCL EU/CN est de 63,44nm ($\pm 2,34$) avec un potentiel zêta moyen -16,1mV ($\pm 2,96$). En revanche, la formulation AT98a présente à J0 une taille moyenne de 78,15nm ($\pm 0,41$) et un potentiel zêta de -16,7 ($\pm 0,70$) mV.

Cette différence de taille peut être due au fait que l'incorporation des actifs se fait dans des cycles différents (6 cycles pour AT98a et 5 cycles pour NCL EU/CN) ce qui pourrait avoir une conséquence sur la taille finale de la NCL. De plus comme nous l'avons fréquemment montré au laboratoire, toute incorporation d'actif peut modifier la conformation des chaînes pégylées à la surface particulaire et donc engendrer une différence de taille hydrodynamique

Rendement d'encapsulation

A l'aide de HPLC, nous avons étudié le temps de rétention pour les trois actifs que nous étudions, l'eugénol, le cinnamaldéhyde et le carvacrol (Figure 20) solubilisés dans du méthanol. Cela va nous permet d'identifier et séparer chaque pic.

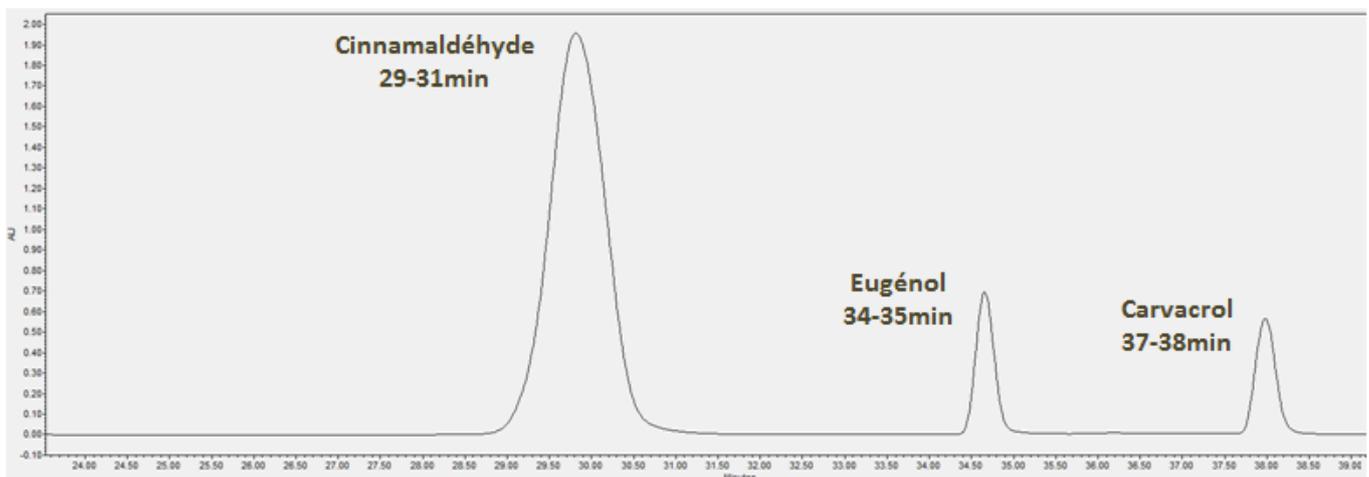


Figure 20: Chromatogramme en phase liquide à haute performance des composants aromatiques : cinnamaldéhyde, eugénol et carvacrol dilués dans du méthanol.

Une courbe d'étalonnage (Figure 21) est établie pour chaque actif afin de démontrer la relation linéaire entre l'absorbance mesurée à 274 nm et la concentration de chaque NCL (AT98a, NCL d'eugénol, NCL de cinnamaldéhyde et NCL d'eugénol-cinnamaldéhyde) (mg/mL)

CHAPITRE 1 : Conception et caractérisation des NCL

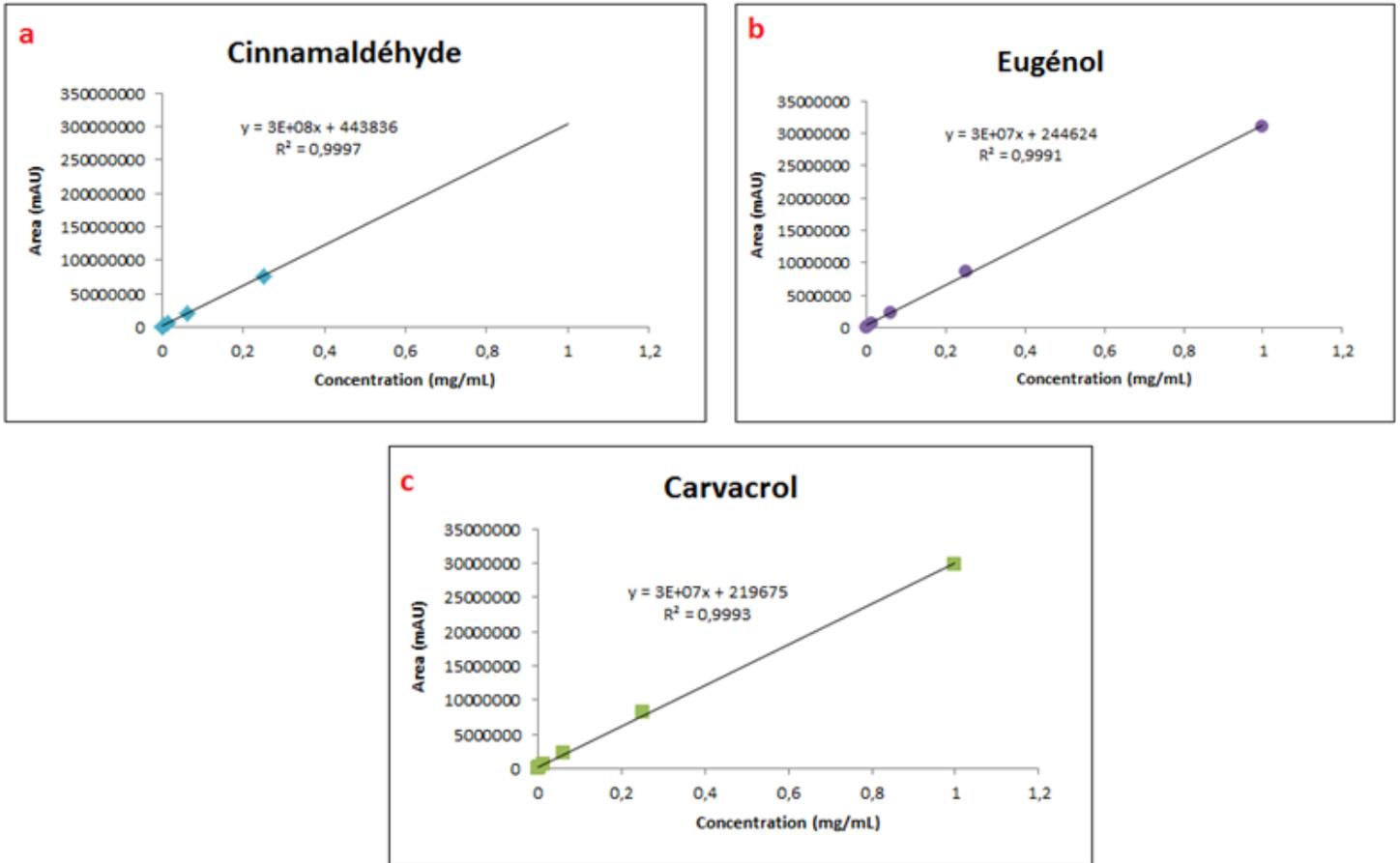


Figure 21 : Courbes d'étalonnage pour le cinnamaldéhyde (a), l'eugénol (b) et le carvacrol (c).

Grâce à la courbe d'étalonnage nous avons pu déterminer une concentration. Ceci nous a permis, en connaissant la concentration initiale, de déterminer le rendement d'encapsulation de chaque composant au cœur de la nanocapsule.

	Cinnamaldéhyde	Eugénol	Carvacrol	TOTAL
AT98a	96,11%±0,34	100%±5,19	91,68% ± 7,27	95,93% ±3,55
NCL EU	---	96,72%±3,84	---	96,72%±3,84
NCL CN	85,71%±1,32	---	---	85,71%±1,32
NCL EU-CN	89,52%±1,40	91,53%±1,72	---	89,03%±6,37

Tableau 5 : Rendement d'encapsulation (%) de chaque actif pour chaque NCL (Fraction encapsulée)

	Cinnamaldéhyde	Eugénol	Carvacrol	TOTAL
Filtrat AT98a	3,31%±0,07	1,96%±0,6	4,5%±0,7	3,25%±0,35
Filtrat EU	---	2,19%±0,12	---	2,19%±0,12
Filtrat CN	14.3%±0,67	---	---	14.3%±0,67
Filtrat EU-CN	12,45%±0,29	5,27%±0,74	---	8,8%±0,31

Tableau 6 : Rendement d'encapsulation (%) de chaque actif pour chaque NCL (Fraction non encapsulée)

En observant les résultats de la fraction encapsulée (Tableau 5) et de la fraction non encapsulée (Tableau 6) nous observons que le composant le mieux encapsulé est l'eugénol avec $96,72\% \pm 3,84$ d'encapsulation, ce qui est cohérent avec la quantité d'eugénol retrouvée dans la fraction non encapsulée ($2,19\% \pm 0,12$).

Les NCL de cinnamaldéhyde présentent le rendement d'encapsulation le plus faible ($85,71\% \pm 1,32$).

En comparant les deux NCL qui possèdent plus d'un actif (AT98a et NCL EU-CN), nous observons une meilleure encapsulation avec la formulation AT98a, avec une encapsulation totale de $95,93\% \pm 3,55$, contre $89,03\% \pm 6,37$ pour les NCL d'eugénol et cinnamaldéhyde.

Imagerie

a) Microscopie électronique à balayage

Nous avons analysé des NCL correspondant à la formulation AT98a comme le montre la figure 22. Nous avons obtenu des objets d'une taille proche de 100nm, avec une structure relativement sphérique. Une des contraintes du MEB dans l'obtention des images de NCL est la mise sous vide et le réchauffement très important de l'échantillon sous le rayonnement laser. Etant donné la nature très hydrophile des chaînes PEG, les NCL sont donc très fragiles à ce type d'imagerie. Aussi, une bonne métallisation est importante afin de protéger au maximum l'échantillon. Les images ci-dessous démontrent l'adéquation de ce traitement de surface pour imager des objets fragiles.

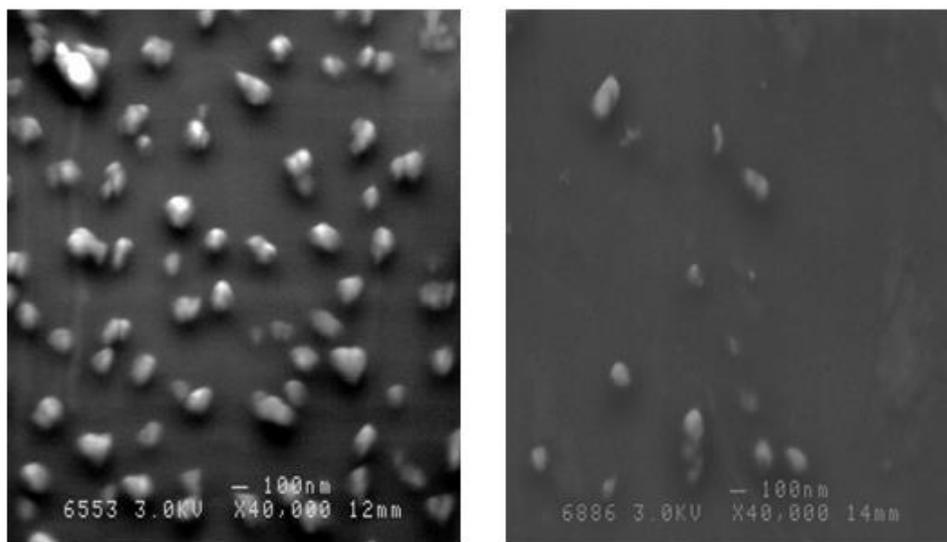


Figure 22 : Images d'AT98a obtenues par microscopie électronique à balayage (résolution x40000).

1.4 CONCLUSION

Dans cette première partie nous avons cherché à développer des NCL chargées en HE stables et actives contre les bactéries. Les résultats obtenus confirment l'obtention de NCL chargées de composants terpéniques d'HE, monodisperses et stables sur une durée supérieure à un mois. La répétabilité des méthodes de fabrication reste assez élevée avec de faibles écarts-types. La méthode choisie au final pour obtenir le meilleur résultat a été la méthode d'incorporation séquentielle des composants l'un après l'autre, qui semble une méthode innovante et intéressante dans l'encapsulation de plusieurs actifs dans une même NCL. Cette méthode développée aussi par Montagu (Montagu et al. 2014) nous permet d'encapsuler nos actifs avec des bons rendements d'encapsulation.

Les images de microscopie (MEB) montrent des objets sphériques d'une taille dans l'intervalle 80-100nm pour les NCL AT98a, ce qui est cohérent avec les résultats de granulométrie obtenus par DLS.

Dans le chapitre suivant, notre but a été de sélectionner la formulation la plus efficace vis-à-vis des bactéries, puis celle qui montrera les meilleures synergies lorsque associée à un antibiotique. Pour cela, nous devons également tester plusieurs antibiotiques appartenant à des familles différentes.

2. EFFICACITE *IN-VITRO* DES NCL ET LEUR ASSOCIATION AVEC DES ANTIBIOTIQUES

2.1 INTRODUCTION

Comme nous l'avons précisé dans les chapitres précédents, des mesures doivent être prises pour mieux contrôler l'utilisation d'antibiotiques dans un contexte où les alternatives à leur utilisation ne sont pas très nombreuses.

Le traitement antibiotique optimal génère encore beaucoup de débats, et l'utilisation d'une antibiothérapie combinée peut être envisagée dans certaines circonstances (Leiro Fernandez et al. 2007).

En comparaison avec la monothérapie, un traitement combiné permet d'élargir le spectre d'action lors de l'antibiothérapie probabiliste (Aspa et al. 2004) ou contre les bactéries atypiques, qui représentent un tiers des pneumonies communautaires (Woodhead 2002). Le traitement combiné permet aussi de traiter des bactéries présentant une résistance acquise (Aspa et al. 2004) voire des BMR.

Les associations sont aussi efficaces lorsque nous voulons réduire la toxicité d'un antibiotique, comme c'est souvent le cas des aminoglycosides (Wilkowske and Hermans 1987 ; Atman and Harris 1991) qui ne sont aujourd'hui utilisées que sur 2 ou 3 jours de traitement en association dans les infections avec des facteurs de gravité.

Des études comparatives (monothérapie/thérapie combinée) ont été réalisées, comme celle menée par Brown et ses collaborateurs en 2003. Les résultats montrent que la mortalité des patients traités avec une thérapie combinée était globalement inférieure. (Brown et al. 2003). D'autres études présentent des résultats similaires (Leyenaar et al. 2014 ; Ambroggio et al. 2012)

En général, lorsqu'on évoque une antibiothérapie combinée, on fait référence à l'association de deux ou plusieurs antibiotiques (par exemple, un β -lactamique avec un macrolide ou une fluoroquinolone) (Lodise et al. 2007 ; Martin-Loeches et al. 2010) mais très rarement avec des substances autres que les antibiotiques.

Néanmoins, plusieurs chercheurs confirment que l'utilisation combinée des HE avec des antibiotiques pourrait représenter une stratégie très prometteuse (Hemaiswarya et al. 2008 ; Rosato et al. 2008, 2009 ; Wagner 2011).

Dans la littérature, la rifampicine a déjà été associée à d'autres antibiotiques comme l'isoniazide (Grumbach 1975 ; Kalra et al. 2007), la clindamycine (Faye et al. 2005 ; Mendonça and Griffiths 2006), la vancomycine (Ju et al. 2005) ou la Ciprofloxacine (Roder and Gustchik 1989 ; Fass and Helsel 1987 ; Van der Auwera and Joly 1987). Dans cette dernière association, les auteurs ont trouvé des antagonismes *in-vitro*.

En milieu hospitalier, l'association d'une β -lactamine (inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne) et un macrolide (inhibition de la synthèse de protéines) est très efficace dans le traitement des pneumopathies aiguës (Brown et al. 2003 ; Leyenaar et al. 2014 ; Ambroggio et al. 2012). Le succès de cette association s'explique par la combinaison de deux antibiotiques qui présentent des mécanismes d'action différents. On peut aussi supposer une augmentation de la pénétration du macrolide dans la bactérie, grâce à l'action qu'exercent les β -lactamines sur la paroi (effet produit également par les huiles essentielles)

b) Résistance bactérienne : exemple du méropénème

Comme nous l'avons déjà dit dans l'introduction de cette thèse, la résistance bactérienne est un processus inévitable (mais qui peut être retardé). Cette résistance peut affecter une bactérie en général ou une souche en particulière.

Le **méropénème** (Figure 24) est un antibiotique de la famille des β -lactamines (classe carbapénèmes). Les carbapénèmes se distinguent des pénicillines par l'absence de l'atome de soufre et d'une liaison insaturée en C2-C3 (Wolff et al. 2009). Le méropénème a une action sur les protéines liant la pénicilline, responsables de la synthèse du peptidoglycan (PG) (Fish and Singletary 1997), ayant comme cibles principales les PLP1a, 1b et 2 (Wolff et al. 2009).

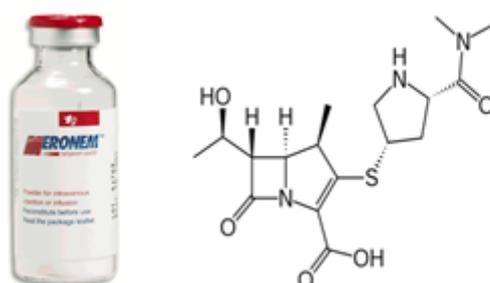


Figure 24 : Structure chimique du Méropénème (Image créée en utilisant ACD/ChemSketch 8.0)

Nous avons choisi cet antibiotique parce que même s'il est actif contre des bactéries à Gram négatif, certaines ont développé des résistances. Nous avons étudié deux souches différentes d'*Acinetobacter baumannii*, SAN008, sensible (CMI=1µg/mL), et RCH, résistante au méropénème (CMI>32µg/mL).

Les mécanismes impliqués dans cette résistance sont principalement une imperméabilité associée à une hyperproduction de céphalosporinase.

D'autres auteurs ont mis en évidence une sensibilité diminuée de la souche Ab-153 d'*A.baumannii* vis-à-vis du méropénème (CMI=8µg/mL). L'association avec le sulbactam permet de réduire sa CMI à 4µg/mL (Ko et al. 2004). L'association méropénème – sulbactam s'est aussi avérée synergique sur d'autres souches d'*A.baumannii* (Kiffer et al. 2005).

Associer le méropénème à d'autres antibiotiques, reste une alternative assez répandue dans le but de lutter contre les BMR. Pour citer quelques exemples, l'utilisation du méropénème avec la colistine (Falagas et al. 2006) ou avec la plazomycine (Rodriguez-Avial et al. 2015), ces résultats sont souvent très intéressants *in-vitro* mais un peu moins *in-vivo* (Petrossilio et al. 2008).

Les associations d'antibiotiques (Hugonnet et al. 2009 ; Payen et al. 2012) sont obligatoires pour le traitement de la tuberculose, maladie provoquée par *Mycobacterium tuberculosis* qui persiste dans le monde, avec plus de 2 milliards d'individus touchés (Hugonnet 2009). Pour éviter l'émergence de mutants résistantes.

En ce qui concerne les HE, nous retrouvons dans la littérature diverses associations avec les HE, notamment l'huile d'origan (Si et al. 2008) ou l'huile de l'arbre du thé (*Melaleuca alternifolia*) (Papadopoulos et al. 2006).

c) La masse moléculaire (taille) de l'antibiotique : exemple de la vancomycine

Les huiles essentielles ont la capacité de déstabiliser la membrane des bactéries (Burt 2004). Nous nous sommes intéressés aux antibiotiques qui ont une taille trop élevée pour traverser librement la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif. Ainsi, des antibiotiques avec des poids moléculaires supérieurs aux 1000Da comme la vancomycine (1449Da), la daptomycine (1620Da) ou la teicobactine (1242Da), pourraient être désormais actifs sur les bactéries à Gram négatif en facilitant leur passage à travers la membrane externe. Comme décrit dans l'introduction, les bactéries à Gram négatif, à différence des bactéries à Gram

positif, présentent une membrane externe supplémentaire formée par des phospholipides et porines. Ces porines régulent le passage des substances à l'intérieur de la bactérie. Ce passage peut être rendu difficile non seulement du fait de la taille de l'antibiotique mais aussi du fait du nombre de porines présentes dans la membrane. Certains mécanismes de résistance s'expliquent par une diminution du nombre de porines. Les porines sont des protéines de membrane avec des dimensions d'environ 35Å de longueur et 50Å d'hauteur (Galdiero et al. 2012). Le diamètre des porines est d'environ 15Å pour les porines générales et 6Å pour les porines très sélectives (Galdiero et al. 2012). Des molécules ayant une taille supérieure à 15Å (~1000Da) seront donc bloquées.

Nous avons testé la **vancomycine** (Figure 25), antibiotique de la famille des Glycopeptides, beaucoup trop volumineux pour emprunter les porines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Cet antibiotique est actif à faibles concentrations contre les bactéries à Gram positif (Reynolds 1989) qui ne présentent pas de membrane externe. Cet antibiotique a la capacité d'inhiber la synthèse du PG, en empêchant l'action des glycotransférases et des transpeptidases bloquant ainsi l'élongation du PG. La vancomycine traverse la paroi bactérienne et se fixe spécifiquement sur le dipeptide D-alanyl-D-alanine terminal de la chaîne disaccharide (unité de base et précurseur de la synthèse du PG) (Bryskier 2005). Cette fixation provoque un encombrement stérique et bloque deux des principales réactions enzymatiques nécessaires pour la synthèse du PG. Ceci finit par provoquer la mort de la bactérie, néanmoins, l'activité de la vancomycine est lente (24h et 48h).

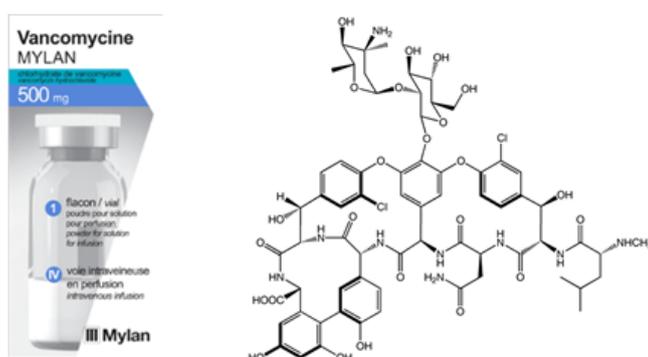


Figure 25 : Structure chimique de la Vancomycine (Image créée en utilisant ACD/ChemSketch 8.0)

Dans la littérature, des nanoparticules de vancomycine ont été utilisées pour le traitement des infections à Gram négatif (Kell et al. 2008) ou des bactéries devenues résistantes aux antibiotiques (Gu et al. 2003). Néanmoins, elle reste une voie très peu exploitée.

d) Pouvoir bactéricide : exemple de la doxycycline

Nous pouvons classer les antibiotiques selon le type d'action qu'ils auront sur la bactérie, bactéricide ou bactériostatique. Le terme bactéricide est appliqué aux substances capables de tuer les bactéries, par contre, la bactériostase s'attribue aux substances qui ont la capacité de stopper la multiplication bactérienne mais sans tuer les bactéries.

Même si les deux types d'antibiotiques sont couramment utilisés, certains auteurs ont prouvé qu'utiliser des antibiotiques bactériostatiques, favoriserait l'apparition des résistances. Les bactéries restantes continuent à produire des toxines en reprenant éventuellement leur croissance (Schaechter et al. 1993).

Nous avons testé aussi la **doxycycline** (Figure 26), antibiotique bactériostatique de la famille des tetracyclines de 2^{ème} génération (1973).

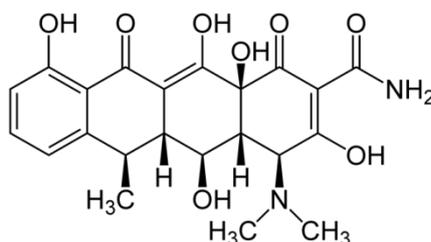


Figure 26 : Structure chimique de la Doxycycline (Image créée en utilisant ACD/ChemSketch 8.0)

Le mécanisme d'action de la Doxycycline repose sur l'inhibition de la synthèse protéique des bactéries en empêchant l'attache de l'ARNt au complexe ARNm-ribosome, et l'inhibition des systèmes enzymatiques bactériens par chélation des cations divalents (notamment Mg^{2+}). Son spectre, au début assez large, s'est beaucoup réduit à cause de l'émergence des résistances. Néanmoins, la doxycycline reste le traitement de choix pour les infections dû à *Chlamydia* et à *Mycoplasma* ou en tant qu'antipaludéen (Filisetti and Monassier 2012).

Dans la littérature, nous retrouvons des associations de la doxycycline avec des huiles essentielles comme l'huile d'origan contre *E.coli* (Si et al. 2008) ou avec l'huile de coriandre contre *A.baumannii* (Duarte et al. 2012)

Types d'interactions médicamenteuses

Nous parlons d'interaction médicamenteuse lorsque l'incorporation de médicaments modifie l'effet des premiers. Pour que cet effet apparaisse, il faut que les médicaments soient simultanément présents dans l'organisme, ou que les effets des premiers soient présents pendant l'administration des seconds. Les mécanismes responsables de ces interactions peuvent être très variables et parfois inconnus. Dans le domaine pharmaceutique, toutes les interactions ne sont pas désirables et certaines peuvent être dangereuses. On peut citer comme exemple l'utilisation simultanée des cyclines avec rétinoïdes ou des macrolides avec des dérivées de l'ergot de seigle. Souvent ces associations délétères pour le patient sont involontaires et doivent être détectées par le Pharmacien. Cette thèse s'inscrit dans un objectif de bénéfice de ces interactions pour améliorer l'efficacité antibiotique. Selon l'effet retrouvé, les interactions peuvent se classer en :

- synergiques**: l'action conjointe de deux antibiotiques est supérieure à la somme des actions de chacun de deux seuls.
- antagonistes**: ce phénomène apparait lorsque l'effet d'un antibiotique réduit ou supprime l'effet de l'autre.
- indifférentes**: ici l'association ne peut pas être considérée comme synergique ni antagoniste. Dans ce cas, nous retrouvons un effet correspondant à l'addition de deux médicaments.

En microbiologie existent plusieurs techniques pour déterminer si une association est synergique ou pas. Dans cette thèse, nous nous sommes servis de deux d'entre elles :

a) Indice FIC.

L'indice FIC ou Fractional inhibitory concentration index, est déterminé grâce à la concentration minimale inhibitrice* (CMI ou MIC en anglais) de chaque médicament, seul et en association, la formule qui met en relation ces paramètres a été reportée par Didry en 1994 :

$$FIC_I = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

MIC_A correspond à la CMI du produit A seul et MIC_{A/B} à la CMI du produit A associé au produit B, de la même manière, MIC_B correspond à la CMI du produit B seul et MIC_{B/A}.

L'interprétation de cet indice varie selon l'auteur, mais nous avons choisi l'interprétation la plus courante :

- la synergie est donc définie pour un indice FIC ≤ 0,5,
- L'indifférence est définie pour un indice FIC tel que 0,5 < FIC ≤ 4
- l'antagonisme est défini pour un indice FIC > 4 (White et al. 1996)

*Définition de MIC page 106.

a) La cinétique de bactéricidie

Il est aussi possible de déterminer une synergie grâce à la cinétique de bactéricidie, nous pouvons considérer une association synergique s'il existe au moins 2 logs CFU/mL de différence entre l'association et le médicament seul le plus actif.

La cinétique de bactéricidie est une technique que permet de représenter graphiquement l'évolution d'un traitement antibactérien sur 24h.

Même si ces deux méthodes sont très utilisées, les résultats obtenus ne sont pas toujours comparables, parce que les protocoles expérimentaux sont légèrement différents. Dans cette thèse, nous avons décidé de travailler avec les deux méthodes.

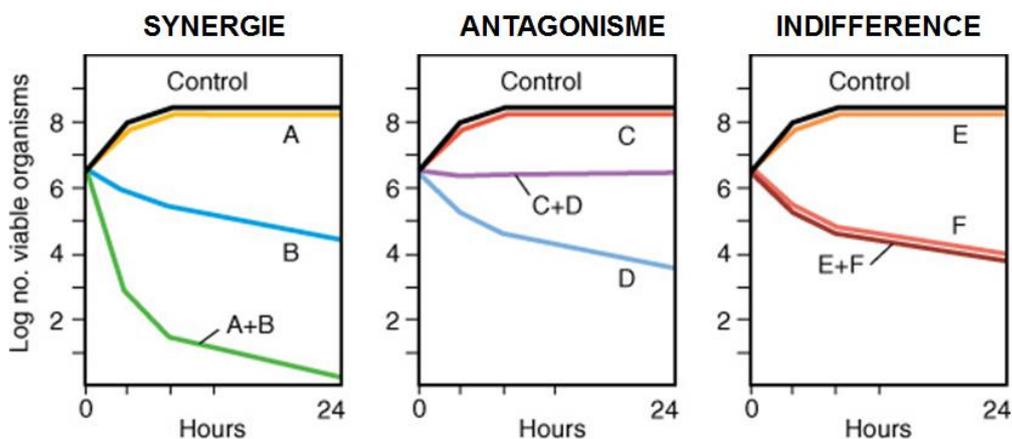


Figure 27 : Différents types d'interaction en cinétique de bactéricidie

Dans la figure 27 nous pouvons schématiser les différents profils que l'on retrouve selon le type d'interactions. Dans un cas de synergie, nous avons un antibiotique « A » d'un effet similaire au Control, un médicament « B », bactériostatique et un effet bactéricide lorsque les deux antibiotiques sont associés.

L'antagonisme est caractérisé pour un effet global (C+D) moins puissant que D

Si l'effet est la même pour l'association (E+F) que pour F, l'association est considérée comme indifférente.

2.2 MATERIELS ET METHODES

Préparation des NCL

Les nanocapsules lipidiques ont été formulées selon la méthode d'inversion de phase. Nous avons testé différents types de nanocapsules réalisées selon les méthodes de formulations décrites dans le chapitre 1.

Les souches bactériennes

Nous avons donc travaillé avec 4 bactéries d'espèces différentes, *A.baumannii* SAN et RCH, *Pseudomonas aeruginosa* souche clinique ATCC, *Klebsiella pneumoniae* et *E .coli* ATCC25922. Les bactéries sont mises en culture pendant 16heures sur une gélose au sang. De 2 à 4 colonies seront prélevées à l'aide d'un écouvillon et déposées dans 2mL d'une solution de NaCl à 0,85%. La turbidité de la suspension bactérienne est mesurée en utilisant un densitomètre. Le densitomètre DENSIMAT permet de mesurer la densité optique d'un inoculum bactérien. La densité bactérienne est calibrée pour que la turbidité soit équivalente au 0,5 unités MacFarland, ce qui équivaut à environ 10^8 CFU/mL. Pour chaque souche, nous avons préparé une solution à DO de 0,5McF, puis effectuer une dilution au $10^{\text{ème}}$ dans du BHI (1mL dans 9mL de BHI).

Les antibiotiques

Nous avons testé 4 antibiotiques différents appartenant à des classes différentes (décrits précédemment)

-Rifampicine, Rifadyne IV (lot: 1A2449) 600mg, poudre et solvant pour perfusion distribué par Sanofi-Aventis.

- Méropénème, Meronem (lot : 13033D) 1000mg, poudre pour perfusion IV, distribué par Astra Zeneca
- Vancomycine (lot: B2142) 1000mg, poudre pour perfusion IV, distribué par MYLAN.
- Doxycycline hyclate (lot : A388805) 100mg, solution injectable pour perfusion, distribué par SERB Laboratoires. Qui a fait l'objet d'une étude à part (article intitulé : Synergistic interaction between doxycycline and terpenics components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against Gram-negative bacteria, qui suit ce chapitre)

Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice ou CMI fait référence à la plus faible concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber, *in-vitro*, la croissance d'une souche bactérienne (Bébéar and Robertson 1996). Elle permet de déterminer quelle concentration d'antibiotique sera efficace contre une bactérie particulière.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice ou CMI est effectuée dans une plaque de 96 puits, comme le montre la Figure 29 : 100µL de BHI (Brain Heart Infusion) sont déposés dans chacun des puits, en réservant la ligne A aux témoins (pas d'actifs). 100µL du produit à tester est ajouté dans chaque puit de la ligne B, et des dilutions de deux en deux sont effectuées dans chaque ligne afin d'obtenir des concentrations décroissantes. Les 100µL restant après la dernière ligne sont éliminés.

100µL de la suspension bactérienne préparée, sont ajoutés dans l'ensemble des puits. Ce qui porte un volume total de chaque puit à 200µL. La plaque sera para-filmée et mise en incubation pendant 24heures à 37°C. La CMI correspond à la concentration en antibiotique du 1^{er} puit ne présentant aucun trouble.

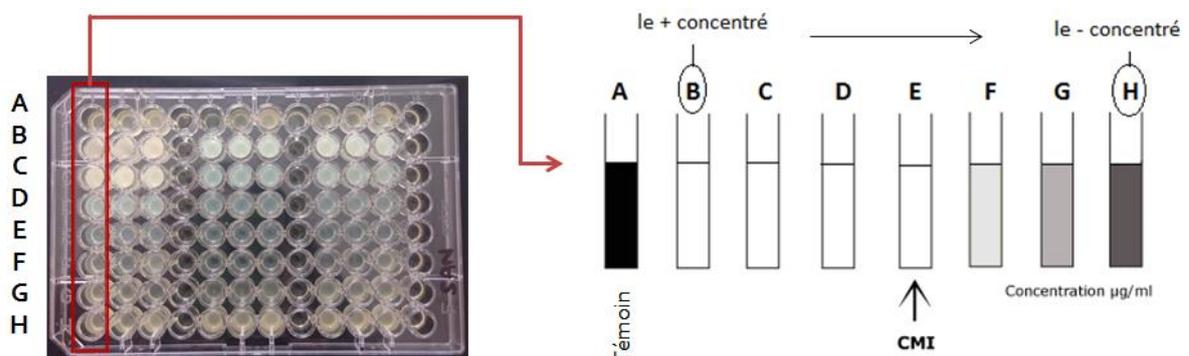


Figure 29 : Plaque 96 puits pour la lecture de la CMI

Cinétique de bactéricidie

La cinétique de bactéricidie (Figure 30) est une technique qui permet de représenter graphiquement la croissance d'une bactérie en présence d'un antibactérien sur 24 heures.

La cinétique de bactéricidie est réalisée avec un inoculum d'environ $1.5 \cdot 10^5$ CFU/mL, dans un volume final de 2 mL. Les échantillons contenant les produits à tester et les témoins (les bactéries en BHI) seront incubés à 37°C. A 0, 3, 6 et 24 h 100 µL de chaque échantillon seront prélevés et dilués (si nécessaire) dans des tubes contenant 10 mL d'eau. 100 µL de chaque dilution seront étalés sur une gélose au sang à l'aide d'un râteau. Les géloses seront incubées toute la nuit à 37°C et les colonies seront comptées afin de pouvoir tracer un graphique logarithmique en fonction du temps.

L'activité a été considérée comme bactéricide lorsque l'inoculum initial est réduit de $\geq 3 \log_{10}$ CFU/mL (99,9%), et l'activité bactériostatique a été défini comme une réduction de l'inoculum initial entre 0 et $3 \log_{10}$ UFC/mL (Tenover et al. 2004). Comme nous l'avons dit, cette technique nous permet aussi de déterminer si une association est synergique. La synergie a été définie comme une diminution de $\geq 2 \log_{10}$ du nombre de CFU par ml par rapport à l'agent le plus actif unique (Singh et al. 2002).

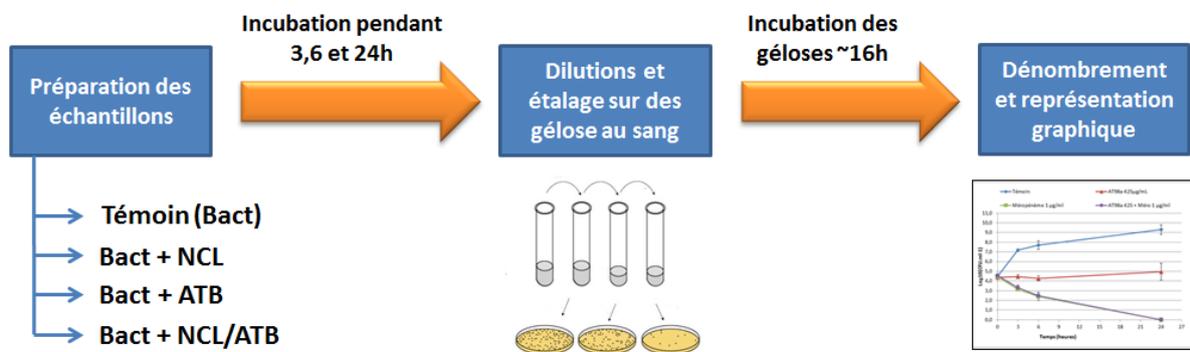


Figure 30 : Protocole de la méthode de cinétique de bactéricidie pour l'étude des associations NCL/ATB.

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Nous avons réalisé des études d'imagerie sur plusieurs bactéries avec l'association AT98a-Vancomycine. Pour chaque souche, nous avons préparé une solution à DO de 0,5 McF, puis effectué une dilution au $10^{\text{ème}}$ dans du BHI (1 mL dans 9 mL de BHI). Nous avons mis les bactéries en contact avec les produits (AT98a, NCL EU, NCL CN et vancomycine) pendant 6 heures à 37°C.

CHAPITRE 2 : Efficacité in-vitro des NCL et leur association avec des antibiotiques

Dans le Tableau ci-dessous (Tableau 7) nous avons compilées les concentrations en actif testés pour chaque bactérie. Dans tous les cas, nous avons utilisé chaque actif avec des concentrations un peu inférieures à leur CMI correspondante.

	A.baumannii SAN	K.pneumoniae	P.aeruginosa
TEMOIN	Sans actifs	Sans actifs	Sans actifs
VANCOMYCINE	10µg/mL	10µg/mL	10µg/mL
AT98a	425µg/mL	620µg/mL	930µg/mL
NCL EU	465µg/mL	---	---
NCL CN	250µg/mL	---	---

Tableau 7: Concentrations de chaque actif utilisé pour chaque bactérie pour la technique de microscopie électronique.

Les bactéries ont été centrifugées à 4000rpm pendant 10min et lavées avec du PBS (phosphate buffered saline). Le culot bactérien a été ensuite posé sur une lamelle ronde et fixé à vide avec une solution glutaraldéhyde 2% - paraformaldéhyde 2%. Le protocole pour la post-fixation et pour la déshydratation des échantillons est le même que celui qui a été décrit dans le Chapitre 1.

Les bactéries testées ont été *A.baumannii* SAN, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, chaque association a été comparée à un témoin négatif. Les images ont été obtenues grâce au microscope Jeol JSM -6301F.

Microscopie électronique à transmission (MET)

Nous avons également décidé d'observer les bactéries par microscopie électronique à transmission, contrairement à celle du balayage, le faisceau laser ne va pas balayer l'échantillon mais la traverser. Cela permet la visualisation d'un échantillon mince en transparence ce qui permettra de regarder la surface de la bactérie et également sa composition interne. Les deux techniques peuvent apporter des informations complémentaires.

Le principe repose sur l'émission des électrons lorsque l'on chauffe un filament. Les électrons sont ensuite accélérés grâce à l'application d'une tension comprise entre 200 et 1000kV. Une fois le vide réalisé, le faisceau d'électrons passe à travers l'échantillon et est focalisé à l'aide de lentilles magnétiques.

Pour la préparation de l'échantillon, nous avons suivi le même protocole que pour la MEB. Nous avons observé *A.baumannii* SAN en présence d'AT98a à une concentration de 255µg/mL. Comme pour les bactéries observées au MEB, elles ont été incubées pendant 6 heures avec l'actif et lavées avec du PBS.

Les bactéries sont fixées dans des tubes Falcon avec du Paraformaldéhyde 2% glutaraldéhyde 2% une nuit sous vide puis rincées avec du tampon phosphate.

Une étape de post fixation est réalisée avec du Tetraoxyde d'osmium (OsO_4) 1% dans du H_2O pendant 1 heure à température ambiante. Cette étape est suivie d'une déshydratation avec des concentrations croissantes en éthanol (50%, 70%, 95%) pendant 20 minutes suivi de trois déshydratations avec de l'éthanol à 100% (3x30min).

Pour l'inclusion en résine Epon deux solutions sont mélangées aux proportions 2/3. La première est constituée par 38g de EMBed 812 (Epon 812) et 50g de 2-Dodeceny succinic anhydride (DDSA) et la deuxième est constituée par 50mL de EMBed 812 et 44,5mL de Nadic Methyl anhydride (NMA). Les deux solutions seront mélangées pendant 15min puis 2,5% de diméthylaminoéthanol (DMAE) est ajoutée et agitée pendant 15 minutes.

Les culots de bactéries sont inclus dans la résine Epon. Pour cela deux lavages avec de l'oxyde de propylène seront réalisés (15min chacun). Ensuite, le bain d'oxyde de propylène est substitué par un mélange à parts égales d'oxyde de propylène et une solution finale d'Epon pendant au moins 18 heures, et enfin le bain est remplacé par la solution finale d'Epon (pendant 4 heures minimum). Le bain est changé à nouveau et l'ensemble polymérisé à l'étuve (24h à 37°C, 24h à 45°C et 48h à 60°C).

Des coupes ultrafines de 60nm sont finalement réalisées avec un ultra-microtome Leica UC7 et elles sont déposées sur des grilles de cuivre.

Pour le contraste, une coloration à l'acétate d'uranyle 3% est réalisée dans l'éthanol pendant 15min, suivie d'un rinçage à l'eau déminéralisée.

Les images ont été obtenues grâce au microscope Jeol TEM 2011 en travaillant à 2000kV.

2.3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Résultats de CMI

Les résultats de CMI pour les NCL et pour les antibiotiques étudiés ont été compilés dans le Tableau 8 et les valeurs de CMI exprimés en µg/mL.

CHAPITRE 2 : Efficacité in-vitro des NCL et leur association avec des antibiotiques

	<i>A.baumannii</i> SAN	<i>A.baumannii</i> RCH	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i>
NCL EU-CN	625	625	1250	1250	625
NCL CN	312	312	312	620	312
NCL EU	1250	1250	>5000 (R)	>5000 (R)	2500
AT98a	625	625	1250	2500	625
AT101	625	625	----	----	----
NCL blanches	>5000 (R)	>5000 (R)	>5000 (R)	>5000 (R)	>5000 (R)
Méropénème	1	32 (R)	----	----	----
Rifampicine	4	2	----	----	----
Vancomycine	---	1240 (R)	----	----	----
Doxycycline	4	4	8 (R)	32 (R)	1

Tableau 8 : Résultats de CMI pour les NCL et les antibiotiques pour les souches d'*Acinetobacter baumannii* SAN et RCH. Les résultats de CMI sont exprimés en µg/mL

(R) : résistant, --- : Expériences non réalisées.

En ce qui concerne les NCL chargées, nous avons pu constater que toutes les NCL montre un effet bactéricide. Néanmoins, les NCL d'eugénol semblent les moins efficaces avec de valeurs de CMI de 1250µg/mL pour la plupart des bactéries étudiées. A l'opposé, nous retrouvons les NCL de cinnamaldéhyde qui présentent la plus faible CMI (320µg/mL pour *A.baumannii* et *E.coli*). Entre les deux, nous retrouvons les mélanges NCL eugénol-cinnamaldéhyde, AT98a et AT101.

Les NCL blanches (sans actif) n'ont pas d'effet bactéricide, nous pouvons donc attribuer tout l'action bactéricide des NCL aux HE et pas aux excipients (Solutol, Labrafac ou Lipoid) des NCL.

Nous pouvons conclure que *Pseudomonas* reste la bactérie testée la moins sensible aux HE. Ce manque de sensibilité peut être caractéristique de la bactérie ou simplement de la souche ATCC 25922.

En ce qui concerne les CMI, nous n'observons pas beaucoup de différence pour les mélanges (AT98a, AT101 et NCL EU-CN) qui montrent des valeurs assez semblables pour chaque bactérie. Néanmoins, c'est lorsque nous l'associons aux antibiotiques que nous observons une différence entre AT98a et les NCL de cinnamaldéhyde et eugénol.

En observant uniquement les résultats de CMI, le choix des NCL de cinnamaldéhyde semblerait le plus logique, mais ce que nous cherchons c'est surtout de sélectionner celles

CHAPITRE 2 : Efficacité in-vitro des NCL et leur association avec des antibiotiques

qui présentent les plus grandes synergies lorsqu'associées aux antibiotiques. Ainsi, l'indice FIC reste le principal paramètre que nous allons utiliser pour sélectionner les NCL.

En observant les CMI des antibiotiques sur la bactérie *A.baumannii* nous pouvons observer 2 résistances : méropénème-*A.baumannii* RCH et vancomycine-*A.baumannii* RCH. La première est relative à une résistance acquise par spécifiquement la souche RCH (SAN est plus sensible à l'antibiotique). La deuxième est plutôt conséquente à l'incapacité de l'antibiotique à franchir les membranes de la bactérie.

La Rifampicine, contrairement aux autres antibiotiques testés, ne présente pas de résistance, nous observons une différence de CMI d'une souche à l'autre (4µg/mL pour la SAN et 2µg/mL pour la RCH). Dans ce cas, l'intérêt d'une association serait d'être plus efficace avec des CMI plus basses.

Détermination de l'indice FIC

Nous avons calculé grâce à la formule montrée précédemment, l'indice FIC de chaque association. Les résultats obtenus ont été compilés dans le Tableau ci-dessous (Tableau 8) :

ATB	NCL	BACT	CMI NCL	CMI NCL/ATB	MIC ATB	MIC ATB/NCL	Indice FIC
Rifampicine	NCL CN	RCH	312	160	2	2	1,5
		SAN	312	160	4	2	1
	NCL EU-CN	RCH	625	312	2	2	1,5
	AT98a	RCH	625	312	2	2	1,5
Méropénème	AT98a	SAN	625	625	1	1	1,5
		RCH	625	625	32 (R)	16	1,5
	NCL EU	RCH	1250	1250	32 (R)	16	1,5
	NCL CN	RCH	312	312	32 (R)	16	1,5
	NCL EU-CN	RCH	625	625	32 (R)	16	1,5
	NCL blanches	SAN	>5000 (R)	2500	1	2	2,5
Vancomycine	AT98a	RCH	625	312	1028 (R)	10	0,5
	NCL EU-CN	RCH	625	312	1028 (R)	10	0,5
	NCL CN	RCH	312	180	1028 (R)	10	0,5

Tableau 9 : Indice FIC (vert : synergique, orange : indifférent) pour les associations des NCL avec la rifampicine, le méropénème et la vancomycine sur deux souche d'*A.baumannii*.

Les valeurs de CMI pour la doxycycline sont montrés dans l'article à la fin de ce chapitre. Après avoir déterminé la CMI de chaque produit, nous les avons associés pour calculer l'indice FIC pour chaque association. Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 9. En analysant les résultats obtenus pour l'association avec la **rifampicine**, nous n'observons pas un effet synergique, dans tous les cas, l'indice FIC est supérieur à 0,5. Néanmoins, nous observons une réduction de la CMI des NCL à la moitié lorsqu'on les associe à la Rifampicine contre *A.baumannii* RCH. Et dans le cas de la souche SAN nous observons une réduction de la moitié de la CMI aussi pour l'antibiotique.

Si nous analysons les indices FIC que nous avons obtenu avec le **méropénème** nous pouvons conclure que cet antibiotique ne présente pas de synergie lorsqu'on l'associe aux NCL.

Si nous comparons la souche SAN à la souche RCH testées toutes les deux avec le mélange AT98a/méropénème, nous observons l'absence de synergie qui est traduit par un indice FIC de 2 et 1,5 respectivement.

Même si certaines NCL montrent des effets bactéricides plus puissants que d'autres, le profil obtenu par rapport à la synergie du mélange reste le même. Nous n'observons pas de diminution de la CMI pour les NCL et nous observons une diminution d'1/2 log pour l'antibiotique (pour la souche RCH).

Nous avons également testé l'action des NCL blanches associées au méropénème, l'association aide à réduire la CMI des NCL blanches mais ne produit aucun effet synergique avec l'antibiotique (fait qui reste assez cohérent parce que les NCL blanches ne sont qu'un vecteur qui ne possède aucune propriété bactéricide).

Lorsque nous avons associé la **vancomycine** avec nos NCL nous nous attendions à obtenir un effet plus intéressant avec AT98a plutôt qu'avec les NCL EU-CN car les premières contiennent en plus du carvacrol qui est le composant sensé avoir un effet puissant dans la déstabilisation de la paroi bactérienne. Néanmoins, lorsque nous comparons l'indice FIC de deux associations nous observons un résultat assez semblable.

Même si nous avons obtenu une synergie (indice $FIC \leq 0,5$) les fortes concentrations de Vancomycine nécessaires pour retrouver cet effet nous ont décidés à rejeter cet antibiotique. Néanmoins nous avons quand même réalisé une cinétique de bactéricidie avec certaines associations, afin de mieux visualiser cette synergie.

2.1 Cinétique de bactéricidie

Nous avons représenté dans des graphes logarithmiques l'évolution sur 24 heures de chaque association, nous avons inclus dans cette thèse les courbes les plus représentatives pour la rifampicine (Figure 31), le méropénème (Figure 32 et Figure 33) et la vancomycine (Figure 34).

a) Rifampicine

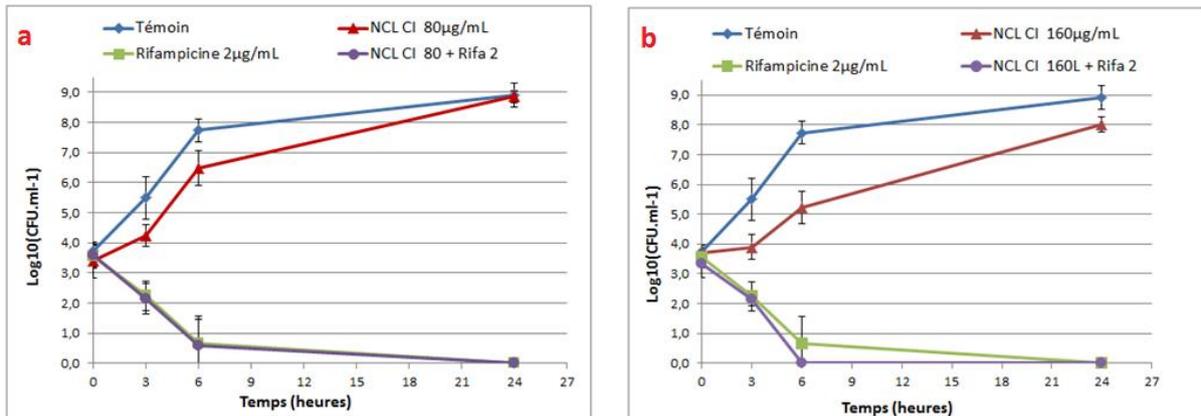


Figure 31 : Résultats de cinétique de bactéricide sur la souche A.baumannii RCH.

a : NCL cinnamaldéhyde 80µg/mL associé à la Rifampicine 2µg/mL

b : NCL cinnamaldéhyde 160µg/mL associé à la Rifampicine 2µg/mL

Les résultats de cinétique de bactéricidie qui apparaissent dans l'image 31 montrent qu'aux concentrations utilisées nous n'avons pas retrouvé de synergie entre nos nanocapsules et la rifampicine.

Nous avons un effet indifférent qui montre que l'ajout des NCL ne modifie pas l'effet de la rifampicine. La Rifampicine est un antibiotique très efficace à des faibles doses, nous avons écarté cette association de notre étude en cherchant d'autres antibiotiques moins efficaces ou qui présentent des résistances afin de trouver une association synergique.

b) Méropénème

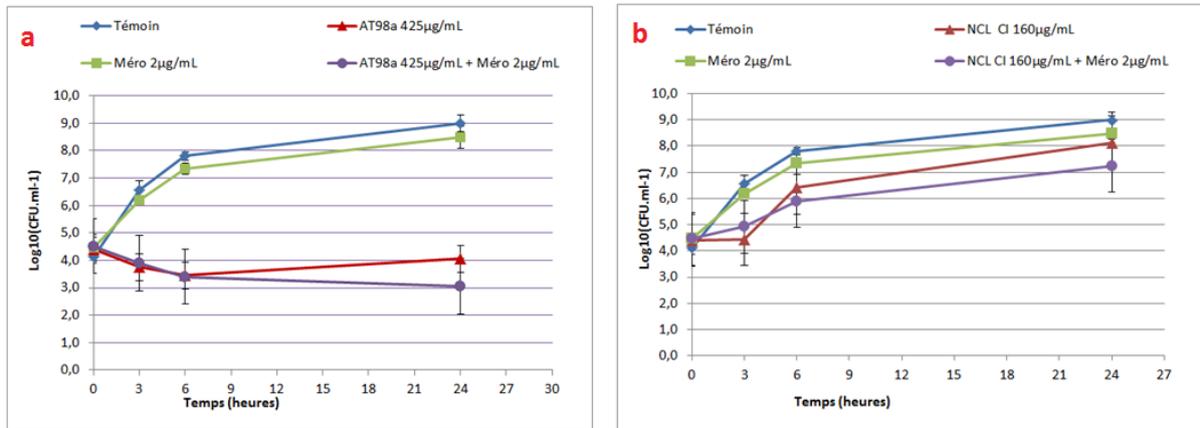


Figure 32 : Résultats de cinétique de bactéricide sur la souche A.baumannii RCH.

a : NCL AT98A 425µg/mL associé au Méropénème 2µg/mL

b : NCL cinnamaldéhyde 160µg/mL associé au Méropénème 2µg/mL

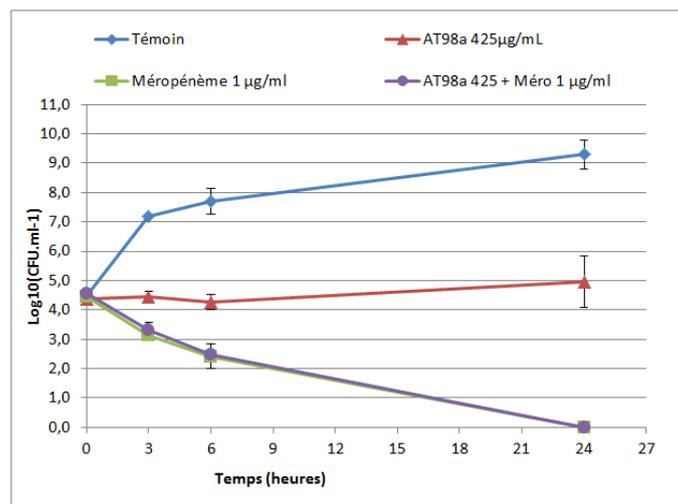


Figure 33 : Résultats de cinétique de bactéricide sur la souche A.baumannii SAN.

AT98a a 425µg/mL et Méropénème à 1µg/mL

Les résultats de cinétique de bactéricidie pour l'association NCL- méropénème sont montrés dans la figure 32 pour la souche RCH et dans la figure 33 pour la souche SAN.

Dans la première figure (32a), nous observons que l'association d'AT98a ainsi que des NCL de cinnamaldéhyde avec le méropénème ne s'avèrent pas synergiques. L'antibiotique à 2µg/mL présente un profil similaire à celui du témoin. L'association est très semblable à AT98a seul.

Nous retrouvons un profil similaire dans la figure 32b avec le cinnamaldéhyde à 160µg/mL

CHAPITRE 2 : Efficacité in-vitro des NCL et leur association avec des antibiotiques

Dans la figure 33, nous avons testé le Méropénème à $1\mu\text{g}/\text{mL}$ avec AT98a à une concentration $425\mu\text{g}/\text{mL}$. Nous observons un effet bactériostatique avec les nanocapsules seules. L'effet est bactéricide avec le Méropénème seul ainsi qu'avec son association avec les AT98a.

Dans les 3 cas, nous n'avons pas retrouvé de synergie, raison pour laquelle, nous n'avons pas retenu cet antibiotique.

c) Vancomycine

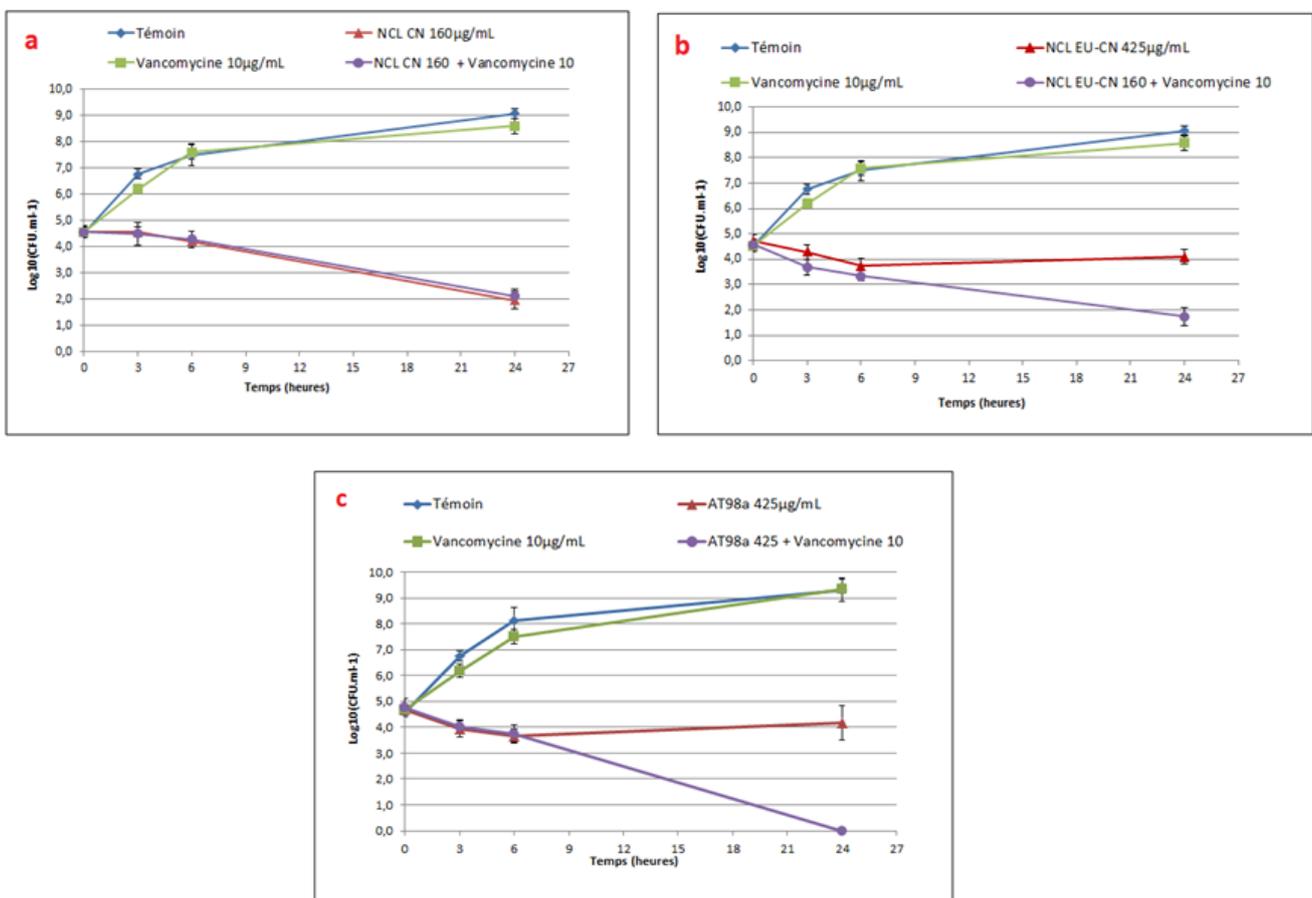


Figure 34 : Résultats de cinétique de bactéricide sur la souche A.baumannii RCH.

a : NCL eugénol-cinnamaldéhyde (50/50) $425\mu\text{g}/\text{mL}$ associé à la Vancomycine $10\mu\text{g}/\text{mL}$

b : NCL cinnamaldéhyde $160\mu\text{g}/\text{mL}$ associé à la Vancomycine $10\mu\text{g}/\text{mL}$

c : AT98a $425\mu\text{g}/\text{mL}$ associé à la Vancomycine $10\mu\text{g}/\text{mL}$

Les résultats de cinétique de bactéricidie ont été montrés dans la Figure 33. Nous avons testé plusieurs concentrations des NCL et nous avons gardés celles qui ont donné les meilleurs résultats.

CHAPITRE 2 : Efficacité in-vitro des NCL et leur association avec des antibiotiques

Nous observons une synergie (au moins 3log de différence entre l'association et l'actif seul le plus puissant) uniquement dans l'association avec AT98a à 425µg/mL avec la Vancomycine à 10µg/mL.

Les NCL d'eugénol et cinnamaldéhyde (34a) montrent un effet légèrement synergique (au moins 2 log d'écart entre l'association et l'actif, le plus puissant, seul) mais qui ne s'avère pas bactéricide et qui est moins important que la synergie retrouvée pour AT98a.

Dans les deux premières figures avec des NCL de cinnamaldéhyde (34b) à des très faibles concentrations, nous n'observons aucune synergie : le cinnamaldéhyde seul montre le même effet que l'association.

La présence de carvacrol dans le mélange d'AT98a, réduit la quantité de cinnamaldéhyde ajouté (l'actif le plus puissant de tous les trois, mais présentant une toxicité plus élevée). La CMI augmente et nous observons un effet bactériostatique lorsque AT98a est utilisé seul et bactéricide lorsque nous le combinons avec la Vancomycine.

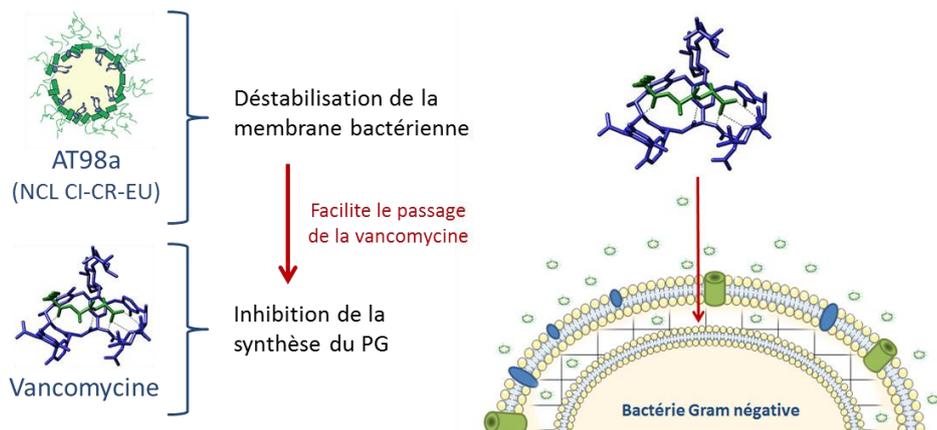


Figure 35 : Schéma sur le mécanisme d'action de l'association AT98a-Vancomycine

Connaissant l'incapacité de la Vancomycine à traverser la membrane des bactéries à Gram négatif, nous considérons que le succès de cette association est dû à la capacité des NCL à déstabiliser la membrane bactérienne, facilitant ainsi le passage de l'antibiotique qui sera donc capable d'exercer son action (Figure 35)

Néanmoins, même si l'association est efficace, les doses de Vancomycine utilisées sont trop élevées pour envisager une administration chez l'homme. Ainsi, nous avons décidé d'écarter cette association de notre étude.

d) Doxycycline

Les tests réalisés vis de la doxycycline se sont révélés positifs vis de la synergie avec les HE. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article à part qui figure à la fin de ce chapitre.

Microscopie électronique à balayage

Nous avons compilés les images de microscopie électronique à balayage dans les pages suivantes. Nous avons étudié le comportement des NCL et de la Vancomycine sur trois types de bactéries : *Acinetobacter baumannii* (Figure 36), *Klebsiella pneumoniae* (Figure 37), et *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 38). Nous avons travaillé avec des grossissements d'entre 15.000 et 20.000 (selon la bactérie) et à 3.0KV

a) *Acinetobacter baumannii* SAN

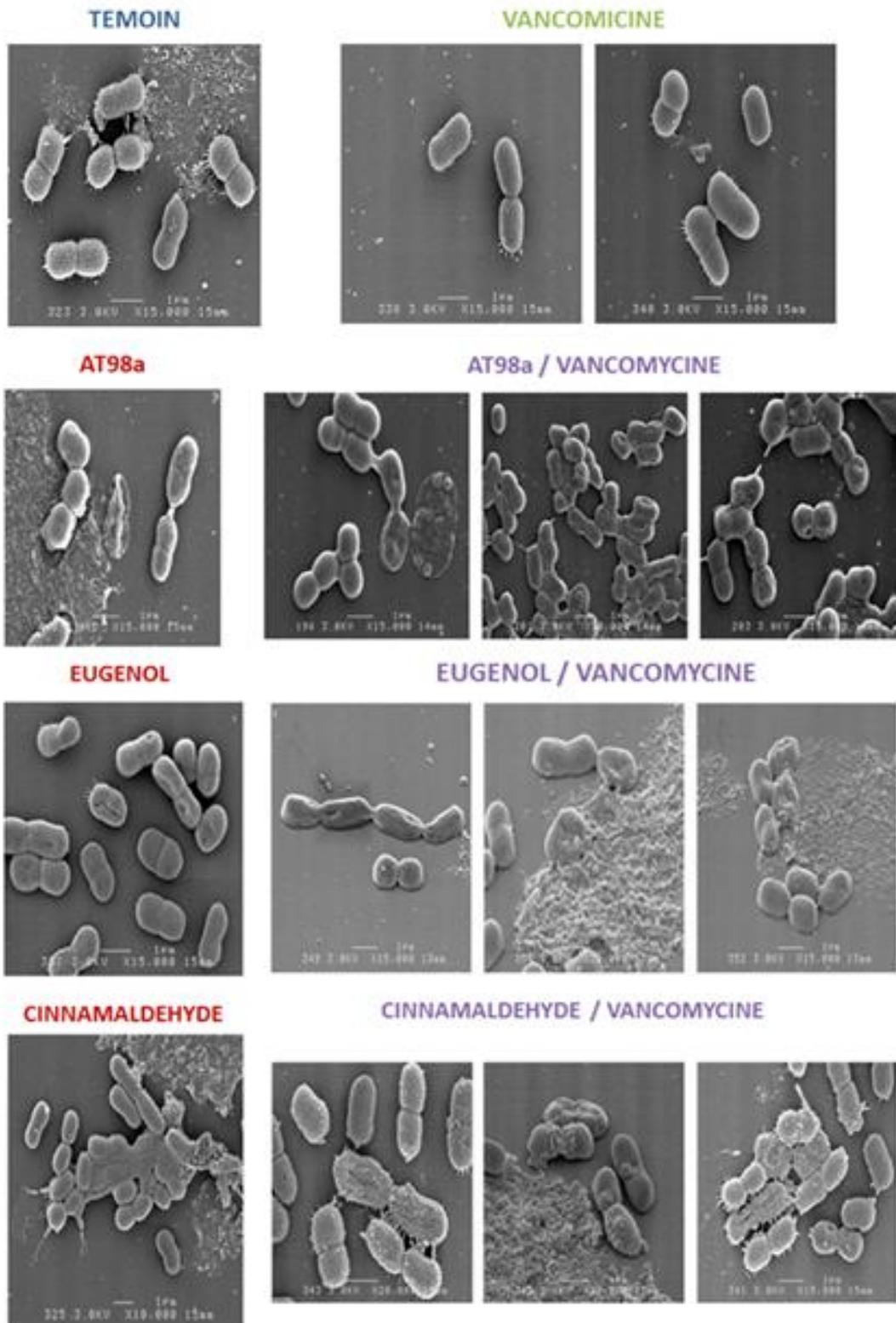


Figure 36: Images de MEB pour la bactérie *Acinetobacter baumannii* SAN traité avec la Vancomycine, AT98a, des NCL d'eugénol, des NCL de cinnamaldéhyde et leurs respectives associations avec la Vancomycine.

b) *Klebsiella pneumoniae*

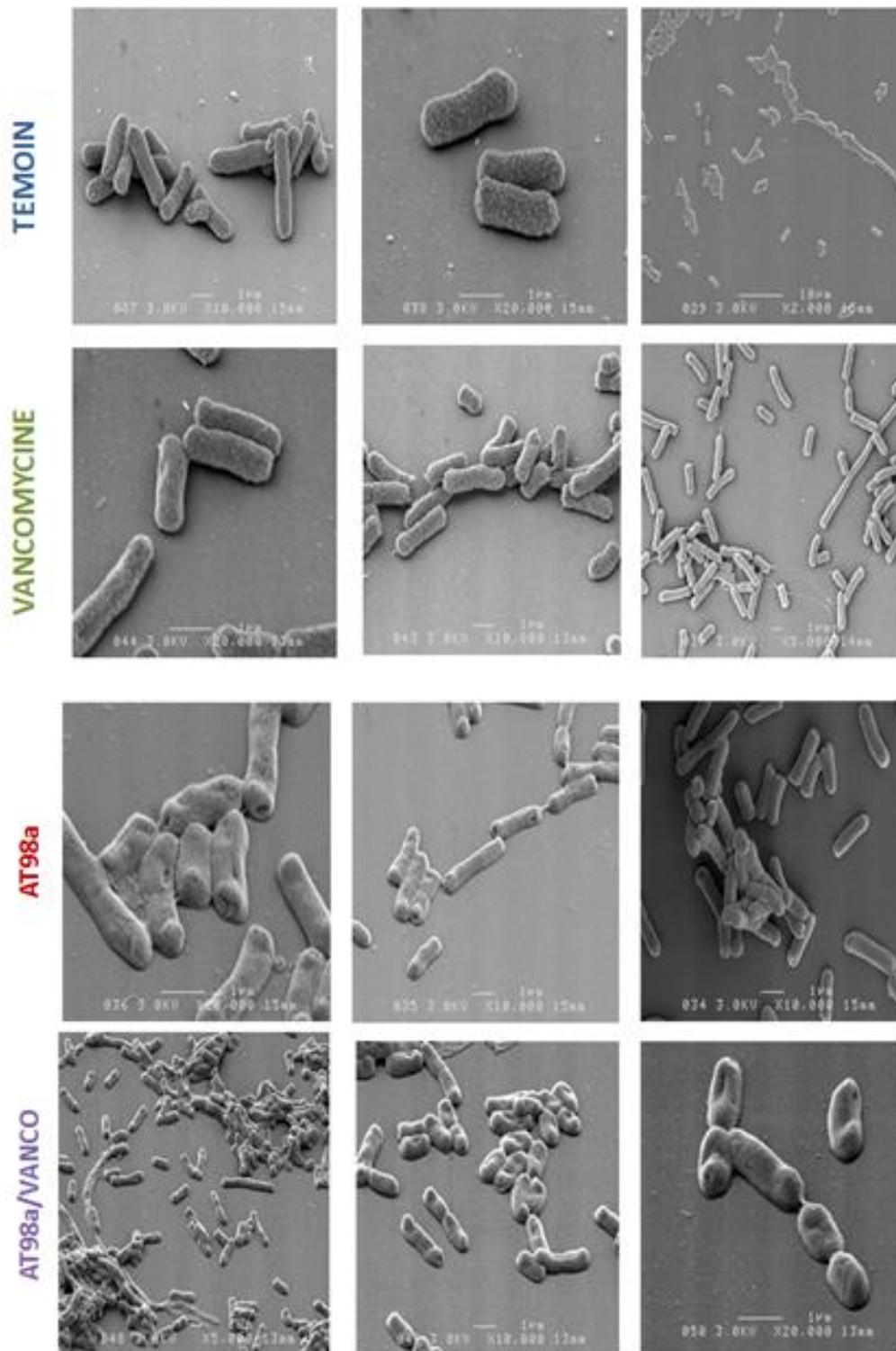


Figure 37 : Images de MEB pour la bactérie *Klebsiella pneumoniae* traitée avec la Vancomycine, AT98a et l'association de deux.

c) *Pseudomonas aeruginosa*

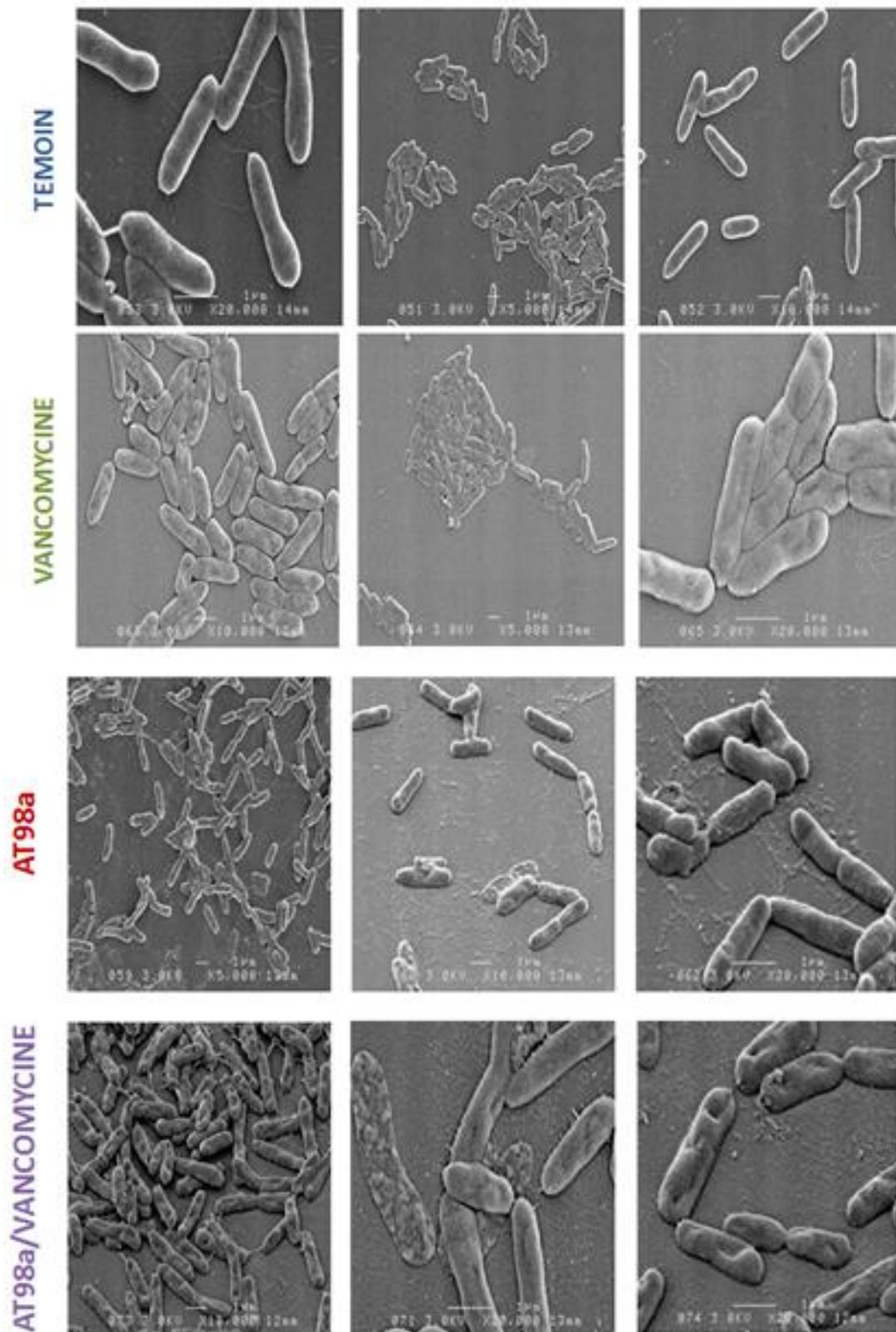


Figure 38 : Images de MEB pour la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* traitée avec la Vancomycine, AT98a et l'association de deux.

Acinetobacter a été notre bactérie de référence tout au long de cette thèse. Raison pour laquelle toutes les associations que nous avons testées, ont d'abord été testées sur *A.baumannii*.

Les images de microscopie montrent que pour toutes les souches étudiées, la vancomycine, utilisée à 10µg/mL, n'a pas beaucoup d'effet sur les bactéries. Nous observons que les bactéries traitées ont la membrane externe lisse et continue comme celle des témoins.

AT98a en combinaison avec la vancomycine semble avoir un effet sur les bactéries, plus importante que les deux actifs séparément, même si nous observons des irrégularités au niveau de la membrane lorsque la bactérie est traitée avec AT98a.

Klebsiella pneumoniae, semble être sensible aux NCL, nous observons des trous aux niveaux des extrémités de la bactérie et une membrane externe qui devienne moins lisse et ferme.

Lorsque nous associons les NCL à la vancomycine nous observons une légère potentialisation des effets des NCL avec une grande partie des bactéries touchées, en comparaison avec les bactéries traitées seules avec des NCL.

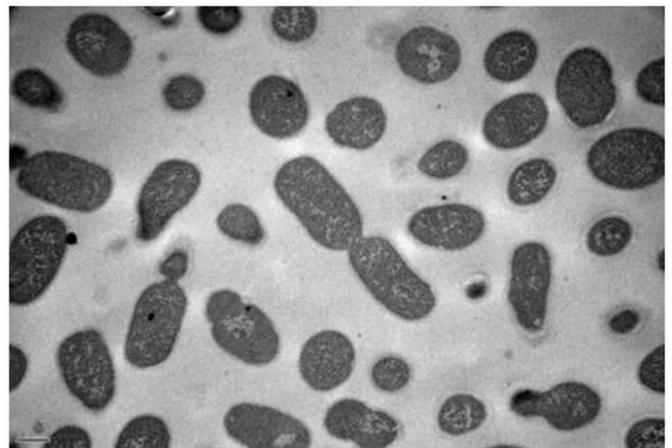
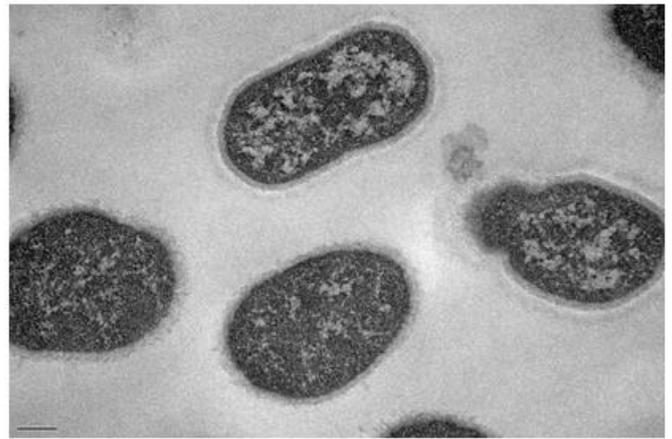
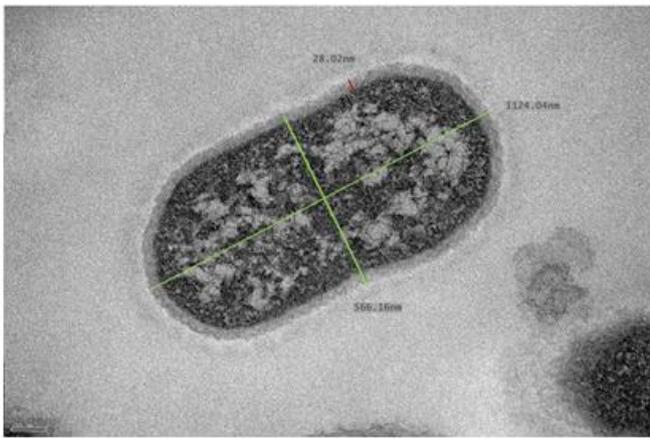
Pseudomonas aeruginosa semble aussi être sensible à l'action des huiles essentielles. Lorsque les NCL sont utilisées seules, nous observons que la surface de la bactérie commence à devenir beaucoup moins ferme que celle des bactéries témoins. Dans ce cas, nous ne constatons pas la présence des trous dans la membrane de la bactérie. L'association paraît montrer un effet plus synergique que celui qu'on retrouve pour *Klebsiella*.

.

Microscopie électronique à transmission

Nous avons compilés les images de microscopie électronique à balayage dans les pages suivantes. Nous avons étudié le comportement des NCL sur *Acinetobacter baumannii* (Figure 39).

TEMOIN



AT98a

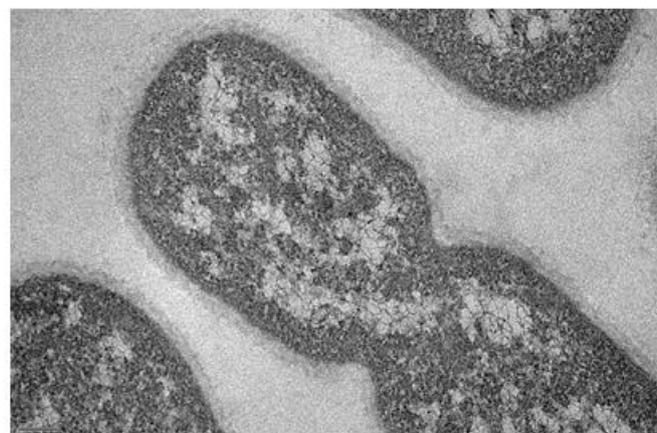
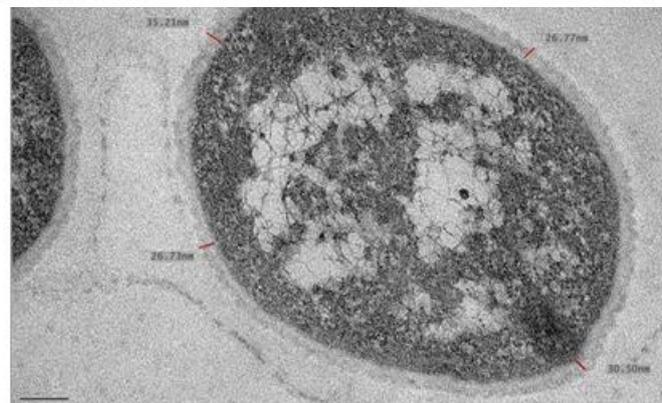


Figure 39 : Images de microscopie électronique à transmission de la bactérie *A.baumannii*

après 6 heures d'incubation, sans aucun traitement (Témoin) et traitées avec AT98a à une concentration de 250µg/mL (AT98a).

Les images montrent que les bactéries traitées avec AT98a présentent un cytoplasme moins dense avec des parties fixant l'OsO₄ (aspect blanchâtre) comparativement aux bactéries témoins. Ceci pourrait être en faveur d'une densité d'organites plus faible. Nous avons aussi remarqué une diminution en nombre de bactéries ce qui montre une efficacité du traitement par rapport au témoin. Néanmoins les coupes ne permettent pas d'apprécier des changements au niveau de la membrane (même si ces changements ont été mis en évidence par technique MEB). Nous avons mesuré l'épaisseur la membrane externe des bactéries (Témoin et traitées avec AT98a) et les deux présentent des valeurs similaires (entre 25 et 35nm).

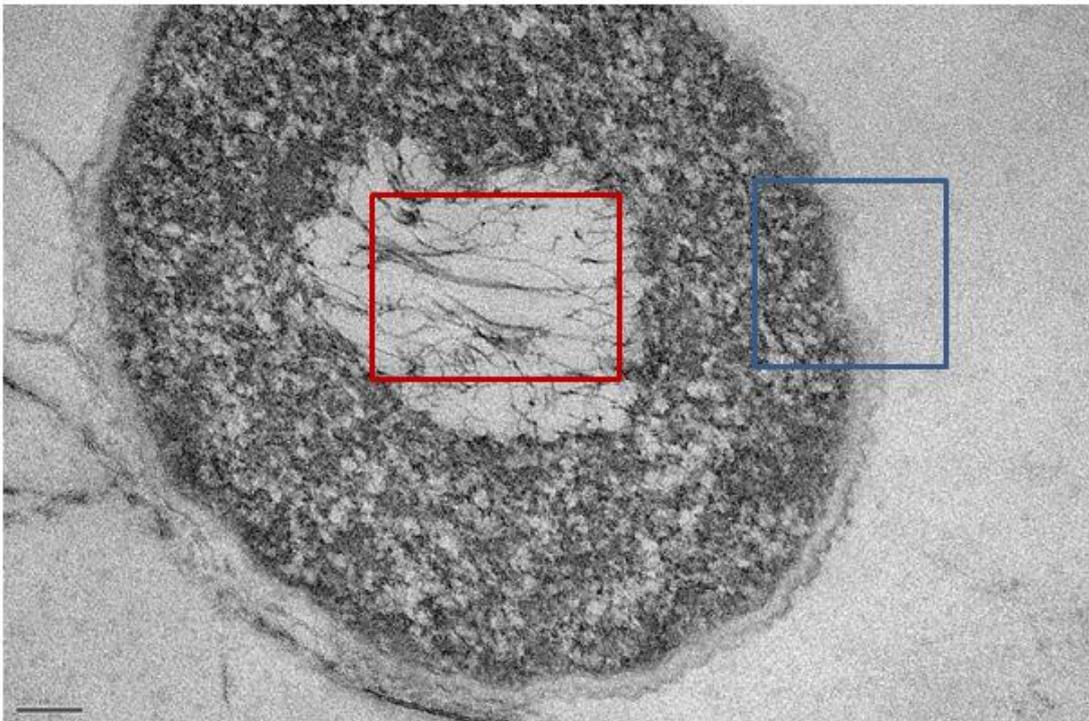


Figure 40 : Coupe transversale d'*A.baumannii* observée par MET, avec le cytoplasme (rouge) et la membrane bactérienne (bleu), à une échelle de 100nm.

Pour certaines bactéries traitées avec AT98a (Figure 40), on peut distinguer ce qui semble être une interruption de la membrane (voir partie bleu) et des structures filamenteuses au cœur du cytoplasme (voir partie rouge).

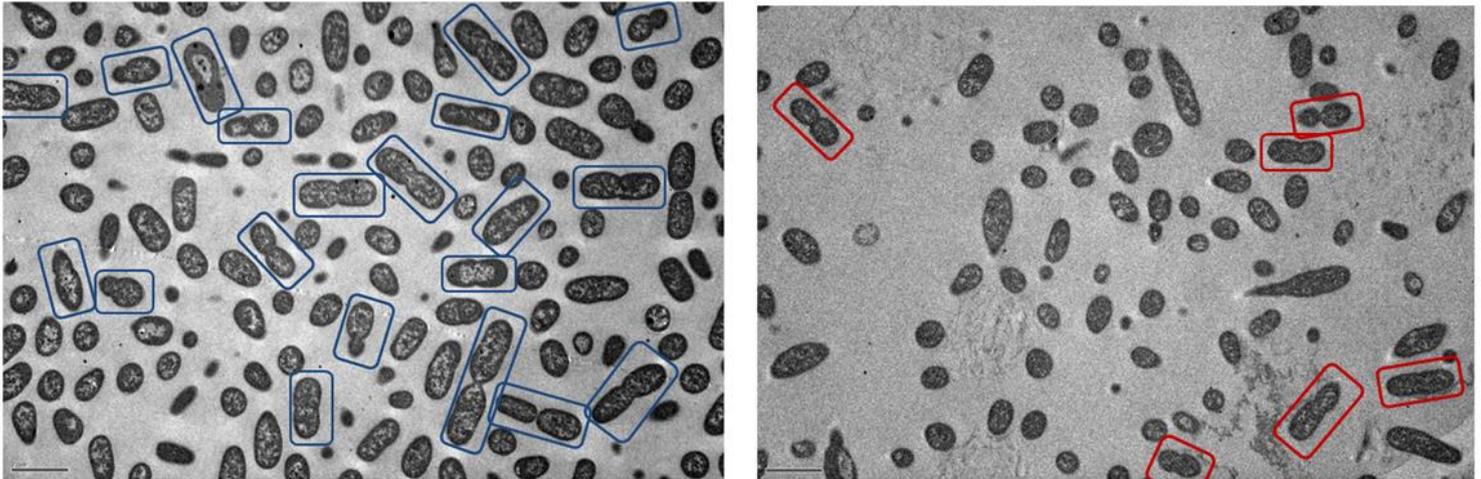


Figure 41 : Images de microscopie électronique à transmission, bactéries non traitées (à gauche) et bactéries traitées avec AT98a (à droite).

Dans la Figure 41 nous comparons des bactéries (*A.baumannii*) non traitées (à gauche) avec des bactéries traitées avec AT98a (à droite). Nous observons dans un premier temps une diminution du nombre de bactéries pour celles qui ont été traitées et une réduction (surement proportionnelle au nombre de bactéries) de bactéries qui se multiplient.

2.4 PUBLICATION n°1 : Association avec la Doxycycline

Accepté à : International Journal of Pharmaceutics

Manuscript number: IJP-D-15-01616

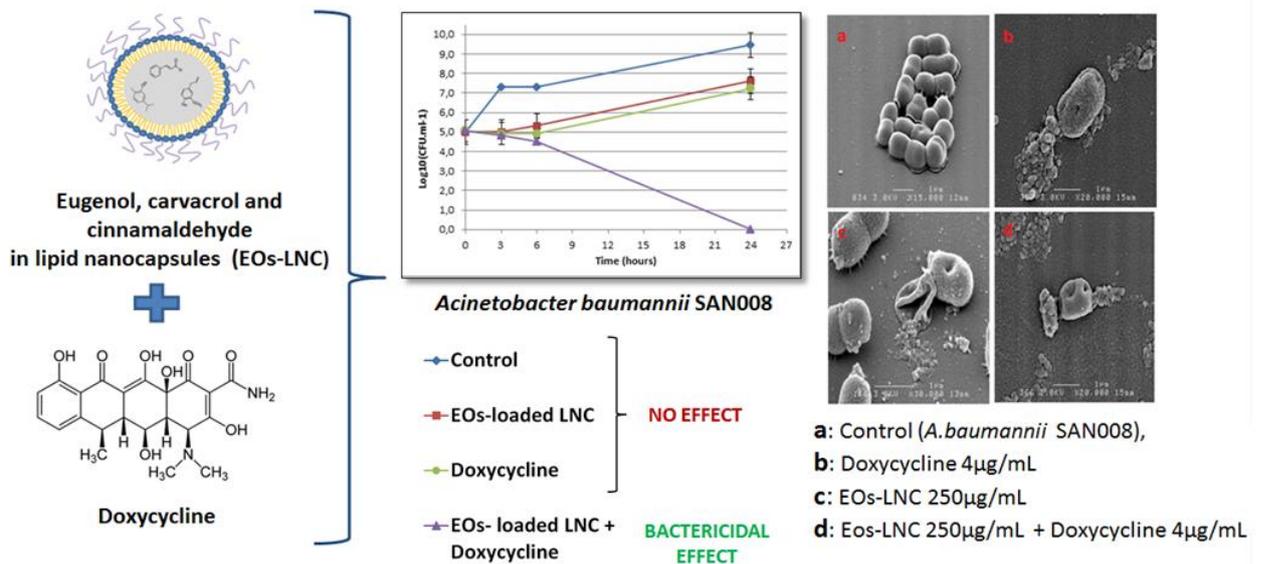


Figure 28: Graphical abstract pour la publication « Synergistic interaction between doxycycline and terpenics components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against Gram-negative bacteria”.

Synergistic interaction between doxycycline and terpenics components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against Gram-negative bacteria.

Valcourt C^a., Saulnier P^a., Umerska A^a., Zanelli M.P^b., Montagu A^a., Rossines E^c., Joly-Guillou M.L^b.

^a INSERM U1066, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, IBS CHU, 4 Rue Larrey, F-49933 Angers, France

^b Department of bacteriology. University Hospital of Angers, 4 Rue Larrey, F-49933 Angers, France.

^c Eydo pharma company. 41 rue Noel Ballay, 28000 Chartres

chantal.valcourtsainz@gmail.com

0033 02 44 68 85 65

Abstract

The combination of essential oils (EOs) with antibiotics makes a promising strategy towards combating resistant bacteria. We have selected a mixture of 3 major components extracted from EOs: carvacrol (oregano oil), eugenol (clove oil) and cinnamaldehyde (cinnamon oil). These compounds were successfully encapsulated within lipid nanocapsules (LNCs). The EOs-loaded LNCs were characterized by a noticeably high drug loading of 20% and a very small particle diameter of 114 nm. The *in vitro* interactions between EOs-loaded LNCs and doxycycline were examined via checkerboard titration and time-kill assay against 5 Gram-negative strains: *A. baumannii* SAN, *A. baumannii* RCH, *K. pneumoniae*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. When growth inhibition was considered no interactions were found between EOs-loaded LNCs and doxycycline (FIC index between 0.7 and 1.30). However when bactericidal effect was considered, a synergistic interaction was observed (FBC index equal to 0.5) against all tested strains. A synergistic effect was also observed in time-kill assay (a difference of at least 3 log between the combination and the most active agent alone). Scanning electron microscopy (SEM) was used to visualize the changes in the bacterial membrane. The holes in bacterial envelope and leakage of cellular contents were observed in SE micrographs after exposure to the EOs-LNCs and doxycycline combination.

Key words:

Doxycycline, Synergy, Lipid nanocapsules, Essential oils, Resistant bacteria, Eugenol, Carvacrol, Trans-cinnamaldehyde,

Abbreviations:

ATP: Adenosine triphosphate

BHI: Brain-Heart Infusion Broth

CFU: colony forming units

EF-G: Elongation factor G

EF-Tu: Elongation factor thermos unstable

EOs: Essential oils

FBC index: Fractional bactericidal concentration index

FIC index: Fractional inhibitory concentration index

HLB: Hydrophilic-lipophilic balance

HMDS: Hexamethyldisilazane

LNCs: Lipid nanocapsules

LPS: Lipopolysaccharide

MIC: Minimum inhibitory concentration

MBC: Minimum bactericidal concentration

PDI: Polydispersity index

PIT: Phase inversion temperature

SCIAM: Service commun d'Imageries et d'analyses microscopiques

INTRODUCTION

Antibiotic resistance is a rapidly growing problem around the world. The emergence of multiresistant bacteria such as *A.baumannii* represents today a serious public health problem (Dennesen et al., 1998; Song et al., 2009). This is the reason why many researchers have focused their work on the search for new antibiotics by developing synthetic molecules and small-molecule libraries customized for bacterial targets. Some of them have intensified the research on DNA synthesis and have studied the correlation between the chemical structure of different molecules and their biological activity (Committee on new directions in the Study of antimicrobial therapeutics). Even though many effective compounds were discovered in the

past, the chemical variability is insufficient to prevent escalation of antibiotic resistance (Rosamond and Allsop, 2000). During the 2000s researchers were interested in genome in search for new antibiotics (Rosamond and Allsop, 2000). Other researchers have focused their work on derivatives of natural origin substances such as actinonin, pleuromutilin, ramoplanin and tiacumicin B (Butler & Buss 2006) or essential oils (Hemaiswarya et al., 2008; Rosato et al., 2008, 2009; Wagner, 2011; Fadli et al., 2012). Essential oils are known to penetrate cell membranes and interact with protein targets (Stone and Williams, 1992).

We have selected a mixture of three terpenic components of essential oils: carvacrol, eugenol, and cinnamaldehyde. These components of plant extracts exert their antibacterial activity by disrupting cell membrane and inhibiting the ATPase activity (Raybaudi Massilia et al., 2009; Negi, 2012).

Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol) is a major component of clove oil (Farak et al., 1989). Eugenol is used in medicine as a local antiseptic and anaesthetic (Didry et al., 1994; Markowitz et al., 1992). Carvacrol (2-Methyl-5-(1-methylethyl)-phenol) is a major component of oregano and thyme oil. It is also found in tequila (Léon-Rodriguez et al., 2008). It is an isoprenyl phenol that has a strong antimicrobial activity (Roller and Sheedhar 2002) and is used in food preservation (Ben Arfa et al., 2006) Trans-cinnamaldehyde (3-phenyl-2-propenal) is a major organic component of cinnamon oil, used as a flavoring agent and in perfumery. Cinnamaldehyde is also used as a fungicide. It exerts hypoglycemic effect, which could be of great interest in diabetes treatment (Marles and Farnsworth, 1995; Ross, 2001)

In order to administer and to protect lipophilic substances such as essential oils, we have chosen lipid nanocapsules (LNCs) as a drug delivery system. LNCs are prepared via a phase inversion method introduced for the first time by Shinoda and Saito in 1969 (Shinoda and Saito, 1969). It is a low energy and solvent-free method based on the changes in the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of a polyoxyethylene surfactant caused by temperature modification (Huynh et al., 2009). This method enables obtaining small, homogeneously dispersed particles. Varying the mass ratio of the LNCs components: surfactants (a hydrophilic surfactant- Solutol®, and optionally a lipophilic surfactant- lecithin) and the oil (Labrafac®), one can yield particles with sizes ranging between 25 and 100 nm. These particles consist of a triglyceride core surrounded by a surfactant shell. One of the most important characteristics of these nanocarriers is a high surface area-to-volume ratio that could offer a considerable advantage in interactions with bacteria.

When treating infections, the use of a single antimicrobial agent is normally sufficient to achieve a desired therapeutic effect. However, there are several instances in which two or more drugs must be given together. These situations include treatment of serious infections before the identity of the microorganism is known, a desired synergistic effect against certain organisms and prevention of the emergence of resistant strains (Garrod et al., 1953, Levinson, 2014). Indeed, combined antibiotic therapy has been used against multiresistant bacteria (Song et al., 2009; Saballs et al., 2006; Yin et al., 2005; Montero et al., 2004). Owing to their mechanism of action, essential oils offer a promising alternative to be used in combination with traditional antibiotics.

We have selected doxycycline, an antibiotic of the tetracycline class with bacteriostatic activity against a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, mycoplasma, chlamydiae and rickettsiae. Doxycycline is used in the treatment of bacterial infections such as acne, urinary tract infections and protozoal infections such as malaria. It is the antibiotic of choice for the treatment of infections caused by *Chlamydia psittaci*, *Vibrio cholerae* (cholera), *Vibrio vulnificus*, *Mycobacterium marinum* and *Mycoplasma pneumoniae* (Bryskier, 2005). Doxycycline is useful in the treatment of respiratory tract infections because of its activity against intracellular atypical microorganisms known to be resistant to antibiotics (Brunton et al., 2010), such as β -lactams. Doxycycline has an excellent oral absorption and a satisfying half-life (Naidong et al., 1990). Its bacteriostatic activity and its rapid emergence of resistance when used alone explain why doxycycline is frequently given with other antibiotics like neomycine (Bryskier, 2005), ofloxacin, amoxicilline or antibacterial compounds like lysosomotropic agents (drugs capable of penetrating lysosomes) (Raoult et al., 1990). Moreover, in certain diseases such as endocarditis, it is often favorable to use a bactericidal drug (Finberg et al., 2004), and doxycycline cannot be used in the treatment of such infections. Other studies suggest that a combination of bactericidal and bacteriostatic agents may lead to improved clinical outcomes, compared with either agent alone (Klastersky, 1986; Chow and Yu, 1999; Finberg et al., 2004,).

Considering that no doxycycline/EOs combination has been reported to date, the aim of this study was to examine *in-vitro* interactions between essential oils encapsulated within lipid nanocapsules and doxycycline using a checkerboard method and a time-kill assay.

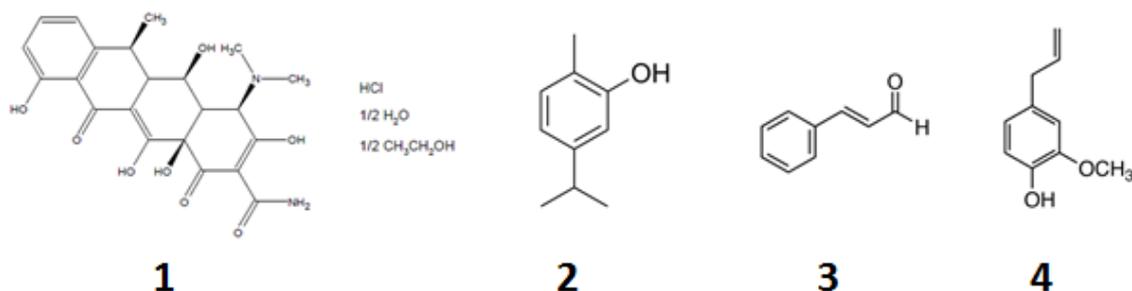


Figure 1 – Structural formulas of doxycycline hyclate (1), carvacrol (2), cinnamaldehyde (3) and eugenol (4).

Materials and Methods

2.1 Materials

Labrafac ® WL1349 (caprylic/capric acid triglycerides; IVth European Pharmacopeia 2002) was kindly provided by Gattefossé S.A. (France). Lipoid ® S75-3 (hydrogenated lecithin) and Solutol ® HS15 (macrogol 15 hydroxystearate, polyoxyl 15 hydroxystearate; a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) (IVth European Pharmacopeia, 2002) were kindly provided by Lipoid GmbH (Germany) and BASF (Germany), respectively. Cinnamaldehyde and eugenol were purchased from Merck (Germany) and carvacrol- from Sigma Aldrich (UK). Doxycycline hyclate (Vibraveneuse®) (100mg) solution for injection by IV route and infusion was furnished by Serb Laboratoires. All other chemicals and solvents were of analytical grade. Brain-heart infusion (BHI) broth was purchased from bioMérieux (France). Columbia agar supplemented with sheep blood (5%) was obtained from Oxoid (France).

2.2 Preparation of LNCs

LNCs were prepared following the procedure described by Montagu et al., (2014) with the composition presented in Table 1. The components of the LNCs (polyoxyl 15 hydroxystearate, hydrogenated lecithin, and triglycerides) and NaCl were weighed, mixed with water and heated to 90°C. The samples were cooled to 60°C. The samples were treated with three heating-cooling cycles, and during the last cooling cycle, at 80-90°C (the temperature of the phase inversion) the system was diluted with cold (~4°C) water. In the case of essential oils-loaded LNCs eugenol was added at 82°C during the third cooling cycle, carvacrol was added at 76°C during the fourth cooling cycle, and cinnamaldehyde was added

at 75°C during the fifth cooling cycle (Figure 2), followed by cooling to 40°C and heating to 90°C. Having reached the temperature of 55°C, the system was diluted with cold water.

	EOs-loaded LNCs	Blank LNCs
Solutol	846mg	846mg
NaCl	89.6mg	89.6mg
Labrafac	1028mg	1028mg
Lipoid	75.2mg	75.2mg
MilliQ water	2.98g	2.98g
MilliQ water(quenching)	12.5mL	12.5mL
Eugenol	173µL	---
Carvacrol	173µL	---
Cinnamaldehyde	173µL	---

Table 1: Composition of formulation for EOs- LNCs and Blank LNCs prepared via phase inversion method.

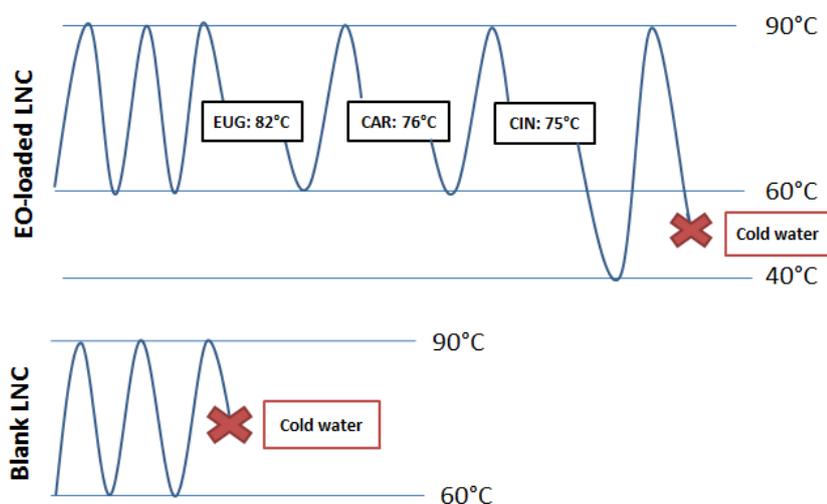


Figure 2- Schematic representation of temperature cycles in the formulation of EOs-loaded LNCs and Blank LNCs

2.3 Characterization of LNCs

The intensity-averaged particle diameter and the polydispersity indexes of the LNCs were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) with 173° backscatter detection. The electrophoretic mobility values measured by Laser Doppler Velocimetry (LDV) were converted to zeta potential by the Smoluchowski equation. Both DLS and LDV measurements were carried out on a Zetasizer nano series Nano-ZS fitted with a helium-neon laser operating

at 633 nm (Malvern Instruments, UK). The measurements were performed after 60-fold dilution of the primary LNCs dispersion with MilliQ water. Each analysis was carried out at 25 °C in triplicate.

2.4 Bacterial strains

Antibacterial activity was tested against two reference strains: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) and three clinical isolates: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* RCH and *Acinetobacter baumannii* SAN008 obtained from the University Hospital of Angers (France).

2.5 Preparation of inoculum

The test strains were grown overnight on Columbia agar at 37°C. 1-2 colonies taken from the plates were suspended in 2 ml of 0.85% NaCl. The density of the microorganism suspension was adjusted to equal that of the 0.5 McFarland standard ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU·mL⁻¹). The bacterial suspension was subsequently diluted 10 times in BHI.

2.6 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

MIC and MBC were determined via a broth microdilution method. The formulations were diluted with BHI to a final volume of 2mL in a poly-propylene tube. 100 µL of BHI was added into each well of a sterile 96-well plate. Serial two-fold dilutions of the samples were performed in BHI to obtain the desired concentration range. 100µl of a bacterial suspension in BHI was added into each well. Positive control wells (containing BHI and the bacterial suspension) and negative control wells (containing the BHI and the tested sample without the bacterial suspension) were also prepared. The plates were incubated at 37°C for 24 hours without shaking. An amount of approximately 10 µl was withdrawn from each well, transferred onto a plate containing Mueller Hinton agar using an AQS multipoint inoculator and incubated overnight at 37°C. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of drug that inhibited the visible growth of the bacteria (Fadli et al., 2012). The minimum bactericidal concentration (MBC) was the lowest concentration of an antibacterial agent that reduced the viability of the initial bacterial inoculum by $\geq 99.9\%$ (Taylor et al., 1983; Andrews, 2001; Petrus et al., 2011).

2.7 Checkerboard titration

EOs and antibiotic combinations were tested via a checkerboard titration method. Two-fold dilutions of EOs loaded LNCs and doxycycline were prepared before mixing. The concentration range of each antimicrobial agent in combination ranged from 1/32xMIC to 4xMIC. The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated using the following equation:

$$FIC_{INDEX} = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

Where MIC_A is the MIC of the compound A alone, $MIC_{A/B}$ is the MIC of compound A in combination, MIC_B and $MIC_{B/A}$ are the MIC of the compound B alone and in combination, respectively.

The fractional bactericidal concentration (FBC) index was calculated using the following equation:

$$FBC_{INDEX} = \frac{MBC_{A/B}}{MBC_A} + \frac{MBC_{B/A}}{MBC_B}$$

Where MBC_A is the MBC of the compound A alone, $MBC_{A/B}$ is the MBC of compound A in combination, MBC_B and $MBC_{B/A}$ are the MBC of the compound B alone and in combination, respectively.

Synergy was defined as an FIC or FBC index of ≤ 0.5 , additivity/indifference as an FIC or FBC index of > 0.5 but of ≤ 4 . Antagonism was defined as an FIC or FBC index of > 4 (White et al., 1996).

2.8 Time-kill studies

The time-kill studies were performed with a final inoculum of approximately 1.5×10^5 CFU/ml in a final volume of 2 ml. The samples, containing the tested formulations/compounds and the control (the bacterial suspension in BHI without tested formulations/compounds) were incubated at 37°C. At each sampling time (0, 3, 6 and 24 hours) an amount of 100µl was withdrawn from each tube, and serial 100-fold dilutions were prepared in distilled water when necessary. A 100µl aliquot of the diluted and/or undiluted sample was delivered onto the surface of the agar and allowed to be absorbed into the agar. Having incubated the agar plates for 24 hours at 37°C, the colonies were counted.

The activity was considered as bactericidal when the original inoculum was reduced by ≥ 3 log₁₀ CFU/ml (99.9%), and bacteriostatic activity was defined as a reduction in the original

inoculum by $<3 \log_{10}$ CFU/ml (Tenover et al. 2004). Synergy was defined as a $>2\log_{10}$ decrease in the number of CFU per ml compared with the most active single agent (Singh et al., 2009).

2.9 Scanning electron microscopy (SEM)

The experiments were performed by the SCIAM (Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques) using Jeol JSM -6301F scanning microscope.

The samples were incubated at 37°C for 10 hours at the same concentration of microorganisms as in time-kill studies. Then, the samples were centrifuged at 3000 g for 10 min (x2) and washed with PBS. Then, the bacteria were fixed with 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde overnight under vacuum, and washed with phosphate buffer (pH 7.4). The post fixation was done using with 1% osmium tetroxide (OsO_4). The samples were dehydrated with graded ethanol series (50%, 70%, 95% and 100%), desiccated with hexamethyldisilazane (HMDS) and coated with platinum. Samples were viewed 15000, 20000 or 30000 times magnification at 3.0 kV.

2.10 Statistical analysis

The statistical significance of the differences between samples was determined using one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Properties of the LNCs

Blank LNCs 60 nm in diameter were successfully obtained via the phase inversion method. Slightly negative zeta potential of these nanocarriers can be attributed to lecithin. Lecithin is an ampholytic surfactant containing phosphate and amino groups and has an isoelectric point of 4.15 (Petelska and Figaszewski, 2002). The negative value of zeta potential is a confirmation that the negative charge of the phosphate groups predominated under the examined conditions (pH=6). Moreover, the presence of the dipoles of the PEG-groups in polyoxyl 15 hydroxystearate molecules may contribute to the negative charge (Vonarbourg et al., 2005). Interestingly, after incorporation of EOs the particle size increased significantly to 114 nm. Furthermore, EOs-LNCs exhibited a more negative zeta potential than blank LNCs. LNCs have been used as carriers for a variety of lipophilic compounds. The influence of the encapsulated active ingredient depended on the ingredient and on the drug loading- higher

drug loading affected the properties of the LNCs, whereas low drug loading did not influence the characteristics of the LNCs (Umerska et al., 2015a). Most of the active ingredients encapsulated within the LNCs thus far were in a solid state and had a melting point markedly higher than 37°C. The EOs loading was noticeably higher compared with the other drugs encapsulated within the LNCs, reaching the values of approximately 20%, comparable to that of polyelectrolyte complex nanoparticles (Umerska et al., 2014a, 2014b, Umerska et al., 2015b), therefore their significant influence on the properties of the LNCs is not surprising. It has been shown that the particle diameter of the LNCs was strongly dependent on the proportions of the LNCs components, particularly on the Solutol®/oil mass ratio (Heurtault et al., 2002; Huynh et al., 2009; Umerska et al., 2015a). The addition of EOs significantly increased the mass of the oil phase, leading to an increase in particle size. Moreover, incorporation of the EOs could have decreased the density of Solutol® molecules at the particle surface, therefore increasing the contact of lecithin molecules with the external phase and resulting in an increase in the absolute value of zeta potential.

Addition of doxycycline did not affect the properties of the EOs-loaded LNCs. It is difficult to conclude whether doxycycline was adsorbed on the particle surface, as the concentration of the former is markedly lower than the latter and might not be sufficient to significantly affect the properties of the LNCs. Size and zeta potential results are shown in Table 2.

	Blank LNCs	EOs- LNC	EOs-LNC + doxycycline
Size (nm)	56 ± 1	99 ± 6***	103 ± 2***
PDI	0.060 ± 0.028	0.120 ± 0.024*	0.125 ± 0.021*
Zeta potential (mV)	-10.7 ± 1.89	-17.7 ± 2.12*	-21.4 ± 2.83**

Table 2: Physical properties of blank LNCs, EOs-loaded LNCs and EOs-loaded LNCs with doxycycline. *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 versus blank LNCs.

3.2 Antibacterial activity of EOs-loaded LNCs, doxycycline and their combination

The MIC and MBC values of EOs-loaded LNCs and doxycycline alone and in combination are shown in Table 3.

	MIC EOs-LNC alone	MIC EOs-LNC in combination	MIC doxycycline alone	MIC doxycycline in combination	FIC index
<i>K. pneumoniae</i>	1250	625	8	4	1
<i>A. baumannii</i> RCH	625	312	4	1	0.8
<i>A.baumannii</i> SAN	625	312	4	1	0.8
<i>P.aeruginosa</i>	2500	1250	32	8	0.7
<i>E.coli</i> ATCC 25922	625	160	1	1	1.3
	MBC EOs-LNC alone	MBC EOs-LNC in combination	MBC doxycycline alone	MBC doxycycline in combination	FBC index
<i>K. pneumoniae</i>	1250	625	640	4	0.5
<i>A. baumannii</i> RCH	625	312	320	1	0.5
<i>A.baumannii</i> SAN	625	312	320	1	0.5
<i>P.aeruginosa</i>	2500	1250	1280	4	0.5
<i>E.coli</i> ATCC 25922	625	312	640	4	0.5

Table 3: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of EOs-loaded LNCs and doxycycline used alone and in combination, fractional inhibitory concentration index (FIC) and fractional bactericidal concentration index. MIC and MBC values are given in µg/ml.

The MIC and MBC of the EOs-loaded LNCs were the same, either 625 µg/ml (*A. baumannii*, RCH and SAN, *E. coli*) or 1250 µg/ml (*K.pneumoniae*) or 2500µg/mL (*P.aeruginosa*). The same values of MIC and MBC might suggest a bactericidal action of the EOs. Indeed, it has been shown that carvacrol had a bactericidal activity, although the bacteria could grow at low concentrations (Ultee et al., 1999; Gill and Holley, 2004) demonstrated bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. On the other hand, Montagu et al. (2014) have shown that at 2MIC EOs-loaded LNCs were bacteriostatic.

Pseudomonas aeruginosa was less sensitive to EOs-loaded LNCs than *A. baumannii* or *E.coli*, as the MIC (MBC) differed by more than one serial dilution. *P. aeruginosa* is known to have low antibiotic susceptibility and low permeability of the cell envelope. Interestingly, thus far only strains of the genus *Pseudomonas* have been shown to be able to overcome the toxicity of high concentrations of cyclic hydrocarbons (Sikkema et al., 1995).

The MBC of doxycycline depended on the strain- *A. baumannii* was significantly more sensitive to doxycycline than *P. aeruginosa* (MBC of 320 µg/ml and 1280 µg/ml, respectively). High MBC values of doxycycline are not surprising, as this antibiotic is known to be bacteriostatic. Indeed, the MIC values of doxycycline are 40-320 times lower than the MBC. The FIC index values of EOs-loaded LNCs and doxycycline combination were between 0.7-1.3, depending on the strain, and therefore in terms of inhibition of bacterial growth the interactions between doxycycline and EOs-loaded LNCs can be considered as additive or indifferent. However, when bactericidal effect is taken into account, LNCs-doxycycline combination demonstrated synergistic effect against all tested strains (FBC index of 0.5).

Blank LNCs did not display bactericidal effect, and the combination LNCs-doxycycline demonstrated the same effect as doxycycline alone (not shown). These results prove that the synergistic bactericidal effect between EOs-loaded LNCs and doxycycline are due to the presence of the EOs in the formulations, and not due to the nanocapsules.

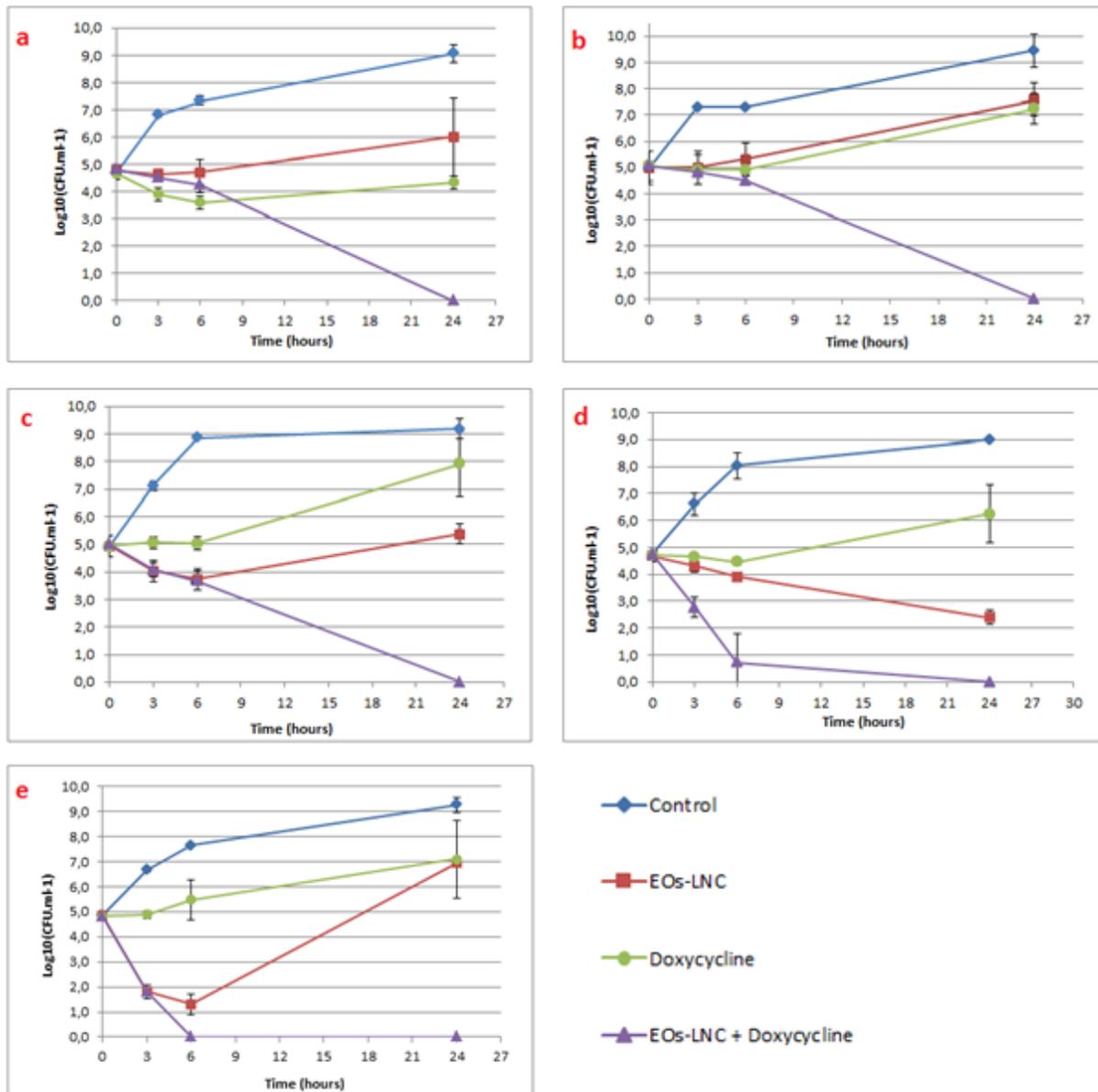


Figure 3: Time kill curves of EOs-loaded LNCs and doxycycline used alone and in combination against a) *A.baumannii* RCH (EOs-loaded LNCs at 295µg/mL, doxycycline at 4µg/mL), b) *A.baumannii* SAN (EOs-loaded LNCs at 250µg/mL, doxycycline at 4µg/mL), c) *Klebsiella pneumoniae* (EOs-loaded LNCs at 625µg/mL, doxycycline at 4µg/mL), d) *E.coli* ATTCC25922 (EOs-loaded LNCs at 465µg/mL, doxycycline at 4µg/mL) and e) *Pseudomonas aeruginosa* (EOs-loaded LNCs at 937µg/mL, doxycycline at 4µg/mL). Diamonds- control, squares- EOs-loaded LNCs, circles- doxycycline, triangles- EOs-loaded LNCs and doxycycline combination.

Time-kill curves against *Klebsiella pneumoniae*, *A.baumannii* SAN and RCH, *E.coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are depicted in Figure 3. Doxycycline at 4µg/mL exhibited bacteriostatic effect against *A. baumannii* RCH. EOs-loaded LNCs showed bacteriostatic

effect after 6 hours, and after 24 hours an increase in the number of colony forming units was observed compared with the initial inoculum. However, when used in combination, EOs-loaded LNCs and doxycycline showed synergistic bactericidal action. A 6 log difference between the combination and the LNCs was found. The bactericidal effect of the combination was observed after 24 hours; after 6 hours the combination exhibited a bacteriostatic effect similar to that of each of the components alone. In another *A. baumannii* strain, a 7 log difference between the combination and each of the ingredients used alone was found (Figure 3b). Similarly to *A. baumannii* RCH, a bacteriostatic effect was observed in the case of each of the ingredients as well as their combination against *A. baumannii* SAN. To better understand the kinetics of antibacterial effect and to determine when exactly the bactericidal effect of the combination occurred, the colonies of *A. baumannii* SAN were counted every 3 hours. The bactericidal effect occurred after 21 hours of incubation. Moreover, the difference between the combination and each ingredient became significant (4 log₁₀ CFU/ml) after 21 hours. Figure 3c shows that, when used alone, EOs-loaded LNCs had a bacteriostatic effect and doxycycline at 4 µg/mL did not exhibit an antibacterial effect after 24 hours, nevertheless the combination of doxycycline and EOs-loaded LNCs showed a synergistic and bactericidal effect against *K. pneumoniae*. A 5 log difference between the combination and the LNCs was found. This effect was observed after 24 hours; between 0 and 6 hours EOs-loaded LNCs used alone or in combination with doxycycline had similar influence on the number of colony forming units. Figure 3d shows that EOs-loaded LNCs alone at 465 µg/mL had a bacteriostatic effect (a 2 log reduction in the number of CFU compared with starting inoculum) against *E. coli*, whereas doxycycline at 4 µg/mL showed an increased number of CFU compared with the starting inoculum. The combination of doxycycline and EOs-loaded LNC showed a synergistic and bactericidal effect. A 2-3 log difference between the combination and the LNCs was found. In contrast to *A. baumannii* or *K. pneumoniae* strains, an important reduction in the number of CFU was observed after 3 hours for the EOs-loaded LNCs and doxycycline combination. After 6 hours further reduction was observed, which was higher than 3 log, therefore the combination can be considered as bactericidal after 6 hours. Figure 4e shows that EOs-loaded LNCs at 937 µg/mL alone had a bactericidal effect against *P. aeruginosa* after 3 and 6 hours, but after 24 hours the number of CFU markedly increased. Doxycycline showed a bacteriostatic effect after 3 hours, and the CFU number was increased by 2 log after 24 hours compared with the starting inoculum. The combination showed a bactericidal effect after 3 hours similar to that of the EOs-loaded LNCs alone, however further reduction in the

number of CFU was observed after 6 hours, and the bactericidal effect was still maintained after 24 hours.

3.3 Scanning electron microscopy

The influence of doxycycline, EOs-loaded LNCs and their combination on *A. baumannii* SAN is shown in Figure 4. Similar effect was observed in *Klebsiella pneumoniae* (not shown). The untreated *A. baumannii* cells displayed a smooth and intact surface (Figure 4a). After treatment with doxycycline bacterial debris can be observed next to the bacteria, the surface became corrugated (Figure 4b). Similarly, after treatment with EOs-loaded LNCs the bacteria became rough and holes in the bacterial cell envelope can be observed (Figure 4c). Likewise, holes in the bacterial cell and large quantities of debris were also observed in *A. baumannii* treated with the combination of EOs-loaded LNCs and doxycycline (Figure 4d).

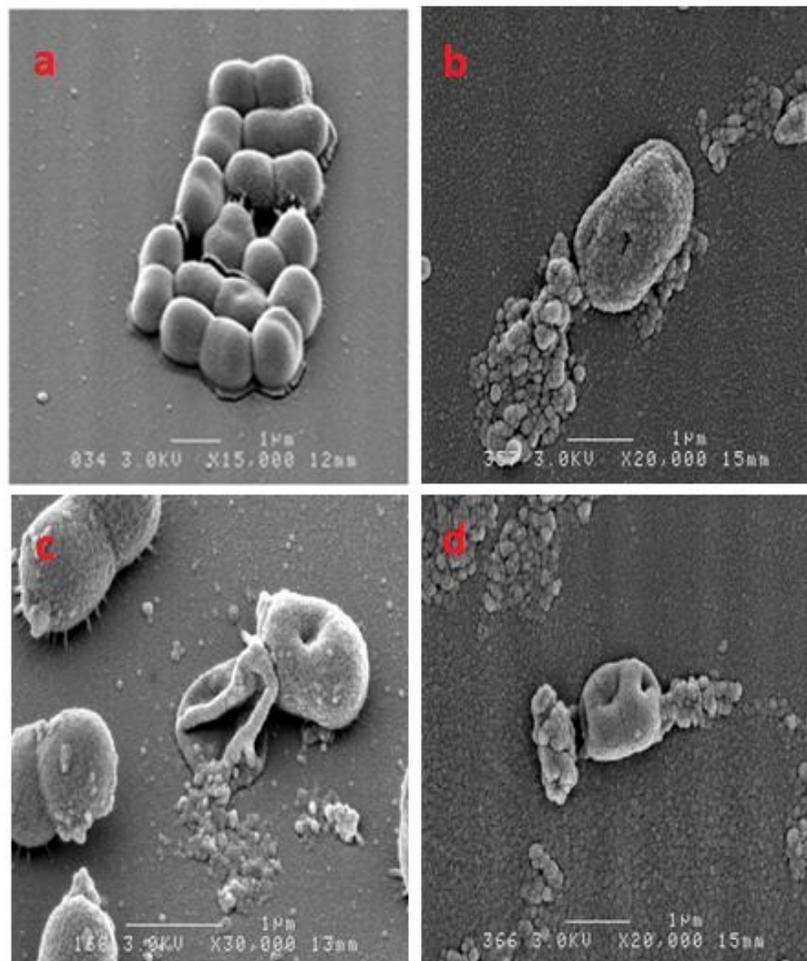


Figure 4: SEM micrographs of *A.baumannii* SAN after 10 hours of incubation. a: Control-untreated *A.baumannii* SAN, b: after treatment with doxycycline (4µg/mL), c: after treatment

with EOs-loaded LNCs (250µg/mL), d: after treatment with EOs-loaded LNCs(250µg/mL) + doxycycline (4µg/mL).

3.4 Discussion

The outer membrane of Gram-negative bacteria provides a hydrophilic surface due to the presence of lipopolysaccharide (Nikaido, 1996), which serves as a penetration barrier for macromolecules and hydrophobic compounds, making Gram-negative bacteria relatively resistant to hydrophobic antibiotics. Trans-cinnamaldehyde and carvacrol gain access to the periplasmic space and to the deeper parts of the cell of Gram-negative bacteria through the porin proteins of the outer membrane (Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001). Tetracyclines cross the outer membrane of Gram-negative bacteria through OmpF and OmpC porin channels as coordination complexes with positively charged cations (probably magnesium). The metal ion-tetracycline complex probably dissociates in the periplasmic space releasing uncharged tetracycline, a weakly lipophilic molecule able to diffuse through the lipid bilayer regions of the inner membrane. The uptake of tetracyclines across the cytoplasmic membrane is energy dependent and driven by the pH gradient component of the proton motive force (Chopra and Roberts, 2001).

The EOs exerted their antibacterial effect due to their lipophilicity, which allows them to partition into the lipids of the bacterial membranes. The accumulation within membranes disturbs their structures and leads to subsequent membrane associated events such as energy depletion and an increased permeability resulting in the leakage of cell contents (Knobloch et al., 1986; Sikkema et al., 1994; Sikkema et al., 1995; Helander et al., 1998). The leakage of the cellular material can be observed in the scanning electron micrographs (Figure 4). Carvacrol was shown to disintegrate the outer membrane of Gram-negative bacteria, releasing lipopolysaccharides (LPS) and sensitizing it to detergents. It inhibited the bacterial growth at concentration similar to those required for the outer membrane disintegration and increased the permeability of the cell membrane to ATP (Helander et al., 1998). Carvacrol was assumed to dissolve in the phospholipid bilayer and to align between the fatty acid chains causing membrane destabilisation (Ultee et al., 2000a). It has been shown that in the presence of carvacrol the membrane fluidity increased, which in turn would increase the passive permeability. It was concluded that carvacrol caused the formation of channels through the membrane by pushing apart the fatty acid chains of the phospholipids, allowing ions to leave the cytoplasm (Ultee, 2000). Cinnamaldehyde inhibited the growth of *E. coli* and *S.*

typhimurium at similar concentrations to carvacrol, but opposite to carvacrol it did not disintegrate the outer membrane or deplete the intracellular ATP pool (Helander et al., 1998). It might be related to the phenolic character of carvacrol, as phenols are known for their membrane-disturbing properties (Sikkema et al., 1995; Helander et al., 1998). Eugenol caused cell wall deterioration and cell lysis (Thoroski et al., 1989). Both, eugenol and cinnamaldehyde are thought to bind to proteins, preventing the action of amino acid decarboxylases in *E. aerogenes* (Wendakoon and Sakaguchi, 1995). However Gram-negative bacteria are known to adapt to lipophilic compounds. These adaptations involve altering of cell envelope composition and removal of toxic compounds via active transport systems (Sikkema et al., 1995). The increase in the number of CFU after the initial growth inhibition (Figure 3) may be the result of the adaptation of bacteria to EOs. Indeed, Ultee et al. (2000a) have shown that *B. cereus* adapts to carvacrol in the presence of non-lethal carvacrol concentrations in the growth medium by lowering the membrane fluidity by changing the fatty acid and head-group composition.

Similarly to EOs-LNCs, at tested concentrations doxycycline exerted a bacteriostatic effect (Figure 3). Doxycycline binds to the 30S subunits of bacterial ribosomes. This prevents the binding of aminoacyl tRNAs to the acceptor (A) site of ribosome inhibiting translation (Figure 5) (Chopra et al., 1992; Chopra and Roberts, 2001; Kogawa et al., 2012). Binding of doxycycline with ribosome is reversible, providing an explanation of the bacteriostatic action of this antibiotic (Chopra et al., 1992). However, the selective action of tetracyclines on bacteria is not at the level of ribosomes, because *in vitro* tetracyclines inhibit protein synthesis equally well in purified ribosomes from both bacterial and human cells (Levinson, 2014). Its selectivity is based on its greatly increased uptake into susceptible bacterial cells compared with human cells (Levinson, 2014).

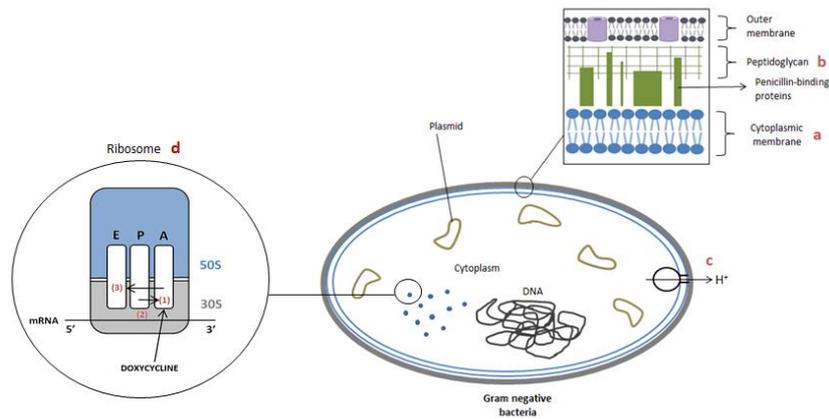


Figure 5: Mechanism of action of carvacrol, eugenol, trans-cinnamaldehyde and doxycycline.

- a) Carvacrol disintegrates the cytoplasmic membrane of Gram-negative bacteria, releasing lipopolysaccharides and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane (Lambert et al., 2001; Burt, 2004). EOs cause damage to membrane proteins
- b) Eugenol causes cell wall deterioration and cell lysis (Thoroski et al., 1989).
- c) EOs cause depletion of proton motive force
- d) Doxycycline binds to the 30 S ribosomal subunits inhibiting protein synthesis. Protein synthesis involves the following steps:
 - (1) Fixing the aminoacyl tRNA to the A site in the form of a complex with GTP and EF-Tu (elongation factor thermo unstable)
 - (2) Formation of peptide bond
 - (3) Translocation in the presence of EF-Tu and EF-G (elongation factor G).
 Tetracyclins inhibit the attachment of aminoacyl tRNA to the site (1) of ribosome (Bryskier, 2005).

In the case of combination, the effect of EOs was strengthened by the action of doxycycline. It is possible that doxycycline, by inhibiting protein synthesis, impeded the adaptation of bacteria to lipophilic EOs. In the case of *A. baumannii* and *K. pneumoniae* the bactericidal effect was observed after relatively long time (21 hours). Although the antibacterial agents did not initially kill the bacteria, they effectively inhibited their growth e.g. causing the leakage of cell contents. Even though the bacteria may tolerate the leakage of a certain amount of cell contents without loss of viability, the exit of critical molecules and ions or excessive loss of cell contents will lead to death (Denyer and Hugo, 1991). A rapid bactericidal effect was

observed against *P. aeruginosa*, but in this case the concentration of the EOs-loaded LNCs was markedly higher than in other strains. Another explanation of the synergistic effect is that the EOs increased the concentration of doxycycline inside the bacteria facilitating its uptake via disrupted cell envelope and/or decreasing its transport out of the bacterial cell.

Conclusions

EOs were successfully encapsulated within lipid nanocapsules with noticeably high drug loading of 20%. Due to their small particle size, lipid nanocapsules make a promising drug delivery system for the administration of essential oils.

The MIC values of EOs-loaded LNCs were equal to MBCs, indicating a bactericidal action of the EOs. Blank LNCs did not show any antibacterial effect. In contrast, the MBC of doxycycline was 40-320 times higher than the MIC, indicating a bacteriostatic mode of action. In terms of inhibition of bacterial growth the EOs-loaded LNCs and doxycycline combination showed additive or indifferent effect, however when bactericidal action was considered a synergy between these two components was observed. The synergistic bactericidal effect was confirmed by two methods: checkerboard titration and time-kill assay. The holes in bacterial envelope and leakage of cellular contents was observed in SE micrographs.

Acknowledgements

This project was funded by Eydo Pharma.

The author AU was funded by the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 604182. <http://ec.europa.eu.research> within the project FORMAMP - Innovative Nanoformulation of Antimicrobial Peptides to Treat Bacterial Infectious Diseases.

The authors thank to Mr Romain Mallet and Ms. Florence Manero, members of SCIAM (Service commun d'Imageries et d'analyses microscopiques), for their help and implication in this project.

References

- Andrews, J.M., 2001. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 5–16.
- Anton, N., Gayet, P., Benoit, J.P., Saulnier, P., 2007. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *International Journal of Pharmaceutics* 344, 44–52.

- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalié, P., 2005. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*. ISSN 0266-8254.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- Butler, M.S. and Buss, A.D. (2006). Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics?. *Biochemical pharmacology* 71. 919 – 929
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L., 2006. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11th ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil;
- Bryskier, A., 2005. Cyclines, in: Chang, R., Bellido, F. (Eds.), *Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals*. American society for microbiology, Washington, pp 662-667.
- Chopra, I., Hawkey, P.M., Hinton, M., 1992. Review: Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 29, 245-277
- Chopra, I. and Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 65-2. 232-260.
- Chow, J.W., Yu, V.L., 1999. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for Gram-negative bacteraemia: a commentary. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 7-12
- Davidson, P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM, Washington, pp. 520–556.
- Denyer, S.P., Hugo, W.B. 1991. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. *Society for applied bacteriology*. 27, 171-187.
- Didry, N., Dubreil, L., Pinkas, M., 1994. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta Helv.* 69, 25-28.
- European Pharmacopeia, IVth, 2002. Doxycycline hyclate. 01/2005:0272
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.E., Pagès, J.M., Hassani L., 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19, 464-471.

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., El-Baroty, G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.* 52, 665-667.

Finberg, R.W., Moellering, R.C., Tally, F.P., Craig, W.A., Pankey, G.A., Patchen Dellinger, E., West, M.A., Joshi, M., Linden, P.K., Rolston, K.V., Rotschafer, J.C., Rybak, M.J., 2004. The importance of bactericidal drugs: Future directions in infectious disease. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 1314-1320

Friberg, S., Lapczynska, I., Gillberg, G., 1976. Microemulsions containing nonionic surfactants—the importance of the pit value. *J. Colloids Interface Sci.* 56, 19–32.

Garrod, L.P. 1953. Combined chemotherapy in bacterial infections. *British medical journal*.

Gill, A.O., Holley, R.A., 2004. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental microbiology.* 70, 5750-5755.

Harold, C., Neu, M.D., 1978. A symposium on the tetracyclines: A major appraisal. *Bulletin of the New York Academy of medicine.* Vol 54, n°2.

Hawkey, P.M., 1998. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ* 317. 657–60

Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3590–3595

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 16, 997–1005.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoit, J.P., 2002. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical Research.* 19, 6.

Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2009. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics.* 379, 201–209

Klastersky, J., 1986. Concept of empiric therapy with antibiotic combinations: indications and limits. *American Journal of Medicine*, 80, 2-12

Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.-M., Vogenschow, H., 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.J. (Ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils.* De Gruyter, Berlin, pp. 429–445.

Kogawa, A.C., Nunes Salgado, H.R., 2012. Doxycycline hyclate: A review of properties, applications and analytical methods. *International journal of life science and pharma research*. ISSN 2250-0480.

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

León-Rodríguez, A. de, Escalante-Minakata, P., Jiménez-García, M. I., Ordoñez-Acevedo, L. G., Flores Flores, J. L. and Barba de la Rosa, A. P., 2008. Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Technology and Biotechnology*. 46, 448-455.

Levinson, W., 2014. Review of medical microbiology and immunology. 13th edition, The McGraw-Hill Companies, ISBN 978-1-25-925517-5

Markowitz, K., Moynihan, M., Liu, Mintsai., Kim, S., 1992. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol: A clinically oriented review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 73, 729-737.

Marles, R.J., Farnsworth, N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2, 137–189.

Montagu, A., Saulnier, P., Cassissa, V., Rossines, E., Eveillard, M., Joly-Guillou M.L. 2014. Aromatic and terpenic compounds loaded in Lipidic Nanocapsules: Activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* assessed in vitro and in a murine model of sepsis. *Journal of Nanomedicine Nanotechnology*.

Montero, A., Ariza, J., Corbella, X., Doménech, A., Cabellos, C., Ayats, J., Tubau, F., Borraz, C., Gudiol, F., 2004. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54, 1085–1091

Naidong, W., Geelen, S., Roets, E., and Hoogmartens, J., 1990 Assay and purity control of oxytetracycline and doxycycline by thinlayer chromatography – a comparison with liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8:891-898.

Negi, P. S., 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 7-17.

Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 178,20. 5853-5859.

Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P., Xu, J., 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *J. Food Sci.* 74, 379-383.

Petelska, A., Figaszewski, Z.A., 2002. Interfacial tension of bilayer lipid membrane formed from phosphatidylethanolamine. *BBA-Biomembranes.* 1567, 79-86.

Petrus, E.M., Tinakumari, S., Chai, L. C., Ubong, A., Tunung, R., Elexson, N., Chai, L. F. and Son, R. (2011) A study on the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of Nano Colloidal Silver on food-borne pathogens. *International Food Research Journal* 18: 55-66

Raoult, D., Drancourt, M. and Vestris, G., 1990. Bactericidal effect of doxycycline associated with lysosomotropic agents on *Coxiella Burnetii* in P388D1 cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* Vol 34, 8. 1512-1514

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O., 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 8, 157-180.

Roller, S., Sheedhar, P., 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C. *Lett Appl Microbiol* 35, 390-394.

Rosamond, J., Allsop A., 2000. Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science.* 287

Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Millillo, M.A., Mallamaci, R., 2008. The inhibition of *Candida* species by selected oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15, 635-638.

Rosato, A., Vitali, C., Piarulli, M., Mazzotta, M., Argentieri, M.P., Mallamaci, R., 2009. In vitro synergistic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* 16, 972-975.

Ross, I.A., 2001. *Medicinal Plants of the World-Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses.* Human Press Inc., Totowa, NJ.

Saballs, M., Pujol, M., Tubau, Fe., Peña, C., Montero, A., Dominguez, M.A., Gudiol, F., Ariza, J., 2006. Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 58, 697-700.

Shinoda, K., Saito, H., 1969. The stability of O/W type emulsions as a function of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT-method. *J. Colloid Interface Sci.* 30, 258–263.

Sikkema, J., De Bont, J.A .M., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022–8028.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59 (2), 201– 222.

Singh, G., Kapoor, I.P.S., Pandey, S.K., Singh, U.K., Singh, R.K., 2002. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytother. Res.* 16, 680-682.

Song, J.Y., Cheong, H.J., Lee, J., Sung, A.K., Kim, W.J., 2009. Efficacy of monotherapy and combined antibiotic therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in an immunosuppressed mouse model. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 33, 33-39.

Stone, M.J. and Williams, D.H., 1992. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Molecular microbiology.* 6, 29-34.

Taylor, P., 1998. Ostwald ripening in emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 75, 107–163.

Tenover, F.C., Weigel, L.M., Appelbaum, P.C., McDougal, L.K., Chaitram, J., McAllister, S., Clark, N., Killgore, G., O'Hara, C.M., Jevitt, L., Patel, J.B., and Bozdogan B., (2004) Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 275–280

Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C., 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection.* 52 (6), 399– 403.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10), 4606–4610.

Ultee, A., 2000. Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*. A Case Study of a Novel Approach to Mild Food Preservation. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 97 pp.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., 2000a. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology.* 174 (4), 233–238.

Umerska, A., Paluch, K.J., Santos-Martinez, M.J., Corrigan, O.I., Medina, C., Tajber, L., 2014a. Self-assembled hyaluronate/protamine polyelectrolyte complexes: synthesis, stability, biocompatibility, and potential use as peptide carriers. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 10, 3568-3673

Umerska, A., Corrigan, O.I., Tajber, L., 2014b. Intermolecular interactions between salmon calcitonin, hyaluronate, and chitosan and their impact on the process of formation and properties of peptide-loaded nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 477, 102-112

Umerska, A., Mouzouvi, C.R.A., Bigot, A., Saulnier, P., 2015a. Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded lipid nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics* 493, 224-232

Umerska, A., Paluch, K.J., Santos-Martinez, M.J., Medina, C., Corrigan, O.I., Tajber, L., 2015b. Chondroitin-based nanoplexes as peptide-delivery systems- investigations into the self-assembly process, solid state and extended release characteristics. *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 93, 242-253

Vonarbourg, A., Saulnier, P., Passirani, C., Benoit, J.P., 2005. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: Influence of the dipolar distribution at the interface. 26, 2066-2075.

Vrignaud, S., Anton, N., Gayet, P., Benoit, J.P., Saulnier, P., 2011. Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: A novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 79, 197–204

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97-110.

Wehrlé P. 2007. Pharmacie galénique, Formulation et technologie pharmaceutique. Maloine 238-240

Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58 (3), 280– 283.

White, R.L., Burgess, D.S., Manduru, M., Bosso, J.A., 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1914-1918.

Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H., 2003. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 1257– 1272.

Yi, L.Y., Lazzarini, L., Li, F., Stevens, M., Calhoun, J.H., 2005. Comparative evaluation of tigecycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55, 995-1002.

Zinner, S.H., Lagast, H., Klastersky, J., 1981. Antistaphylococcal activity of rifampin with other antibiotics. *The Journal of Infectious Diseases* 144, 4.

2.5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différentes associations testées ont permis de sélectionner l'antibiotique qui était le plus efficace en association avec nos huiles essentielles.

Nous avons choisi la Doxycycline associée à AT98a qui s'est avérée efficace contre plusieurs souches de bactéries à Gram négatif, multirésistantes (*P.aeruginosa*, *A. baumannii* SAN et RCH, *K.pneumoniae* et *E.coli*).

Les associations avec le méropénème, la Rifampicine et la Vancomycine, n'ont pas donné les résultats attendus, nous n'avons pas retrouvé une synergie ou cette synergie était présente pour de trop grandes concentrations en actif.

Les NCL ont toutes démontré un pouvoir antibactérien avec des CMI comprises entre 312 et 1250 µg/mL selon le type de LNC et de bactérie. Ceci confirme le pouvoir antibactérien des composants terpéniques utilisés. Les associations (AT98a et NCL cinnamaldéhyde-eugénol) semblent les plus intéressantes. Nous observons un effet bactéricide assez important en condition *in-vitro*. La raison pour laquelle nous n'avons pas sélectionné ces NCL pour des études *in vivo* repose sur les résultats non satisfaisants de cinétique de bactéricidie.

Les NCL chargées de cinnamaldéhyde sont très efficaces en solo, mais moins lorsque nous les associons aux antibiotiques. Les résultats que nous avons obtenu avec la combinaison « AT98a-Doxycycline » pourraient être à l'origine d'une synergie produite par la Doxycycline avec les trois constituants : cinnamaldéhyde, carvacrol et eugénol. Nous ne retrouvons pas cette synergie lorsque nous enlevons ces deux derniers composants.

Finalement, les mécanismes d'action responsables des synergies des composants terpéniques sont assez complexes.

Le cinnamaldéhyde présente un LD₅₀ par voie I.V. de 75mg/Kg (Zhao et al. 2015). Il est donc important de réduire au maximum sa concentration. Aussi, le mélange avec les 3 composants terpéniques semble montrer la synergie la plus intéressante. La présence du carvacrol compense la faible CMI de l'eugénol et réduit la quantité de cinnamaldéhyde ajoutée.

3. EFFICACITE IN-VIVO DE L'ASSOCIATION AT98a - DOXYCYCLINE

3.1 INTRODUCTION

Dans les objectifs de cette thèse, nous avons cherché à obtenir une efficacité sur les bactéries multirésistantes en utilisant une association antibiotique-NCL. Nous avons donc testé plusieurs types d'antibiotiques et de NCL dans le but de trouver l'association la plus efficace (ces résultats ont été compilés dans le chapitre précédent).

Une fois le choix de l'association fixé, grâce aux tests *in-vitro* (CMI et cinétique de bactéricidie), la deuxième étape consistait à la tester *in-vivo* chez la souris.

Nous avons donc choisi un modèle murin de pneumopathie à *A.baumannii* chez la souris C3H/HeN développé au CHU d'Angers par le professeur Joly-Guillou (Joly-Guillou et al ; 1997 ; Joly-Guillou et al. 2000).

Nous cherchons à provoquer chez la souris une pneumopathie bactérienne compartimentalisée qui sera traitée par voie intra-péritonéale (IP). Cette voie a une action équivalente à l'administration veineuse et est d'accès facile. Elle offre une grande surface d'absorption mais elle s'utilise presque exclusivement dans l'expérimentation animale à cause du grand risque d'infections.

Pour ce qui concerne l'expérimentation animale, la législation européenne et française établie un document élaboré en 1985 par le conseil de l'Europe : La convention STE 123 (Décret 2001-486).

En 1959, Russell et Burch ont élaboré la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer) qui constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord (Balls and Straughan 1996). Cette règle a comme objectif éviter ou limiter la douleur et la souffrance subie par les animaux. Elle repose sur trois points principaux :

- réduire : réduire le nombre d'animaux en expérimentation,
- raffiner : raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique l'utilisation des scores cliniques ou critères d'interruption,
- remplacer : remplacer les modèles animaux à chaque fois que cela soit possible par un modèle *in-vitro* ou *in-silico* (modèles mathématiques ou bio-informatiques).

Nous avons utilisé ce modèle animal en plein accord avec les principes éthiques établis par la

législation européenne. Ce protocole a reçu l'accord du comité d'éthique local du ministère de la recherche (référence : 20150 602 10313101 APAFIS5751) selon l'article R214-120 du décret 2013-118 du 1^{er} février 2013.

3.2 MATERIELS ET METHODES

L'antibiotique

Nous avons travaillé avec la doxycycline (doxycycline hyclate), antibiotique bactériostatique de la famille des cyclines à large spectre. La doxycycline est une molécule qui diffuse très bien dans les tissus avec une $\frac{1}{2}$ vie de 16 à 22 heures.

Les NCL

Les NCL sélectionnées correspondent à un mélange de 3 composants terpéniques à parts égales ; eugénol, cinnamaldéhyde et carvacrol formulées grâce à la méthode d'inversion de phase (Chapitre 1). Ces NCL ont été sélectionnées après les résultats in-vitro (Chapitre 2).

Les bactéries

Acinetobacter baumannii souche clinique SAN isolée d'une bactériémie d'un patient hospitalisé. Cette souche est productrice de céphalosporinases à haut niveau. Et sa CMI vis-à-vis de la doxycycline est de 4mg/mL. (Annexe 2 : Antibiogramme de la souche SAN).

Les animaux

Nous avons utilisé pour ce modèle de pneumopathie murine, 40 souris femelles C3H/HeN SPF (Tableau 10), provenant de l'élevage Janvier LABS et âgées de 6 semaines qui pèsent en moyenne 20 grammes +/- 4 grammes (Présentation du modèle dans les annexes).

	TYPE	Souris consanguine
	COULEUR	Souris agouti
	GENOTYPE ASSOCIE	A/A-MHC: Haplotype H2 ^k
	ORIGINE	National Institutes of Health (USA) 1996 (F169)
	PERFORMANCES DE REPRODUCTION	Animal excellent reproduction

Tableau 10: Image et principales caractéristiques de la souris C3H/HeN.

Les 40 souris sont randomisées (répartition aléatoire dans les différents groupes thérapeutiques), mises dans des cages (5 souris par cage) et identifiées avec un marquage dans l'oreille (Fiche de marquage de souris dans les annexes). Les cages sont placées dans des enceintes ventilées et contrôlées en atmosphère (température et hygrométrie), dans une salle spécifiquement dédiée à l'hébergement des animaux réservés à l'expérimentation animale. Elles sont choisies en raison de leur sensibilité particulière vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii*, et en raison de la reproductibilité des résultats de par la consanguinité de la race. Le temps d'acclimatation des animaux est de 7 jours avant toute expérimentation.

Cette acclimatation a comme objectif stabiliser les animaux du point de vue physiologique et comportemental et contribuer à diminuer le stress de l'animal.

Les expériences se sont déroulées au Service Commun d'Animalerie Hospitalo-universitaire (SCAHU) à Angers.

Hémolyse

L'hémolyse fait référence à la destruction des globules rouges libérant leur hémoglobine, même s'il s'agit d'un processus naturel (les globules rouges ont une durée de vie de 120 jours), certaines substances comme la méthyl dopa (Garatty and Petz 1975) ou le venin de serpent (Condrea et al. 1964), peuvent provoquer la destruction précoce et brutale des hématies.

Nous avons testé la toxicité de nos NCLs afin d'en mesurer l'hémolyse liée au produit.

Des dilutions en série des échantillons ont été mélangées avec du sang de cheval défibriné à un volume final de 2mL et incubées à 37° C pendant 24 heures. La plage de concentration est de 0,05 à 50 était mg/mL pour les NCL et 0,01 à 10 mg/mL pour la Doxycycline. Une solution de SDS (Sodium dodecyl sulfate) à 10% a été utilisé comme contrôle positif parce qu'il provoque un 100% d'hémolyse. Tandis que HBSS (Hank's balanced salt solution) a été utilisé comme témoin négatif (0% d'hémolyse). Après avoir terminé l'incubation, nous avons ajouté 2 ml de HBSS, et les échantillons ont été centrifugées (1000 g, 10 minutes). Le surnageant a été dilué avec de l'HBSS 20 fois et l'absorbance a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu, Japon) à une longueur d'onde de fonctionnement de 540 nm dans des cuves en quartz optiquement homogènes (Hellma, Allemagne) avec un trajet lumineux de 10 mm. Le contrôle négatif a été traité comme blanc, et son absorbance a été soustraite à chaque lecture. Le pourcentage d'hémolyse a été exprimé comme le rapport

entre l'absorbance du surnageant et celle du contrôle positif (10% SDS).

Test *in-vivo*

L'expérimentation *in-vivo* ne peut débuter qu'après une semaine d'acclimatation pour les souris, une fois celles-ci arrivées à l'animalerie afin de diminuer le stress animal du au transport. Les différentes étapes à suivre sont montré dans la figure 44, à l'aide d'un Time-Line.

1. Immunodépression transitoire

Les souris sont rendues transitoirement neutropéniques par deux injections IP de 150µL de cyclophosphamide (Endoxan : 150mg/kg) (molécule anticancéreuse) l'une à J-4 et l'autre à J-3 avant l'inoculation bactérienne. L'intérêt d'une immunodépression transitoire est de permettre à la souche SAN d'*Acinetobacter baumannii* de s'implanter dans le poumon.

A J-1, la souche bactérienne *A.baumannii* SAN005, conservée en cryobille à -80°C, seraensemencée sur une gélose au sang à l'aide d'une oese. La gélose est mise à l'étuve à 37°C et cultivé en aérobie pendant 24heures.

Nous réalisons un inoculum de 10^6 CFU à partir d'une solution de 0,5 mesurée au Mc. Farland correspondante à de 2×10^8 CFU/mL. L'inoculation est réalisée en intratrachéal sous un volume de 50µL.

2. Inoculation d'*Acinetobacter baumannii*

Les souris ont été brièvement anesthésiées à l'isoflurane (Figure 41). L'isoflurane est un agent anesthésique de la famille des éthers halogénés, avec un effet analgésique myorelaxant. L'inoculation bactérienne est alors réalisée par voie intra-trachéale à l'aide d'une sonde d'intubation comme montre la figure 42. Une fois la sonde est bien mise en place, la seringue s'ajuste à la sonde pour réaliser l'inoculation.

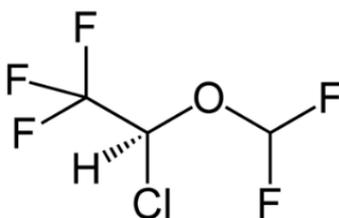


Figure 41 : Formule chimique de l'isoflurane (agent anesthésique)

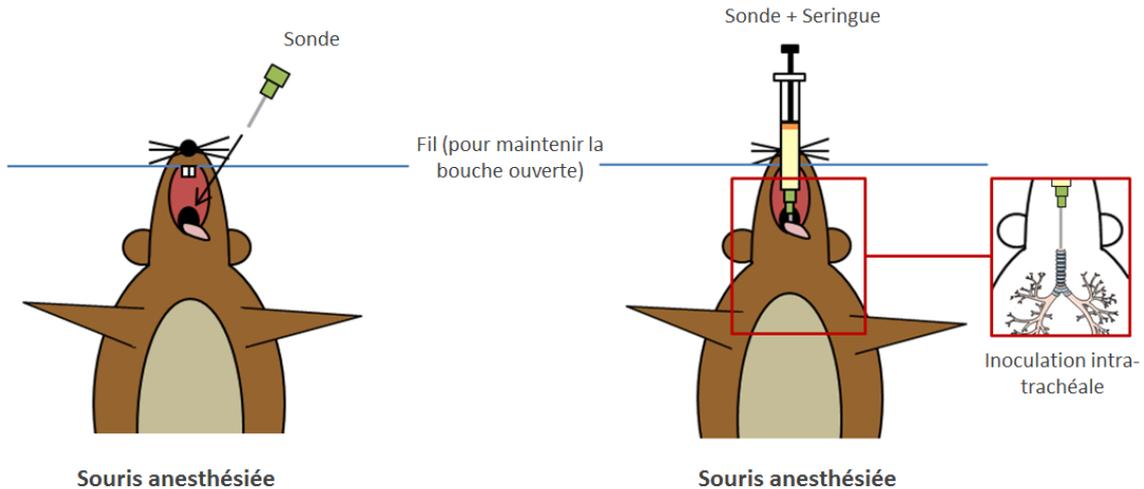


Figure 42 : Procédure d'intubation intra-trachéale.

3. Traitement par les produits antibactériens

Les 40 souris sont réparties en 4 groupes de 10 animaux :

- Groupe 1 (Témoins positifs) : Les 10 souris reçoivent une injection de 100 μ L de sérum physiologique par IP, 6h après inoculation bactérienne. Puis deux injections par jour à J1 et J2 par IP à 6h d'intervalle.

Les poumons d'une souris témoin euthanasié seront prélevés pour réaliser une culture quantitative, qui servira de Témoin « inoculation ».

- Groupe 2 : 10 souris reçoivent une injection de NCL (29 mg/ml) par IP, 6h après inoculation bactérienne. Puis deux injections par jour à J1 et J2 en IP à 6h d'intervalle (20mg/kg dans 100ml (13,8 μ l de NCL + 86,2 μ l de sérum physiologique), soit 40 mg/kg/j).
- Groupe 3 : 10 souris reçoivent une injection de doxycycline (20 mg/ml) par IP, 6h après inoculation bactérienne. Puis deux injections par jour à J1 et J2 en IP à 6h d'intervalle (4mg/kg dans 100ml (4 μ l de doxycycline + 96 μ l de sérum physiologique), soit 8 mg/kg/j).
- Groupe 4: 10 souris reçoivent une injection d'une association NCL+ doxycycline (le mélange est réalisé 1/4h avant inoculation) par IP, 6h après inoculation bactérienne. Puis deux injections par jour à J1 et J2 en IP à 6h d'intervalle (20 mg/kg de NCL et 4 mg/kg de doxycycline dans 100ml, 13,8 μ l de NCL + 4 μ l + 82,2 μ l de sérum physiologique).

Les souris ont été traitées 2 fois par jour pendant 3 jours. L'administration IP se réalise sans anesthésie, la souris est immobilisée en la maintenant fermement par la peau de son dos et l'injection se réalise au niveau abdominal comme le montre la figure 43.

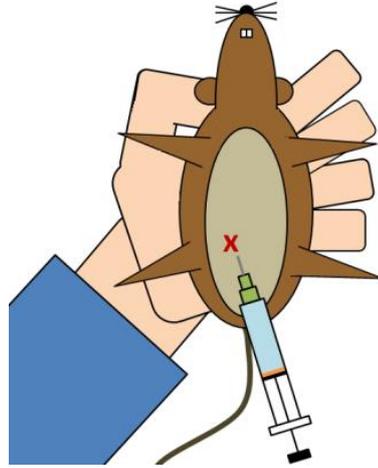


Figure 43 : Procédure d'administration IP en expérimentation animale chez la souris.

4. Poids, scores cliniques et mortalité

a) Le poids

Le poids est un indicatif de la santé de la souris, une diminution de plus de 2 grammes par rapport au poids initial montre un état pathologique dans la souris. La perte de poids peut être aussi une conséquence de la perte d'appétit en raison de l'infection.

Les souris ont été pesées tous les jours et les résultats représentés graphiquement.

b) Les scores cliniques

Comme la douleur est un critère très difficile à déterminer lorsqu'il s'agit d'expérimentation animale, il existe des signes qui peuvent nous indiquer l'état pathologique de la souris, ces signes sont les appelés scores cliniques (SC) (Tableau 11).

Les SC sont des indicateurs qui nous servent à pondérer des signes (mobilité, état du poil, conjonctivite...) (Eveillard et al. 2010) avec une valeur numérique entre 0 et 5.

La somme de ces items donne un chiffre global nous permet d'établir un statut de la souris par rapport à son état pathologique. Un score de 0 est obtenu pour une souris en pleine santé.

- **Mobilité :** La mobilité est un signe de la santé et de la souffrance d'un animal. Si l'animal reste immobile ou ne bouge pas même après un stimulus, on lui accord un

score de 2 ; Si la souris ne bouge qu'après un stimulus on lui accord un score de 1. Si elle bouge spontanément on lui accord un score de 0.

- L'état des poils : Nous pouvons observer le pelage de la souris pour avoir une idée de son état de santé. En effet, un animal malade ne prendra pas le temps de se nettoyer et son poil dévient hirsute et gras. On lui accord alors un score de 1.
- Conjonctivite : La conjonctivite est un autre des signes visibles de l'infection bactérienne au cours d'une pneumopathie. Elle se traduit par des yeux fermés ou collés, avec ou sans présence de pus. On lui accord un score de 1.
- Diarrhée : L'infection bactérienne peut aussi provoquer des diarrhées chez la souris. La diarrhée est facilement identifiable avec des selles collées à l'anus (souillure) ou si la souris présent une auréole jaunâtre autour de l'anus. On accord alors à la souris un score de 1.

	0	1	2
Mobilité	La souris bouge et court avec normalité (mobilité spontanée)	La souris bouge après stimulation ou très lentement	La souris ne bouge pas
Etat des poils	Poil soyeux (normal)	Poil hirsute et gras	-----
Conjonctivite	Non	Oui	-----
Diarrhée	Non	Oui	-----

Tableau 11 : Différents scores cliniques et leurs ponctuations.

Quand la souris atteint un $SC \geq 4$ elle est euthanasiée avec du CO_2 pour éviter que l'animal souffre trop. Ce score est appelé point limite.

Il existe des autres critères qui ne sont pas inclus dans les SC mais qui nous servent d'indicatifs sur la santé de la souris comme sont ; sa température corporelle, sa respiration (rapide et superficielle ou difficultés pour respirer) ou la réponse aux stimuli externes (si elle ne réagit pas lorsqu'on le pince une patte entre les doigts).

Ces signes sont des indicateurs complémentaires qui nous servent aussi pour déterminer si la souris doit être euthanasiée.

c) La survie

Chaque jour les souris mortes sont identifiées et comptées pour établir le rapport final.

5. Fin de l'expérimentation

Les souris sont surveillées pendant 4 jours, durée complète d'une expérimentation. Les souris survivantes seront analysées pour voir leur état de santé et finalement elles seront euthanasiées avec du CO₂.

Les différentes données obtenues tout au long de cette expérience (poids, scores cliniques et mortalité) seront compilées dans des tableaux ainsi que représentées graphiquement pour faciliter leur interprétation.

Les différentes étapes à suivre sont montrées dans la figure 44 à l'aide d'une Time-Line.

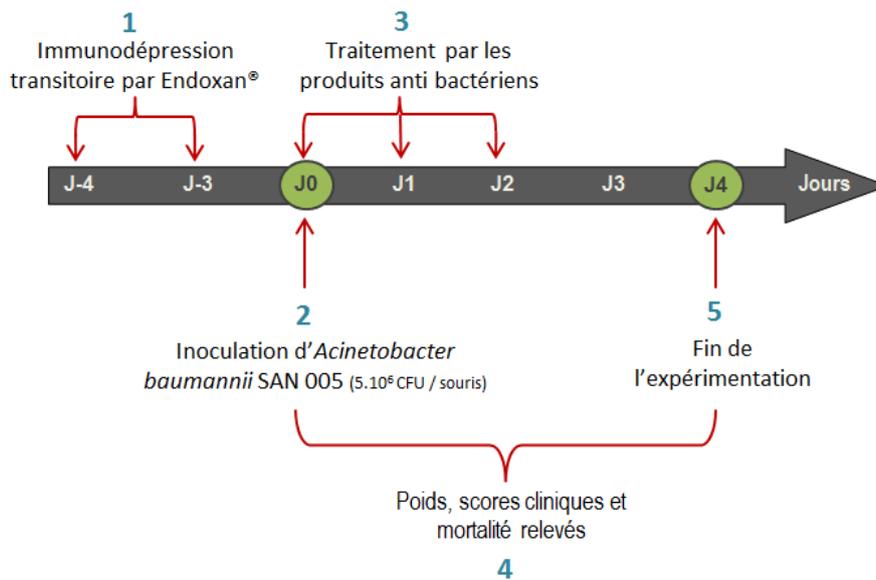


Figure 44: Time-line du protocole du modèle de pneumopathie murine établie par le CHU d'Angers.

3.3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Antibiogramme

Selon le Comité Français de l'antibiogramme (CA-SFM) créé par la Société Française de Microbiologie, les résultats de sensibilité *in-vitro* d'un antibiogramme peuvent se classer en :

-Sensibles (S) : Forte probabilité de succès thérapeutique dans le cas d'un traitement par voie systémique.

-Résistantes (R) : Forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

-Intermédiaire (I) : Succès thérapeutique imprévisible.

Nous avons retrouvé une résistance de la souche clinique SAN d'*A.baumannii* à la doxycycline qui se traduit par un diamètre d'inhibition d'11mm et une CMI de 64 mg/mL.

Hémolyse

Nous avons analysé chaque échantillon (NCL blanches, AT98a, doxycycline et l'association) séparément et nous avons compilé dans la Figure 45 :

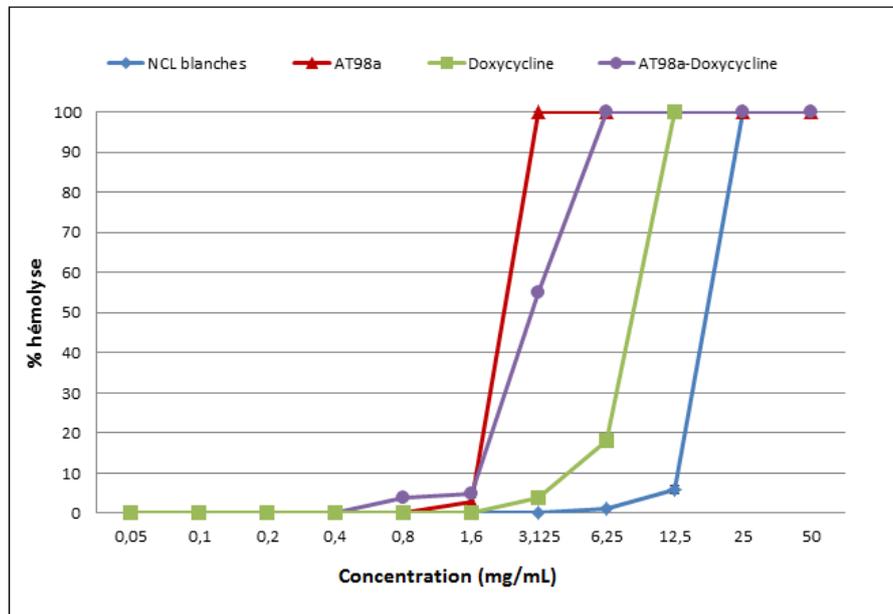


Figure 45: Evolution du pourcentage d'hémolyse par rapport à la concentration en mg/mL pour les NCL blanches (bleu), AT98a (rouge), la doxycycline (vert) et l'association (violet).

Les résultats d'hémolyse montrent que la présence de nos actifs rendent les NCL hémolytiques par rapport aux NCL blanches en retrouvant un 100% d'hémolyse à partir d'une concentration de 3,125mg/mL pour les NCL chargées par rapport à 25mg/mL pour les NCL blanches, presque 9 fois plus hémolytiques. Ces résultats restent cohérents parce que la capacité des HE à interagir avec les membranes biologiques est très connue.

Néanmoins, ces concentrations restent bien en-dessous des concentrations que nous avons utilisées pour l'expérimentation animale (0,250mg/mL).

En ce qui concerne la doxycycline nous observons un effet hémolytique à partir de 5mg/mL qui devient 100% hémolytique à une concentration de 10mg/mL.

Grâce à la Figure 45 nous pouvons observer que les NCL blanches sont les moins hémolytiques, suivies par la doxycycline, l'association et finalement AT98a. Ces résultats restent cohérents si nous tenons compte que dans l'association nous avons la moitié de NCL. Au total la toxicité sur les globules rouges de l'association doxycycline-NCL ne montre qu'une dilution d'écart avec la doxycycline seule. Les NCL blanches sont moins hémolytiques que la doxycycline seul e et ne sont donc pas considérés comme toxiques.

Evolution du poids, des SC et de la mortalité

Les souris montrant un score clinique de 0 et une perte de poids de < 2g ont été exclues de l'étude en raison de l'absence d'inoculation pulmonaire leur permettant de rentrer dans l'étude. Suivant ces consignes, 3 souris du groupe NCL et 1 souris du groupe Témoin ont été exclues de l'étude.

Evolution du poids

Les résultats concernant l'évolution du poids, ont été représentés graphiquement dans la Figure 46

Les résultats révèlent que toutes les souris ont perdu en moyenne 3,5g au cours de l'expérimentation. Les souris traitées avec les NCL ont été les plus touchées par cette perte de poids, avec un pourcentage de perte de poids d'environ 25% par rapport à leur poids initial.

Les souris traitées avec la doxycycline sont celles qui ont perdu moins de poids avec 13% de perte moyenne. Les souris traitées avec l'association ont perdu en moyenne 18,5% de leur poids et 22% pour les témoins.

La possible toxicité des NCL peut être à l'origine de cette perte de poids subit par les souris. Le tableau 12 montre les doses létales des molécules utilisées, en comparaison avec les doses utilisées. Le cinnamaldéhyde le plus toxique avec une DL50 de 75mg/Kg.

La DL50 fait référence à la dose qu'administré en une seule fois, provoque dans un délai de 14 jours, la mort de la moitié d'animaux étudiés.

L'association, ayant une quantité des NCL plus faible, présent une perte moins important, mais supérieure à celle des souris traitées uniquement avec la doxycycline.

Néanmoins les concentrations utilisées lors de cette étude restent bien inférieures à leurs respectives DL50 et nous observons une faible récupération du poids à partir du 4^{ème} jour.

	DL50 (mg/kg)	Doses utilisées (mg/kg/jour)	Doses utilisées pour l'association (mg/Kg/jour)
Eugénol	500	13.3	6.66
Carvacrol	471	13.3	6.66
Cinnamaldéhyde	75	13,3	6.66
Doxycycline	410	8	4

Tableau 12 : Doses de chaque composant terpénique utilisé en chaque injection.

Pour ce qui concerne le poids, le traitement avec la doxycycline semble le moins agressif, néanmoins la mortalité des souris traitées avec la doxycycline a été de 80%.

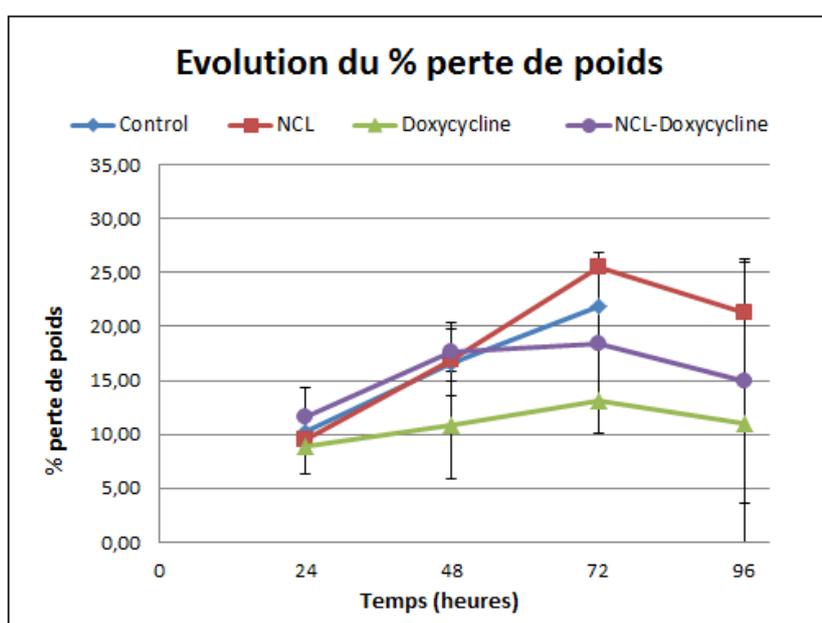


Figure 46 : Evolution en pourcentage de la perte de poids des 4 groupes de souris par rapport à leur poids d'origine. Aucune souris survivante dans le groupe témoin à 72 heures.

Scores cliniques

Les résultats concernant l'évolution des SC ont été représenté graphiquement dans les figure 47 a et b.

Dans l'image 47a, les résultats révèlent que dans le premier jour après l'infection, les souris traitées avec la doxycycline et les NCL ont un SC similaire aux souris témoins (entre 3-4), par rapport aux souris traitées avec l'association qui présentent un score clinique plus faible (2). Les souris qui présentent un SC plus élevé sont celles qui ont été traitées avec les NCL (SC final de 3 avec un pic maximal le J2 de 4,5).

CHAPITRE 3 : Efficacité in-vivo de l'association AT98a-Doxycycline

A J3, les deux souris traitées avec de la doxycycline commencent à se récupérer avec une forte diminution de leur score clinique

A J4 (96h), toutes les souris qui ont survécu, présentent un SC entre 0.5 et 1. Ce qui, uni à l'augmentation du poids, montre une récupération de leur état de santé.

Cependant, aucune différence significative ne peut pas être notée statistiquement en raison du faible nombre de souris.

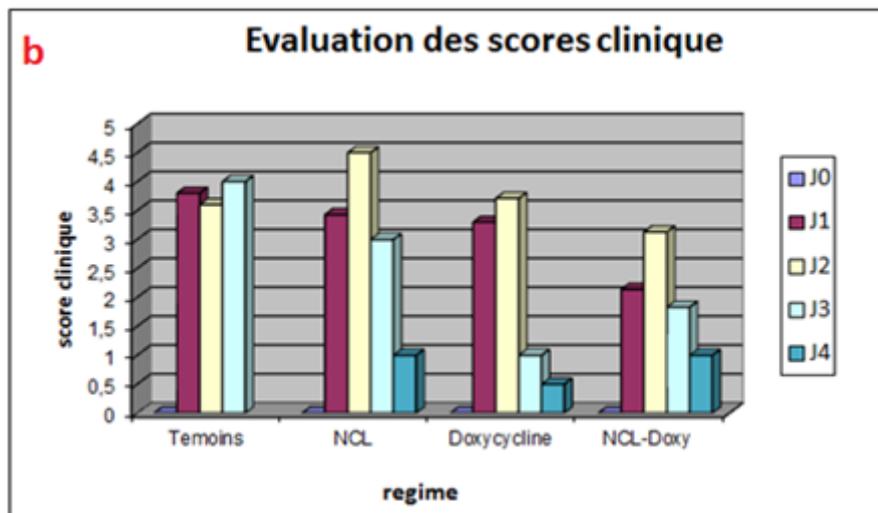
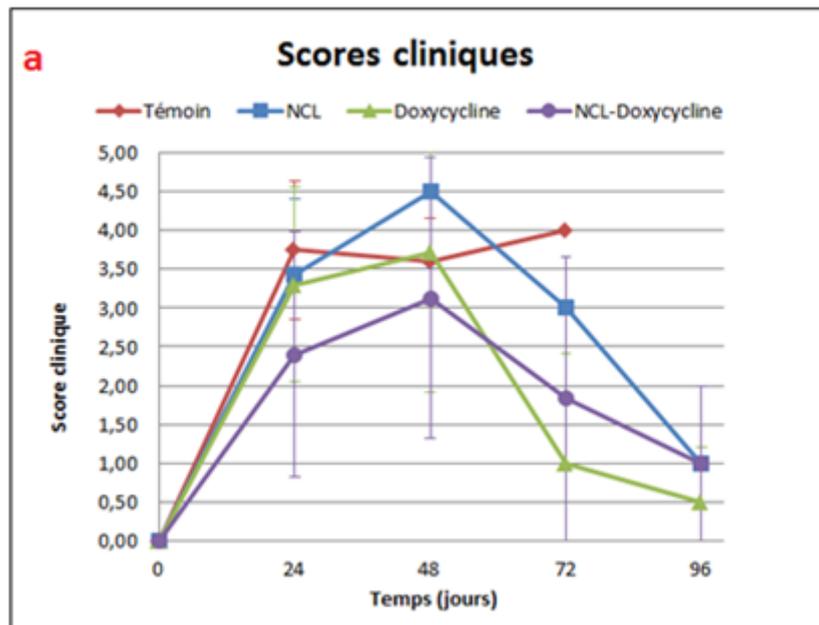


Figure 47 : Evolution des SC pour les témoins, les souris traitées avec les NCL, la doxycycline et l'association pendant 4 jours

Survie

L'évolution de la survie sur 4 jours a été représentée sur la Figure 48 qui représente la courbe de survie.

L'évolution de la survie a été étudiée pendant 4 jours.

Nous observons, que sans traitement, 90% des souris meurent entre le deuxième et troisième jour après inoculation. La mort est plus rapide mais moins élevée chez les souris traitées. Les souris traitées avec l'association sont celles qui survivent plus. Le tableau 13, montre les valeurs de survie jour par jour, ainsi que le pourcentage de survie pour chaque groupe.

A J4, nous retrouvons un pourcentage de survie de 0% pour les souris témoins, inférieur au 25% pour les souris traitées avec les NCL ou la doxycycline, et de 50% pour les souris traitées avec l'association.

Les résultats de mortalité pour la doxycycline sont en accord avec les résultats de l'antibiogramme qui avait classé catégorisé cet antibiotique, résistant.

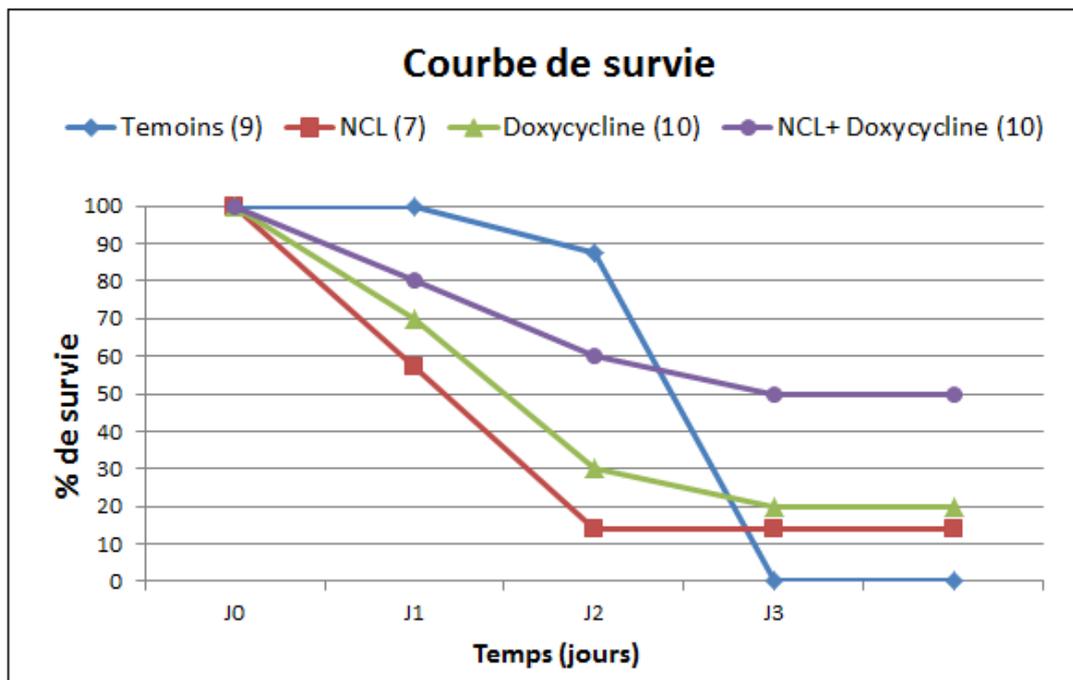


Figure 48 : Evolution de la survie des souris sur 4 jours

	J1	J2		J3			J4				%
Témoin (9)	0	0	8	0	8	1	0	8	1	0	0%
NCL (7)	3	3	3	3	3	0	3	3	0	0	14%
Doxycycline (10)	3	3	5	3	5	0	3	5	0	0	20%
NCL-Doxy (10)	2	2	2	2	2	1	2	2	1	0	50%

Tableau 13: Mortalité journalière des souris après l'inoculation des bactéries (J0). En beige le nombre de souris mortes dans les jours précédents. Dans la dernière colonne, pourcentage de survie à la fin de l'étude. Entre parenthèses, le nombre de souris dans chaque groupe.

3.4 CONCLUSION

A la fin de cette étude nous avons pu observer une survie 2 fois plus importante chez les souris traitées par l'association NCL-antibiotique comparativement aux témoins ou à la doxycycline ou les NCL seules.

Ces résultats confirment les résultats obtenus dans les expériences *in-vitro*.

En ce qui concerne le SC, nous avons pu constater une amélioration de l'état de santé de toutes les souris à partir du 3^{ème} jour, cette amélioration est particulièrement importante chez les souris traitées avec la doxycycline. Néanmoins, le taux de survie final de ce groupe n'est pas très élevé (20%).

Les souris traitées avec l'association ont présenté des SC cliniques faibles et une amélioration de leur état de santé au bout du 3^{ème} jour accompagné d'une récupération de poids.

Nous observons que les NCL utilisées seules (C= 40mg/kg/jour) ont un effet légèrement délétère qui se traduit par une perte de poids plus importante que dans les autres groupes (25% au J3). On observe une amélioration lorsque nous arrêtons le traitement.

Les résultats des tests d'hémolyse montrent que bien que nos composants aromatiques présentent une action hémolytique important, les concentrations auxquelles nous les utilisons, restent bien en dessous des concentrations toxiques pour les globules rouges.

4. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES NCL ET LES BACTERIES

4.1 INTRODUCTION

Le but de cette étude est de mieux comprendre le comportement des NCL lorsqu'elles sont en contact avec les bactéries mortes ou vivantes, ainsi que d'essayer de comprendre les changements dans la structure des NCL lorsque les composants aromatiques des huiles essentielles sont ajoutés. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser des méthodes physico-chimiques suivantes : la mesure de l'angle de contact, une méthode d'interprétation de la mobilité électrophorétique et la microscopie confocale.

Dans un premier temps, nous avons considéré 3 hypothèses (Figure 49) plausibles pour expliquer comment les NCL interagissent avec les membranes bactériennes.

La première suppose que les NCL ne sont pas capables de traverser la membrane des bactéries, par contre, elles peuvent la recouvrir et libérer leurs actifs, (Figure 49-1). Ces derniers vont traverser et déliter la membrane des bactéries (grâce à leurs propriétés antibactériennes).

La deuxième hypothèse (Figure 49-2) repose sur le fait que les NCL ont la capacité de pénétrer dans la bactérie, en traversant les porines des Gram négatifs et ainsi la membrane bactérienne. Une fois à l'intérieur de la bactérie, elles libèrent les actifs.

Enfin, nous envisageons un troisième scénario qui combinerait les deux situations précédentes.

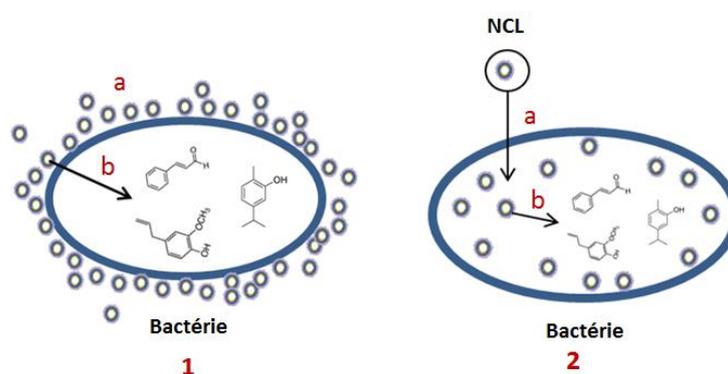


Figure 49 : Hypothèses sur le comportement des NCL vis-à-vis des bactéries

1: Les NCL recouvrent la surface de la bactérie sans pénétrer à l'intérieur (a). Elles libèrent au fur et à mesure les actifs qui traversent la membrane bactérienne (b).

2: Les NCL pénètrent à l'intérieur de la bactérie (a), elles libèrent leurs actifs (b)

La mesure de la mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique de la particule est définie comme le rapport entre la vitesse de migration électrophorétique et le champ électrique appliqué (Masliyah et Bhattacharjee 2006).

Le modèle « soft particle analysis » se réfère à des particules présentant en surface des macromolécules de type polymères ou protéines. Ce modèle a été utilisé de nombreuses fois (Ohshima and Kondo 1987 ; Ohshima 1995 ; Ohshima 1998 ; Tsuneda *et al.* 2003 ; Tsuneda *et al.* 2004), et s'appuie sur la présence d'une couche accessible à des contre-ions utilisés comme des sondes électrolytiques, au voisinage de la paroi extérieure de la particule. Ce modèle a été utilisé pour étudier les propriétés de surface de différentes bactéries (Bos *et al.* 1998 ; Morisaki *et al.* 1999 ; Kiers *et al.* 2001 ; Tsuneda *et al.* 2003 ; Tsuneda *et al.* 2004 ; Duval *et al.* 2005 ; Chandraprabha *et al.* 2007), de nanoparticules (Phenrat *et al.* 2007 ; López-Viota *et al.* 2009) ainsi que pour étudier les interactions électrostatiques entre particules molles (Ducel *et al.* 2005 ; Ohshima, 2008).

Ce modèle cherche à déterminer ZN, où N représente la densité de charge dans la région polyélectrolytique (charges/m³) et Z correspond à la valence de ces charges. Le modèle permet également la détermination de 1/λ, qui correspond à la profondeur (en nm) de la couche accessible aux contre-ions. Ce paramètre est généralement décrit comme le degré de résistance à l'écoulement du liquide dans la région polyélectrolytique (Kim *et al.* 2009). Le NaCl est utilisé comme pourvoyeur de sondes électrolytiques (Na⁺ et Cl⁻) pour interagir avec les charges électriques des macromolécules présentes en couche superficielle.

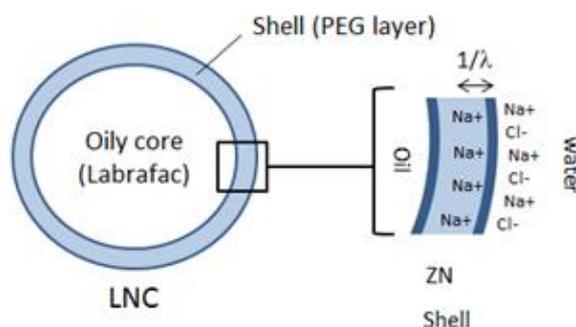


Figure 50 : Représentation schématique des paramètres de ZN et 1/λ des LNC dans une suspension ionique des NCL (image extraite de l'article de Vonarbourg *et al.* 2005)

La mobilité électrophorétique est calculée à partir de la vitesse des particules selon l'équation suivante :

$$\mu_E = v/E \quad \text{Equation 2}$$

Cette équation met en relation la vitesse de particules ($\mu\text{m/s}$) avec le champ électrique appliqué (V/cm). Ce paramètre peut être converti en potentiel Zêta (Aberkane 2010) grâce à l'équation d'Henry suivante:

$$\zeta = \frac{6\pi\eta}{\epsilon f(\kappa a)} \mu_E \quad \text{avec} \quad \begin{aligned} f(\kappa a) &= 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - \frac{5(\kappa a)^3}{48} \quad \text{pour } \kappa a \ll 1 \\ f(\kappa a) &= \frac{3}{2} - \frac{9}{2\kappa a} + \frac{75}{2\kappa^2 a^2} - \frac{330}{\kappa^3 a^3} \quad \text{pour } \kappa a \gg 1 \end{aligned} \quad \text{Equation 3}$$

Dans cette équation, le potentiel zêta (ζ) est mis en relation avec la permittivité (ϵ), avec la viscosité du milieu (η), et avec une fonction ($f(\kappa a)$) liée à la proportion entre la taille caractéristique du système (a) et l'inverse de la longueur de Debye (κ). (Kimura et al. 2002) définie dans l'équation 4.

La mobilité électrophorétique d'une particule (répondant au critère « soft particle ») est exprimé dans l'équation suivante

$$\mu_E = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{\eta} \frac{\psi_0/\kappa_m + \psi_{\text{DON}}/\lambda}{1/\kappa_m + 1/\lambda} + \frac{eZN}{\eta\lambda^2} \quad \text{Equation 4}$$

Où κ_m correspond au paramètre de Debye Hückel de la couche de polyélectrolytes et où η correspond à la viscosité, ψ_{DOM} est le potentiel de Donnan et le ψ_0 est le potentiel de surface. Pour simplifier, l'équation suivante nous pouvons représenter $ZN/2zn$ par la lettre A, ce qui transforme l'équation en :

$$\kappa_m = \kappa \left[1 + \frac{(ZN/2zn)^2}{\kappa^2} \right]^{1/4} \quad \text{Equation 5}$$

$$\kappa = \left(\frac{2z^2 e^2 n}{\epsilon_0 \epsilon_1 kT} \right)^{1/2}$$

Sachant que κ est le paramètre de Deby Hückel (l'inverse de la longueur de Debye). ψ_{DON} ou le potentiel de Donnan qui se caractérise par une répartition inégale des ions diffusibles entre deux solutions ioniques. Peut être représenté par l'équation suivante :

$$\longrightarrow \psi_{\text{DON}} = \frac{kT}{ze} \ln \left\{ A + (A^2 + 1)^{1/2} \right\} \quad \text{Equation 6}$$

ψ_0 ou Potentiel à la limite entre la région se surface et la solution est représentée par l'équation suivante :

$$\longrightarrow \psi_0 = \frac{kT}{ze} \left(\ln \left\{ A + (A^2 + 1)^{1/2} \right\} + \frac{1}{A} \times \left\{ 1 - (A^2 + 1)^{1/2} \right\} \right) \quad \text{Equation 7}$$

ZN et $1/\lambda$ sont considérés comme des paramètres ajustables permettant de faire correspondre la courbe théorique à la courbe expérimentale $m_E = f(n)$ où n est la concentration osmolaire de NaCl ajouté dans la suspension où sera mesurée la mobilité électrophorétique des particules.

L'angle de contact

L'hydrophobicité de la surface bactérienne peut être évaluée par différentes méthodes comme la chromatographie d'interaction hydrophobe (Stenström 1989), l'adhérence bactérienne à l'hydrocarbure (Rosenberg et al. 1980) ou la mesure de l'angle de contact (Absolom et al. 1983 ; Busscher et al. 1984 ; Hamadi et al. 2008).

La détermination de la tension de surfaces solides grâce à l'angle de contact a motivé nombreuses études qui utilisent l'équation de Young qui traduit l'équilibre mécanique d'une goutte sous l'action de trois tensions interfaciales (Tavana et al. 2005).

En 1805, Young avait déjà proposé une équation faisant intervenir les tensions interfaciales à un point sur la ligne de contact triphasique.

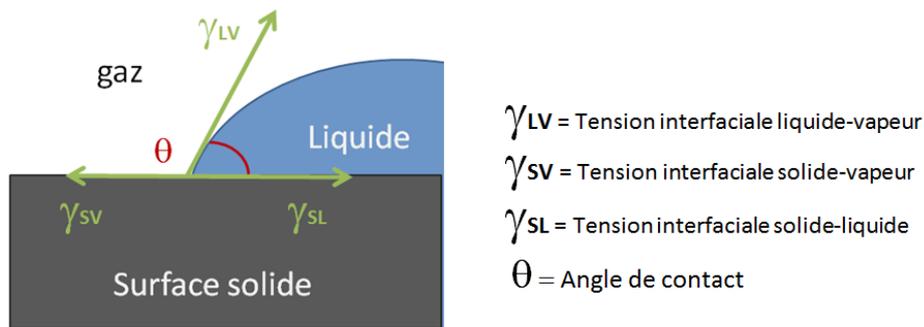


Figure 51 : Equation de Young pour la mesure de l'angle de contact et schéma des forces de surface

γ_S et γ_{LV} sont respectivement la tension interfaciale solide et liquide et γ_{SL} la tension interfaciale commune entre les deux phases (seulement γ_{LV} , et θ sont mesurables).

La détermination appropriée de γ_{SL} est un problème récurrent depuis de nombreuses années. Beaucoup de travaux ont été consacrés à cette détermination. Notamment, on peut citer les travaux pionniers de Busscher (Busscher et al. 1984).

L'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente d'une goutte déposée sur le substrat. Elle permet d'évaluer l'énergie de surface du liquide ou du solide.

La mesure de l'angle de contact sert aussi à déterminer le pouvoir d'adhésion bactérienne, un bon indicateur dans la formation de biofilms (Hamadi and Latrache 2008). Ce processus est dominé par des interactions de type Van der Waals, des interactions électrostatiques ou polaires. Ces interactions dépendent des propriétés physico-chimiques du substrat, de l'hydrophobicité de la bactérie (Gannon et al. 1991), de la charge de surface (Gannon et al. 1991) et de ses propriétés d'accepteur et donneur d'électrons (Van Oss 1993).

Dans cette étude, nous avons utilisé l'angle de contact pour déterminer non seulement la nature hydrophile ou lipophile de la membrane bactérienne aux différents états de croissance, mais aussi les interactions qui existent entre la bactérie et la nanoparticule chargée

La mesure de l'angle de contact sur une couche déposée de NCL (en suspension) sur un substrat solide (lamelle de microscopie en verre) et sans bactérie, nous permet de quantifier les caractéristiques hydrophiles des NCL. En second lieu, nous avons déposé une couche de

NCL nébulisée (nébuliseur E-flow® rapid) sur un film bactérien afin ici aussi, de quantifier les caractéristiques hydrophile-lipophiles des bactéries recouvertes.

Microscopie confocale

La microscopie confocale grâce à l'utilisation optimisée de lasers, de marqueurs fluorescents, des dispositifs de balayage rapide et du traitement numérique des images obtenues dans différents plans de focalisation permet d'analyser l'intérieur des objets microscopiques et de les visualiser en 3 dimensions.

Le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon marqué avec des fluorochromes. Il y a alors une émission des rayons fluorescents provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable ou « pinhole » qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation. Ces rayons passent alors à travers un bloc de filtrage des longueurs d'onde, puis arrivent à un système de détection par photomultiplicateurs.

L'objectif de cette expérience est de visualiser si et comment les NCL se placent (en surface ou au cœur bactérien) lorsqu'elles sont en incubation avec des bactéries.

4.2 MATERIELS ET METHODES

Nanocapsules lipidiques

Pour ces études nous avons utilisé des NCL blanches et d'AT98a. Elles ont été préparées grâce aux méthodes décrites dans le Chapitre 1.

Marquage des NCL

Pour la microscopie confocale, nous avons utilisé des NCL marquées avec du Nile Red (1mg de Nile Red® par gramme de labrafac®). Ces NCL marquées sont formulées en suivant le même protocole que pour les NCL blanches. Le Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo [α] phenoxazine-5-one) est un fluorochrome introduit pour la première fois par Smith en 1907, Il a une longueur d'excitation dans la gamme 515-530nm et qui émet dans la gamme 525-605nm (Figure 52).

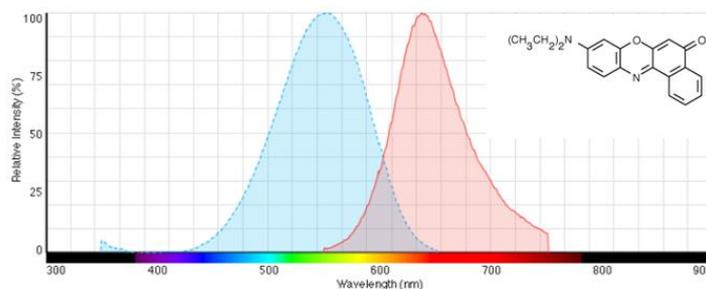


Figure 52 : Spectre de fluorescence et molécule du Nile-Red

Les bactéries

Acinetobacter baumannii : souche clinique obtenue à partir des patients du laboratoire de microbiologie du CHU d'Angers SAN 008 et RCH.

Escherichia coli : souche clinique de référence du laboratoire de microbiologie du CHU d'Angers ATCC25922.

Pour les études d'angle de contact nous avons décidé d'étudier l'évolution d'*A.baumannii* SAN en phase exponentielle et en phase stationnaire.

La croissance d'une bactérie décrite par Buchanan en 1918, divisait la courbe de croissance en 7 phases différentes (Buchanan 1918). Dans la phase de croissance exponentielle, les bactéries se multiplient jusqu'à atteindre une vitesse maximale. Cette phase perdure tant que la vitesse de croissance est constante, elle est ensuite suivie par un ralentissement où la vitesse de croissance régresse à cause de l'épuisement du milieu de culture.

Dans la phase stationnaire, le taux de croissance devient nul. Le nombre de bactéries qui se multiplient compense le nombre de celles qui meurent.

Marquage des bactéries

Pour la microscopie confocale, *A.baumannii* SAN a été marquée avec du FITC (Fluoresceine isothiocyanate isomer I). Excitation: 490nm, émission: 525nm (Figure 53)

Pour le marquage des bactéries une suspension bactérienne à 1,5McF est réalisée et centrifugée à 4000rpm pendant 5min. Ces bactéries sont lavées avec du tampon bicarbonate (0,1M, pH= 9). On ajoute ensuite 0,2µL d'une solution de FITC/DMSO (10mg de FITC dans 1mL de DMSO). L'ensemble est mis en incubation dans le noir pendant 30min à température ambiante sous agitation.

Les bactéries sont ensuite lavées 4 fois avec du PBS pour enlever le colorant qui n'est pas lié aux bactéries.

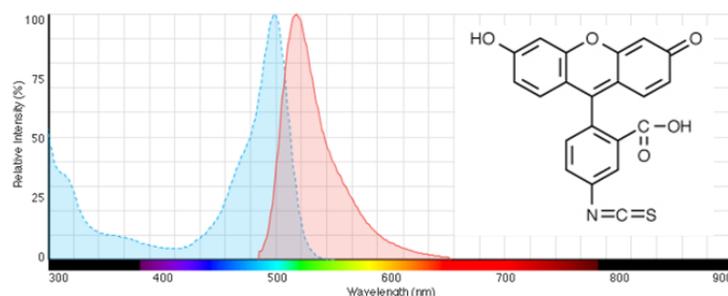


Figure 53 : Spectre de fluorescence et molécule du FITC

Antibiotique

Pour les études de mobilité électrophorétique, nous avons utilisé la Doxycycline hyclate (Vibraveneuse®) distribué par les laboratoires Serb.

Méthode Ohshima

Les bactéries (ou/et les NCL) sont mises en suspension dans une solution aqueuse saline avec une concentration croissante de NaCl de 0 à 85mM.

Les conditions de mesure sont les mêmes pour toutes les expériences. Nous avons travaillé à 25°C, avec une constante diélectrique relative de 78, un indice de réfraction de 1,33, une viscosité de 0,89 et un voltage de 150V, et nous travaillons à pH 7,4 tout au long de l'expérience. L'ajout des bactéries ne modifie pas le pH.

Pour les bactéries, nous avons travaillé avec une concentration de $1 \cdot 10^8$ bactéries/mL (0,5McF) (quantité suffisante pour avoir un signal interprétable).

Les mobilités électrophorétiques (ME) mesurées sont tracées en fonction de la concentration saline osmolaire (n dans les équations 4, 5, 6 et 7) permettant d'établir la courbe expérimentale. En ajustant au mieux les deux paramètres ZN et $1/\lambda$ de la théorie d'Ohshima on tente de superposer la courbe théorique à la courbe expérimentale. La superposition des deux courbes est qualifiée grâce à la méthode des moindres carrés permettant de déterminer les deux paramètres avec la meilleure précision possible.

Nous avons travaillé sur les différents systèmes présentés ci-après :

a) NCL avec des bactéries

Nous avons étudié la ME des NCL lorsqu'elles sont en contact avec des bactéries en les comparant aux mesures de ME de NCL seules et de bactéries seules.

Pour cela, nous avons travaillé avec une concentration fixe en NCL (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) légèrement inférieure à la CMI de la bactérie en présence de NCL (620 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

b) Influence de la concentration/quantité en NCL

Nous avons voulu étudier l'influence de la concentration en NCL sur la variation de la ME. Pour cela nous avons mis en contact des bactéries avec différentes concentrations en NCL (Tableau 13), supérieures et inférieures à la CMI relative à *E.coli*. Dans le tableau 13, nous mettons en relation les μL de NCL dans l'échantillon avec l'équivalence en $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'actifs.

	μL de NCL/1mL	[C] $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'actif	CMI (<i>E.coli</i>)
LNC 40	40	120	<
LNC 80	80	230	<
LNC 170	170	500	>
LNC 250	250	740	>
LNC 340	340	1000	>

Tableau 13 : Quantité, concentration en actif ($\mu\text{g}/\text{mL}$) et CMI de chaque NCL utilisée dans l'expérience

c) Caractérisation de bactéries mortes et des bactéries vivantes

Nous avons mesuré la ME d'*E.coli* avec des NCL à une concentration de 740 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en actif (pour être au-dessus de sa CMI) au temps T0 (bactéries vivantes) et après 24 heures d'incubation (bactéries mortes).

d) Influence de la présence d'actifs dans les NCL

Nous avons mesuré la ME des NCL blanches et AT98a à la même concentration (170 μL de NCL/mL) avec des bactéries (*E.coli*).

e) Influence de la résistance bactérienne.

Nous avons mesuré la ME de deux souches d'*A.baumannii* avec des NCL, une sensible au méropénème (SAN) et une autre résistante (RCH) dans le but de déterminer si l'un de mécanismes de résistance implique une modification détectable par mesure électrophorétique des propriétés de la membrane bactérienne.

Chaque échantillon est analysé en *triplicata* et on a mesuré la conductivité de la solution et la mobilité électrophorétique.

Angle de contact

Pour le déroulement de l'étude, un film bactérien est préparé sur lequel nous avons posé des gouttes avec trois différents liquides de référence (l'eau, le glycérol et l'éthylène glycol) (Tableau 13) afin de déterminer (équation suivante) les paramètres γ_S^+ et γ_S^- caractérisant la nature du film bactérien.

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2\left(\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_L^+ \gamma_S^-}\right) \quad \text{Equation 8}$$

	γ_L	γ_L^d	γ_L^+	γ_L^-
Eau	72,8	21,8	25,5	25,5
Glycérol	64	34	3,92	57,4
Ethylène glycol	48	29	1,92	47

Tableau 13 : Valeurs de γ_L , γ_L^d , γ_L^+ et γ_L^- des trois liquides de référence utilisés lors de cette étude

Le choix de ces liquides n'est pas usuel car ne couvrant pas toute la gamme de polarité habituelle. Par exemple, le bromonaphtalène (utilisé pour des mesures d'état de surface solide) ne peut être appliqué sur une surface bactérienne. Nous avons choisi les liquides les moins toxiques pour l'étude de films bactériens et les résultats obtenus restent en concordance avec la littérature.

L'angle de contact est déterminé pour chacun des liquides. Nous avons utilisé un logiciel en ligne de résolution par la méthode du pivot de Gauss (<http://homemath.ilingo.net/systemjs.htm>) pour résoudre les trois équations relatives aux trois liquides de référence permettant la détermination de γ_S^+ et γ_S^- .

Préparation du film bactérien

100 μ L d'une suspension à 3McF est étalée sur une lame de verre afin de former une surface liquide homogène, en utilisant les $\frac{3}{4}$ de la surface de la lame comme le montre la Figure 54. Ensuite le film est séché à l'étuve (37°C) pendant 5-10min pour ne pas altérer les bactéries étalées.

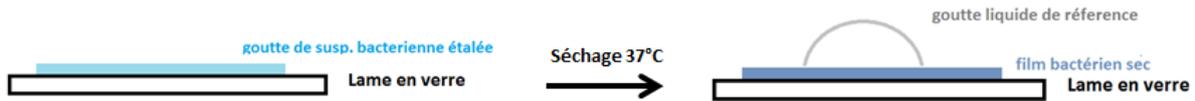


Figure 54 : Schéma de la préparation des lames pour la mesure de l'angle de contact

Préparation du film bactérien avec des NCL nébulisées

100µL d'une suspension à 3McF est étalée sur une lame de verre afin de former une surface liquide homogène. Les NCL sont ensuite nébulisées sur la goutte bactérienne à l'aide du nébuliseur Eflow Rapid® connu pour ne pas déstabiliser les NCL (Hureaux et al. 2009). L'ensemble est séché à l'étuve (37°C) afin de former un film sur lequel on peut réaliser la mesure de l'angle de contact comme le montre la Figure 55.

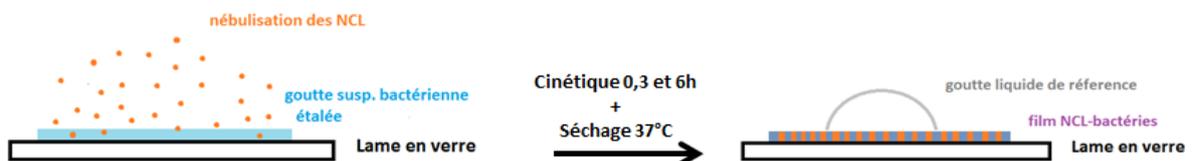


Figure 55 : Schéma de la préparation des lames (Bactéries + LNC) pour la mesure de l'angle de contact

Une goutte du liquide de référence sera déposée sur le film bactérien. Sa forme est déterminée grâce à une caméra numérique (Hitachi CCTV caméra TV 200m, lens 18-108 mm) Les images sont traitées par le logiciel Videomet permettant de mesurer l'angle de contact comme indiqué dans la figure 56.

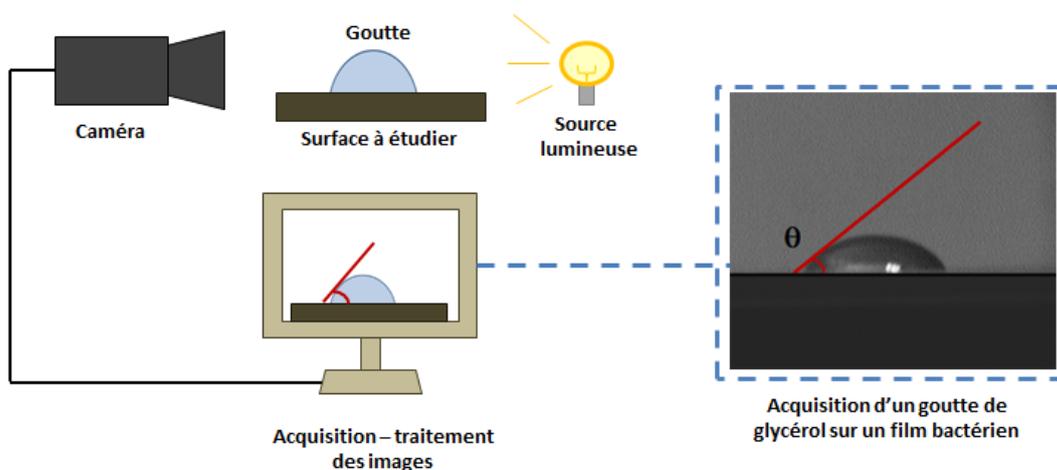


Figure 56 : Schéma de l'acquisition grâce à une caméra pour la détermination de l'angle de contact.

4.3 RESULTATS

Méthode Ohshima

a) NCL avec des bactéries

Dans un premier temps, nous avons mesuré la mobilité électrophorétique des NCL, des bactéries (*E.coli*), et du mélange (figure 57). Les courbes de mobilité ont été ajustées (courbes théoriques en trait plein) par la théorie d’Ohshima. Les valeurs optimales des paramètres ajustables (ZN et $1/\lambda$) ont été compilées dans le tableau 14.

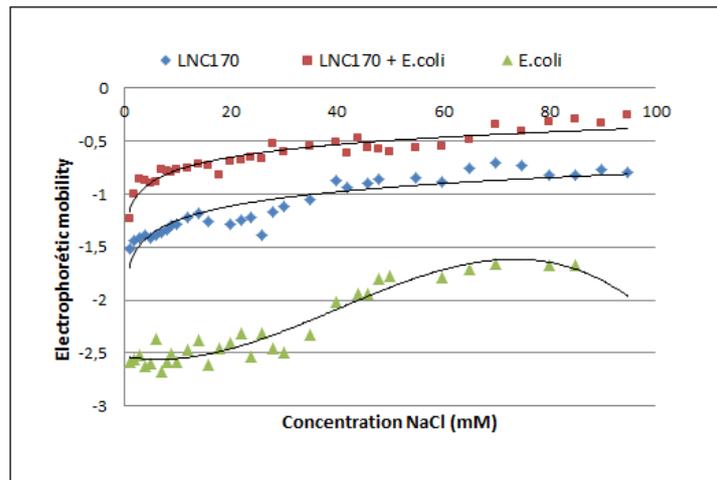


Figure 57: Mobilité électrophorétique et spectres de potentiel zêta pour les NCL seuls, les bactéries et les deux ensembles.

	$1/\lambda$ (10^{-9} m)	ZN (C/m^3)
NCL	4,6	$-3,13 \cdot 10^{23}$
Bactérie	1,4	$-2,97 \cdot 10^{25}$
NCL + Bactérie	7,32	$-6,25 \cdot 10^{23}$

Tableau 14 : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN pour les NCL seules, les bactéries et le mélange des deux.

En observant la figure 57, nous pouvons observer une différence entre la ME des NCL (en rouge) et celle de la bactérie étudiée (en vert). Ce qui se traduit par un ZN plus élevé pour les bactéries (Tableau 14). Lorsque les NCL sont incubées pendant 30min avec les bactéries nous observons un ZN qui s’approche de celui des NCL seules. En ce qui concerne $1/\lambda$, on remarque que la profondeur de la couche accessible aux contre-ions est significativement plus importantes (7,32 nm).

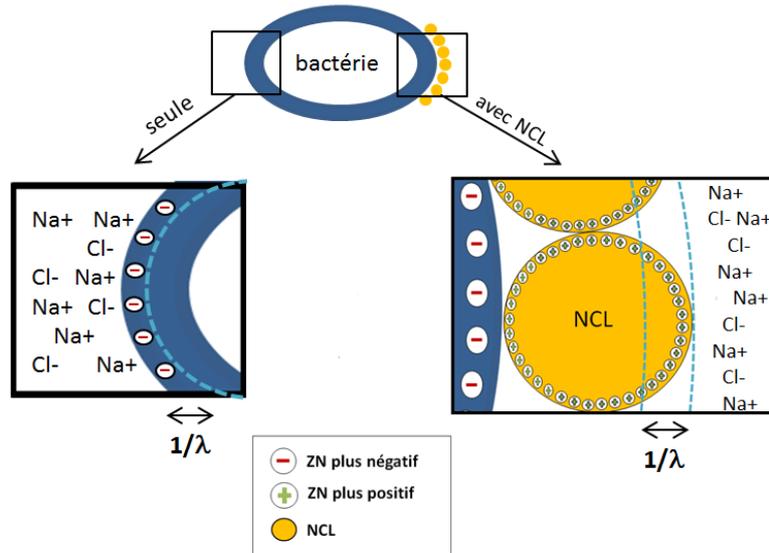


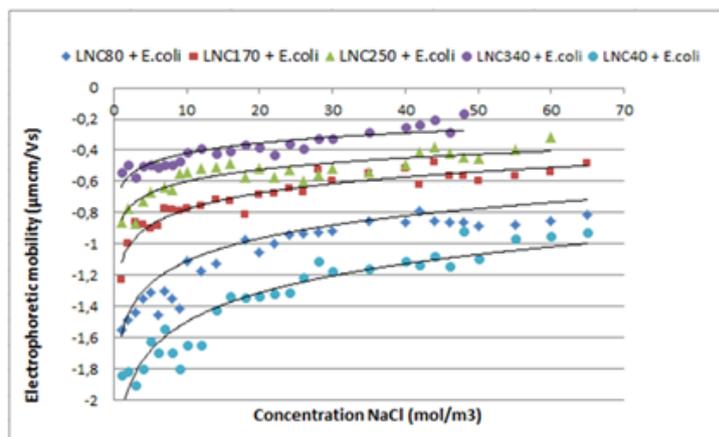
Figure 58 : Représentation schématique de ZN et $1/\lambda$ dans une suspension bactérienne (gauche) et dans une suspension contenant des bactéries et des NCL (droite)

La Figure 58 schématise le recouvrement des bactéries par des NCL dont on connaît par ailleurs leur comportement filmogène. Nous avons représenté les différentes couches accessibles caractéristiques de la bactérie seule (à gauche) et de la bactérie recouverte d'une couche des NCL (à droite). Dans le premier cas, la couche accessible aux contre-ions ne peut être qu'au niveau de la périphérie de la bactérie. Les résultats de l'augmentation de l'épaisseur de la couche accessible ($1/\lambda$) sembleraient vouloir indiquer que les NCL se placent de préférence sur la surface des bactéries. Ceci est cohérent avec une augmentation de la profondeur (environ 6 nm) de cette couche accessible.

En ce qui concerne la charge électro négative (ZN), nous retrouvons une valeur du même ordre de grandeur que celui des NCL seules. Cette indication est très en faveur d'une hypothèse de recouvrement des bactéries par les NCL. Néanmoins, des études directes de composition de surface restent nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

b) Influence de la concentration/quantité en NCL

Les résultats concernant l'évolution de la mobilité électrophorétique par rapport à la quantité et concentration des NCL est représentée dans la Figure 59, et les valeurs correspondant de $1/\lambda$ et ZN ont été compilés dans le Tableau 15.



	[C] µg/mL d'actif	CMI
LNC 40	120	<
LNC 80	230	<
LNC170	500	<
LNC250	740	>
LNC340	1000	>

Figure 59 Evolution de la mobilité électrophorétique des bactéries avec des différentes concentrations de LNC (inférieurs et supérieures à sa CMI). A droite, l'équivalence de la concentration de NCL en µg/mL d'actif.

	$1/\lambda$ (10^{-9} m)	ZN (10^{23} C/m ³)
LNC40 + <i>E.coli</i>	8,57	-9,20
LNC80 + <i>E.coli</i>	8,28	-7,72
LNC170 + <i>E.coli</i>	7,32	-6,25
LNC250 + <i>E.coli</i>	7,93	-4,23
LNC340 + <i>E.coli</i>	8,49	-2,63

Tableau 15 : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN pour les bactéries avec des différentes concentrations de NCL.

Nous observons dans la Figure 49 une tendance homothétique de la mobilité électrophorétique par rapport à la concentration en NCL. Plus la concentration en NCL est élevée, plus grande sera la mobilité électrophorétique.

Pour ce que concerne les valeurs de ZN et $1/\lambda$, nous observons que même s'il n'y a pas une différence significative ($p=0,59$) pour les valeurs de $1/\lambda$, ce qui voudrait dire que la sonde est également accessible aux contre-ions donc indépendante de la concentration en NCL. Néanmoins, nous observons une variation significative ($p=0,011$) de la charge électro négative (ZN) de la suspension par rapport à la quantité de NCL. Plus la quantité en NCL est élevée, moins la charge est négative. Ce résultat peut être expliqué du fait qu'*E.coli* est plus électro négative que les NCL. Comme dans tous les la quantité des bactéries est la même, moins nous avons des NCL plus on retrouve une charge correspondante à celle des bactéries seules.

c) *Caractérisation de bactéries mortes et des bactéries vivantes*

Les résultats concernant l'évolution de la mobilité électrophorétique des NCL avec des bactéries vivantes et des bactéries mortes est représentée dans la Figure 60, et les valeurs correspondant de $1/\lambda$ et ZN ont été compilées dans le Tableau 16.

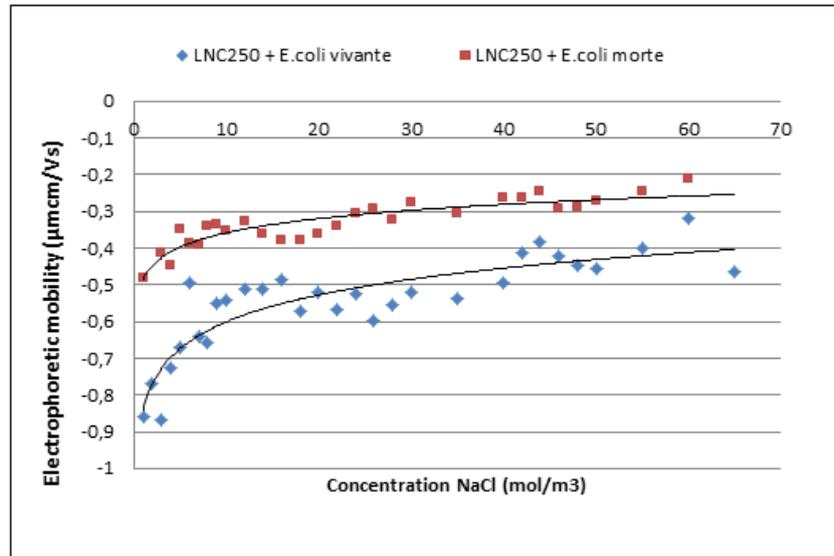


Figure 60 : Evolution de la mobilité électrophorétique des bactéries (mortes et vivantes) avec des NCL

	$1/\lambda$ (10^{-9} m)	ZN (10^{23} C/m ³)
LNC250 + Bactéries vivantes	7,93	-4,23
LNC250 + Bactéries mortes	9,39	-1,89

Tableau 16 : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN pour les bactéries (mortes et vivantes) avec des différentes concentrations de NCL

Les résultats de ZN et $1/\lambda$ pour les bactéries mortes et vivantes recouvertes de NCL sont compilés dans le Tableau 16. Nous observons une différence significative ($p=0,05$) entre les valeurs de ZN et les valeurs de $1/\lambda$ entre les bactéries mortes et les vivantes. On montre une épaisseur de couche accessible plus importante pour les bactéries mortes recouvertes de NCL peut-être en relation avec une modification structurale de la membrane recouverte. De la même façon la charge ZN est moins importante pour ces mêmes bactéries.

d) *Influence de la présence d'actifs dans les NCL*

Les résultats concernant l'évolution de la mobilité électrophorétique des NCL blanches et chargées (AT98a) avec des bactéries (E.coli) est représentée dans la Figure 61, et les valeurs

correspondant de $1/\lambda$ et ZN ont été compilées dans le Tableau 17.

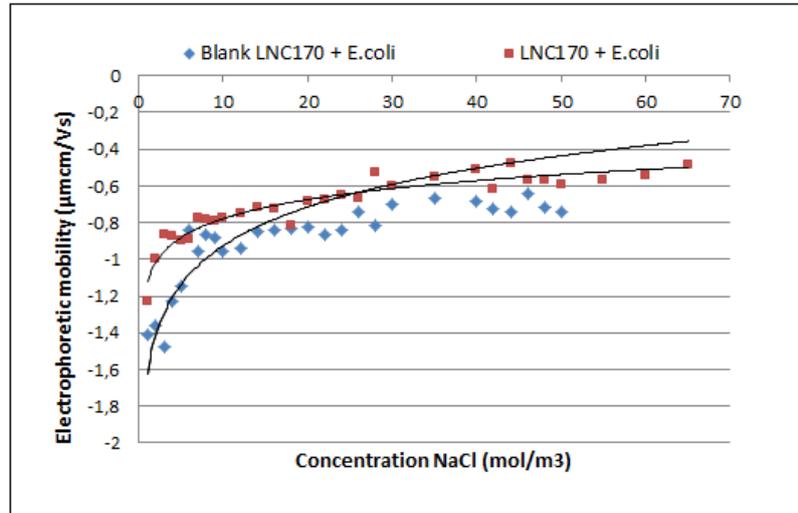


Figure 61 : Comparaison de la mobilité électrophorétique des NCL blanches et des NCL chargées avec des bactéries

	$1/\lambda$ (10^{-9} m)	ZN (10^{23} C/m ³)
NCL blanches + Bactéries	7,25	-8,00
NCL chargées + Bactéries	7,32	-6.25

Tableau 17 : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN des NCL blanches et des NCL chargées avec des bactéries.

En observant la Figure 61 nous retrouvons une ME similaire entre les NCL blanches (Blank LNC170) et les NCL chargées (LNC170). Les résultats montrent un $1/\lambda$ très similaire ce qui voudrait dire que la sonde pénètre à la même profondeur dans les deux cas. Néanmoins, les NCL blanches présentent une charge électrique (ZN) légèrement plus négative que les NCL chargées.

e) Influence de la résistance bactérienne.

Les résultats concernant l'évolution de la mobilité électrophorétique sur des bactéries sensibles (SAN) et résistantes (RCH) au méropénème sont représentés dans la Figure 62, et les valeurs correspondant de $1/\lambda$ et ZN ont été compilées dans le Tableau 18.

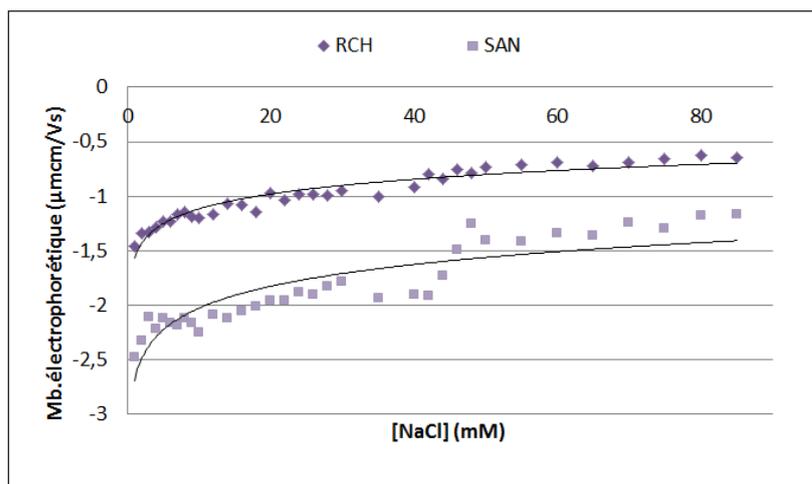


Figure 62 : Comparaison de la mobilité électrophorétique de la bactérie *A.baumannii* SAN et *A.baumannii* RCH.

	$1/\lambda$ (10^{-9} m)	ZN (10^{23} C/m ³)
RCH + NCL	8,48	-6,75
SAN + NCL	9,87	-9,69

Tableau 18 : Détermination des paramètres $1/\lambda$ et ZN *A. baumannii* SAN et *A. baumannii* RCH avec des NCL.

Nous observons qu'*A.baumannii* SAN est plus électronégativement chargée que RCH, mais toutes les deux présentent des $1/\lambda$ similaires.

Nous ne pouvons pas conclure que cette plus faible électronégativité soit une conséquence des mécanismes de résistance présentes dans la souche RCH qui expliquent que le méropénème ne soit pas actif contre cette souche. Mais nous observons que ces deux bactéries présentent des charges électriques différentes.

Angle de contact

Angle de contact avec l'eau

L'angle de contact avec l'eau a été mesuré pour des bactéries en phase exponentielle et en phase stationnaire avec et sans NCL, les résultats ont été compilés dans le Tableau 19 :

	<i>A.baumannii</i>		<i>A.baumannii</i> + NCL	
	Temps	θ avec l'eau	Temps	θ avec l'eau
Phase exponentielle	0h	$40^\circ \pm 3$	0h	$25^\circ \pm 4$
	3h	$45^\circ \pm 4$	3h	$25^\circ \pm 6$
	6h	$50^\circ \pm 2$	6h	$30^\circ \pm 6$
Phase stationnaire	0h	$55^\circ \pm 2$	0h	$40^\circ \pm 5$
	3h	$50^\circ \pm 5$	3h	$45^\circ \pm 3$
	6h	$53^\circ \pm 3$	6h	$35^\circ \pm 2$

Tableau 19 : Détermination de l'angle de contact pour *A.baumannii* et *A.baumannii* avec des NCL en phase exponentielle et en phase stationnaire pendant 0,3 et 6 heures.

Si nous utilisons l'eau comme liquide de mesure de l'angle de contact (θ), nous pouvons déduire le caractère hydrophobe (grand angle et faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle et grande énergie de surface) de la surface à étudier.

$\theta > 90^\circ$: la goutte ne s'étale pas, le support est hydrophobe

$\theta < 30^\circ$: la goutte d'eau s'étale sur le support, le support est hydrophile

$30 < \theta < 90^\circ$: le support est moyennement hydrophobe / hydrophile

Selon les résultats obtenus, nous pouvons observer que l'angle de contact est plus grand en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle (en présence ou non de NCL). Ce que se traduit par une membrane légèrement plus hydrophobe en phase exponentielle.

Les NCL rendent plus hydrophile le film bactérien qu'il soit en phase stationnaire ou en phase exponentielle. On ne démontre pas de modifications significatives de l'angle de contact avec le temps (ici 0, 3 et 6h)

Détermination des paramètres γ_S^+ et γ_S^-

Nous avons déterminé les paramètres γ_S^+ et γ_S^- pour les bactéries seules et avec les NCL en phase exponentielle (pendant 6 heures) et en phase stationnaire (pendant 6 heures). Les résultats obtenus ont été représentés dans les Figures 63 et 64.

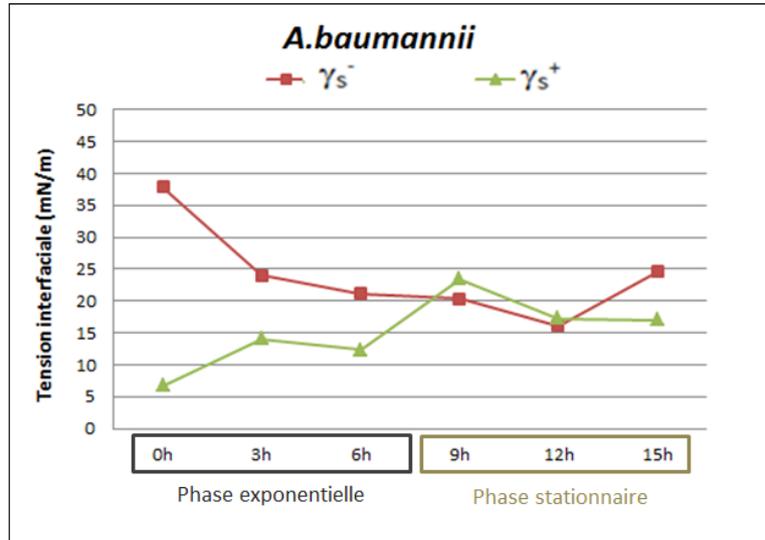


Figure 63 : Graphique montrant l'évolution des paramètres γ^+ et γ^- pour la bactérie *A.baumannii* SAN008, en phase exponentielle et en phase stationnaire.

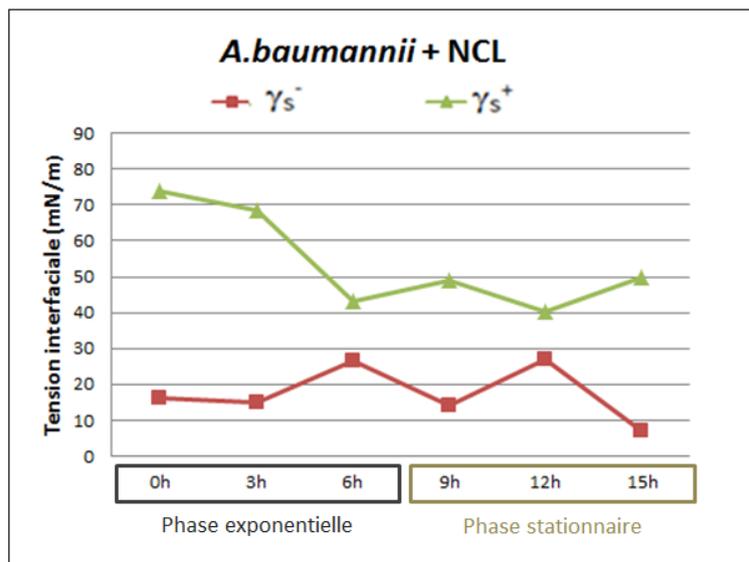


Figure 64: Graphique montrant l'évolution des paramètres γ^+ et γ^- pour la bactérie *A.baumannii* SAN008 avec les NCLs, en phase exponentielle et en phase stationnaire.

Les bases de Lewis sont des espèces avec des électrons non liant qui peuvent être donnés pour former de nouvelles liaisons. Les acides de Lewis peuvent accepter des électrons pour former de nouvelles liaisons. Les acides de Lewis sont connus comme électrophiles grâce à leur capacité à accepter des électrons. Les bases de Lewis sont connues comme nucléophiles puisqu'elles donnent des électrons à un noyau qui possède une orbitale vide. La charge, la

basicité, la polarisabilité et les empêchements stériques ont une influence dans la nucléophilie.

En général, la nucléophilie augmente avec la charge négative, la basicité et la polarisabilité, mais diminue avec l'encombrement stérique. Ainsi, lorsque la bactérie a une forte γ_S^- elle possède beaucoup de caractéristiques électronégatives. Elle pourra réagir plus favorablement avec des molécules chargées positivement. Dans le cas contraire, lorsque la bactérie présente une forte γ_S^+ elle aura une tendance à mieux interagir avec les molécules chargées négativement.

Ces caractéristiques membranaires sont un indicateur des interactions avec le milieu extérieur et dans notre cas, avec les NCL.

Pour *A.baumannii* seule, on remarque une baisse de γ_S^- et une augmentation de γ_S^+ , lorsque la bactérie rentre en phase stationnaire. Ceci est en faveur avec une capacité plus marquée en phase stationnaire pour que la bactérie interagisse avec des molécules extérieures chargées négativement ou ayant de fortes composantes polaires. Ceci est notamment le cas pour les NCL. Néanmoins, en phase stationnaire, les valeurs de γ_S^- et γ_S^+ restent assez similaires (comparés à la phase exponentielle).

Pour la bactérie en présence de NCL, on remarque une très forte composante γ_S^+ très précoce qui diminue après quelques heures. Néanmoins, nous observons un comportement inverse pour γ_S^- et γ_S^+ lorsque les bactéries sont en incubation avec les NCL ce qui pourrait aussi indiquer qu'une grande partie des NCL restent à la surface de la bactérie.

Microscopie confocale

Le traitement des images (le contrôle de l'intensité, la diminution du bruit de fond et le montage des images) sont effectués au sein du service commun SCIAM de l'Université d'Angers.

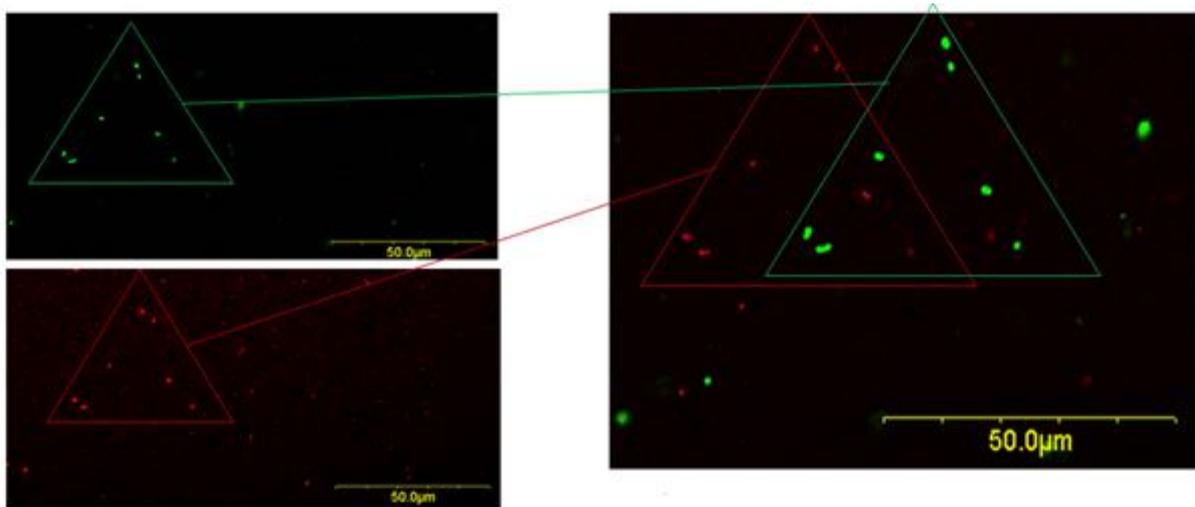


Figure 65 : Images de microscopie confocale sur le même échantillon. A gauche et en haut avec filtre FITC (bactéries marquées). A gauche en bas, avec filtre Nile red (NCL marquées). A droite, image séquentielle avec les deux filtres (Les deux images sont un peu décalées)

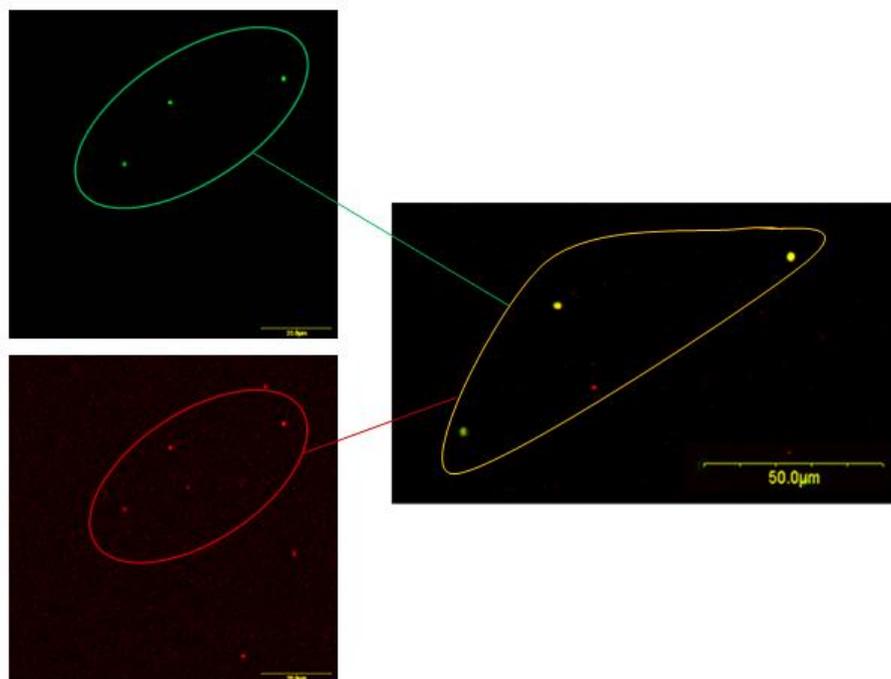


Figure 66: Images de microscopie confocale sur le même échantillon. A gauche et en haut avec filtre FITC (bactéries marquées). A gauche en bas, avec filtre Nile red (NCL marquées). A droite, image séquentielle avec les deux filtres (les deux images se superposent en jaune).

Avec le filtre pour le FITC (Figure 65 en vert), nous ne voyons exclusivement que la fluorescence du FITC, donc des bactéries. La taille et la forme des objets marqués en vert correspondent plus ou moins à celle d'*A.baumannii*. Avec le filtre pour le Nile Red (Figure 65

en rouge) nous ne voyons que la fluorescence du Nile Red, donc des NCL. En observant la forme et surtout l'échelle de taille de ces objets, tout semble indiquer que les NCL recouvrent la surface de la bactérie. Grâce à l'image séquentielle, nous avons superposé les deux images. Néanmoins, comme il est difficile de maintenir l'échantillon strictement à la même place (milieu liquide), les deux images ne sont pas parfaitement superposées, mais restent homothétiques.

La Figure 66 montre une image avec des points en jaune (rouge et vert superposé) qui indique ici que les NCL sont au même endroit que les bactéries, ce qui soutient l'hypothèse que les NCL recouvrent la surface bactérienne.

4.5. CONCLUSIONS

La méthode Ohshima semble indiquer que les nanocapsules se mettent à la surface de la bactérie mais cette méthode reste indirecte. Il est difficile de prouver qu'il existe vraiment un effet filmogène de nanocapsules autour des bactéries. Malheureusement, la microscopie à force atomique (condition sèche et dans l'eau) ne nous a pas permis pas de visualiser cette couche.

La microscopie confocale nous a permis de conforter l'hypothèse établie précédemment, tout autant que la méthode des angles de contact. En effet, cette dernière nous a permis de caractériser non seulement les membranes bactériennes seules mais aussi d'identifier de nouvelles propriétés prouvant des interactions avec les NCL.

En observant l'angle de contact de la surface de la bactérie avec de l'eau nous observons que la membrane dévient plus lipophile en phase stationnaire ($40^\circ > 30^\circ$), néanmoins nous ignorons les raisons de ce changement.

Néanmoins, nous avons pu observer une γ_s^- supérieur en phase exponentielle. Ceci pourrait indiquer que la bactérie à cette étape-là est plus à même d'interagir avec des composants donneurs d'électrons (anions) telles que les composés aromatiques présents dans la formule chimique des composants majoritaires des HE.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1.1 CONCLUSIONS

Tout au long de cette thèse, nous nous sommes posé des questions par rapport aux huiles essentielles, les NCL et les BMR. Le but de cette thèse n'était pas seulement de développer des NCL aux HE avec une activité bactéricide mais aussi d'essayer trouver de réponse à certaines questions :

1. Huiles essentielles = Médecine alternative ?

Les HE ont été pendant très longtemps considérées comme des produits utilisés exclusivement par les naturopathes. L'Aromathérapie (du grec, soigner avec les arômes), est un terme utilisé pour la première fois par René Maurice Gattefossé en 1935. L'aromathérapie est une technique très utilisée pour l'administration des HE, grâce à l'utilisation des diffuseurs comme le montre le Tableau 22.

	Quantité d'HE	Durée de la diffusion
Adulte (>40Kg)	30 gouttes	15 min
Enfant de plus de 6 ans		5 min
Enfant de moins de 6 ans		5 min (en dehors de la présence de l'enfant dans la pièce)

Tableau 22 : Posologie indicative des huiles essentielles susceptibles d'une utilisation en diffusion.

Cette technique est souvent utilisée dans les domaines du bien-être où beaucoup d'allégations prévalent sur les HE sans que celles-ci soient considérées comme des médicaments. Cependant, des avertissements sur l'importance de respecter les posologies sont indiquées sur le packaging de tous les produits à base d'HE. Si certaines plantes, donc dérivent les huiles essentielles, ne sont pas dangereuses, la toxicité aiguë des huiles est un fait souvent démontré. Il faut tenir compte que grâce à leur caractère lipophile, les HE sont très rapidement absorbées par voie pulmonaire, cutanée ou digestives. Raison pour laquelle il faut faire spécialement attention aux doses administrées (Bruneton 2005).

Les HE peuvent se retrouver sur le marché (directive 76/768/CEE) (Duval 2012), dans des cosmétiques, dans des produits alimentaires ou dans certains médicaments. Néanmoins, le monopole de la commercialisation de certaines huiles essentielles appartient exclusivement aux pharmaciens selon l'article L. 4211-1 (Directive 2004/24/CE du Parlement européen et du conseil)(Brunengo-Basso) « *la vente au détail et toute dispensation au public des huiles essentielles dont la liste est fixée par décret ainsi que de leurs dilutions et préparations ne constituant ni des produits cosmétiques, ni des produits à usage ménager, ni des denrées ou boissons alimentaires* ». Les huiles essentielles soumises à ce monopole sont principalement l'huile d'absinthe (*Artemisia absinthium* L, *Artemisia pontica* L.), l'huile d'armoise (*Artemisia vulgaris* L., *Artemisia herba alba* Asso, *Artemisia arborescens* L.), l'huile de sauge (*Salvia officinalis* L.) l'huile de thuya et l'huile de sassafras (*Sassafras albidum* Nees).

Néanmoins, selon la FDA (Food and Drug Administration) « *Si un produit est destiné à un usage thérapeutique, par exemple le traitement ou la prévention d'une maladie ou pour affecter la structure ou la fonction du corps, il est un médicament* ». Le fait qu'un composant d'un parfum ou d'un autre produit commercial provient d'une plante ne le classe pas automatiquement comme un médicament. Cet aspect induit une confusion dans la définition et utilisation des HEs.

Il est important de faire la différence entre « aromathérapie », « phytothérapie » et médicaments qui possèdent des principes actifs dérivés des huiles essentielles. Il ne faut pas oublier qu'une grande partie des médicaments existant aujourd'hui sur le marché pharmaceutique impliquent des molécules actives provenant de certaines plantes (la digoxine, un cardiotonique extrait de la feuille de Digitale laineuse) ou à travers la modification de ces molécules dans le but de diminuer leur toxicité ou potentialiser leur action.

2. Doit-on travailler avec les composants majoritaires des HE ou bien directement avec les HE pures ?

Dans la première thèse financée par Eydo Pharma®, Mme Tram Pham avait réalisé ses études sur un mélange de 3 huiles essentielles. Vu la complexité chimique des mélanges de molécules, nous avons uniquement travaillé avec les composants majoritaires de ces huiles essentielles :

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- Huile de clou de girofle : Eugénol
- Huile d'origan : Carvacrol
- Huile de cannelle : Cinnamaldéhyde

Table 1. Chemical Constituents of the Essential Oils of *O. scabrum* and *O. microphyllum*

compound*	KI	GC area %		compound*	KI	GC area %	
		<i>O. scabrum</i>	<i>O. microphyllum</i>			<i>O. scabrum</i>	<i>O. microphyllum</i>
1 α -thujene	929	0.66	2.25	26 borneol	1166		0.68
2 α -pinene	936	0.31	1.91	27 terpin-4-ol	1178	0.89	24.86
3 camphene	950		1.09	28 α -terpineol	1190	0.23	2.38
4 sabinene	975	0.09	7.70	29 estragol	1195		0.08
5 β -pinene	978	0.09		30 <i>trans</i> -dihydrocarvone	1199	0.11	
6 octen-3-ol	980	0.83	0.26	31 <i>trans</i> -piperitol	1205		0.20
7 3-octanone	988	0.21		32 octanol acetate	1211		0.11
8 myrcene	993	1.10	1.75	33 thymol, methyl ether	1233		0.77
9 3-octanol	996	0.25	0.04	34 carvacrol, methyl ether	1243		0.17
10 β -phellandrene	1005	0.17	0.73	35 linalool acetate	1257		0.25
11 δ -3-carene	1009	0.08	0.05	36 bornyl acetate	1286		1.26
12 α -terpinene	1017	0.79	9.86	37 thymol	1292	4.51	0.17
13 <i>p</i> -cymene	1026	5.41	1.36	38 carvacrol	1300	74.86	
14 β -phellandrene	1030	0.30	2.34	39 neryl acetate	1364		0.05
15 <i>cis</i> -ocimene	1040		0.09	40 geranyl acetate	1383		0.05
16 phenylacetaldehyde	1044		0.06	41 decanol acetate	1408		0.07
17 <i>trans</i> -ocimene	1050		0.09	42 β -caryophyllene	1417	1.32	5.55
18 γ -terpinene	1061	4.66	13.83	43 α -humulene	1451		0.30
19 <i>cis</i> -sabinene hydrate	1069	0.24	0.66	44 bicyclogermacrene	1492	0.32	0.04
20 terpinolene	1089	0.09	3.51	45 β -bisabolene	1508	0.25	
21 linalool	1098	0.25	10.81	46 γ -bisabolene	1535	0.23	
22 octen-3-yl acetate	1111		0.70	47 spathulenol	1575	0.13	
23 <i>p</i> -menth-2-en-1-ol	1119		1.27	48 caryophyllene oxide	1579	0.21	0.29
24 <i>cis</i> -pinene hydrate	1123		0.08				
25 terpin-1-ol	1136		0.94	total		98.59	98.66

Tableau 23: Composition chimique des huiles essentielles d'origan *O.scabrum* et *O.microphyllum* (Aligiannis et al. 2001).

Dans le tableau 23 nous montrons un exemple de la composition chimique de huiles essentielles d'origan de deux espèces différents (*O. scabrum* et *O. microphyllum*), la première avec une grande concentration de carvacrol (74,86%) et l'autre qui n'en présente pas.

Même si certains auteurs assurent qu'une partie de l'efficacité des HE est due aux effets synergiques entre les différentes molécules (certaines dans des quantités infimes) (Burt 2004), nous avons décidé de travailler uniquement avec 3 molécules, facilitant l'encapsulation dans des NCL. La méthode d'encapsulation que nous utilisons est basée sur le fait d'ajouter chaque actif séparément en prenant en compte la modification de la température d'inversion de phase de la formulation.

Une autre contrainte de travailler avec les huiles essentielles pures est l'hétérogénéité des molécules que nous pouvons retrouver non seulement d'une espèce à une autre (Tableau 23) mais aussi d'un lot à un autre. De plus, dans le développement d'un nouveau médicament, il est toujours plus simple de travailler avec un faible nombre de molécules.

Nous ne devons pas oublier le manque de réglementation spécifique aux HE en ce qui concerne leur utilisation dans des médicaments. Aussi, nous nous sommes finalement décidés à ne pas utiliser les huiles pures.

3. Les NCL sont-elles un bon réservoir (vecteur) pour les HE ? et plus précisément, sont-elles une forme pharmaceutique adaptée pour le traitement des pneumopathies infectieuses ?

Selon les résultats obtenus, nous pouvons conclure que nous arrivons à encapsuler tous nos actifs d'intérêt dans les NCL, avec des rendements d'encapsulation très corrects. Nous avons réussi à caractériser la surface des NCL à l'aide de la microscopie électronique à balayage, ce qui montre que nous avons réussi à produire des nano-objets qui de surcroît sont capables de contenir dans leur cœur les actifs que nous voulons encapsuler.

Grâce aux tests *in-vitro*, nous pouvons affirmer que les NCL sont capables non seulement d'encapsuler des actifs mais aussi de permettre une action pharmacologique importante. Ceci est confirmé par les CMI qui se rapprochent des CMI des actifs non encapsulés retrouvés dans la littérature.

Les études physico-chimiques (Ohshima, angle de contact et microscopie confocale) suggèrent que les NCL recouvrent la surface de la bactérie libérant leur contenu, mais nous n'excluons pas l'hypothèse de que certaines puissent aussi pénétrer à l'intérieur de la bactérie.

Les tests *in-vivo* ont montré que le principe actif est capable d'atteindre sa cible après une administration IP pour le traitement d'une pneumopathie aiguë. Ainsi, les NCL arrivent à circuler dans le sang sans se faire phagocyter par les macrophages ou d'autres cellules sanguines. Elles arrivent aux poumons dans des quantités suffisantes pour exercer une action pharmacologique.

Un des principaux résultats de cette thèse correspond à la preuve d'un effet synergique *in-vitro* et *in-vivo* lors de l'association des NCL chargées avec la doxycycline. Ceci est montré pour des concentrations où l'antibiotique seul n'est pas actif.

De plus, le traitement d'une infection localisée aux niveaux des poumons nécessite que le médicament soit capable d'atteindre sa cible. Dans la circulation, le médicament va subir

différents processus résumés dans l'acronyme ADME.

L'ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion) décrit le devenir d'un médicament dès son arrivée à l'organisme jusqu'à son élimination :

Absorption

Dans l'administration IP, le médicament arrive à la circulation sanguine puis atteint le foie par le système porte, où il peut subir une dégradation connue sous le nom de 1^{er} passage hépatique. Ce qui reste de médicament passe à la veine hépatique puis à la veine cave inférieure jusqu'à atteindre le cœur qui le distribue à la circulation générale (Figure 67).

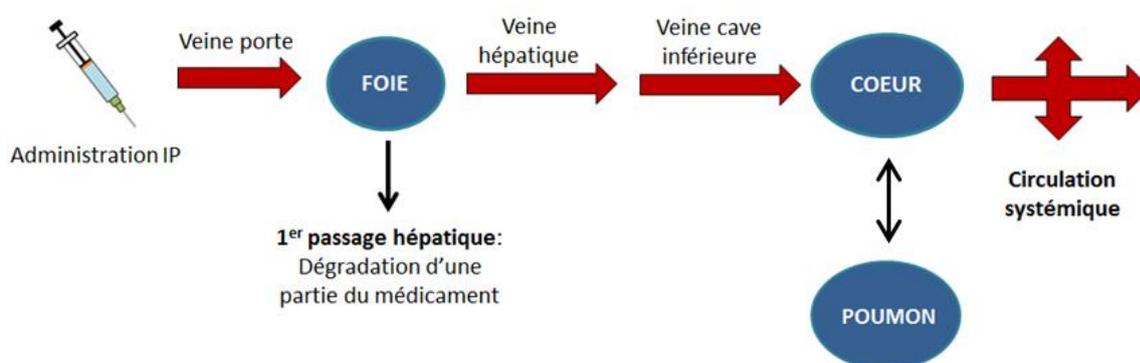


Figure 67 : Devenir de médicament dès qu'il est administré jusqu'à qu'il arrive à la circulation générale.

Distribution :

Une fois dans la circulation générale, il est distribué dans le corps à tous les endroits où il a accès (il s'agit d'un processus réversible). Il existe plusieurs facteurs qui peuvent intervenir dans la distribution :

- Les propriétés physico-chimiques du médicament.
- Sa fixation aux protéines plasmatiques, à l'hémoglobine etc.
- L'affinité du médicament aux tissus.
- Le flux sanguin : les tissus bien irrigués recevront le médicament en premier.
- La perméabilité de la membrane.

Métabolisme :

Le métabolisme transforme le médicament en d'autres composants plus polaires, et par conséquent, plus facilement excrétables.

Excrétion :

L'excrétion est l'élimination du médicament ou de ses métabolites à travers les selles, l'urine le lait maternel ou la bile. Dans l'excrétion biliaire, certains médicaments excrétés par la bile peuvent être réabsorbés. Ce phénomène est connu sous le nom de cycle entéro-hépatique.

En conclusion, l'encapsulation des composants aromatiques des huiles essentielles semble un bon moyen pour une administration IP ou IV. En arrivant à encapsuler, protéger, vectoriser et délivrer nos actifs.

La formulation AT98a a montré un très bon rendement d'encapsulation (proche de 100%), une bonne stabilité, et une efficacité significative *in-vitro* et *in-vivo*. Mais surtout, cette formulation présente une synergie très intéressante avec la Doxycycline.

4. Quel est l'intérêt de l'antibiothérapie combinée ? Est-elle toujours efficace ?

L'intérêt de l'antibiothérapie combinée consiste à élargir le spectre d'action des antibiotiques surtout lorsqu'on ne connaît pas l'espèce bactérienne responsable de l'infection ou lorsque cette infection est produite par plusieurs bactéries. De plus, certains auteurs affirment que l'utilisation d'une antibiothérapie adaptée pourrait aider à diminuer l'apparition des BMR.

L'antibiothérapie combinée est devenu une stratégie de choix pour le traitement de certaines infections graves comme le sepsis (Kumar et al. 2010) (réponse inflammatoire généralisée associée à une infection grave dû à la présence des bactéries dans le sang) (Bryant et al.2006). Néanmoins la communauté médico-scientifique n'est pas toujours d'accord avec cette stratégie (Paul et al. 2006). Certains auteurs considèrent que la stratégie thérapeutique la plus adaptée est de traiter les patients tout au début avec une antibiothérapie combinée jusqu'à avoir la confirmation de l'espèce bactérienne incriminée. Ensuite, une monothérapie ciblée est appliquée en choisissant l'antibiotique le plus actif contre cette bactérie (Carmeli et al. 1999 ; Kollef and Fraser 2001). Dans notre cas, l'antibiothérapie combinée aux HE permet de « re-inventer » certains antibiotiques devenus peu efficaces, voire inefficaces grâce à l'adjonction de molécules indépendantes des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Kempf et al. 2012).

5. L'association antibiotique-HE, est-elle une bonne alternative dans la lutte contre les BMR ?

Un des objectifs de cette thèse était de trouver une association synergique antibiotique/NCL qui permettait d'abord de réduire la dose en NCL puis d'améliorer l'efficacité de certains antibiotiques inactifs. Nous avons trouvé une association qui semble une bonne alternative et qui présente des résultats intéressants dans les premiers tests *in-vivo*. Nous considérons que même si les résultats *in-vivo* ne sont pas concluants à cause du faible nombre de souris que nous avons pu utiliser pour l'étude, nous avons réussi à améliorer l'efficacité de la doxycycline.

6. Quel est l'avenir des HE en milieu hospitalier.

L'usage des HE en milieu hospitalier n'est presque pas développé, même si dans certains hôpitaux, elles sont utilisées dans l'assainissement de l'air ambiant ou dans des systèmes de ventilation pour éviter la propagation des bactéries (Pibiri 2005).

Imaginer qu'un jour les huiles essentielles seront utilisées en tant que médicaments antibactériens en milieu hospitalier semble assez difficile à concevoir du fait de l'absence de législation claire sur l'utilisation des HE. Néanmoins, l'usage de certains composants aromatiques semble une alternative beaucoup plus plausible. Cette thèse s'inscrit dans cette démarche.

La recherche de médicaments à base de composants aromatiques commence à se développer. Pourtant, le nombre d'industries pharmaceutiques qui se consacrent au développement de ces composants reste encore très faible.

Eydo Pharma travaille depuis 2007 dans le développement et l'étude des huiles essentielles à propriétés antibactériennes. L'efficacité de ces HE a été démontrée par de nombreux chercheurs. Pourtant, ces molécules n'ont pas encore trouvé leur place dans l'industrie pharmaceutique.

Dans cette thèse, nous ne cherchions pas à substituer des antibiotiques par d'autres substances. Nous sommes partis de l'hypothèse que l'usage combiné des antibiotiques avec des substances adjuvantes (comme les HE), est une force dans la lutte contre les résistances

aux antibiotiques. Avec les associations, nous espérons ralentir l'apparition de résistance et rendre des antibiotiques devenus inactifs, à nouveau efficaces.

7. Les interactions entre les NCL et les bactéries.

Dans cette thèse nous avons voulu étudier comment les NCL interagissaient avec les bactéries, comme nous l'avons montré dans le Chapitre 4. Pour cela, nous nous sommes servi de différentes méthodes physico-chimiques car il est difficile de montrer directement l'association bactérie-NCL vu la taille nanométrique de ces dernières. Nous avons obtenu un faisceau de résultats prouvant que les NCL recouvrent la surface de la bactérie (même s'il y a sûrement, une quantité de NCL qui traverse la bactérie) et libèrent leur principe actif. Les actifs ainsi libérés traverseraient la membrane de la bactérie. Grâce à la méthode Ohshima nous avons observé que la couche accessible aux contre-ions, lorsque les bactéries sont en contact avec les NCL, reste aux niveaux des NCL. Ce qui pourrait indiquer que les NCL recouvrent la bactérie. Néanmoins, même si les résultats d'angle de contact confirment cette hypothèse nous retrouvons quand même une diminution de γ_s^+ dans les premières 3 heures pourrait indiquer qu'une partie des NCL arrivent à traverser la membrane bactérienne ou retournent à l'extérieur de la bactérie.

Les résultats de microscopie confocale renforcent cette théorie en localisant les NCL aux mêmes endroits que ceux où les bactéries sont présentes.

1.2 PERSPECTIVES

Les résultats que nous avons obtenus grâce à cette thèse ouvrent un grand nombre de perspectives et donc de futurs développements.

Une investigation *in-vivo* avec un plus grand nombre de souris permettrait non seulement d'obtenir des résultats significatifs sur l'efficacité de l'association. Nous pourrions tester des NCL modifiées après post-insertion de PEG de différentes longueurs afin de modifier le temps de circulation de la NCL dans le sang.

D'autres techniques physico-chimiques pourraient être utilisées afin de mieux comprendre les interactions qui se produisent entre les NCL et les bactéries : tensiomètre à goutte sur un modèle validé de membrane bactérienne, adhésion microbienne au solvant, étude de résonance par plasmons de surface (technique Biacore), etc...

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Il sera important d'optimiser l'administration de l'antibiotique et des NCL : administration simultanée, administration séquentielle, etc. Mais principalement, nous devons préciser les mécanismes d'action biologiques impliqués lors des effets synergiques.

Une étude de pharmacocinétique et pharmacodynamique sera obligatoire dans la poursuite du développement de cette stratégie d'associations

Finalement, nous devons montrer si les effets synergiques démontrés ici pour la Doxycycline sont transposables à d'autres antibiotiques de la même famille (tétracyclines) ou d'autres familles et tester d'autres antibiotiques devenus inefficaces contre certaines bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

Aberkane, L. 2010. Etude des mécanismes de structuration d'assemblages β -lactoglobuline-gomme d'Acacia en présence d'un flavonoïde, la quercétine. Procédés Biotechnologiques et alimentaires, Université de Nancy.

Abraham, E. P., Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146(3713), 837.

Absolom, D.R., Lamberti, F.V., Policova, Z., Zingg, W., Van Oss, C.J., Neumann, A.W. 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. 46:1, 90-97.

Aiyegoro, O.A., Afolayan, A.J., Okoh, A.I. 2010. Interactions of antibiotics and extracts of *Helichrysum pedunculatum* against bacteria implicated in wound infections. *Folia microbiology*. 55:2, 176-180.

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. 2001. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49:9, 4168-4170.

Allard, E. 2008. Apport des nanocapsules lipidiques dans le traitement local des gliomes malins: Application à l'encapsulation de complexes lipophiles métalliques. *Pharmaceutical sciences*. Université d'Angers.

Anton, N., Benoit, J.P., Saulnier, P. 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *Journal of Controlled Release*. 128, 185-199.

Ambroggio L, Taylor Ja, Tabb LP, Newschaffer CJ, Evans Aa, Shah SS. 2012. Comparative effectiveness of empiric β -lactam monotherapy and β -lactam-macrolide combination therapy in children hospitalized with community-acquired pneumonia. *The Journal of pediatrics*. 161(6), 1097–1103.

Angmor, J. E., Dicks, D. M., Evans, W. C., Santra, D. K., 1972. *Planta Med*. 21, 416.

Aspa J, Rajas O, Rodríguez de Castro F, Blanquer J, Zalacaín J, Fenoll A. 2004. Drug-resistant pneumococcal pneumonia: clinical relevance and related factors. *Clin Infect dis*. 38:787-98.

Archambaud, M. 2009. Antibiotiques: Mode d'action et mécanismes de résistance. Laboratoire bactériologie-Hygiène. CHU Rangueil, Toulouse.

BIBLIOGRAPHIE

- Aronoff, S. C., M. R. Jacobs, S. Johanning, and S. Yamabe. 1984. Comparative activities of the 13-lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26, 580-582.
- Atman R, Harris R. 1991. Bacteriemia. En: Conn's current therapy. Philadelphia: WB Saunders. 43-7.
- Badei, A. Z., EL-AKEL, A., Faheid, S. M., Mahmoud, B. S. 2002. Application of some spices in flavoring and preservation of cookies: 1-antioxidant properties of cardamom, cinnamon and clove. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 98:5, 176-183.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils— a review. *Food and chemical toxicology*, 46:2, 446-475.
- Balls, M., Straughan, D.W. 1996. The three Rs of Russell & Burch and the testing of biological products. *Developments in biological standardization*. 86, 11-8.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13:1, 238-IN27.
- Bébéar, C. and Robertson, J.A. 1992. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. *Diagnostic Procedures. Volume II.* Tully and Razin. Academic Press Limited, London.
- Benoit, J.P., Briançon, S., Fattal, E., Fessi, H., Legrand, P., Passirani, C. 2007. Sphéroïdes et formes vectorisées. *Pharmacie galénique : Formulation et technologie pharmaceutique.* Wehrlé P. Maloine, Paris. 238-239
- Bergogne-Berezin E. 1995. The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp. : the need for control and new agents. *J Hosp Infect.* 30, 441-52.
- Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML, Vieu JF. 1987. Epidemiology of nosocomial infections due to *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Hosp Infect.* 10:105-13.
- Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML, Towner KJ. 1996. In *Acinetobacter: Microbiology, epidemiology, infections, management.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida 1996.
- Beristain, C. I., Garcia, H. S., Vernon-Carter, E. J. 2001. Spray-dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *LWT-Food Science and Technology*, 34:6, 398-401.
- Bonner, A. B., Monroe, K. W., Talley, L. I., Klasner, A. E., Kimberlin, D. W. 2003. Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the

BIBLIOGRAPHIE

pediatric emergency department: results of a randomized, prospective, controlled trial. *Pediatrics*, 112:2, 363-367.

Bos, R., Van der Mei, H.C., Busscher, H.J. 1998. 'Soft-particle' analysis of the electrophoretic mobility of a fibrillated and non-fibrillated oral streptococcal strain: *Streptococcus salivarius*. *Biophysical Chemistry*. 74:3, 251-255.

Bou G, Martinez-Beltran J. 2000. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44, 428-32

Bouvet PJ, Joly-Guillou ML. *Acinetobacter*. In ESKA (ed) *Précis de bactériologie clinique* 2000:1239-56.

Bouvet PJM, Grimont PAD. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol*. 36, 228-40.

Brown BR, Iannini P, Gross P, Kunkel M. 2003. Impact of initial choice on clinical outcomes in community acquired pneumonia. *Chest*. 123, 1503-11.

Brown AG, Butterworth D, Cole M, 1976. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot*; 29: 668–669

Brunengo-Basso, S. Quel cadre juridique pour les huiles essentielles ?. *Arthéo Avocats*. Université Paul Cézanne.

Bruneton, J. 2005. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Chapitre Huiles essentielles. Lavoisier (Paris). 484-574.

Buchanan, R., 1918. Life phases in a bacterial culture. *Journal of Infectious Diseases* 23, 109_125.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94:3, 223-253.

Bush, K., Macalintal, C., Rasmussen, B. A., Lee, V. J., Yang, Y. 1993. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37:4, 851-858.

BIBLIOGRAPHIE

Busscher, H.J., Van Pelt, A.W.J., De Boer, P., De Jong, H.P., Arends, J. 1984. The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids and Surfaces*. 9:4, 319-331.

Bryant, H., Nguyen, B., Rivers, E.P., Abrahamian, F.M., Moran, G.J., Abraham, E., Trzeciak, S., Huang, D.T., Osborn, T., Stevens, D., Talan, D.A. 2006. Severe Sepsis and Septic Shock: Review of the Literature and Emergency Department Management Guidelines. *Annals of emergency medicine*. 48:1, 28-54.

Bryskier, A., 2005. Vancomycine, Teicloplanine, in: Domart Y., Veyssier, P. (Eds.), *Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals*. American society for microbiology, Washington, pp 930-945.

Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Masi, I., Audino, S., Sisi, B., de Martino, M. 2004. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center. *Journal of Cystic Fibrosis*, 3:3, 159-163.

Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. and Darst, S.A. 2001. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*, Vol. 104, 901–912.

Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 43, 1379-82.

Carlin, F.; Gontard, M.; Reich, M.; Nguten-The, C. 2001. Utilization of zein coating and sorbic acid to reduce *Listeria monocytogenes* growth on cooked sweet corn. *J. Food Sci*. 66, 1385-1386.

Carson C. F., Hammer K.A., Riley TV. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical microbiology reviews* , 19(1), 50-62

Chandraprabha, M.N., Modak, J.M., Natarajan, K.A. 2007. Effect of LPS removal on electrophoretic softness of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells. *Advanced Materials Research*. 20:21, 341-344.

Chen LF, Chopra T, Kaye K. 2009. Pathogens resistant to antibacterial agents. *Infect Dis Clin N Am*. 23, 817–45.

BIBLIOGRAPHIE

Chen H., Davidson, P.M., Zhong, Q., 2014. Impacts of sample preparation methods on solubility and antibacterial characteristics of essential oil components in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:3, 907-916.

Chopra, I., Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65:2, 232-260.

Cohen, R. 2006. Approaches to reduce antibiotic resistance in the community. *The Pediatric infectious disease journal*, 25:10, 977-980.

Condrea, E., Mammon, Z., Aloof, S., De Vries, A. 1964. Susceptibility of erythrocytes of various animal species to the hemolytic and phospholipid splitting action of snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects*. 84:4, 365-375.

Courvalin, P. 2007. La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull. Acad. Vét.* 161:1, 7-11.

Dagan, R., Sikuler-Cohen, M., Zamir, O., Janco, J., Givon-Lavi, N., Fraser, D. 2001. Effect of a conjugate pneumococcal vaccine on the occurrence of respiratory infections and antibiotic use in day-care center attendees. *The Pediatric infectious disease journal*, 20:10, 951-958.

Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and molecular reviews*. 74:3, 417-433.

Dax, S. L.1997. *Antibacterial chemotherapeutic agents*. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom

De Mouy D, Cavallo ID, Fabre R, GarraM E, Armengaud A et les membres de l'AFORCOPIBIO. 1996. Les entérobactéries isolées d'infections urinaires en pratique de ville : Etude AFORCOPIBIO. Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. 398-422

Decré, D. 2012. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques: Un modèle d'adaptation. *Revue Francophone des Laboratoires*, 441, 43-52.

Degryse, A.C. , Delpla, I., Voinier, M.A. 2008. Atelier santé environnement. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ecole des hautes études en santé publique (EHESP).

BIBLIOGRAPHIE

Descheemaeker, P., Chapelle, S., Lammens, C., Hauchecorne, M., Wijdooghe, M., Vandamme, P., Goossens, H. 2000. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 45:2, 167-173.

Di Giambattista, M., Cocito, C. 1989. Le ribosome bactérien: structure et fonctions.

Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M. 1994. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 69:1, 25-28.

Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44:9, 1908-1914.

Dougherty, E.C., Allen, M.B., 1958. The words "protest" and "Protista". *Kurze Mitteilungen Disputanda*. 14, 78-78.

Drault, J. N., Herbland, A., Kaidomar, S., Mehdaoui, H., Olive, C., Jouanelle, J. 2001. Pneumopathie communautaire à *Acinetobacter baumannii*. In *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. 20:9, 795-798. Elsevier Masson.

Duarte A, Ferreira S, Silva F, Domingues F.C. 2012. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*. 19(3-4): 236-8.

Ducel, V., Saulnier, P., Richard, J., Boury, F. 2005. Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: application of soft particle analysis and light scattering measurements. *Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: application of soft particle analysis and light scattering measurements. Colloids and Surface B: Biointerfaces*. 41, 95-102.

Duval, L. 2012. Les huiles essentielles à l'officine. *Pharmaceutical sciences*. Université de Rouen.

Duval, J.F.L., Busscher, H.J., Van de Belt-Gritter, B., Van der Mei, H.C., Norde, W. 2005. Analysis of the Interfacial Properties of Fibrillated and Nonfibrillated Oral Streptococcal Strains from Electrophoretic Mobility and Titration Measurements: Evidence for the Shortcomings of the 'Classical Soft-Particle Approach'. *Langmuir*. 21, 11268-11282.

Eveillard, M., Soltner, C., Kempf, M., Saint-André, J.P., Lemarié, C., Randrianarivelo, C., Seifert, H., Wolff, M., Joly-Guillou, M.L. 2010. The virulence variability of different *Acinetobacter baumannii* strains in experimental pneumonia. *Journal of infection*. 60, 154-161.

BIBLIOGRAPHIE

Falagas, M.E., Rafailidis, P.I., Kasiakou, S.K., Hatzopoulou, P. and Michalopoulos, A. 2006. Effectiveness and nephrotoxicity of colistin monotherapy vs. colistin–meropenem combination therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Microbiol Infect.* 12, 1227–1230.

Fass RJ, Helsel VL. In vitro antistaphylococcal activity of pefloxacin alone and in combination with other antistaphylococcal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1457–60.

Faye, O., Poli, F., Gabison, G., Pouget, F., Wolkenstein, P., Revuz, J. 2005. C106-Association rifampicine/clindamycine dans l'hidradénite suppurée. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 132, 68-69

Filisetti D. and Monassier, L. 2012. Les antipaludéens : Paludisme, argumenter l'attitude thérapeutique et planifier le suivi du patient. Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Clinique DCEM3.

Fish, D.N. Singletary, T.J. 2012. Meropenem, a New Carbapenem Antibiotic. *Pharmacotherapy*. 17:4, 644-669.

Fleming, A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology*.

Galdiero S., Falaga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Della Pepa, M.E., D'Orlando, V., Galdiero, M. 2012. Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. *Current Protein and Peptide Science*. 13, 843-854.

Gallucci, N., Casero, C., Oliva, M., Zygodlo, J., Demo M., 2006. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Mol. Med. Chem.* 10, 30-32

Gannon, J.T., Manlilal, V.B., Alexander, M. 1991. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 190.

Garatti, G., Petz, L.D. 1975. Drug induced immune hemolytic anemia. *The American journal of medicine*. 58, 398-407.

Gaysinsky, S., Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. 2007. Anti-microbial efficacy of eugenol microemulsions in milk against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Protection*. 70 (11), 2631-2637.

BIBLIOGRAPHIE

Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., Weiss, J. 2005. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. *Journal of Food Protection*[®], 68:12, 2559-2566.

Gest, H., 2004. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society

Glew RH, Moellering RC Jr, Kunz LJ. 1977. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*): clinical and laboratory studies. *Medicine (Baltimore)* 56, 79-97.

Grange, J. D., Amiot, X., Grange, V., Gutmann, L., Biour, M., Bodin, F., Poupon, R. 1990. Amoxicillin-clavulanic acid therapy of spontaneous bacterial peritonitis: A prospective study of twenty-seven cases in cirrhotic patients. *Hepatology*, 11:3, 360-364.

Gill, A. O., Holley, R. A. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and environmental microbiology*, 70:10, 5750-5755.

Gill, A. O., Holley, R. A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 108:1, 1-9.

Godreuil, S., Torrea, G., Terru, D., Chevenet, F., Diagbouga, S., Supply, P., Banuls, A. L. 2007. First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Burkina Faso. *Journal of clinical microbiology*, 45 :3, 921-927.

Goldstein FW and the multicenter study group. 1997. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections in the community: results of a multicenter study. *Reunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse* 387IP24

Grumbach, F. 1975. La durée optimale de l'antibiothérapie par l'association isoniazide 1 rifampicine dans la tuberculose expérimentale de la souris. Etude de la phase post-thérapeutique. Epreuve de la cortisone. *Rev Fr Mal Respir*, 3, 625-634.

Gu, H., Ho, P.L., Tsang, K.W.T., Wang L. and Xu, B. 2003. Using Biofunctional Magnetic Nanoparticles to Capture Vancomycin-Resistant Enterococci and Other Gram-Positive Bacteria at Ultralow Concentration. *American Chemical Society*. 125, 15702-15703

Guillot, M., Eckart, P., Desrosières, H., Brouard, J. 2000. Macrolides et infection à *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives de pédiatrie*, 7, S523-S530.

BIBLIOGRAPHIE

Guinoiseau, E., Lorenzi, V., Luciani, A., Tomi, F., Casanova, J., Liliane, B. 2011. susceptibility of the multi-drug resistant strain of *Enterobacter aerogenes* EA 289 to the terpene alcohols from *cistus ladaniferus* essential oil. *Natural Product Communications*, 6, 1-4.

Hamadi, F., Latrache, H. 2008. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor–electron acceptor (acid–base) properties of bacterial surface. 65:1, 134-139.

Hamouche, E., & Sarkis, D. K. 2012. Évolution de la sensibilité aux antibiotiques de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009. *Pathologie Biologie*, 60:3, 15-20.

Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., Steitz, T. A. 2002. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Molecular cell*, 10:1, 117-128.

Hartmann, G., Honikel, K.O., Knusel, F., and Nuesch, J. 1967. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim. Biophys. Acta* 145, 843–844.

Helander, I. K.; Alakomi, H. L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; 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, A.K., Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 16, 997–1005

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Richard, J., Benoit, J.P. 2000. Nanocapsules lipidiques, procédé de préparation et utilisation comme médicament, Patent No. 0002688000.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust J.E., Benoit, J.P. 2002. A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. *Pharmaceutical Research* 19:6, 875-880.

Hugonnet, J.E., Tremblay, L.W., Boshoff, H.I., Barry 3rd, C.E., Blanchard, J.S. 2009. Meropenem-Clavulanate Is Effective Against Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Scienc.* 5918, 1215-1218.

Hugonnet, J.E. 2009. Une thérapie prometteuse contre les souches ultrarésistantes de *M. tuberculosis*. *Medicine/science.* 25, 661-80.

BIBLIOGRAPHIE

Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., Dufosse, L. 1998. Antimicrobial properties of essential oils and flavour compounds. Sciences des Aliments (France).

Hureaux, J., Lagarce, F., Gagnadoux, F., Vecellio, L., Clavreul, A., Roger, E., Kempf, M., Racineux, J-L., Diot, P., Benoit, J.P., Urban, T. 2009. Lipid nanocapsules: Ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 73 :2, 239-246.

Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P. 2009. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. International Journal of Pharmaceutics 379; 201–209.

Joly-Guillou, M.L., Wolff, M., Pocardalo, J.J., Walker, F., Carbon, C. 1997. Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the postantibiotic effect of imipenem. Antimicrobial agents and chemotherapy. 41:2, 345-351.

Joly-Guillou, M.L., Wolff, M., Farinotti, R., Bryskier, A., Carbon, C. 2000. *In vivo* activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. 46:5, 827-830.

Jouda, M.M. 2013. The antibacterial effect of some medicinal plant extracts and their synergistic effect with antibiotic and non-antibiotic drugs. Islamic University-Gaza.

Ju, O., Woolley, M., Gordon, D. 2005. Emergence and spread of rifampicin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during vancomycin–rifampicin combination therapy in an intensive care unit. European Journal of Clinical microbiology and infectious diseases. 25:1, 61-62.

Kalemba, D., Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current medicinal chemistry, 10:10, 813-829.

Kalra, B. S., Aggarwal, S., Khurana, N., Gupta, U. 2007. Effect of cimetidine on hepatotoxicity induced by isoniazid-rifampicin combination in rabbits. Indian Journal of Gastroenterology, 26:1, 18.

BIBLIOGRAPHIE

Kell, A.J., Stewart, G., Ryan, S., Peytavi, R., Boissinot, M., Huletsky, A., Bergeron, M.G., Simard, B. 2008. Vancomycin-Modified Nanoparticles for Efficient Targeting and Preconcentration of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *American Chemical Society*. 2:9, 1777-1788.

Kempf, M., Rolain, J. M. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International journal of antimicrobial agents*, 39 :2, 105-114.

Kiers, P.J.M., Bos, R., Van der Mei, H.C., Busscher, H.J. 2001. The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar. *Microbiology Society*. 147, 757-762.

Kiffer C.R.V., Sampaio J.L.M., Sinto, S., Oplustil, C.P., Koga P.C.M., Arruda A.C., Turner, P.J., Mendes C. 2005. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.52, 317–322.

Kim, H.N., Hong, Y., Lee, I., Bradford, S.A., Walker, S.L., 2009. Surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli* O157:H7: Role of extracellular macromolecules. *Biomacromolecules*, 10, 2556-2564.

Kimura, K., Takashima, S., Ohshima, H.2002. Molecular approach to the surface potential estimate of thiolate-modified gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*,106, 7260-7266.

Ko, W.C., Lee H.C., Chiang, S.R., Yan, J.J., Wu, J.J., Lu C.L., Chuang Y.C., 2004. *In vitro* and *in vivo* activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53, 393–395.

Kollef, M.H., Fraser, V.J..2001. Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med* . 134, 298-314.

Kumar, A., Zarychanski, R., Light, B., Parrillo, J., Maki, D., Simon, D., Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock (CATSS) Database Research Group. 2010. Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: A propensity-matched analysis*. *Critical care medicine*, 38(9), 1773-1785.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91:3, 453-462.

BIBLIOGRAPHIE

Lavigne, J.P. 2007. Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. Faculté de médecine Montpellier-Nîmes.

Leelapornpisid, P., Chansakaow, S., Boonlong, N.A., SUVISA, Jantrawut, P. 2014. Developmet of cream containing nanostructured lipid carriers loaded marigold (*Tagetes erecta* linn) flowers extract for anti-wrinkles application. *International Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 6:5, 309-313.

Leiro-Fernandez, V., Fernandez-Villar, A., Represas-Represas, C., Botana-Rial, M., Piñeiro-Amigo, L. 2007. Indicaciones de la antibioterapia combinada en la neumonía comunitaria que precisa ingreso. *Pneuma*, 9, 29-33.

Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S., Aromdee, C., Khunkitti, W. 2006. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. *International Journal of Aromatherapy*, 16:1, 43-49.

Levy, S. B., McMurry, L. 1978. Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline.

Levy, S. B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36:4, 695.

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

Lewis, K., Ausubel, F. M. 2006. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology*, 24:12, 1504-1507.

Adam, K. P., Zapp, J. 1998. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry*, 48:6, 953-959.

Leyenaar J.K., Shieh M.S., Lagu, T, Pekow, P.S., Lindenauer, P.K. 2014. Comparative Effectiveness of Ceftriaxone in Combination with a Macrolide Compared with Ceftriaxone Alone for Pediatric Patients Hospitalized with Community Acquired Pneumonia. *Pediatr Infect Dis J.* 33(4), 387–392.

Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F., & Huang, Q. 2012. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60:30, 7548-7555.

BIBLIOGRAPHIE

Lodise, T.P., Kwa, A., Cosler, L., Gupta, R. and Smith, R.P. 2007. Comparison of β -Lactam and Macrolide Combination Therapy versus Fluoroquinolone Monotherapy in Hospitalized Veterans Affairs Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51:11, 3977-3982.

López-Viota J., Mandal, S., Delgado, A.V., Toca-Herrera, J.L., Möller, M., Zanuttin, F., Balestrino, M., Krol, S. 2009. Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine. *Journal of Colloid and Interface Science*. 332, 215-223.

Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., Brasseur, R. 2004. Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 8:3, 163-176.

Lozniewski, A., Rabaud, C. 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Disponible en ligne sur: http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/Doc_Reco/guides/FCPRI/IAS/IAS_ResistanceAntibiotiques.pdf*.

Magnet S, Courvalin P, Lambert T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* .45, 557-62.

Martin-Loeches, I., Lisboa, T., Rodriguez, A., Putensen, C., Annane, D., Garnacho-Montero, J., Restrepo, M.I. and Rello, J. 2010. Combination antibiotic therapy with macrolides improves survival in intubated patients with community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med*. 36:612–620.

Martinez, A. 2001. Aceites esenciales. Facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia (Medellin).

Masliyah, J.H., Bhattacharjee, S. 2006. *Electrokinetic and colloid transport phenomena*, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey

Marques, H. M. C. 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25:5, 313-326.

McDonald, L. C., Kuehnert, M. J., Tenover, F. C., Jarvis, W. R. 1997. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerging infectious diseases*, 3:3, 311.

McGarvey, D. J., Croteau, R. 1995. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7:7, 1015.

BIBLIOGRAPHIE

Members of the SFM Antibiogram Committee, 2003. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Report 2003. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 21 :4, 364-391.

Mendonça, C.O. Griffiths, C.E.M. 2006. Clindamycin and rifampicin combination therapy for hidradenitis suppurativa. *British journal of dermatology*. 154:5, 977-978.

Mesaros, N., Glupczynski, Y., Avrain, L., Caceres, N. E., Tulkens, P. M., Van Bambeke, F. 2007. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59:3, 378-386.

Meyer, E. 1992. Atomic force microscopy. *Progress in Surface Science*. Vol 41, 3-49.

Miller, M.B., Bassler, B.L. 2001. Quorum Sensing in bacteria. *Annual review of microbiology*. 55, 165-199.

Mitscher, L. A. 1978. The chemistry of the tetracycline antibiotics. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y

Moleyar, V., Narasimham, P. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, 16 :4, 337-342.

Montagu, A., Saulnier, P, Rossines, E., Joly-Guillou, M.L. 2014. Prevention of bacterial infections using encapsulated phytophenolic actives. *Journal of nanopharmaceutics and drug delivery*. 2:1. 1-16.

Morille, M., Montier, T., Legras, P., Carmoy, N., Brodin, P., Pitard, B., Passirani, C. 2010. Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials*, 31:2, 321-329.

Morisaki, H., Nagai, S., Ohshima, H., Ikemoto, E., Kogure K. 1999. The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology Society*. 145, 2797-2802.

Mulvey MR, Simor AE. 2009. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *Can Med Ass J*.180 (4).

Nemec A, Dolzani L, Brisse S, et al. 2004. Diversity of aminoglycoside resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol*. 53, 1233-40.

Neilands, J. B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270:45, 26723-26726.

BIBLIOGRAPHIE

Neuzil, K. M., Mellen, B. G., Wright, P. F., Mitchel Jr, E. F., Griffin, M. R. 2000. The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *New England Journal of Medicine*, 342:4, 225-231.

Nguyen Van JC, Collet L, Chardon H, Jarlier V, Poyart-Salmeron C, Sirot D. 1994. Etude de la sensibilité à l'Augmentin de 998 souches d'Escherichia coli isolées en 1992 dans quatre centres hospitaliers français (étude Colicerib I). *Méd Mal Infect.* 24 : 765-73

Niu, C., Afre, S., Gilbert, E. S. 2006. Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Letters in applied microbiology*, 43:5, 489-494.

Ohshima, H., Kondo, T. 1987. Electrostatic repulsion of ion penetrable charged membranes: Role of Donnan potential. *Journal of Theoretical biology.* 128:2, 187-194.

Ohshima, H. 1995. Electrophoresis of soft particles. *Advances in Colloid and Interface Science.* 62:2-3, 189-235.

Ohshima, H., 1995. Electrophoretic mobility of soft particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 103, 249-255.

Ohshima, H., 1998. *Electrical Phenomena at Interfaces*, second ed., Marcel Dekker, New York.

Ohshima, H. 2008. Electrostatic interaction between soft particles. *Journal of Colloid and Interface Science.* 328 :1, 3-9.

Papadopoulos, C.J., Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., 2006. Susceptibility of pseudomonads to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and components. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 58, 449–451

Parris, N., Cooke, P. H., Hicks, K. B. 2005. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53:12, 4788-4792.

Paul, M., Silbiger, I., Grozinsky, S., Soares-Weiser, K., Leibovici, L. 2006. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*, 1.

Payen, M.C., De Wit, S., Martin, C., Sergysels, R., Muylle, I., Van Laethem, Y., Clumeck, N., 2012. Clinical use of the meropenem-clavulanate combination for extensively drug-resistant tuberculosis. *International journal tuberc lung dis.* 16:4, 558-560.

BIBLIOGRAPHIE

- Perrier, T. 2009. Modifications de nanocapsules lipidiques par des procédés post-formulation. Elaboration de vecteurs multifonctionnels de médicaments. Nanosciences. Université d'Angers.
- Perrier, T., Saulnier, P., Fouchet, F., Lautram, N., Benoît, J. P. 2010. Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms. *International journal of pharmaceutics*, 396:1, 204-209.
- Petrosillo, N., Ioannidou, E., Falagas, M.E. 2008. Colistin monotherapy vs combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. *Clin Microbiol Infect.* 14, 816–27.
- Phenrat T, Saleh N, Sirk K, Tilton RD, Lowry GV. 2007. Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. *Environ Sci Technol* 41(1):284–290
- Pibiri M.C. 2005. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, thèse de doctorat, EPFL, Lausanne, Suisse
- Porse, B.T., Garrett, R.A. 1999. Sites of interaction of streptogramin A and B antibiotics in the peptidyl transferase loop of 23 S rRNA and the synergism of their inhibitory mechanisms. *Journal of molecular biology.* 286:2, 375-387
- Parris, N., Cooke, P. H., Hicks, K. B. 2005. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53:12, 4788-4792.
- Rabarijaona, L., Boisier, P., Ratsirahonana, O., Razafinimanana, J., Rakotomanana, F., Ratsitorahina, M., Aurégan, G. 1999. Replacement of streptomycin by ethambutol in the intensive phase of tuberculosis treatment: no effect on compliance. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3:1, 42-46.
- Rabeau, S. 2009. Etude d'un procédé continu de microencapsulation basé sur un micromélangeur. Université de Nancy.
- Rami, M.L. 2012. Etude de la stabilité de dispersions colloïdales de zircone yttrée pour la fabrication de céramiques à grains fins. Génie des procédés et de l'environnement. Université de Toulouse.
- Reynolds, P.E. 1989. Structure, Biochemistry and Mechanism of Action of Glycopeptide Antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8.11, 943-950.

- Roder BL, Gutschik E. In-vitro activity of ciprofloxacin combined with either fusidic acid or rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1989;23:347–52.
- Rodriguez-Avial, I., Pena, I., Picazo, J.J., Rodriguez-Avial, C., Culebras, E. 2015. In vitro activity Of the next-generation aminoglycoside plazomicin alone and in combination with colistin, meropenem, fosfomycin or tigecycline against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*. (Article in press).
- Rogalski, W. 1985. Chemical modification of the tetracyclines, p. 179–316. In J. J. Hlavka and J. H. Boothe (ed.), *Handbook of experimental pharmacology*, vol. 78. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Millillo, M.A., Mallamaci, R., 2008. The inhibition of *Candida* species by selected oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15, 635-638.
- Rosato, A., Vitali, C., Piarulli, M., Mazzotta, M., Argentieri, M.P., Mallamaci, R., 2009. In vitro synergistic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* 16, 972-975.
- Rosenberg, M., Guynick, D., E. Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Lettres*. 9, 29.
- Ross, M. S. F. 1976. Analysis of cinnamon oils by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 118:2, 273-275.
- Sakulku, U., Nuchuchua, O., Uawongyart, N., Puttipipatkachorn, S., Soottitantawat, A., Ruktanonchai, U. 2009. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *International journal of pharmaceutics*, 372:1, 105-111.
- Schaechter, M., Medoff, G., Eisenstein, B. I. (Eds.). 1993. *Mechanisms of microbial disease*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Si, H., Hu, J., Liu, Z., Zeng, Z.I. 2008. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 53: 190-194.
- Siesser, W.G. 1981. Christian Gottfried Ehrenberg: founder of micropaleontology. *Centaurus*. 25:2, 166-188.

BIBLIOGRAPHIE

Sikkema, J., De Bont, J. A., Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269:11, 8022-8028.

Singh, G., Kapoor, I.P.S., Pandey, S.K., Singh, U.K., Singh, R.K., 2002. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytother. Res.* 16, 680-682

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

Smith, J.L. 1907. On the simultaneously staining of neutral fat and fatty acids by oxacine dyes. *J. Pathol. Bacteriol.* 12, 1–4

Socha, M. 2007. Développement de nanoparticules furtives. Pharmacie industrielle et biomédicale. Université de Nancy.

Stapleton P, Wu PJ, King A, Shannon K, French G, Phillips I. 1995. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemotherapy.* 39 : 2478-83

Strenström T.A. 1989. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Applied and environmental microbiology.* 55:1, 142-147.

Tavana, H., Simon, F., Grundke, K., Kwok, D.Y., Hair, M.L., Neumann, A.W. 2005. Interpretation of contact angle measurements on two different fluoropolymers for the determination of solid surface tension. *Journal of Colloid and Interface Science.* 291 :2, 497-506.

Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., Lewis, K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46:10, 3133-3141.

Tenover, F.C., Weigel, L.M., Appelbaum, P.C., McDougal, L.K., Chaitram, J., McAllister, S., Clark, N., Killgore, G., O'Hara, C.M., Jevitt, L., Patel, J.B., and Bozdogan B. 2004. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 275–280

Tenson, T., Lovmar, M., Ehrenberg, M. 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of molecular biology*, 330:5, 1005-1014.

- Thevenot, P., 2004. De l'antibiogramme à la prescription. Editions Biomérieux. 15-25.
- Trémolières, F., Cohen, R., Schlemmer, B. 2006. Requiem pour les antibiotiques Faut-il craindre une disparition des antibiotiques?. *Médecine thérapeutique*, 12:3, 154-159.
- Tsuneda, S., Jung, J., Hayashi, H., Aikawa, H., Hirata, A., Sasaki, H. 2003. Influence of extracellular polymers on electrokinetic properties of heterotrophic bacterial cells examined by soft particle electrophoresis theory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 29:2-3, 181-188.
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Hirata, A. 2004. Significance of cell electrokinetic properties determined by soft-particle analysis in bacterial adhesion onto a solid surface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 279:2, 410-417.
- Ultee, A., Smid, E. J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64:3, 373-378.
- Ultee, A.; Bennik, M. H.; 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.
- Van der Auwera P, Joly P. Comparative in-vitro activities of teicoplanin, vancomycin, coumermycin and ciprofloxacin, alone and in combination with rifampicin or LM 427, against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1987;19: 313—20.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A.J.B. 1987. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 1893
- Van Oss C.J. 1993. Acid-Base, interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 78. 1-49.
- Van Zuylen, J., 1980. The microscopes of Antoni van Leeuwenhoek. *Journal of microscopy*. 121, 309-328.
- Vanpouille-Box, C. 2011. Les nanocapsules lipidiques chargées en Rhénium-188 : Nouvel outil pour la radiothérapie interne du carcinome hépatocellulaire et du gliome. *Pharmaceutical sciences*. Université d'Angers.
- Vakilian, K., Atarha, M., Bekhradi, R., Chaman, R. 2011. Healing advantages of lavender essential oil during episiotomy recovery: a clinical trial. *Complementary therapies in clinical practice*, 17:1, 50-53.

- Veldhuizen, E. J., Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L., Zweijtzer, C., Burt, S. A., Haagsman, H. P. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 54:5, 1874-1879.
- Vonarbourg, A., Saulnier, P., Passirani, C., Benoit, J.P. 2005. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: Influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis*. 26:11, 2066-2075.
- Vu-Thien, H. 1998. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les infections urinaires en pédiatrie. *Archives de pédiatrie*, 5, 266S-268S.
- Wagner, H. 2011. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*. 82:1, 34-37.
- Wendakoon, C. N., Sakaguchi, M. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*®, 58:3, 280-283.
- Weber P, Scotto M, Plaisance JJ, Mancy C, Chouteau J. Chef F. 1995. Activités in vitro de l'amoxicilline et de l'association amoxicilline acide clavulanique vis-à-vis d'*Escherichia coli* en médecine de ville. *Md Mal Infect*. 25, 593-R
- Wegener, H. C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current opinion in microbiology*, 6:5, 439-445.
- Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 39:3, 577.
- White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., Bosso, J. A. 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40:8, 1914-1918.
- Wilkowske, C.J., Hermans, P.E. 1987. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clinic proceedings*. 62:9, 789-798.
- Wolff, M., Joly-Guillou, M.L., Pajot, O., 2009. Les carbapénèmes: comparative review of carbapenems. *Reanimation*. 18, S199-S208.
- Woodhead M. 2002. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur Respir J*.20:36, 20-7

BIBLIOGRAPHIE

Yoo, C. B., Han, K. T., Cho, K. S., Ha, J., Park, H. J., Nam, J. H., Lee, K. T. 2005. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer letters*, 225:1, 41-52.

Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J., Yan, W., 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food-borne pathogen *Salmonella typhimurium*. *J. Food Saf.* 27, 124-133.

ANNEXES

Annexe 1 : Curriculum vitae.

Annexe 2 : Poster congrès ECCMID 2015.

Annexe 3 : Diplôme de Pharmacie (Université de Navarre)

Annexe 4 : Diplôme M2 : Technologies innovantes en formulation (Université d'Angers).

Annexe 5 : Tableau interactions Antibiotique-HE (Revue bibliographique)

Annexe 6 : Code de marquage des souris

ANNEXE 1 : CURRICULUM VITAE

CHANTAL VALCOURT SAINZ

1 bis rue Paul Bert, 49000 Angers (France)
 (0033) 06 64 05 34 41
 chantal.valcourtsainz@gmail.com
 28 ans, Permis B



DEPARTEMENT RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT GALENIQUE

FORMATION

2012-2015- Thèse doctorale financée par Eydo pharma®: Contribution à l'étude du traitement de bactéries multirésistantes : Associations de composants aromatiques d'huiles essentielles nano-encapsulés avec des antibiotiques

2011-2012-Master 2 Technologies innovantes en formulation à l'ISSBA (Institut Supérieur de la Santé et des Bioproduits d'Angers)

- Formation scientifique et technologique :
 - Physico-chimie des systèmes dispersés
 - Formulation des systèmes dispersés classiques et innovantes (micro et nanoencapsulation, vectorisation...)
 - PEA (Projet d'étude appliquée)
- Management et gestion.

2005-2011- Diplôme de Pharmacie à l'Université de Navarre (Espagne)

- **2008-2009** : 3^{ème} année de pharmacie à l'université F.Rabelais, à Tours (Erasmus)

2004- BACCALAUREAT scientifique.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2012-Stagiaire, Microfluidique et particules Janus à l'INRA (Nantes), pendant 6 mois.

2011-Stagiaire, à la banque d'ADN à Vitoria (Espagne), stage d'été.

2011-Pharmacienne, Stage de 6 mois au sein du CHU de Bordeaux (France).

2006-2008- Professeur de chimie, maths et biologie à un lycée (cours de soutien)

LANGUES ET INFORMATIQUE

Langues

-Espagnol- Langue maternelle.
 -Français-Courant.
 -Anglais-Intermédiaire

Bureautique: Word, PowerPoint, Excel, Access.

Logiciels de pharmacie hospitalière : DxCare, pharmaTIP, CHIMIO, PHARMA, C.Page, Theriak, TraceLine, Retrocession.

Database of articles et des ressources scientifiques : PubMed, ChemDraw, SciFinder.

LOISIRS ou CENTRES D'INTERET

-Lecture, voyage et tourisme, athlétisme et cuisine

ANNEXE 2 : Poster congrès ECCMID 2015


SYNERGISTIC INTERACTION BETWEEN THE TERPENIC COMPONENTS OF ESSENTIAL OILS AND ATB01 AGAINST ACINETOBACTER BAUMANNII
Chantal Valcourt¹, Patrick Saulnier, Elisabeth Rossines and Marie Laure Joly-Guillou

Unité U1066, Laboratoire INSERM Angers (France). Project financed by Eydo pharma® company

¹chantal.valcourtsainz@gmail.com**Objectives**

Essential oils (EO) are odorous substances contained in plants. Some of them have antibacterial properties. We have selected a mixture of three major constituents of different EO: EP1010 (a methoxyphenol), EP1011 (an aldehyde) and EP1012 (a phenol), and an antibiotic of the glycopeptide class (ATB01). ATB01 is not effective against Gram-negative bacteria because their intrinsic resistance against this antibiotic is mediated by porins. The use of ATB01 in combination with EO which have the ability to destabilize the membrane of bacteria might facilitate the passage of the former so that it can pursue its action. The aim of this work was to combine ATB01 with essential oils in order to make the former effective against a multiresistant gram negative bacteria.

Methods• **Formulation of LNCs**

LNCs was formulated via a phase inversion method in order to make the EO suitable for injection.



The formulation was heated to 90 °C followed by cooling to 60 °C. 3 times. During the 3rd cooling step, at 82 °C the active EP1010 was added, in the next cycle, EP1011 was added at 76 °C, following by EP1012 added at 75 °C. The system was diluted with 12,5 mL cold water (4 °C) in the last cycle at 55 °C leading to the formation of stable LNCs.

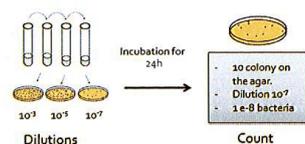
• **Determination of MIC and FIC index**

Minimal inhibitory concentration (MIC): The lowest concentration of antibiotic sufficient to inhibit the growth of a strain of bacteria.

The fractional inhibitory concentration index (FIC index) was determined using the checkerboard method. The microtiter plates were covered and incubated at 37 °C overnight.

• **Kill-time assay**

The LNCs and the ATB01 were tested at concentrations of 425 µg/mL and 2 µg/mL, respectively. The samples were collected after 0, 3, 6 and 24 hours.

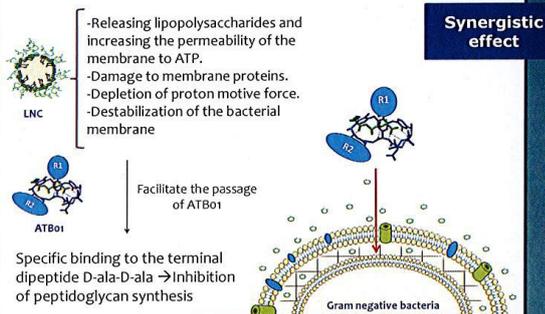


Graphic representation of the evolution of antibacterial treatment over 24 hours.

• **Scanning electron microscopy (SEM)**

SEM was used to visualize the changes in the bacterial membrane. Observations were carried out using Jeol JSM-6301F scanning microscope.

- 6 hours of incubation at 37 °C with each drug.
- Fixation with glutaraldehyde 2% and paraformaldehyde 2% overnight under vacuum.
- Post fixation with OsO₄.
- Dehydration with ethanol and metallization with platinum.

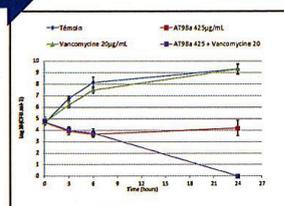
**Synergistic effect**

MIC	LNC	ATB01
Alone	1250 µg/mL	1028 µg/mL
Combination	425 µg/mL	10 µg/mL

Results

$$FIC_i = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

$FIC_i > 2$ Antagonism
 $0,75 < FIC_i \leq 2$ Additive
 $0,5 < FIC_i \leq 0,75$ Partial synergism
 $FIC_i \leq 0,5$ Total synergism

In-vitro

RESISTANT
-Control
-ATB01 10 µg/mL

BACTERIOSTATIC
-LNC 425 µg/mL

BACTERICIDE
-LNC 425 µg/mL + ATB01 10 µg/mL

3log between LNC à 425 µg/mL and LNC + ATB01 → **SYNERGISTIC EFFECT***

*Synergy was defined as a decrease of $>2\log_{10}$ CFU/mL (colony-forming units per milliliter) between the combination and the most active single agent

Microscopy

Effect of the association AT98a + ATB01 against *Acinetobacter baumannii* after 6 hours of incubation at 37 °C.

Conclusion

The combination of ATB01 with EOs-loaded LNCs allowed the use of antibiotic doses which are not active when used alone. The active agents used (especially EP1012), destabilize the bacterial membrane and allowed the passage of ATB01 which inhibits the synthesis of the peptidoglycan. The use of the EO with antibacterial activity and the antibiotics in combination offers an excellent opportunity to use antibiotics which are otherwise inactive against certain bacteria.

ANNEXE 3 : Diplôme de pharmacie (Université de Navarre)



Universidad de Navarra

FACULTAD DE FARMACIA

D^a. CHANTAL ALICE VALCOURT SÁINZ, nacida el 23 de septiembre de 1986 en Vitoria, provincia de Álava, de nacionalidad española y con documento nacional de identidad 72748075H, ha superado en esta Universidad en junio de 2012 los estudios conducentes al título universitario OFICIAL de

LICENCIADA EN FARMACIA

(Orden de 29 de noviembre de 2000, BOE 19-12-2000)

que será expedido por el Rector de la Universidad de Navarra en nombre de S.M. el Rey de España, y ha abonado los derechos de expedición del título el 9 de enero de 2013.

A efectos de lo señalado en la disposición final cuarta del Real Decreto 1496/1987, de 6 de noviembre (BOE de 14 de diciembre), y para que surta los mismos efectos del título con carácter provisional hasta que éste se edite, expido el presente resguardo a solicitud de la interesada en Pamplona a 9 de enero de 2013.

El Oficial Mayor



Número de resguardo: 61472-1
Derechos de expedición: 330.00 €. (derechos ordinarios).

La expedición de este título puede comprobarse en las consultas de la gestión académica para el alumno.

ANNEXE 4 : Diplôme master 2: Technologies innovantes en formulation

R É P U B L I Q U E F R A N Ç A I S E

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

UNIVERSITÉ D'ANGERS

MASTER

Vu le code de l'éducation :

Vu le décret n° 84-573 du 5 juillet 1984 modifié relatif aux diplômes nationaux de l'enseignement supérieur :

Vu le décret n° 99-747 du 30 août 1999 modifié relatif à la création du grade de master :

Vu le décret n°2002-481 du 8 avril 2002 modifié relatif aux grades et titres universitaires et aux diplômes nationaux :

Vu l'arrêté du 25 avril 2002 relatif au diplôme national de master :

Vu l'arrêté ministériel du 10 octobre 2008 relatif à l'habilitation de l'UNIVERSITÉ D'ANGERS à délivrer des diplômes nationaux :

Vu les pièces justificatives produites par Mme CHANTAL VALCOURT, née le 23 septembre 1986 à VHORIA-GASTEIZ (ESPAGNE), en vue de son inscription au

master :

Vu les procès-verbaux du jury attestant que l'intéressée a satisfait au contrôle des connaissances et des aptitudes prévu par les textes réglementaires :

Le diplôme de **MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTÉ**, à finalité PROFESSIONNELLE. Mention SCIENCES, TECHNOLOGIES ET INGÉNIEURIE DE LA SANTÉ, spécialité **PRODUITS DE SANTÉ : INNOVATION, RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT**
*mention bien*est délivré à **Mme CHANTAL VALCOURT**au titre de l'année universitaire 2011-2012, et confère le **grade de master**,
pour en jouir avec les droits et prérogatives qui y sont attachés.

Fait à Nantes, le 25 février 2013

Le titulaire

N° ANGERS 9585147
/2013201105624

Le Président




Jean-Paul SAINT-ANDRÉ

Le Recteur d'Académie,
Chancelier des universités


William MAROIS

ANNEXE 5: Tableau interactions Antibiotique-HE (Revue bibliographique)

	Antibiotic	Bacteria	Method	Interaction	Reference
Carvacrol	Penicillin	<i>E.coli</i>	FIC index <0,5 0,11	Synergistic	Palaniappan et al. 2010
		<i>S.aureus</i>	FIC index<0,5 0,37	Synergistic	Palaniappan et al. 2010
	Tetracyclin	<i>E.coli</i>	FIC index <0,5 0,15	Synergistic	Palaniappan et al. 2010
	Ampicillin	<i>S.aureus</i>	FIC index <0,5 0,15	Synergistic	Palaniappan et al. 2010
	Nalidixic acid	<i>Bactéries résistantes à l'ac.nalidixique</i>	FIC index 0,12- 2,25	Synergistic (ou partial Synergistic)	Choi et al. 2009
	Nisin (peptide)	<i>L.monocytogenes</i>	MIC 0,63	Synergistic	Pol et Smid 1999
		<i>B. cereus</i>	MIC 1,25	Synergistic	Pol et Smid 1999
<i>T.maroccanus</i> (39,77% carvacrol)	Ciprofloxacin	<i>E.coli</i>	FIC index: 0,12	Synergistic	Fadli et al. 2012
		<i>S.aureus</i>	FIC index: 0,15		
		<i>P.aeruginosa</i>	FIC index : 0,26		
<i>Zataria multiflora</i> (thymol, carvacrol and p-cymène)	Vancomycin	<i>S.aureus (MRSA)</i>	FIC index : 0,32	Synergistic	Mahboubi et Ghazian 2010
		<i>S.aureus (MSSA)</i>	FIC index :0,185		Mahboubi et Ghazian 2010
Origan oil (Thymol and Carvacrol)	Sarafloxacin	<i>E.coli</i>	FIC index : 0,375	Synergistic	Si et al. 2008
	Levofloxacin	<i>E.coli</i>	FIC index : 0,5	Synergistic	Si et al. 2008
	Amoxicillin	<i>E.coli</i>	FIC index :0,75	Additive	Si et al. 2008
	Ceftriaxon	<i>E.coli</i>	FIC index : 0,625	Additive	Si et al. 2008
	Doxycyclin	<i>E.coli</i>	FIC index : 0,375	Synergistic	Si et al. 2008
	Ampicillin	<i>S.aureus ATCC 25922</i>	FIC index= 1	Additive	Nascimento et al.2007
Eugénol	Ampicillin	<i>S.mutans</i>	FIC index :0,5/0,5	Synergistic	Moon et al. 2009
		<i>S.sanguinis</i>	FIC index :0,5/0,5	Synergistic	Moon et al. 2009
		<i>S.sobrinus</i>	FIC index :0,5/0,5	Synergistic	Moon et al. 2009

ANNEXES

		<i>P.gingivalis</i>	FIC index :0,5/0,375	Synergistic	Moon et al. 2009
		<i>P.intermedia</i>	FIC index :0,5/0,5	Synergistic	Moon et al. 2009
	Gentamicin	<i>S.mutans</i>	FIC index :0,75/0,75	Additive	Moon et al. 2009
		<i>S.sanguinis</i>	FIC index :0,5/0,375	Synergistic	Moon et al. 2009
		<i>S.sobrinus</i>	FIC index :0,5/0,5	Synergistic	Moon et al. 2009
		<i>P.gingivalis</i>	FIC index :0,5/0,375	Synergistic	Moon et al. 2009
		<i>P.intermedia</i>	FIC index :0,5/0,5	Synergistic	Moon et al. 2009
		Penicillin	<i>E.coli</i>	FIC index : 0,16	Synergistic
	<i>S.pneumoniae</i>		FIC index : 0,5	Synergistic	Yadav et al. 2013
	Fluconazol	<i>Candida</i>	FIC index : 0,31-0,55	Synergistic	Ahmad et al. 2010
	Ofloxacin ou Amikacin	<i>E.coli</i>	mm ± SD % : 13/15	Synergistic	Ghali et al. 2009
		<i>Proteus mirabilis</i>	mm ± SD % : 15-23	Synergistic	Ghali et al. 2009
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	mm ± SD % : 16-20	Synergistic	Ghali et al. 2009
		<i>S.saprothiticus</i>	mm ± SD % : 18-25	Synergistic	Ghali et al. 2009
		<i>P.aeruginosa</i>	mm ± SD % : 15-18	Synergistic	Ghali et al. 2009
	Vancomycin	<i>Bactéries gram -</i>		Synergistic	Hemiswarya et Doble 2009
Cinnamaldehy de	Piperacillin	<i>E.coli</i>	FIC index: 0,50	Synergistic	Yap et al. 2013
	Penicillin	<i>S.aureus</i>	FIC index: 0,37	Synergistic	Palaniappan et al. 2010
	Ampicillin	<i>S.aureus</i>	FIC index: 0,25	Synergistic	Palaniappan et al. 2010
	Clindamicyn	Clostridium dif	FIC index: 0,25	Reduce the MIC of the antibiotic	Shahverdi et al. 2007
Carvone	Pénicilline-	<i>S.aureus (MRSA)</i>	FIC index: 0,0078	Synergistic	Gallucci et al. 2006

ANNEXES

Thymol	Pénicilline	<i>S.aureus (MRSA)</i>	FIC index: 3,98	Antagonist	Gallucci et al. 2006
		<i>E.coli</i>	FIC index: 0,15	Synergistic	Gallucci et al. 2006
	Nisin	<i>L.monocytogenes</i> <i>B.subtilus</i>			Ettayebi et al. 2000
<i>Thymus glabrescens</i> (Geraniol et thymol)	Chloranphénicol	<i>E.coli ATCC25922</i> <i>K.pneumoniae</i>	FIC index: 0,21-0,87	Synergistic/Additive	Ilic et al.
		<i>P.aeruginosa</i>	FIC index: 0,43-0,87	Synergistic/Additive	Ilic et al.
		<i>P.mirabilis</i>	FIC index: 0,68-0,82	Synergistic/Additive	Ilic et al.
<i>Ocimum sanctum</i> (linalool, méthylchavicol et carvone)	Fluconazole Ketoconazole	<i>Candida (C.albicans, C.glabrata et C.tropicalis)</i>	FIC index: 0,25-0,5	Synergistic	Amber et al.2010
<i>Ocimum gratissimum</i>	Ciprofloxacin	<i>S.aureus</i>	%change in IZD* : 0	indifference	Nweze et Eze 2009
		<i>P.aeruginosa</i>	%change in IZD : 66,67	Synergistic	Nweze et Eze 2009
		<i>E.coli</i>	%change in IZD : 20	Additive	Nweze et Eze 2009
	Streptomycine	<i>S.aureus</i>	%change in IZD : -8,33	Antagonist	Nweze et Eze 2009
		<i>P.aeruginosa</i>	%change in IZD : --	Without activity	Nweze et Eze 2009
		<i>E.coli ATCC 11775</i>	%change in IZD :-50	Antagonist	Nweze et Eze 2009
	Ampicilline	<i>S.aureus</i>	%change in IZD : --	Without activity	Nweze et Eze 2009
		<i>P.aeruginosa</i>	%change in IZD : --	Without activity	Nweze et Eze 2009
		<i>E.coli</i>	%change in IZD : 25	Synergistic	Nweze et Eze 2009
	Ketoconazole	<i>C.albicans ATCC90028</i>	%change in IZD : -11,54	Antagonist	Nweze et Eze 2009
		<i>C.albicans</i>	%change in IZD : 28,57	Synergistic	Nweze et Eze 2009
<i>Vanillosmopsis arborea</i> (α -	Gentamycine	<i>S.aureus</i>	mm \pm SD % : 16 \pm 2	Reduce the MIC of the antibiotic	Santos et al. 2010

ANNEXES

bisabolol)	Tetracycline	<i>S.aureus</i>	mm ± SD % : 30±3	Reduce the MIC of the antibiotic	Santos et al. 2010
		<i>P.vulgaris</i>	mm ± SD % : 26±0,5	Reduce the MIC of the antibiotic	Santos et al. 2010
	Tobramycine	<i>S.aureus</i>	mm ± SD % : 17,5±0,5	Reduce the MIC of the antibiotic	Santos et al. 2010
		<i>P.vulgaris</i>	mm ± SD % : 26±0,5	Reduce the MIC of the antibiotic	Santos et al. 2010
Green tea	Levofloxacin	<i>E.coli</i>		Synergistic	Isogai et al. 2001
Mint	Piperacilline	<i>E.coli</i>	FIC index: 0,31	Synergistic	Yap et al. 2013
	Méropénème	<i>E.coli</i>	FIC index: 0,26	Synergistic	Yap et al. 2013
Anethol	Gentamycine	<i>P.aeruginosa</i>	%SD :42,8	Reduce the MIC of the antibiotic	Rodrigues et al. 2009
<i>P. graveolens</i> (géraniol et citronellol)	Norfloxacin	<i>B.cereus</i>	FIC index: 0,50	Synergistic	Rosato et al. 2007
		<i>E.coli</i> ATCC 35218	FIC index: 0,57	Additive	
		<i>S.aureus</i> ATCC 6538	FIC index:0,37	Synergistic	Rosato et al. 2007
<i>Geraniol</i>	Norfloxacin	<i>B.cereus</i>	FIC index:0,5	Synergistic	Rosato et al. 2007
		<i>S.aureus</i> ATCC 29213 et 6538	FIC index: 0,5	Synergistic	Rosato et al. 2007
<i>Citronellol</i>	Norfloxacin	<i>B.cereus</i>	FIC index: 0,5	Synergistic	Rosato et al. 2007
		<i>S.aureus</i> ATCC 29213 et 6538	FIC index : 0,5	Synergistic	Rosato et al. 2007

Tableau 24 : interactions Antibiotique-HE (Revue bibliographique)

ANNEXE 6 : Code de marquage des souris

Le marquage des souris s'est réalisé avec des trous aux niveaux des oreilles (gauche ou droite) L'image XX, compile les codes pour chaque chiffre, ce marquage peut atteindre un chiffre de 99 (grâce aux codes des unités réalisés dans l'oreille droite et les codes des dizaines réalisés dans l'oreille gauche)

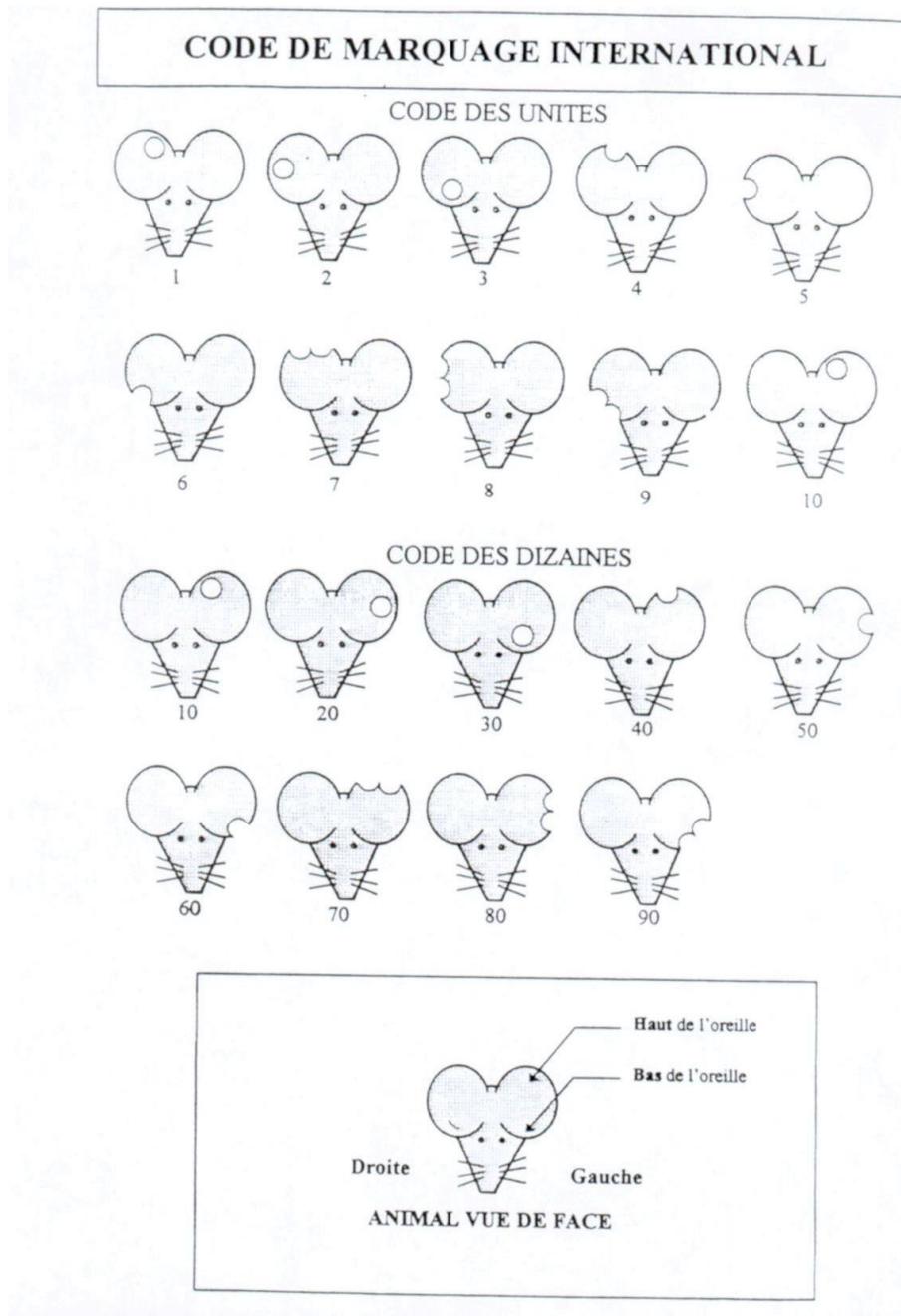


Figure 68 : Code de marquage international pour expérimentation animale chez la souris.

Thèse de Doctorat

Chantal Valcourt

Contribution à l'étude du traitement de bactéries multirésistantes

Association des composants aromatiques d'huiles essentielles nano-encapsulés avec des antibiotiques

Résumé

Les bactéries multirésistantes (BMR) représentent un véritable problème de santé publique. Les antibiotiques conventionnels commencent à devenir inefficaces et des bactéries qu'à une époque étaient contrôlées, commencent à devenir de plus en plus pathogènes.

L'utilisation des actifs dérivant des plantes comme certains composants issus des huiles essentielles ont déjà démontré une action bactérienne contre plusieurs bactéries dites résistantes.

Pour l'administration de ces actifs, à nature lipophile, nous les avons encapsulés à l'intérieur des nanocapsules au cœur lipidique (NCL) grâce à une modification de la méthode d'inversion de phase développé dans le laboratoire Inserm U1066 au début des années 2000.

Le but de cette thèse est de trouver une association avec des antibiotiques qui puisse s'avérer synergique contre des BMR.

Nous avons obtenu une synergie sur plusieurs souches bactériennes avec un mélange avec trois actifs différents : l'eugénole, le carvacrol et le cinnamaldéhyde et la doxycycline (antibiotique bactériostatique de la famille des tétracyclines). Cette synergie a été également testée *in vivo* sur un modèle pneumopathique de souris avec des résultats qui semblent en concordance avec les résultats *in vitro*.

Nous nous sommes servis des méthodes physico-chimiques comme l'angle de contact ou la mobilité électrophorétique, dans le but d'étudier les interactions entre les NCL et les bactéries. Les résultats obtenus semblent indiquer que les NCL recouvrent la surface de la bactérie et libèrent leurs actifs, néanmoins nous n'écartons pas l'hypothèse qu'une certaine quantité des NCL puisse aussi pénétrer la bactérie.

Mots clés

Huiles essentielles, antibiotiques, synergie, bactéries multirésistantes, nanocapsules lipidiques

Abstract

Multiresistant bacteria (MRB) present today a public health problem. Some antibiotics are ineffective and bacteria formerly controlled, begin to become more and more pathogenic.

The use of drugs derived from plants as some components from essential oils have demonstrated a bactericidal effect against resistant bacteria.

For the administration of these lipophilic drugs, they have been encapsulated in the core of lipid nanocapsules (LNC), formulated via the phase inversion method. This method was developed in the laboratory Inserm U1066 in the early 2000s.

The aim of this thesis is to find a combination with an antibiotic that prove to be synergistic against MRB.

We have found a synergistic effect with the combination of doxycycline (bacteriostatic antibiotic of the tetracycline class) and the LNC of a mixture of three aromatic components of essential oils (eugenol, carvacrol and cinnamaldehyde)

This synergy was also tested *in vivo* in a pneumopathic mice model with interesting results which appear consistent with *in vitro* results.

The interactions between LNC and bacteria were studied using physicochemical method as electrophoretic mobility and contact angle measurement.

Obtained results suggest that LNC cover the surface of the bacteria and release the aromatic components. These results are also observed by confocal microscopy.

Nevertheless, we also accept the hypothesis that, a certain amount of LNC can cross the bacteria..

Key Words

Essential oils, antibiotics, synergistic effect, multiresistant bacteria, lipidic nanocapsule