



HAL
open science

Recherche des mécanismes d'action des molécules à activité biologique issues des produits naturels

Jean-Pierre Poli

► **To cite this version:**

Jean-Pierre Poli. Recherche des mécanismes d'action des molécules à activité biologique issues des produits naturels. Sciences agricoles. Université Pascal Paoli, 2018. Français. NNT : 2018CORT0017 . tel-03476770

HAL Id: tel-03476770

<https://theses.hal.science/tel-03476770v1>

Submitted on 13 Dec 2021

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

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



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
UMR CNRS 6134 (SPE)



Thèse présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN ASPECTS MOLECULAIRES ET
CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement par

Jean-Pierre POLI

le 7 Décembre 2018

**Recherche des mécanismes d'action des molécules à activité
biologique issues des produits naturels**

Directeurs :

Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse
Mme Vannina Lorenzi, Docteur, Université de Corse

Rapporteurs :

Mme Maryline Foglino, Docteur-HDR, Aix-Marseille Université
M. Vincent Méjean, Directeur de Recherche, Aix-Marseille Université

Jury :

Mme. Annick Méjean, Professeur, Université Paris-Diderot
Mme Maryline Foglino, Docteur-HDR, Aix-Marseille Université
M. Vincent Méjean, Directeur de Recherche, Aix-Marseille Université
M. Félix Tomi, Professeur, Université de Corse
Mme Vannina Lorenzi, Docteur, Université de Corse
Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
1. LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES	2
1.1 LES DIFFERENTS TYPES DE MOLECULES ANTIBIOTIQUES	2
1.1.1 <i>Les antibiotiques naturels et synthétiques</i>	2
1.1.2 <i>Les différentes classes d'antibiotiques</i>	8
1.2 LES CIBLES DES ANTIBIOTIQUES.....	10
1.3 LA RESISTANCE BACTERIENNE.....	10
1.3.1 <i>La résistance innée</i>	10
1.3.2 <i>La résistance acquise</i>	11
1.3.3 <i>Les mécanismes de la résistance bactérienne</i>	12
1.3.3.1 <i>Modification de la cible cellulaire des antibiotiques</i>	13
1.3.3.2 <i>Modification et dégradation enzymatique des antibiotiques</i>	13
1.3.3.3 <i>Réduction de la concentration intracellulaire en antibiotiques</i>	17
1.3.3.3.1 <i>Réduction de la perméabilité membranaire</i>	17
1.3.3.3.2 <i>L'efflux membranaire bactérien</i>	18
2. LES STRATEGIES INNOVANTES DE LUTTE CONTRE LA RESISTANCE BACTERIENNE.....	21
2.1 LA PHAGOTHERAPIE.....	21
2.1.1 <i>L'utilisation des phages contre des pathogènes importants</i>	23
2.1.2 <i>Le développement d'enzymes lytiques dérivées des phages</i>	23
2.2 INHIBITION DES POMPES D'EFFLUX MEMBRANAIRE.....	25
2.2.1 <i>Nouveaux antibiotiques et modification du design</i>	25
2.2.2 <i>Altération des fonctions des pompes d'efflux</i>	25
2.3 LE QUORUM SENSING	28
2.3.1 <i>Les mécanismes du quorum sensing</i>	30
2.3.1.1 <i>Le quorum sensing chez les bactéries Gram positives</i>	31
2.3.1.2 <i>Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives</i>	33
2.3.1.3 <i>La communication inter-espèces</i>	36
2.3.2 <i>Les souches biosenseurs</i>	37
2.3.2.1 <i>Chromobacterium violaceum</i>	37

2.3.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
2.3.3 <i>Les inhibiteurs du quorum sensing</i>	39
3. LES RESSOURCES NATURELLES DANS LA RECHERCHE DE MOLECULES ANTIBACTERIENNES INNOVANTES.....	42
3.1 LES HUILES ESSENTIELLES	42
3.1.1 <i>Composition des huiles essentielles</i>	42
3.1.2 <i>Activités biologiques</i>	45
3.1.3 <i>Activités antibactériennes et mode d'action</i>	47
3.2 LES HYDROLATS	54
3.2.3 <i>Définition et composition</i>	54
3.2.2 <i>Activités biologiques</i>	55
3.3. LE MIEL	55
3.3.1 <i>Action cicatrisante</i>	56
3.3.2 <i>Action antibactérienne</i>	57
3.3.2.1 <i>Le peroxyde d'hydrogène</i>	57
3.3.2.2 <i>Les peptides et protéines du miel</i>	57
3.3.2.3 <i>Le méthylglyoxal</i>	58
3.3.2.4 <i>Les polyphénols</i>	59
3.3.2.5 <i>Les facteurs physico-chimiques (pression osmotique, pH...)</i>	61
3.3.2.6 <i>Autres propriétés biologiques</i>	61
4. PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS	65
RESULTATS ET DISCUSSION	67
CHAPITRE 1 ACTIVITES ANTIBACTERIENNES ET MECANISMES D'ACTION DES MIELS DE CORSE	68
CHAPITRE 2 ACTIVITE ANTI-QUORUM SENSING DES HUILES ESSENTIELLES ET HYDROLATS	89
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	108
ANNEXES.....	130

Table des Tableaux

Tableau 1 : Les principales classes d'antibiotiques et leurs modes d'action.....	9
Tableau 2 : Mécanismes et cibles des enzymes de résistance aux antibiotiques.....	14
Tableau 3 : CMI du chloramphénicol (CMI_{CL}) en présence des molécules testées pour l'identification de la relation structure-activité anti-efflux.	27
Tableau 4 : Constituants principaux des huiles essentielles (HEs) à activité antimicrobienne.....	48

Table des Figures

Figure 1 : Chronologie de la découverte et de mise sur le marché des principaux antibiotiques.....	2
Figure 2 : Structure chimique de la teixobactine	3
Figure 3 : Structures des molécules analogues de la teixobactine	4
Figure 4 : Structures chimiques des malacidines naturelles A et B.....	5
Figure 5 : Synthèse des SNAPP avec NCA : <i>N</i> -carboxyanhydrides d' α -aminoacides	6
Figure 6 : Mécanisme d'action des polymères peptidiques étoilés (SNAPP)	7
Figure 7 : Les différents sites d'action des antibiotiques	10
Figure 8 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques.....	11
Figure 9 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques	12
Figure 10 : Mode d'action des β -lactamases à sérine (A) et des métallo- β -lactamases (B) contre l'amoxicilline	15
Figure 11 : Structures chimiques de la 1 ^{ère} et 5 ^{ème} génération de céphalosporines	15
Figure 12 : Réactions enzymatiques et non-enzymatiques permettant la formation d'adduits acétylés du chloramphénicol	16
Figure 13 : Inactivation de la tétracycline par l'enzyme TetX.....	16
Figure 14 : Comparaison de la paroi chez les bactéries Gram négatives et positives.....	17
Figure 15 : Représentation schématique des 5 grandes familles de pompes d'efflux bactérien.....	19
Figure 16 : Illustration de la structure du bactériophage T4.....	22
Figure 17 : Illustration des deux types cycles de vie des phages	22
Figure 18 : Action de la lysine ClyS contre un SARM causant une perturbation du peptidoglycane et une lyse hypotonique en moins d'une minute	24
Figure 19 : Liaisons du peptidoglycane sensibles à l'action des lysines	24
Figure 20 : Structure chimique de la 13-cyclopentylthio-5-hydroxy tétracycline.....	26
Figure 21 : Structure chimique du PA β N	26
Figure 22 : Molécules dérivés de polyamines-isopropényles à action anti-efflux.....	28
Figure 23 : Les différentes étapes de la formation du biofilm.....	29
Figure 24 : Système Lux (LuxI/LuxR) impliqué dans le quorum sensing de <i>V. fischeri</i> . 31	

Figure 25 : Schémas des circuits du quorum sensing chez les bactéries Gram positives (a) : <i>via</i> un système à deux composants ; (b) : <i>via</i> régulation par l'AIP.....	32
Figure 26 : La régulation du quorum sensing chez <i>S. aureus</i>	33
Figure 27 : Biosynthèse des AHL.....	34
Figure 28 : Les différents systèmes de quorum sensing chez <i>P. aeruginosa</i>	35
Figure 29 : L'auto-inducteur 2 (AI-2) de <i>Vibrio harveyi</i>	36
Figure 30 : Structure chimique de la violacéine	38
Figure 31 : Biosynthèse de la violacéine	38
Figure 32 : Dégradation des AHL (A) et produits obtenus après action enzymatique (B)	40
Figure 33 : Synthèse de l'IPP et du DMAPP par les voies du méthyl-érythritol phosphate et de l'acide mévalonique.....	43
Figure 34 : Voie de la biosynthèse des terpènes.....	44
Figure 35 : Biosynthèse de l'acide cinnamique <i>via</i> la voie de l'acide shikimique	45
Figure 36 : Composés soufrés et azotés retrouvés dans les huiles essentielles.....	45
Figure 37 : Structure chimique de l'isointermédéol.....	46
Figure 38 : Structures chimiques du citral et du citronellal	47
Figure 39 : Modes d'actions des huiles essentielles sur les bactéries	49
Figure 40 : Structures chimiques du <i>p</i> -cymène et du carvacrol	49
Figure 41 : Structures chimiques du thymol, de l'eugénol et du chavicol.....	50
Figure 42 : Structures chimiques du γ -terpinène et du terpinène-4-ol.....	51
Figure 43 : Structures chimiques du viridiflorol et du lédol	52
Figure 44 : Micrographies obtenues au microscope électronique à transmission de <i>S. aureus</i> contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb	52
Figure 45 : Structure chimique de l'estragol	53
Figure 46 : Structure chimique du cinnamaldéhyde.....	53
Figure 47 : Processus d'hydrodistillation.....	54
Figure 48 : Localisation de production anatomique des différents produits de la ruche par l'abeille	56
Figure 49 : Modèle structural de la défensine 1 d' <i>Apis mellifera</i>	58
Figure 50 : Formation du méthylglyoxal.....	58
Figure 51 : Les grandes familles de polyphénols.....	59

Figure 52 : Structures moléculaire des six classes de flavonoïdes	60
Figure 53 : les effets du miel sur la voie de l'apoptose.....	62

INTRODUCTION

1. La résistance bactérienne aux antibiotiques

1.1 Les différents types de molécules antibiotiques

1.1.1 Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques sont décrits comme « des produits microbiens ou leurs dérivés capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » (Prescott *et al.*, 1995). Ils sont définis comme des substances d'origine naturelle ou produite par un microorganisme, ayant le pouvoir, à de faibles concentrations, d'inhiber ou de tuer d'autres microorganismes. Les antibiotiques peuvent être regroupés en familles ou en classes selon leurs propriétés structurales.

Les produits naturels développés par des cultures bactériennes sont les principales sources d'antibiotiques utilisés à des fins curatives (Newman *et al.*, 2003 ; Hover *et al.*, 2018). La découverte des antibiotiques à large spectre a débuté avec la première β -lactame, la pénicilline redécouverte par Alexander Fleming (Fleming, 1929).

Cette première étape dans la lutte contre les maladies infectieuses a été « l'âge d'or des antibiotiques » puisque la plupart des molécules encore utilisées aujourd'hui ont été découvertes entre 1940 et 1962 (fig. 1) avec notamment les aminoglycosides, les β -lactames de deuxième génération et les glycopeptides.

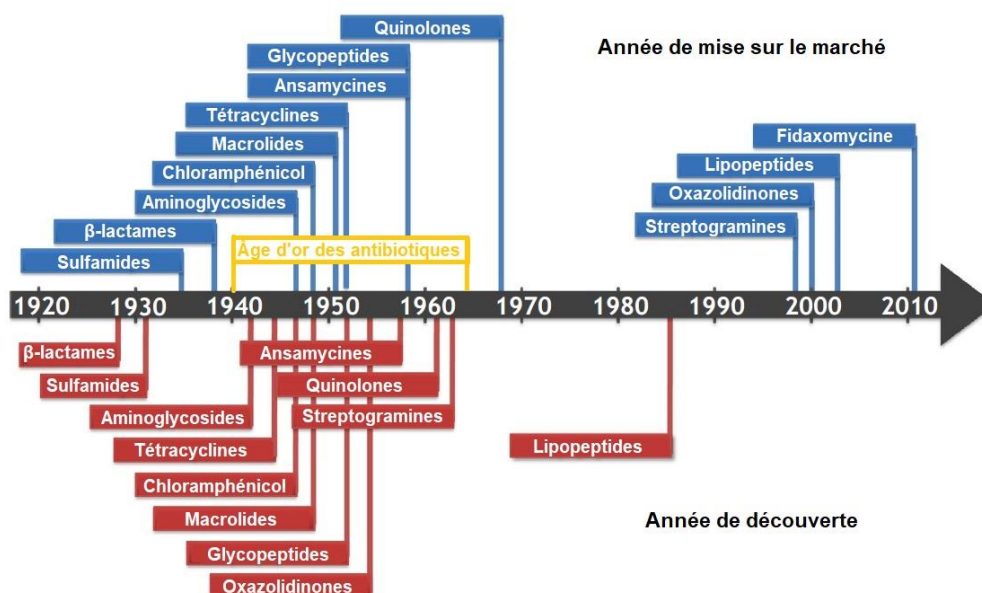


Figure 1 : Chronologie de la découverte et de mise sur le marché des principaux antibiotiques (adapté de Lewis, 2017)

Une troisième classe de β -lactames a été découverte au début des années 1970 : les carbapénèmes dont l'imipénem. Les trois générations de β -lactames se différencient par des modifications au niveau de leur second cycle.

Les maladies infectieuses restent une cause majeure de décès dans le monde (O'Neill, 2016). En l'absence de nouvelles thérapies, le taux d'infections non traitables devrait augmenter de plus d'un facteur 10 d'ici à 2050 (Hover *et al.*, 2018). C'est pourquoi il est obligatoire de rechercher de nouvelles molécules antibactériennes.

Parmi les dernières molécules découvertes, la teixobactine a été isolée chez *Eleftheria terrae*. Il s'agit d'un depsipeptide inhabituel dans lequel une liaison amide (-CONH-) est remplacée par une liaison ester (-COO-) (fig. 2).

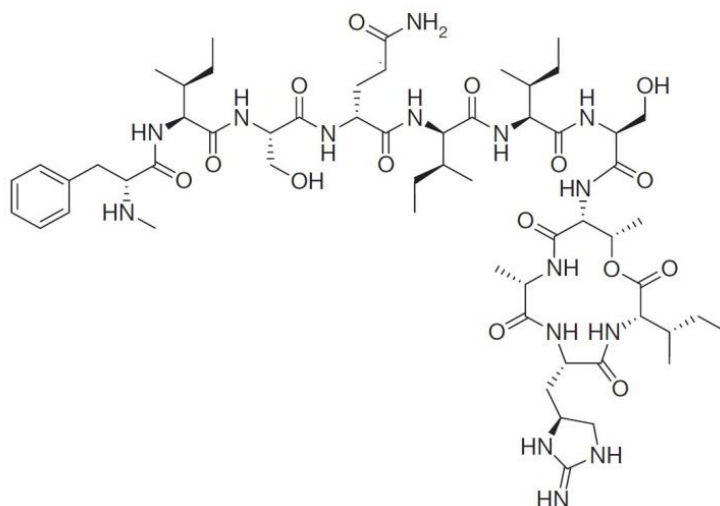


Figure 2 : Structure chimique de la teixobactine (d'après Ling *et al.*, 2015)

Cette molécule inhibe la synthèse de la paroi bactérienne en se liant au lipide II (un précurseur du peptidoglycane) et au lipide III (un précurseur de l'acide teichoïque présent dans la paroi), ce qui explique d'ailleurs sa spécificité d'action contre les bactéries Gram positives. Cette capacité à se lier à ces précurseurs extrêmement conservés est importante car elle empêchera la bactérie de développer de nouvelles résistances. Lors de la première étude, aucune résistance ne s'est développée parmi les bactéries sensibles, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* (Ling *et al.*, 2015).

Comme la teixobactine est le seul représentant naturel de cette nouvelle classe d'antibiotique, Parmar *et al.* (2018) ont synthétisé 10 dérivés où certains résidus spécifiques permettent de

garder un profil similaire à la teixobactine naturelle en conservant la même polarité. Cette étude contre *S. aureus* résistant à la méticilline (ATCC 35591) a mis en évidence que certains d'entre eux Arg3-Leu10-teixobactine (fig. 3a), D-Arg4-Leu10-teixobactine (fig. 3b), Arg9-Leu10-teixobactine (fig. 3c) et la D-Arg4-Ile10-teixobactine (fig. 3d) présentent des valeurs de CMI légèrement inférieures ($0,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) à celles de leur homologue naturel ($0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) mais sans être réellement significatives.

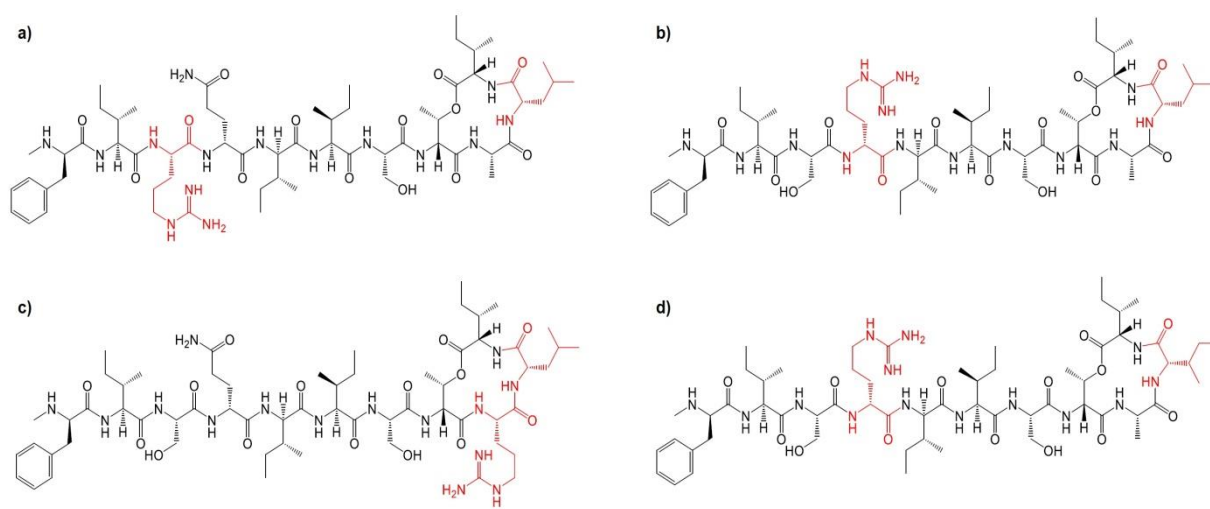
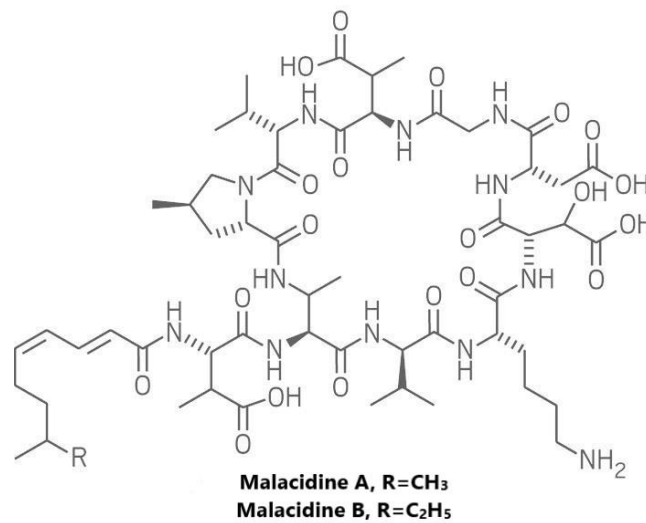


Figure 3 : Structures des molécules analogues de la teixobactine (d'après Parmar *et al.* 2018)

Des résultats similaires, montrant une forte activité antibactérienne, ont été mis en évidence pour certains de ces analogues contre des *Enterococcus spp.* résistants à la vancomycine avec des CMI basses, comprises entre $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tout récemment, Hover *et al.* (2018) ont mis en évidence une nouvelle classe d'antibiotiques naturels, les malacidines (fig. 4). Elles ont été découvertes en recherchant, dans des échantillons de sols, des groupements de gènes codant pour des motifs de liaison au calcium retrouvés dans certains antibiotiques



**Figure 4 : Structures chimiques des malacidines naturelles A et B
(adapté de Hover *et al.*, 2018)**

Elles sont très efficaces dans la lutte contre certaines souches Gram positives spécifiques comme *S. aureus* résistant à différents antibiotiques tels les β -lactames, la tétracycline, la kanamycine ou la vancomycine avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Les antibiotiques peuvent également avoir une origine synthétique ou semi-synthétique. C'est le cas, par exemple, des sulfamides (1935) qui ont été les premiers à être utilisés cliniquement (Laub, 1986). Une autre classe, découverte en 1962, est celle des quinolones (fluoroquinolones). Ces dernières sont produites au cours de la synthèse de la chloroquine, un anti-paludéen (Singh et Barrett, 2006). La troisième classe, décrite en 1979, est celle des oxazolidinones et en particulier le linézolide qui a été le premier membre de cette classe mis sur le marché en près de 35 ans (2000). Il est actif contre des infections à bactéries Gram positives telles *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ou encore *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (Leach *et al.*, 2011).

La majorité des antibiotiques conventionnels agissent sur des cibles intracellulaires spécifiques (Kohanski *et al.*, 2010). A l'inverse, les peptides antimicrobiens, qui interagissent avec les membranes microbiennes *via* des interactions électrostatiques, sont prometteuses contre les bactéries multi-résistantes (Brogden, 2005). Ces interactions entraînent un déplacement des lipides et donc une altération de la structure membranaire, voire même une entrée du peptide à l'intérieur de la cellule (Zasloff, 2002). En plus, ce type d'altération entraîne une pression de sélection bien plus faible pour le développement de résistance. Les

travaux de nano-ingénierie permettent d'augmenter le potentiel de ces peptides. Par exemple, Lam *et al.* (2016a) ont créé une nouvelle classe d'antibiotiques semi-synthétiques : des polymères peptidiques étoilés (SNAPP). Ils sont formés d'un cœur multifonctionnel de poly(amido amine) sur lequel sont greffés les différents peptides (fig. 5).

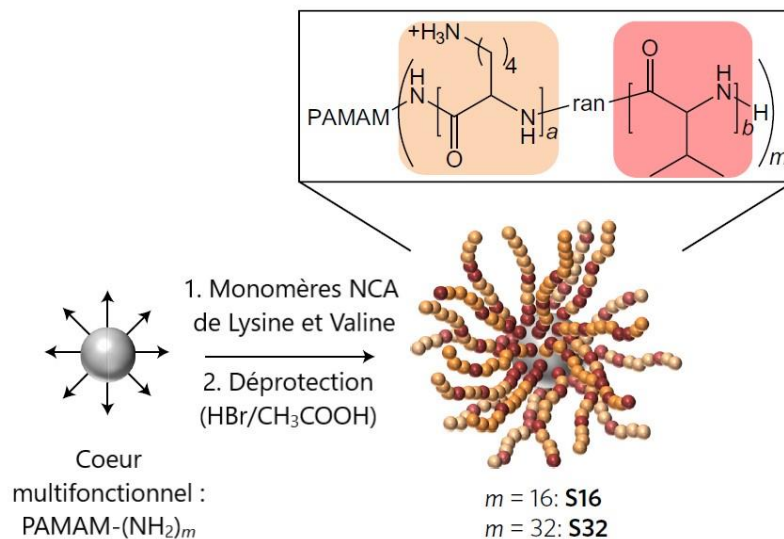


Figure 5 : Synthèse des SNAPP
avec NCA : *N*-carboxyanhydrides d' α -aminoacides
(d'après Lam *et al.* 2016a)

Ils sont particulièrement efficaces contre des souches à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (Lam *et al.*, 2016b ; Scorciapino *et al.*, 2017). En pénétrant dans la membrane externe des bactéries Gram négatives, la formation de pores conduit à une déstabilisation du flux ionique. Cette action est similaire sur la membrane interne ce qui mène, à la lyse de la cellule (Mei *et al.*, 2013) (fig. 6).

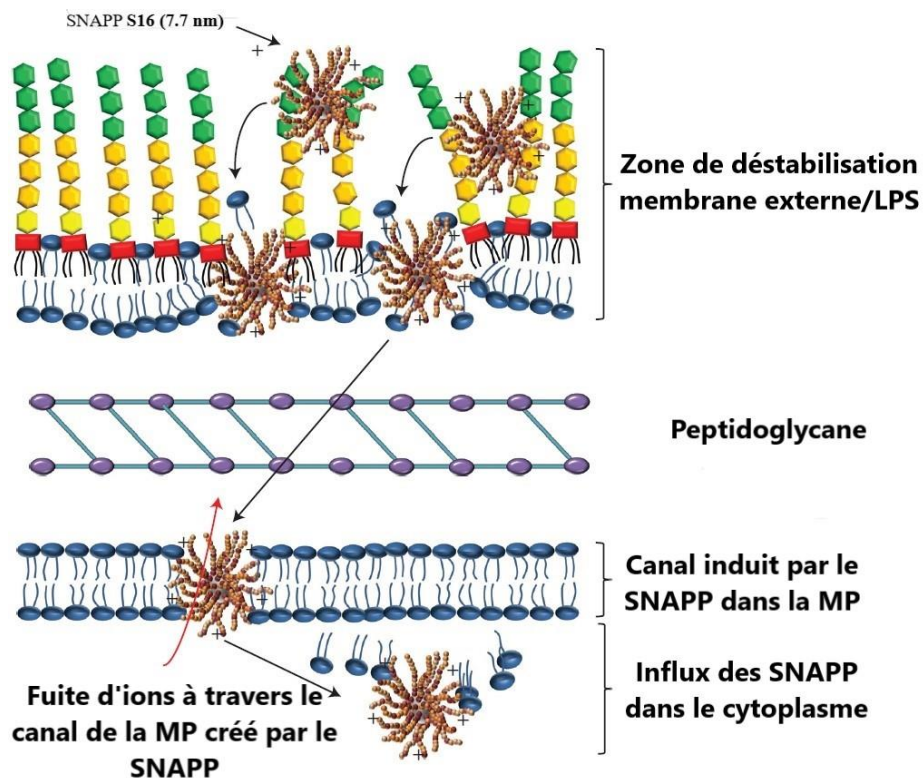


Figure 6 : Mécanisme d'action des polymères peptidiques étoilés (SNAPP) avec MP : membrane plasmique ; LPS : lipopolysaccharide (adapté de Lam *et al.*, 2016a)

Afin de montrer l'importance de la structure tridimensionnelle des SNAPP, les inventeurs ont synthétisé une molécule linéaire et ont testé son action sur *Escherichia coli* et *S. aureus*. Les concentrations minimales bactéricides (CMB) mesurées sont respectivement égales à 29,50 μM et 213,37 μM , soit au moins 40 fois supérieures à celle des SNAPP (0,72 μM et 4,58 μM), indiquant bien l'importance de l'architecture étoilée de ces derniers dans l'action antimicrobienne. De plus, ils ont été testés en longue durée (24 jours, soit près de 600 générations) sur des bactéries Gram négatives multi-résistantes et aucune des souches n'a développé de résistances à leur rencontre.

L'activité antimicrobienne de ces SNAPP a pu être également testée, pour la première fois, *in vivo*. Cette étude a été réalisée sur des souris souffrant de péritonite due à un pathogène multi-résistant. Les SNAPP se sont montrés extrêmement efficaces puisque le taux de survie des souris était de 100% contre seulement 50% pour celles traitées à l'imipénem (Lam *et al.*, 2016a).

1.1.2 Les différentes classes d'antibiotiques

Il existe plus de 15 classes d'antibiotiques qui, grâce notamment à leur grande variabilité chimique et structurale, agissent sur les bactéries à divers niveaux (Tableau 1).

Tableau 1 : Les principales classes d'antibiotiques et leurs modes d'action

Classe	Organisme d'origine	Mode d'action	Exemple	Structures chimiques (Singh et Barrett, 2006)
<i>Origine naturelle</i>				
β -lactames de 1 ^{ère} génération	<i>Penicillium notatum</i>	Inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane via blocage des transpeptidases	Pénicilline	
β -lactames de 2 ^{ème} génération	<i>Cephalosporum</i>		Céphalosporine	
Macrolides	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Fixation sur l'ARN 23 S de la sous-unité ribosomique 50 S → blocage de l'élongation peptidique pendant la traduction	Erythromycine	
Phénylpropanoïdes	<i>Streptomyces venezuelae</i>		Chloramphénicol	
Aminoglycosides	<i>Streptomyces ou Micromonospora</i>	Fixation sur la sous-unité ribosomique 30 S → blocage en partie de la traduction + erreurs de lecture	Streptomycine	
Tétracyclines	<i>Streptomyces</i>	Fixation sur la sous-unité ribosomique 30 S → blocage de la traduction	Tétracycline	
<i>Origine synthétique</i>				
Sulfamides	∅	Inhibition de la synthèse de l'acide folique entraînant une diminution de la production de base des bactéries	Sulfaméthoxazole	
Quinolones et fluoroquinolones	∅	Inhibition de la gyrase bactérienne	Ciprofloxacine	

Ces différentes classes se distinguent par la variété des cibles visées.

1.2 Les cibles des antibiotiques

Les fonctions métaboliques ou physiologiques bactériennes sont les cibles préférentielles des antibiotiques (fig. 7).

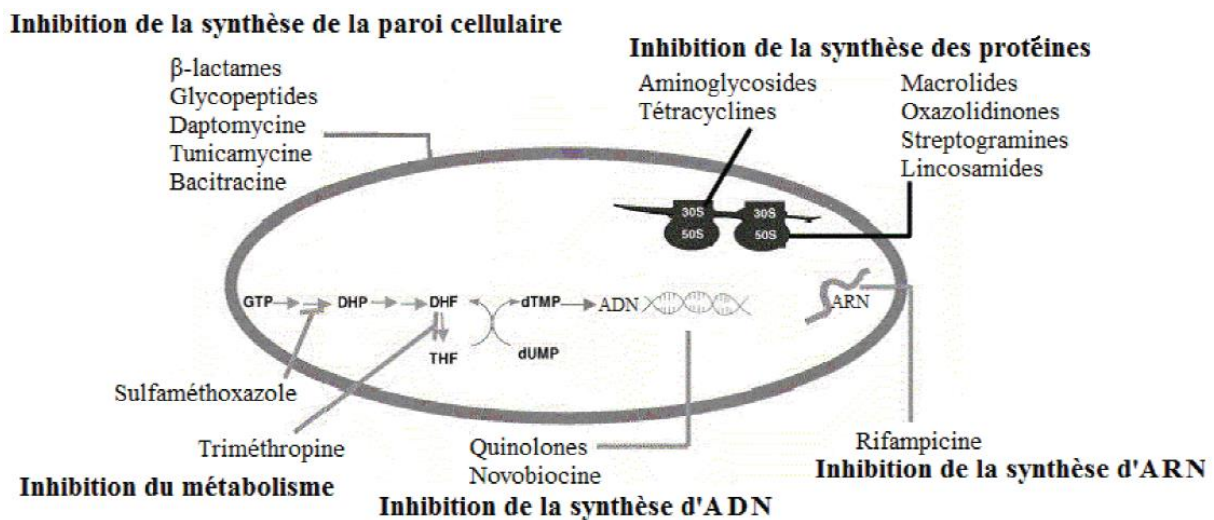


Figure 7 : Les différents sites d'action des antibiotiques avec DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF tétrahydrofolate (adapté de Singh et Barrett, 2006)

Néanmoins cette haute spécificité d'action des molécules antibiotiques, combinée aux très fortes capacités d'évolution et d'adaptation des bactéries, aide à la sélection de mutants résistants.

1.3 La résistance bactérienne

De nos jours, les bactéries pathogènes posent de plus en plus de problèmes dans le domaine de la santé à cause de l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques. De plus, les mécanismes d'acquisition de la résistance aux antibiotiques sont nombreux et variés.

1.3.1 La résistance innée

La résistance est dite innée, ou naturelle, quand toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. Par exemple, les β-lactames inhibent la synthèse du peptidoglycane qui est le composant principal de la paroi bactérienne. Les bactéries du genre *Mycoplasma* sp, dépourvues de cet élément constitutif, sont, de ce fait, naturellement

résistantes à cette catégorie d'antibiotiques (Normark et Normark, 2002). Les bactéries peuvent également produire des molécules contre les antibiotiques comme la β -lactamase L2 de *Stenotrophomonas maltophilia* (Avison *et al.*, 2002).

1.3.2 La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque seules quelques souches d'une même espèce deviennent résistantes à un antibiotique auquel elles sont, à la base, sensibles. Cette résistance peut être acquise soit par transfert de gène soit par mutation.

Le transfert de gènes peut se produire par acquisition de petits éléments génétiques mobiles tels les transposons ou les plasmides et ce au cours de 3 processus majeurs (Levy et Marshall, 2004) (fig. 8) :

- la transduction correspond à la transmission d'ADN entre deux bactéries par un bactériophage ;
- la conjugaison est un transfert de plasmides s'effectuant grâce à des pili sexuels ;
- la transformation représente l'assimilation de courts fragments d'ADN, présents dans l'environnement, par des bactéries naturellement transformables. Cet ADN présent à l'état libre provient de la lyse d'autres bactéries.

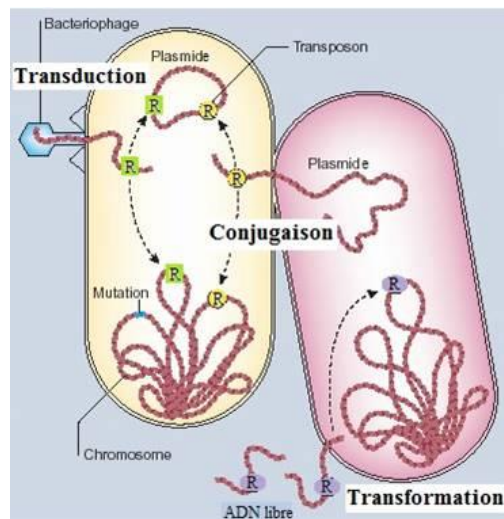


Figure 8 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques (adapté de Levy et Marshall, 2004)

Le second mode d'apparition de résistances provient des mutations (résistance chromosomique). La fréquence des mutations spontanées, menant à une résistance aux

antibiotiques, est de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} . Une fois les gènes de résistance développés, ils sont transmis directement à la descendance lors de la réplication de l'ADN : c'est le transfert vertical de gènes. De ce fait, les bactéries mutantes se développent alors que les souches sauvages ne survivent pas. Cette résistance, dite chromosomique, pose de plus en plus de problèmes car l'usage à grande échelle d'antibiotiques contribue d'autant plus à la sélection de mutants résistants (Goossens *et al.*, 2006). Ce phénomène est donc notamment favorisé par l'usage souvent excessif et inapproprié des antibiotiques et à la présence de souches dites « hypermutables ». C'est le cas notamment de *P. aeruginosa* qui présente un taux de mutations spontanées pouvant être jusqu'à mille fois supérieur à la normale. Cette faculté lui permet de créer facilement des mutants résistants à de très larges gammes d'antibiotiques, notamment dans les infections chroniques des poumons (Maciá *et al.*, 2005).

1.3.3 Les mécanismes de la résistance bactérienne

Afin de survivre à l'action des antibiotiques, les bactéries ont développé trois types de mécanismes de résistances (fig. 9). Les stratégies mises en place vont viser soit directement les molécules soit modifier des paramètres physiologiques de la bactérie.

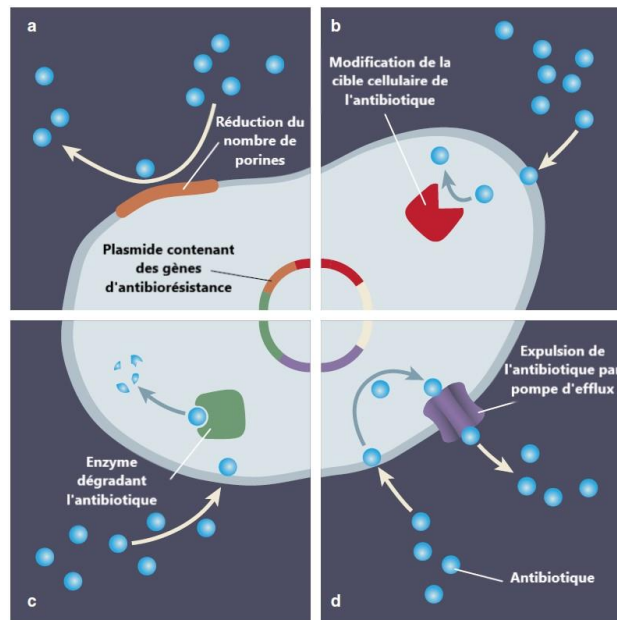


Figure 9 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques
avec a,d : l'antibiotique ne peut atteindre sa cible
b : la cible de l'antibiotique est modifiée
c : l'antibiotique est inactivé avant d'atteindre sa cible
 (adapté de Dantas et Sommer, 2014)

Les principaux mécanismes sont : la modification de la cible des antibiotiques, la production d'enzymes capables de dégrader les antibiotiques et la réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotiques par surexpression de pompes d'efflux et/ou modification de la perméabilité membranaire.

1.3.3.1 Modification de la cible cellulaire des antibiotiques

L'acquisition d'une faculté de résistance, grâce à un transfert de gène vertical ou horizontal, peut mener à l'apparition d'un premier mécanisme de résistance : l'altération de la cible d'un antibiotique (Lambert, 2005). Ces modifications/altérations diminuent la sensibilité de la cible aux possibles attaques. Les cibles modifiables sont extrêmement variées.

Neisseria gonorrhoeae, l'agent responsable de la blennorragie, infection sexuellement transmissible, présente des résistances importantes aux pénicillines. *N. gonorrhoeae* possède 4 transpeptidases bien caractéristiques : des protéines présentant une affinité spécifique pour la pénicilline, les PLP (Protéines Liant la Pénicilline) 1, 2, 3 et 4 (Barbour, 1981). Les deux premières sont facilement altérées. En effet, une mutation des gènes *ponA* et *penA*, respectivement impliqués dans l'expression de PLP 1 et PLP 2, mène à une réduction du taux d'acylation de la pénicilline de 3 à 4 fois pour PLP 1 et 5 à 10 fois pour PLP 2 (Spratt, 1988 ; Ropp *et al.*, 2002).

Les fluoroquinolones agissent en inhibant deux enzymes impliquées dans la synthèse du chromosome bactérien : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Hooper, 2001). La résistance bactérienne à ces antibiotiques peut provenir de mutations dans ces enzymes comme une réduction de l'affinité entre l'antibiotique et le complexe gyrase-ADN (Hooper, 1999).

En plus d'altérer la cible, la concentration de l'antibiotique peut également être modifiée. En effet, il a été montré que la résistance à la vancomycine de *S. aureus* pouvait être due à un doublement de l'épaisseur de la paroi bactérienne. L'augmentation des sites d'affinité pour la vancomycine entraîne un piégeage de l'antibiotique qui ne peut plus rejoindre la membrane cytoplasmique, son site d'action privilégié (Cui *et al.*, 2003).

1.3.3.2 Modification et dégradation enzymatique des antibiotiques

Parmi les modes de résistance développés par les bactéries, la synthèse d'enzyme permet de modifier et/ou de détruire les antibiotiques. Différentes réactions comme

l'hydrolyse enzymatique, le transfert de groupement ou bien des procédés d'oxydo-réduction (Davies, 1994) sont les plus couramment utilisés (Tableau 2).

Tableau 2 : Mécanismes et cibles des enzymes de résistance aux antibiotiques (adapté de Kumar et Varela, 2013)

Mécanisme	Protéine bactérienne – Cible responsable	Antibiotiques ciblés
Hydrolyse	β -lactamases	β -lactames
	Estérase	Macrolides
	Complexe C-P lyase	Fosfomycine
Transfert de groupements	Acétyltransférases	Streptogramines, aminoglycosides, chloramphénicol
	Phosphotransférases	Aminoglycosides, macrolides
	Nucléotidyltransférases	Lincomycine, clindamycine, aminoglycosides
	Glycosyltransférase	Macrolides
	Ribosyltransférase	Rifampicine
	Thiol transférase	Fosfomycine
Oxydo-réduction	TetX	Tétracyclines

L'exemple d'inactivation enzymatique des antibiotiques le plus répandu est celui de la production de β -lactamases, qui est le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines des bactéries Gram négatives. Ces enzymes vont hydrolyser le cycle β -lactame des pénicillines et des céphalosporines. Deux types de β -lactamases, ayant un mode d'action différent, sont connus, suivant qu'elles aient au niveau de leur site actif, soit un résidu sérine, soit des ions métalliques comme le Zn^{2+} (métallo- β -lactamases) (fig. 10).

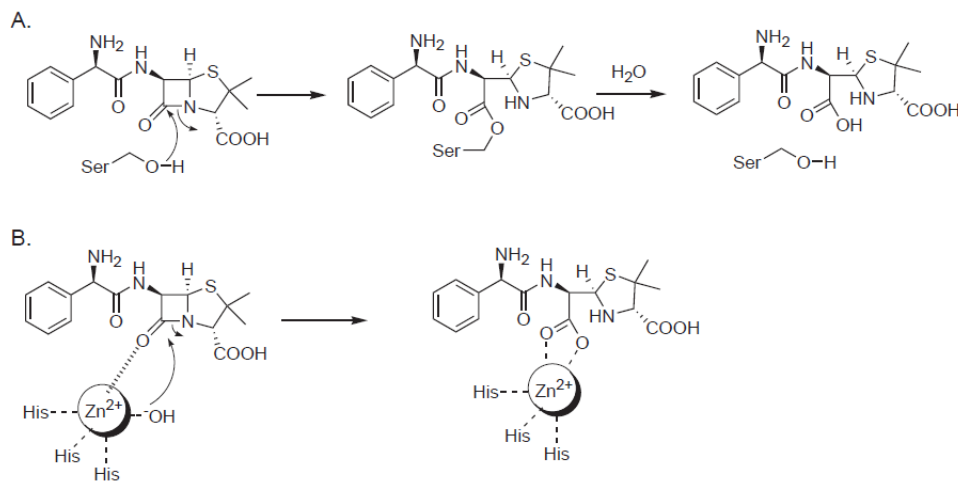


Figure 10 : Mode d'action des β -lactamases à sérine (A) et des métallo- β -lactamases (B) contre l'amoxicilline (d'après Wright, 2005)

Afin de contrer cette dégradation enzymatique, de nouvelles molécules ont été synthétisées dans lesquelles la protection du noyau β -lactame est assurée par l'augmentation du nombre de groupements chimiques qui l'entoure. De ce fait, l'activité antibactérienne est restaurée puisque l'enzyme a plus de difficultés à accéder à sa cible. Si l'on compare les structures chimiques de la première et de la cinquième génération de céphalosporine (fig. 11), l'augmentation de la taille des groupements chimiques qui entourent le noyau β -lactame du ceftobiprole est plus importante.

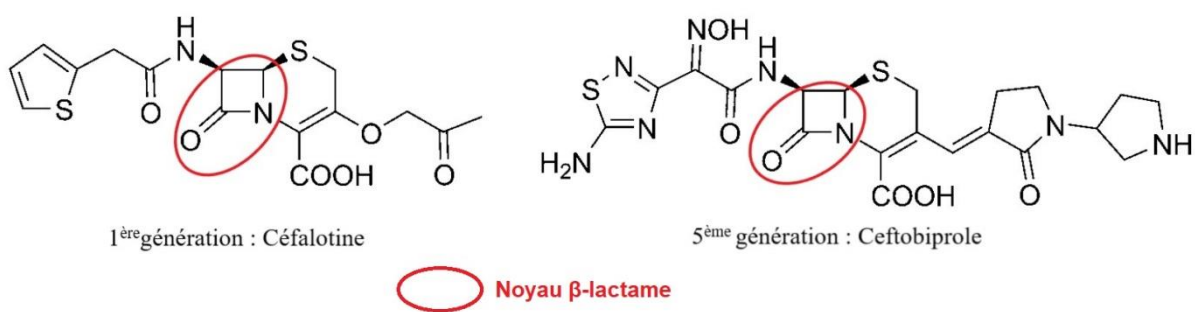


Figure 11 : Structures chimiques de la 1^{ère} et 5^{ème} génération de céphalosporines (d'après Pascale et Wright, 2010)

Les antibiotiques peuvent être également inactivés par des modifications structurales médiées par transfert de groupements fonctionnels, comme des groupements phosphates, des acyles, des ribosyles, ou thiols (Wright, 2005). L'O-acétylation enzymatique du

chloramphénicol par la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) est, par exemple, responsable de son inactivation (Murray *et al.*, 1991 ; Schwarz *et al.*, 2004) (fig. 12).

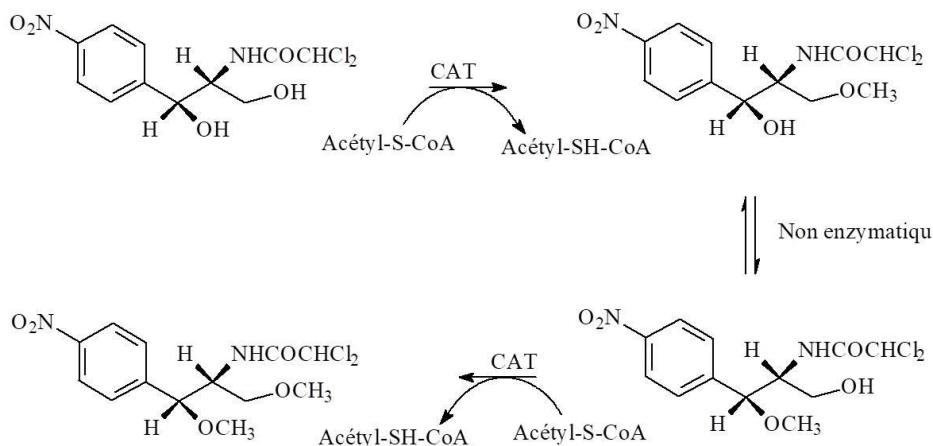


Figure 12 : Réactions enzymatiques et non-enzymatiques permettant la formation d'adduits acétylés du chloramphénicol

Plus rarement, les bactéries utilisent les réactions d'oxydoréduction impliquant la monooxygénase flavine dépendante TetX pour inactiver les antibiotiques. Cette enzyme va pouvoir transférer un groupement hydroxyle à la tétracycline en position 11. Elle va ainsi diminuer sa capacité à séquestrer l'ion magnésium qui est le point central de liaison entre la tétracycline et sa cible bactérienne (Park et Levy, 1988 ; Yang *et al.*, 2004) (fig. 13).

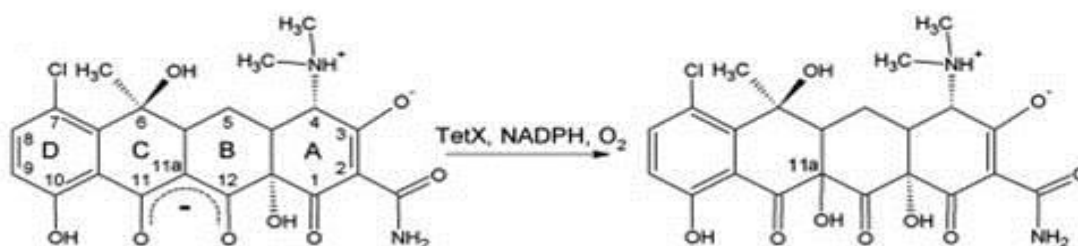


Figure 13 : Inactivation de la tétracycline par l'enzyme TetX (D'après Yang *et al.*, 2004)

Cette enzyme se retrouve sur un transposon et est responsable de la résistance à la tigecycline, une tétracycline de troisième génération (Moore *et al.*, 2005).

1.3.3.3 Réduction de la concentration intracellulaire en antibiotiques

Les bactéries peuvent mettre en place deux stratégies : la première consiste à empêcher ou réduire la pénétration de l'antibiotique dans la cellule en modifiant sa perméabilité membranaire. La seconde consiste en l'expulsion de l'antibiotique grâce à des pompes d'efflux membranaires. Des cas de multi-résistances peuvent également être dus à la combinaison de ces deux possibilités.

1.3.3.3.1 Réduction de la perméabilité membranaire

Les bactéries Gram positives (fig. 14b) ont une membrane plasmique surmontée d'une paroi qui est surtout constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane portant des inclusions d'acides teichoïques. Par contre, les bactéries Gram négatives (fig. 14a) possèdent deux membranes plasmiques (interne et externe) entourant une fine couche de peptidoglycane. La membrane externe est composée de glycolipides, principalement le lipopolysaccharide (LPS) (Kamio et Nikaido, 1976).

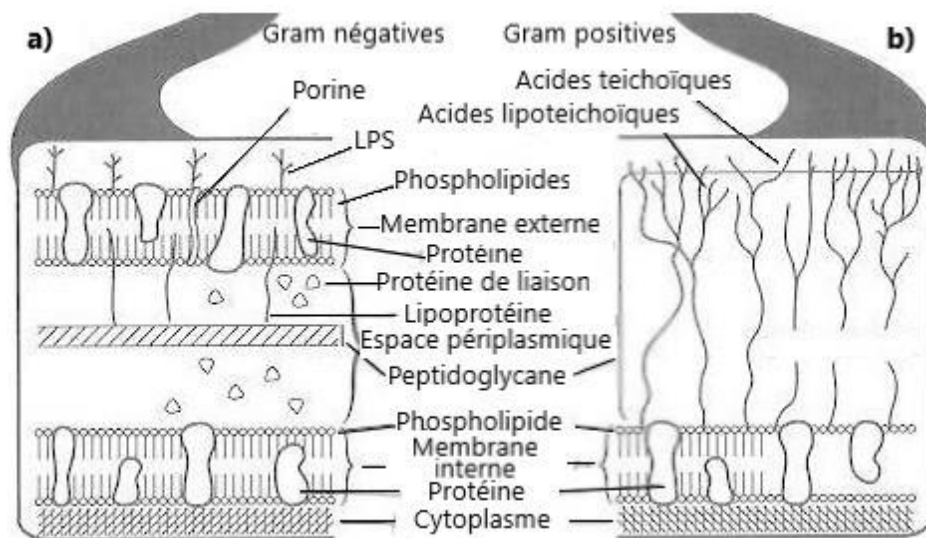


Figure 14 : Comparaison de la paroi chez les bactéries Gram négatives et positives (adapté de Salton et Kim, 1996)

Le LPS se compose de trois parties spécifiques : le lipide A, qui l'ancre à la membrane, un oligosaccharide intermédiaire et une chaîne polysaccharidique, l'antigène O. Il permet de rendre, par son caractère hydrophile, la membrane imperméable aux molécules hydrophobes comme certains antibiotiques (Lewis et Ausubel, 2006). De plus, cette molécule

est bien connue car elle est responsable du choc endotoxique associé à la septicémie pouvant être causée par les bactéries Gram négatives (Raetz et Whitfield, 2002).

L'efficace protection induite par le LPS est également couplée au fait que les porines limitent également la diffusion de molécules hydrophiles d'une masse moléculaire supérieure à 700 Da (Nikaido, 2003). Certains cas de résistance sont dus à une diminution de l'expression génétique des porines (Chow et Shlaes, 1991 ; Epp *et al.*, 2001) ou à leur modification structurale. En effet, Dé *et al.* (2001) ont mis en évidence que, chez une souche résistante d'*Enterobacter aerogenes*, la porine majoritaire (homologue OmpC/OmpF) présente des modifications qui conduisent à une réduction de la conductance de près de 70%, une sélectivité trois fois plus importante pour les cations et aucune sensibilité à la tension électrique par rapport à la protéine de la souche sensible.

1.3.3.3.2 L'efflux membranaire bactérien

Les bactéries peuvent avoir recours à un système d'efflux actif pour diminuer la concentration intracellulaire en antibiotique. Ces pompes permettent de rejeter dans le milieu extérieur les antibiotiques ayant pu pénétrer dans la cellule afin qu'ils n'atteignent pas une concentration létale pour la bactérie. Elles ont été observées pour la première fois dans un cadre de résistance à la tétracycline, à la fin des années 1970, chez *E. coli* (Levy et McMurry, 1978). La plupart de ces systèmes ne sont pas « antibio-spécifiques » et peuvent effluer un grand nombre de classes d'antibiotiques (ou d'autres molécules), ce qui fait qu'une bactérie possédant un système d'efflux est souvent multi-résistante (Kumar et Schweizer, 2005).

Il existe cinq types de pompes d'efflux (fig. 15) qui vont notamment se différencier par l'énergie fournie ainsi que le type de molécules effluées.

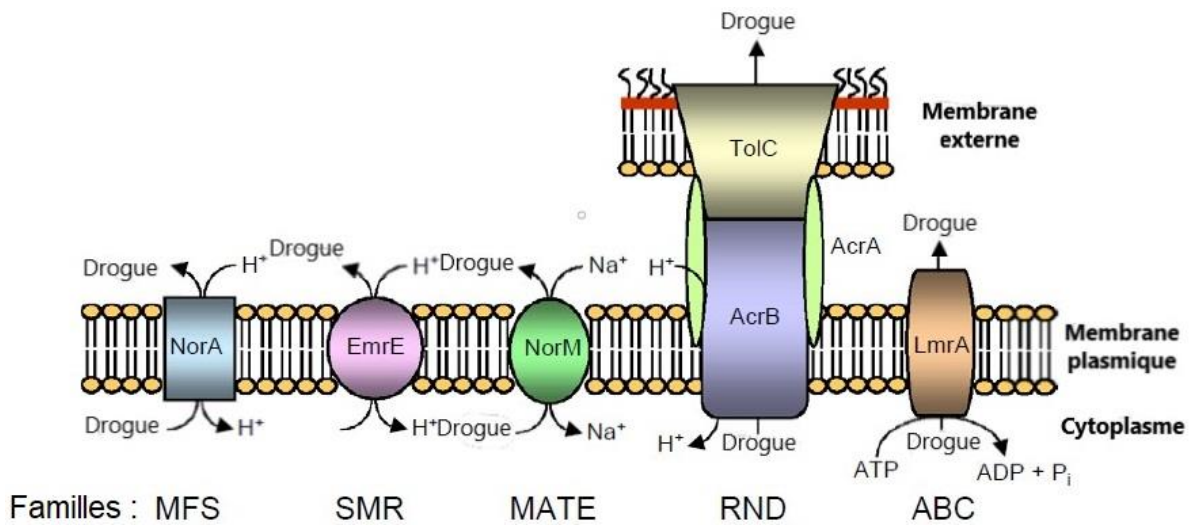


Figure 15 : Représentation schématique des 5 grandes familles de pompes d'efflux bactérien (adapté de Kumar et Schweizer, 2005)

La superfamille des MFS (Major Facilitator Superfamily) est la plus grande famille de transporteurs car on la retrouve chez tous les êtres vivants. Cette famille utilise tous les types de transports (Du *et al.*, 2018) :

- Uniport → transport du substrat sans couplage ionique ;
- Symport → couplage du transport du substrat et d'ions dans le même sens ;
- Antiport → couplage du transport du substrat et d'ions dans des directions opposées.

L'efflux d'antibiotique est conféré par les familles d'antiports DHA1 et DHA2 de type antibiotique/H⁺. Dans cette famille, le transporteur MdfA d'*E. coli* (Protein DataBank identifier :4ZOW) peut lier le chloramphénicol (Heng *et al.*, 2015), ou bien encore la pompe NorA de *S. aureus* est responsable de sa résistance aux fluoroquinolones (Yoshida *et al.*, 1990).

La famille des SMR (Small Multidrug Resistance) (Paulsen *et al.*, 1996) est de petite taille avec seulement 4 domaines transmembranaires, fonctionnant en homo ou hétérodimères (Bay *et al.*, 2008). Plus de 250 transporteurs SMR peuvent être codés par le chromosome bactérien, des plasmides et/ou associés à des intégrons (Li et Nikaido, 2009). Leur spécificité peut s'étendre jusqu'à l'efflux de puissants antibiotiques comme les aminoglycosides. La pompe EmrE d'*E. coli* compte parmi les membres les plus représentatifs de cette famille (Kumar et Schweizer, 2005).

Récemment, Hassan *et al.* (2015) ont présenté l'AceI (protéine d'efflux de la chlorhexidine d'*Acinetobacter*) qui, malgré ses similitudes avec les SMR, est considérée comme une nouvelle famille de pompes d'efflux. AceI et ses homologues confèrent un pouvoir de résistance à de nombreuses molécules antimicrobiennes telles la chlorhexidine, la proflavine, l'acriflavine ou le benzalkonium.

La superfamille des MATE (MultiDrug and Toxic compound Extrusion) (Brown *et al.*, 1999) est semblable à celle des pompes MFS mais n'a pas de similitude de séquence avec elle. Pour fonctionner, elle utilise un gradient de proton ou de Na⁺ afin d'effluer de nombreux antibiotiques comme les fluoroquinolones, les aminoglycosides ainsi que de nombreux composés cationiques (Mohanty, 2012). La pompe NorM de *N. gonorrhoeae* (PDB : 4HUN) peut lier et effluer la rhodamine 6G (Du *et al.*, 2018).

La superfamille des RND (Resistance-Nodulation cell Division) (Saier *et al.*, 1994) est la principale cause de résistance chez les bactéries Gram négatives. Les transporteurs RND utilisent un système antiport de type H⁺/substrat et sont constitués d'un complexe protéique tripartite. Chez *E. coli*, le système AcrAB-TolC est constitué de la pompe RND AcrB, de la protéine de fusion membranaire AcrA et de la protéine de membrane externe TolC (Ma *et al.*, 1995). Le système MexAB-OprM de *P. aeruginosa* permet d'effluer de très nombreuses molécules antibiotiques incluant les β-lactames (et la plupart des carbapénèmes), les macrolides, les tétracyclines et les aminoglycosides (Lister *et al.*, 2009 ; Dreier et Ruggerone, 2015).

La superfamille des ABC (ATP-Binding Cassette) est rare dans le monde bactérien (Kumar et Schweizer, 2005). Néanmoins, ces pompes d'efflux sont essentielles au métabolisme de la bactérie (van Veen et Konings, 1998) car elles peuvent transporter de nombreuses substances d'intérêt (ions métalliques, acides aminés, protéines, sucres). Le transport est régi par l'activité ATPasique de la pompe. Il est intéressant de noter que, suite à des alignements de séquences, de fortes similitudes ont été démontrées entre le transporteur ABC LmrA de *Lactobacillus lactis* et la transporteur RND MexB de *P. aeruginosa* (Kim *et al.*, 2004).

2. Les stratégies innovantes de lutte contre la résistance bactérienne

La première stratégie consiste en la recherche de nouveaux agents antimicrobiens *via* une action létale « directe » contre la cellule bactérienne. L'action de la majorité des antibiotiques actuels se fait sur des processus cellulaires bien spécifiques tels que la synthèse des protéines, de l'acide folique, de l'ADN, de l'ARN ou bien de la paroi bactérienne (Makarov *et al.*, 2009 ; Bax *et al.*, 2010 ; Phillips *et al.*, 2011). De plus, la découverte de nouveaux antibiotiques se fait de plus en plus rare et la plupart des nouvelles molécules mises sur le marché ne sont, pour la grande majorité, que des dérivés d'antibiotiques déjà connus, dont la structure a été modifiée afin d'en améliorer l'activité et la stabilité.

La « redécouverte » des thérapies par utilisation de bactériophages peut être un facteur important dans l'avènement de l'ère post-antibiotique. La très forte spécificité de ces phages pour les cellules bactériennes pourrait offrir une alternative sûre aux antibiotiques conventionnels.

D'un autre côté, il est possible de cibler une action « indirecte » sur les bactéries grâce à des molécules limitant leur virulence ou capable d'inhiber les pompes d'efflux.

L'inhibition du quorum sensing apparaît également comme une voie de recherche prometteuse. La connaissance des mécanismes de la voie du quorum sensing offre la possibilité de développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour atténuer la virulence bactérienne (Rasmussen et Givskov, 2006).

2.1 La phagothérapie

Les bactériophages sont définis comme « les organismes les plus ubiquitaires sur terre, jouant un rôle très important dans le maintien de l'équilibre de la population microbienne sur la planète » (Sulakvelidze, 2011). Avec une population totale estimée à près de 10^{32} bactériophages, cela en fait l'entité biologique la plus abondante sur la planète (Suttle, 2007). A ce jour, plus de 6 000 bactériophages différents ont été découverts et décrits morphologiquement (Ackermann et Prangishvili, 2012).

Les bactériophages sont des entités biologiques à la fois très simples et très diverses consistant en de l'acide nucléique (ADN ou ARN) contenu dans une capsidie protéique peut être injecté dans l'hôte à infecter (fig. 16).

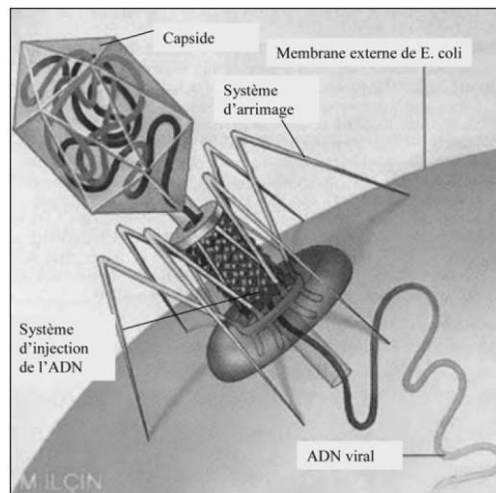


Figure 16 : Illustration de la structure du bactériophage T4 (d'après Ravat *et al.*, 2015)

Ces virus sont des parasites obligatoires, spécifiques des bactéries, qui ont donc besoin de leurs hôtes pour assurer leur reproduction sous forme de nouveaux virions. Ils présentent deux modes de reproduction spécifiques : le cycle lytique ou le cycle lysogénique (fig. 17).

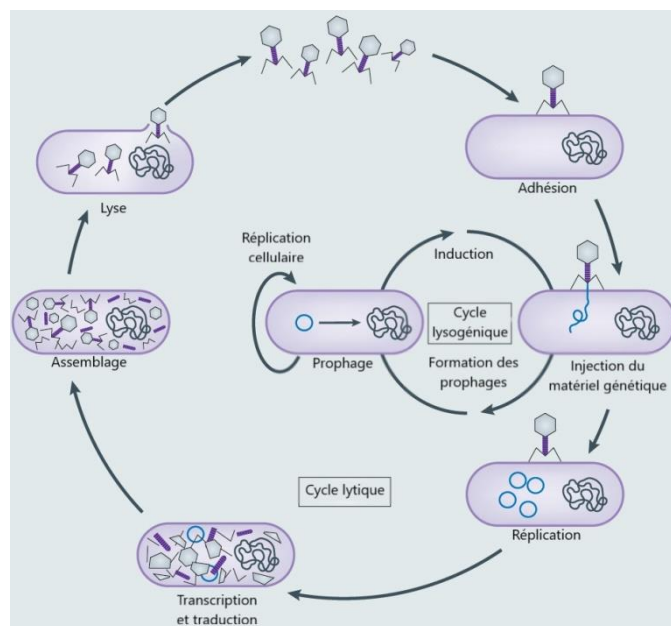


Figure 17 : Illustration des deux types cycles de vie des phages (adapté de Salmond et Fineran, 2015)

Pour infecter une bactérie, le phage devra, en premier lieu, adhérer à la surface bactérienne *via* une interaction avec des récepteurs spécifiques. Une fois l'attachement réalisé,

il pourra injecter son génome dans l'hôte. La stratégie de répllication du phage sera dépendante du fait que le phage sera de type virulent ou « tempéré ».

Les phages virulents, comme le phage T4, spécifique d'*E. coli*, ne peuvent se répliquer que par la voie lytique. A l'inverse, les phages dits « tempérés » ont la capacité de contaminer la bactérie en intégrant leur matériel génétique de façon stable : c'est le phénomène de transduction. Il peut d'ailleurs donner lieu, pour l'hôte, à l'acquisition de nouveaux gènes de résistance. Dans ce cas de lysogénie, le génome intégré est alors qualifié de prophage et se réplique de concert avec celui de la bactérie, qu'il soit directement inséré dans le chromosome bactérien ou libre sous forme « plasmidique » (Salmond et Fineran, 2015).

2.1.1 L'utilisation des phages contre des pathogènes importants

Pour combattre une septicémie intestinale induite par *P. aeruginosa*, Watanabe *et al.* (2007) ont montré que l'ingestion par voie orale de phages a pu sauver près de 66,7% d'une population de souris contre 0% du groupe témoin. L'application locale de phages spécifiques chez six patients diabétiques souffrant d'ulcères au pied, provoqués par un *S. aureus* multi-résistant, a permis une rémission complète (Fish *et al.*, 2016).

Des « cocktails de phages » ont également été utilisés, permettant ainsi un plus large spectre d'action. Ces derniers se sont montrés efficaces dans le traitement d'infections à *P. aeruginosa* résistants sur différentes muqueuses : la peau, le tractus intestinal ou encore les poumons (Soothill, 1992 ; Watanabe *et al.*, 2007). D'autres études ont montré des résultats similaires pour traiter des infections à germes multi-résistants tels *E. coli* O25:H4-ST131 (Pouillot *et al.*, 2012) ou *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 (Jun *et al.*, 2014). Néanmoins, il convient d'être mesuré quant à l'utilisation de cocktails de phages « standards » peu spécifiques (Chan *et al.*, 2013), qui pourraient interférer avec le microbiote de l'hôte en altérant sa flore commensale. (Mai *et al.*, 2015 ; Galtier *et al.*, 2016 ; Hong *et al.*, 2016).

2.1.2 Le développement d'enzymes lytiques dérivées des phages

L'isolement des enzymes lytiques (lysines) codées par les phages est une stratégie prometteuse sachant que les phages peuvent être immunogènes (Matsuzaki *et al.*, 2005). Les lysines sont des enzymes spécifiques des bactériophages, qui induisent la lyse de la paroi bactérienne (fig. 18) des bactéries Gram positives, entraînant leur mort (Nelson *et al.*, 2001 ; Trudil, 2015).

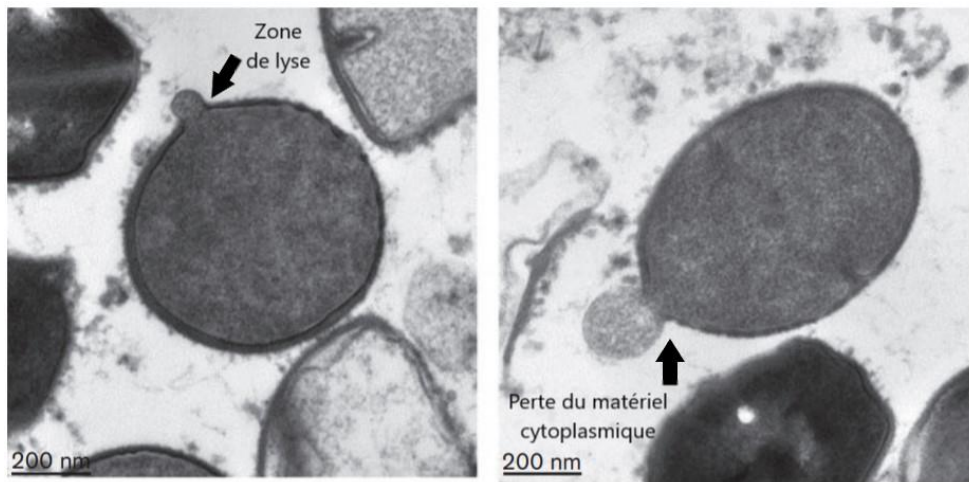


Figure 18 : Action de la lysine ClyS contre un SARM causant une perturbation du peptidoglycane et une lyse hypotonique en moins d'une minute (d'après Pastagia *et al.*, 2013)

10 ng de ces enzymes peuvent lyser 10^7 bactéries en moins de 30 secondes (Schuch *et al.*, 2002 ; Fischetti, 2005).

Parmi les lysines les plus connues pour leur action hydrolytique du peptidoglycane, les endopeptidases clivent les ponts peptidiques, les *N*-acétylmuramoyl-*L*-alanine amidases coupent la liaison amide reliant le fragment glycanique et le peptide de base, les *N*-acétyl- β -glucosaminidases et les *N*-acétylmuramidases (glycosidases) hydrolysent les liaisons glycosidiques du brin glycanique (Díaz *et al.*, 1990) (fig. 19).

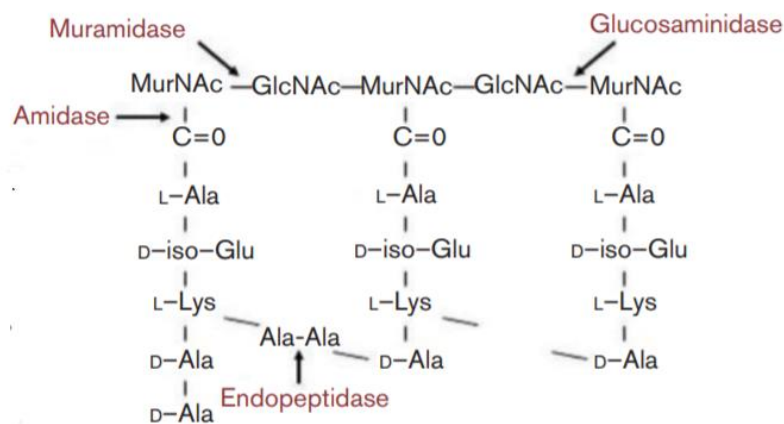


Figure 19 : Liaisons du peptidoglycane sensibles à l'action des lysines (d'après Pastagia *et al.*, 2013)

Ces lysines ne dépendent pas de la croissance bactérienne et peuvent être dirigées directement contre les bactéries visées, grâce à leur spécificité, sans perturber la flore commensale (Trudil, 2015).

Les artilysines sont la combinaison d'un nanopeptide polycationique et d'une endolysine (pénétrant la membrane externe) ce qui leur confère un fort pouvoir bactéricide contre des bactéries telles *P. aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii*. Elles permettent de tuer ces souches multi-résistantes *in vitro* avec une réduction de 4 à 5 log dans les 30 premières minutes (Briers *et al.*, 2014).

2.2 Inhibition des pompes d'efflux membranaire

Différentes stratégies peuvent être utilisées afin de découvrir ou de produire de nouvelles molécules inhibitrices des pompes d'efflux (EPI).

2.2.1 Nouveaux antibiotiques et modification du design

La première stratégie consiste à créer ou modifier des antibiotiques qui n'auraient plus d'affinité pour les systèmes d'efflux ou bien leur ajouter de nouvelles chaînes latérales, afin de bloquer leur transport pour qu'ils ne soient plus rejetés hors de la cellule. Les systèmes AcrAB et MefA/E sont contournés par la télithromycine (Chollet *et al.*, 2004), il en est de même pour la tygécycline qui n'est pas reconnue par les pompes MFS spécifiques de la tétracycline (Chopra, 2002).

Une autre approche originale consiste en l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens afin d'inhiber l'expression des pompes d'efflux. Un oligonucléotide phosphorothioate anti-sens encapsulé dans un liposome anionique a permis de restaurer l'activité des fluoroquinolones chez *E. coli* (Meng *et al.*, 2012).

2.2.2 Altération des fonctions des pompes d'efflux

Les pompes d'efflux utilisent soit directement l'hydrolyse de l'ATP (transporteurs ABC), soit des gradients de Na⁺ (transporteurs MATE) ou un gradient de H⁺ (transporteurs SNR, MFS, PACE et RND). Des découpleurs énergétiques les empêchent de fonctionner comme la carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone qui dissipe la force protomotrice.

Des inhibiteurs compétitifs peuvent également être utilisés. La 13-cyclopentylthio-5-hydroxy tétracycline (13-CPTC) (fig. 20) se lie à la protéine TetB des bactéries comme *E. coli*

ou *S. aureus* résistantes aux tétracyclines ou à la doxycycline (Nelson *et al.*, 1993 ; Nelson and Levy, 1999).

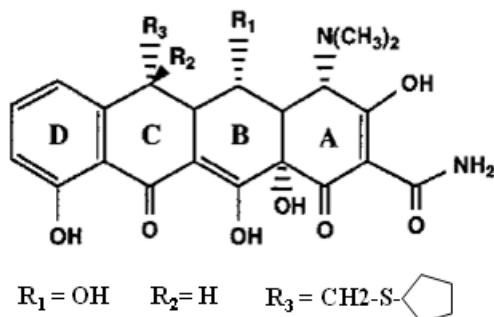


Figure 20 : Structure chimique de la 13-cyclopentylthio-5-hydroxy tétracycline (d'après Nelson et Levy, 1999)

Le PAβN (Phénylalanine Arginine β-Naphtylamide) (fig. 21). restaure l'activité de la levofloxacine et potentialise également l'activité du chloramphénicol, des oxazolidinones, de la rifampicine et des macrolides (kétolides) (Mamelli *et al.*, 2003 ; Zechini et Versace, 2009). Néanmoins, sa toxicité cellulaire rend impossible son utilisation pour de potentiels traitements.

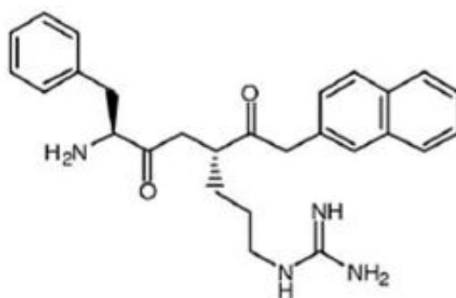


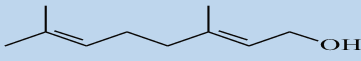
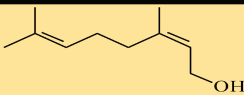
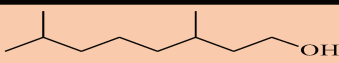
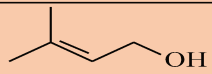
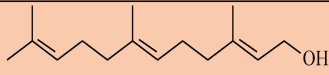
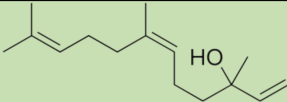
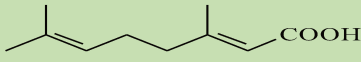
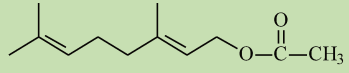
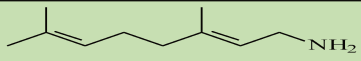
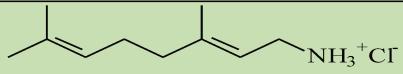
Figure 21 : Structure chimique du PAβN (Phe-Arg-β-Naphtylamide, MC-207,110) (d'après Pagès et Amaral, 2009)

Le géraniol ((2*E*)-3,7-diméthyl-octa-2,6-diène-1-ol) est aussi efficace que le PAβN (Lorenzi *et al.* 2009). *E. aerogenes* (EAEP289), un mutant sensible de la souche EA 27 (isolat clinique multi-résistant) qui surexprime les pompes d'efflux Acr-AB-TolC (Mallea *et al.*, 1998 ; Pradel et Pagès, 2002) est résistante au chloramphénicol, qui présente une CMI de 1024 mg.L⁻¹. L'utilisation du géraniol permet d'abaisser drastiquement la CMI de cet antibiotique à 64 mg.L⁻¹ la rendant ainsi égale à celle du PAβN. La combinaison du géraniol

avec le PAβN fait chuter la CMI du chloramphénicol a un niveau encore plus bas, puisque inférieure à 0,25 mg.L⁻¹.

La détermination des motifs structuraux nécessaires à l'efficacité de la molécule et à l'amélioration de la solubilité du géraniol ont été étudiés. Ainsi, de nombreuses molécules ont été criblées (Tableau 3).

Tableau 3 : CMI du chloramphénicol (CMI_{CL}) en présence des molécules testées pour l'identification de la relation structure-activité anti-efflux.

Produit	Formule	Solvant	CMI _{CL} (mg.L ⁻¹)
Géraniol		Méthanol DMSO	64
Nérol		Méthanol DMSO	256
Tétrahydrogéraniol		Méthanol DMSO	512
3-Méthyl-2-buten-1-ol		Méthanol DMSO	512
Farnésol		Méthanol DMSO	1024
Nérolidol		Méthanol DMSO	1024
Acide gérannique		Méthanol DMSO	> 1024
Acétate de géranyle		Méthanol DMSO	1024
Géranylamine		Méthanol DMSO	32
Chlorhydrate de Géranylamine		Eau	16

La comparaison de la CMI du chloramphénicol (CMI_{CL}) en présence du géraniol (64 mg.L⁻¹) avec celle de son isomère, le nérol (256 mg.L⁻¹), met en évidence la nécessité de la stéréochimie (E) au niveau du premier groupement isoprène.

D'ailleurs, le nombre de ces groupements dans la molécule semble lui aussi avoir une influence sur son efficacité. En effet, l'absence totale d'isoprène (CMI_{CL} tétrahydrogéraniol = 512 mg.L⁻¹), la présence d'un (CMI_{CL} 3-méthyl-2-buten-1-ol = 512 mg.L⁻¹) ou de trois (CMI_{CL} farnésol = 1024 mg.L⁻¹) groupement(s) réduisent considérablement l'activité anti-efflux.

Enfin, la fonction alcool primaire du géraniol semble permettre le maintien de l'efficacité de la molécule en comparaison de la fonction alcool tertiaire (CMI_{CL} nérolidol = 1024 mg.L⁻¹), acide (CMI_{CL} acide gérannique > 1024 mg.L⁻¹) ou ester (CMI_{CL} acétate de géranyle = 1024 mg.L⁻¹). Le remplacement de cette fonction alcool terminale par une fonction amine primaire, améliore légèrement l'activité obtenue (CMI_{CL} géranylamine = 32 mg.L⁻¹) et la formation du chlorhydrate permet d'optimiser non seulement l'activité (CMI_{CL} chlorhydrate de géranylamine = 16 mg.L⁻¹) mais aussi la solubilité de la molécule. Ce squelette a été utilisé par la suite pour produire des dérivés polyaminés présentant une activité intéressante. C'est le cas notamment des molécules NV 720 (fig. 22a) et NV 731 (fig. 22b) qui présentent des concentrations efficaces de 2,5 µM et 5 µM.

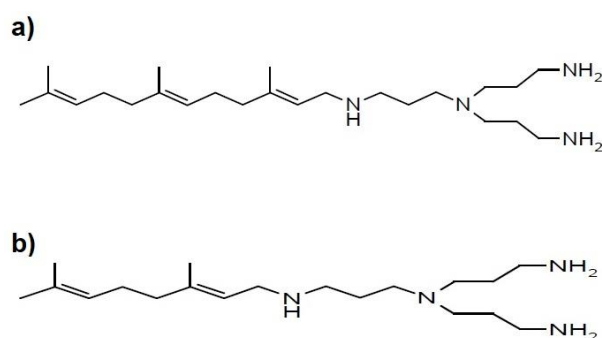


Figure 22 : Molécules dérivés de polyamines-isopropényles à action anti-efflux

L'utilisation de ces molécules en tant qu'inhibiteur des pompes d'efflux a fait l'objet d'un dépôt de brevet européen (n°11 305193.2).

2.3 Le quorum sensing

Le quorum sensing est un système de communication bactérien intercellulaire découvert par Nealson *et al.* (1970) sur la bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri*. Il permet à une population bactérienne de percevoir et évaluer sa densité cellulaire *via* la synthèse et la diffusion de petites molécules « signal » appelées auto-inducteurs. Ce système permet la coordination et la synchronisation de l'expression génétique à l'échelle d'une population (de Kievit et Iglewski, 2000) et l'amplification d'un comportement particulier (production de toxines, émission de lumière...) à l'échelle de la population bactérienne en déclenchant une réponse collective. Le quorum sensing contrôle également la formation et la

maturation du biofilm conférant aux bactéries la capacité d'adhérer à des surfaces autres que cellulaires, comme les biomatériaux implantés (cathéters, prothèses). A l'intérieur du biofilm, la sécrétion d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS) hydratée, adhésive et protectrice, permet une adhésion intercellulaire et à la surface colonisée. Le biofilm est donc une communauté multicellulaire sédentaire (homogène ou hétérogène), de structure complexe présentant une hétérogénéité spatiale et fonctionnelle (Bordi et de Bentzmann, 2011). Au sein du biofilm s'exercent une coopération métabolique, ainsi que des transferts horizontaux de gènes favorisant l'acquisition de nouveaux caractères et donc de potentielles facultés de résistance. La formation d'un biofilm est un processus dynamique s'effectuant en 5 étapes successives (fig. 23) :

- I- Rapprochement de la surface et adhésion transitoire réversible ;
- II- Adhésion forte et irréversible ;
- III- Formation de microcolonies et production des exopolysaccharides de la matrice ;
- IV- Croissance et maturation du biofilm ;
- V- Dispersion du biofilm et recolonisation.

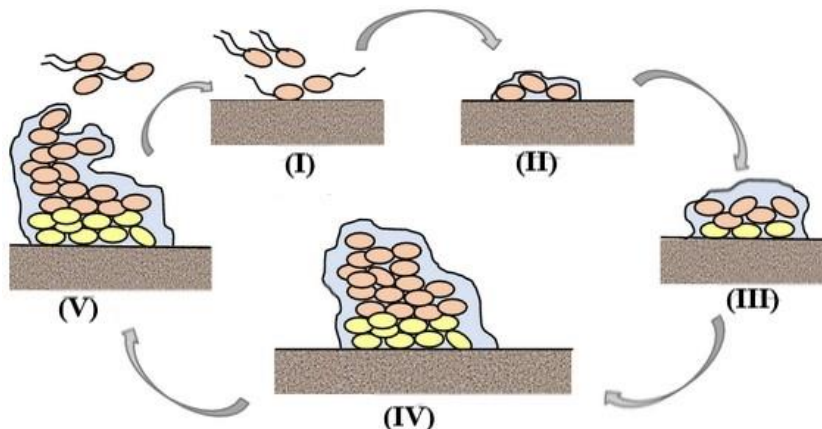


Figure 23 : Les différentes étapes de la formation du biofilm (d'après Soto, 2014)

Cette organisation en biofilm rend ainsi les bactéries plus résistantes à l'action des antibiotiques et les protège contre le système immunitaire de l'hôte infecté (Costerton *et al.*, 1999). Les biofilms compliquent d'ailleurs le traitement de nombreuses maladies, surtout quand ils sont constitués de bactéries responsables d'infections nosocomiales sévères comme *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Plus de 80% de ces infections sont d'ailleurs liées aux biofilms

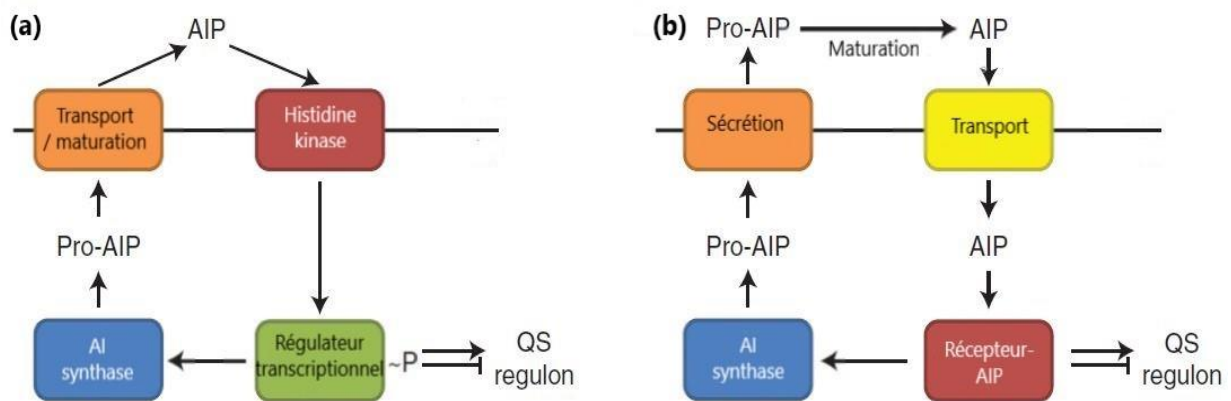
bactériens (Davies, 2003) car les bactéries sessiles sont beaucoup moins sensibles aux antibiotiques que leurs homologues planctoniques (Costerton *et al.*, 1999).

Une fois en biofilm, les bactéries vont pouvoir réguler leur quorum sensing. En effet, on sait que la sécrétion d'EPS pourra se produire en continu ou complètement stoppée ce qui permet de basculer l'utilisation de l'énergie pour la sécrétion d'EPS vers la croissance bactérienne et donc du biofilm, avant dissémination (Watnick et Kolter, 1999).

La connaissance des mécanismes moléculaires du quorum sensing offre l'opportunité de développer de nouvelles cibles thérapeutiques, visant à atténuer la virulence bactérienne, à défaut d'une action bactéricide directe (Rasmussen et Givskov, 2006).

2.3.1 Les mécanismes du quorum sensing

Les auto-inducteurs sont produits par la bactérie, rejetés dans le milieu extracellulaire où ils s'accumulent, leur concentration augmente alors avec la densité cellulaire. Lorsque leur concentration externe atteint un seuil critique, ils se lient à des protéines réceptrices. Le complexe protéine réceptrice/auto-inducteur, ainsi formé, agit comme activateur transcriptionnel de gènes spécifiques (gène de virulence, de bioluminescence...). Deux gènes principaux sont impliqués dans ce mécanisme (Engebrecht *et al.*, 1983) : le gène *luxI*, codant pour l'acyl-homosérine lactone synthase (LuxI) responsable de la biosynthèse de l'auto-inducteur qui est une acyl-homosérine lactone (AHL), et le gène *luxR* codant pour une protéine (LuxR), fixatrice de l'auto-inducteur qui joue le rôle d'activateur transcriptionnel en favorisant la transcription de l'opéron *luxICDABE*, responsable de la production de la luciférase et donc de la luminescence de *V. fischeri* (fig. 24).



**Figure 25 : Schémas des circuits du quorum sensing chez les bactéries Gram positives
 (a) : *via* un système à deux composants ; (b) : *via* régulation par l'AIP
 (Adapté de Rutherford et Bassler, 2012)**

Dans le cytoplasme, les AIP peuvent interagir avec le facteur de transcription et moduler les changements d'expression génétique (Rutherford et Bassler, 2012) (fig. 25b).

Chez *S. aureus*, les deux phases d'infections sont régulées grâce au quorum sensing. La première correspond à une faible densité cellulaire au cours de laquelle la sécrétion de facteurs protéiques va favoriser la colonisation. La seconde phase, où il y a une forte densité de population, pendant laquelle *S. aureus* va réprimer les facteurs protéiques et produire des toxines et des protéases nécessaires à l'infection (Lyon et Novick, 2004). Le passage d'une phase à l'autre est régulé par le système *Agr* qui est un opéron de 4 gènes (*agrA*, *agrB*, *agrC* et *agrD*). *agrB* et *agrD* codent pour des protéines qui vont pouvoir synthétiser des AIP qui sont des thiolactones cycliques. Ils se lient aux histidines kinases *AgrC* qui vont activer le facteur de transcription *AgrA* (Njoroge et Sperandio, 2009). La phosphorylation activatrice du régulateur *AgrA* va conduire à la sécrétion de l'effecteur RNAPIII menant directement à l'expression de différents facteurs de virulence comme des toxines, des lipases ou des protéases (George et Muir, 2007 ; Novick et Geisinger, 2008 ; Njoroge et Sperandio, 2009) (fig. 26).

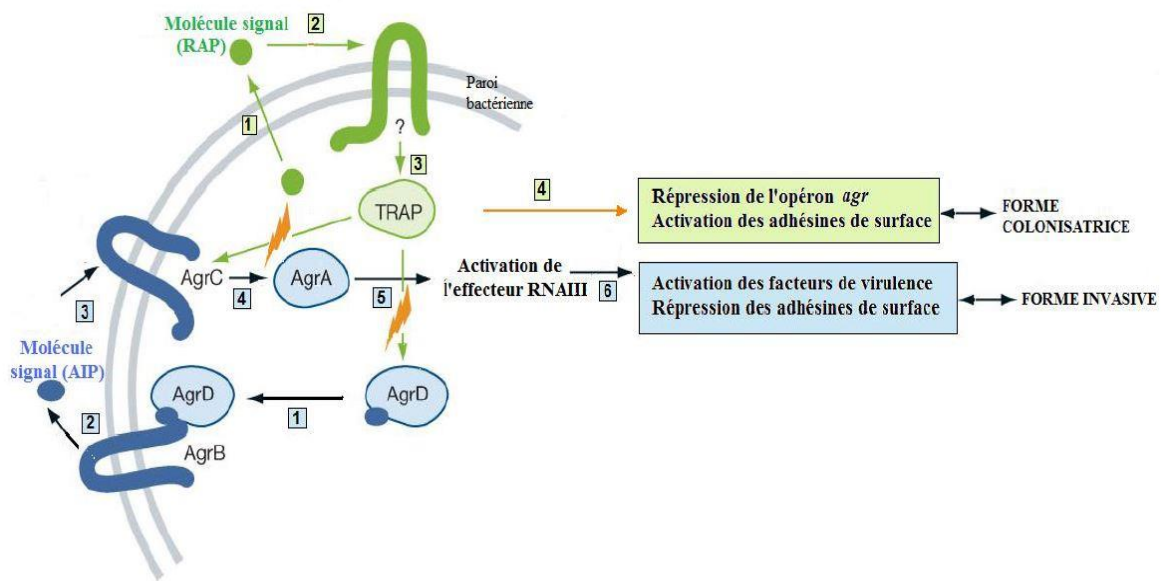
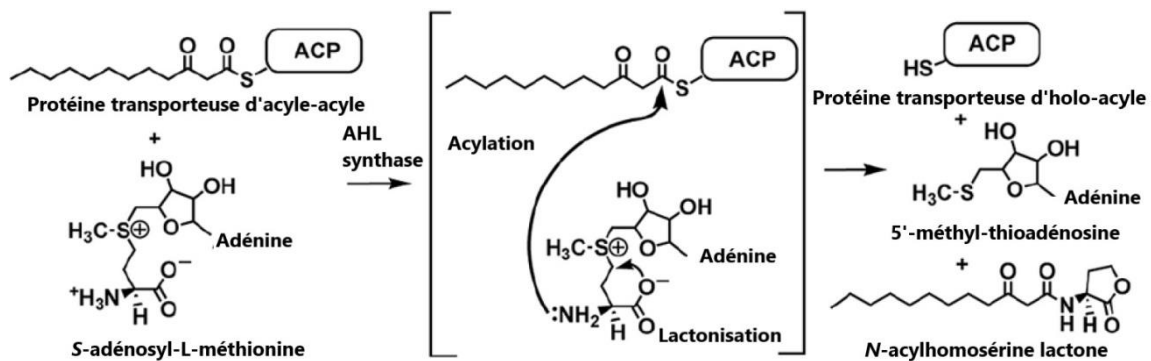


Figure 26 : La régulation du quorum sensing chez *S. aureus*
(adapté de Njoroge et Sperandio, 2009)

Pour la phase non invasive, la production des adhésines utilisées par *S. aureus* se fait sous la régulation du système RAP-TRAP. L'auto-inducteur RAP, après excrétion hors de la cellule, est de nouveau capté afin d'activer le récepteur TRAP. La sécrétion des adhésines commence alors en même temps que la répression de l'opéron *agr* (Harraghy *et al.*, 2007 ; Peterson *et al.*, 2008 ; Njoroge et Sperandio, 2009)

2.3.1.2 Le quorum sensing chez les bactéries Gram négatives

Les bactéries Gram négatives produisent des *N*-acylhomosérines lactones (AHL) dont la synthèse est dépendante d'une protéine synthase de la famille LuxI. Les protéines homologues de LuxI contiennent entre 190 à 230 acides aminés et présentent, pour la plupart, dix résidus conservés autour de l'acide aminé 110 de la partie *N*-terminale servant à la reconnaissance de la *S*-adénylméthionine et de la protéine transporteuse d'acyle (Fuqua et Greenberg, 2002) qui serviront à la formation de l'AHL (fig. 27).



**Figure 27 : Biosynthèse des AHL
(d'après Churchill and Chen, 2011)**

Il existe beaucoup de protéines homologues de type LuxI, qui vont permettre de synthétiser des AHL, dont les variations vont se situer au niveau de la longueur de la chaîne carbonée et de la fixation, ou pas, d'un groupement « oxo » sur le C3. Dans le système RhlI/RhlR de *P. aeruginosa* PAO1 la C₄-HSL sera formée alors que pour son système LasI/LasR, c'est la 3-oxo-C₁₂-HSL qui sera produite (Pearson *et al.*, 1994, 1997 ; Davies *et al.*, 1998).

Les AHL diffusent librement dans le milieu extracellulaire et se lient à leur récepteur spécifique, qui est un activateur transcriptionnel appartenant à la famille de LuxR. LuxR est une protéine intracellulaire constituée de deux domaines, le N-terminal qui se fixe à l'AHL et le C-terminal qui se fixe à l'ADN (Choi et Greenberg, 1991). Quand la concentration en AHL atteint une valeur seuil, qui varie selon la souche, elles vont pouvoir se lier au facteur de régulation transcriptionnel homologue de LuxR. Sans liaison à l'auto-inducteur, LuxR est très vite dégradé. La liaison à l'AHL la stabilise, permettant *de facto*, son repliement, sa liaison à l'ADN et l'activation de la transcription (Engebrecht *et al.*, 1983 ; Engebrecht et Silverman, 1984 ; Stevens *et al.*, 1994 ; Zhu et Winans, 1999, 2001).

Plusieurs bactéries Gram négatives (protéobactéries), essentiellement symbiotiques ou pathogènes, utilisent des systèmes homologues au système LuxI/LuxR de *V. fischeri* afin de contrôler différentes fonctions dépendant de la densité cellulaire (Engebrecht *et al.*, 1983 ; Fuqua *et al.*, 1994 ; Waters et Bassler, 2005).

Par exemple, *P. aeruginosa* utilise 4 systèmes de quorum sensing. Elle emploie préférentiellement les deux systèmes de type LuxI/LuxR (LasI/LasR et RhlI/RhlR) et ensuite les systèmes à quinolones PqsR et IQS (fig. 28).

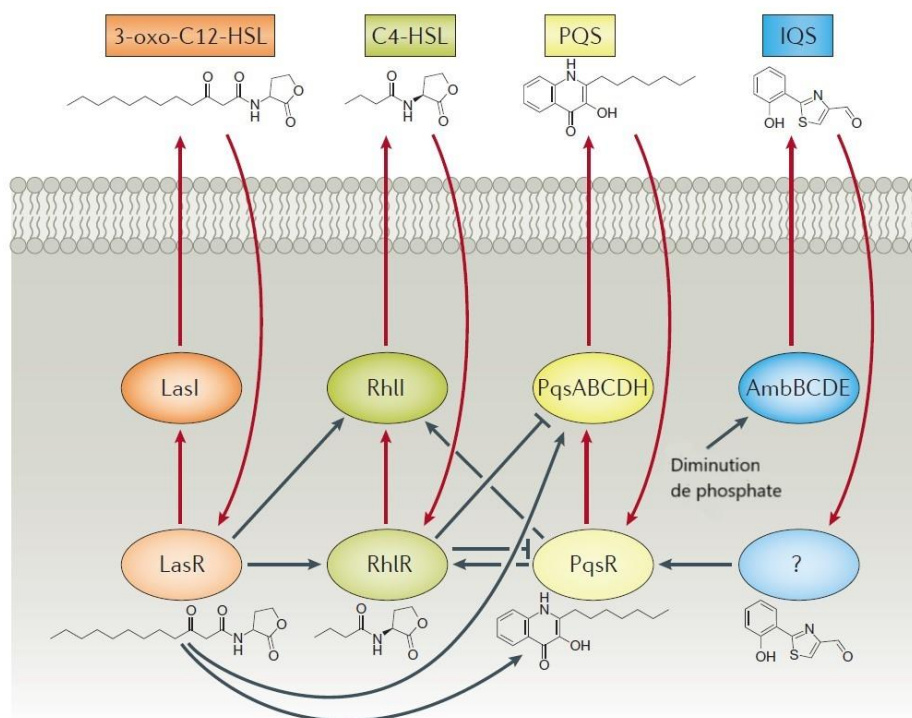


Figure 28 : Les différents systèmes de quorum sensing chez *P. aeruginosa* (adapté de Papenfort et Bassler, 2016)

Les systèmes de LasI/LasR et RhlI/RhlR vont respectivement induire la formation des AHL suivants : la *N*-(3-oxododécanoyl)-homoserinelactone et la *N*-(butyryl)-homosérinelactone. Ces deux systèmes agissent conjointement pour mener à l'expression de différents facteurs de virulence responsables de destructions tissulaires tels des protéases, des élastases, des phosphatases alcalines, des exotoxines (Passador *et al.*, 1993 ; Jones *et al.*, 1993 ; Davies *et al.*, 1998 ; de Kievit et Iglewski, 2000).

Le complexe LasR-AHL va également induire l'activation de *rhlR* (Ochsner et Reiser, 1995) qui va lui-même, permettre la sécrétion de différents facteurs de virulence.

Le complexe PqsR/PQS joue également un rôle dans l'activation de RhlR (McKnight *et al.*, 2000) ce qui fait que les trois premiers systèmes de quorum sensing sont tous reliés par différentes boucles permettant une inter-régulation en s'activant ou en s'inhibant.

RhlR semble jouer un rôle central dans le quorum sensing de *P. aeruginosa* pour ce qui est de sa virulence (Jimenez *et al.*, 2012). En effet, comme RhlI peut être activé par LasR ou par PqsR, combiné à RhlR lié à son auto-inducteur (C₄-HSL), la bactérie a besoin d'un autre auto-inducteur pour enclencher la pathogénicité. Ce rôle est normalement assuré par le système LasR. Néanmoins, des mutations dans *lasR* ont été observées sur des isolats cliniques de *P.*

aeruginosa (Hoffman *et al.*, 2009) indiquant qu'un système de quorum sensing alternatif existe pour lui permettre de contrecarrer ces possibles mutations et induire la pathogénicité (Lee et Zhang, 2015). La protéine PhoB, régulateur positif du régulon phosphate, va alors induire la production d'un autre auto-inducteur, l'IQS, qui pourra à son tour activer les gènes *pqs*.

Les bactéries Gram négatives utilisent souvent de nombreux auto-inducteurs et les informations concernant le quorum sensing sont souvent intégrées par des ARN qui vont contrôler l'expression du gène cible et jouent un rôle dans les boucles de rétroaction (Papenfort et Vogel, 2010). Chez *Vibrio cholerae*, les ARN dépendant de la protéine chaperonne hfq sont exprimés indépendamment des auto-inducteurs à faible densité cellulaire. Ils vont pouvoir réprimer, de façon post-transcriptionnelle, le principal facteur du quorum sensing, HapR. *De facto*, la synthèse du système de sécrétion de type III ainsi que d'autres gènes de virulence se retrouveront bloqués (Lenz *et al.*, 2004).

2.3.1.3 La communication inter-espèces

L'AI-2 est synthétisé par l'enzyme LuxS. Le gène *luxS* est très conservé et répandu chez les bactéries (Chen *et al.*, 2002). L'AI-2, un diester de furanosyl-borate (fig. 29), est un signal « universel », pouvant être utilisé par les bactéries Gram positives et négatives pour une communication intra et inter-espèces (Schauder *et al.*, 2001).

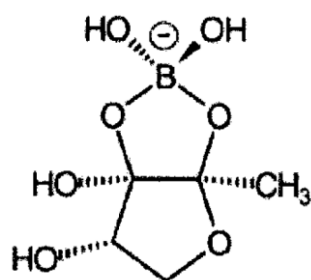


Figure 29 : L'auto-inducteur 2 (AI-2) de *Vibrio harveyi* (d'après Bassler, 2002)

Cependant, la régulation de sa biosynthèse est inconnue. Certaines bactéries utilisent cet auto-inducteur alors qu'elles semblent dépourvues de LuxP, son récepteur spécifique (Pereira *et al.*, 2013).

2.3.2 Les souches biosenseurs

Chromobacterium violaceum ou *V. fischeri* sont des biosenseurs naturels, respectivement *via* production de violacéine ou par émission de bioluminescence. Il existe également des biosenseurs « synthétiques » qui ont été transformés afin de leur incorporer un système rapporteur (Cha *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 2003), comme par exemple *Agrobacterium tumefaciens* (A136, NT1, KYC55) ou *E. coli* (XL1-Blue, MG4).

2.3.2.1 *Chromobacterium violaceum*

C. violaceum est un bacille à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, mobile et non sporulé. C'est une bactérie tellurique et aquatique principalement présente dans les régions tropicales et subtropicales (De Almeida *et al.*, 2003). C'est un pathogène opportuniste chez l'homme et les animaux qui provoque des lésions cutanées, des abcès, des infections septicémiques sévères, avec dissémination pulmonaire et hépatique, et des infections urinaires pouvant être mortelles (Richard, 1993).

C. violaceum synthétise une AHL majoritaire, la *N*-hexanoyl-L-homosérine lactone (C₆-HSL, HHL) qui induit l'expression de la violacéine. D'autres AHL synthétiques à chaîne courte (C₄ à C₈) sont susceptibles d'induire l'expression de la violacéine. Les AHL à chaîne longue (C₁₀ à C₁₄) inhibent la production de la violacéine (McClellan *et al.*, 1997).

C. violaceum utilise un système de régulation du quorum sensing de type LuxI/LuxR qui comprend CviI, enzyme auto-inductrice, et CviR, protéine régulatrice cytoplasmique qui se lie à l'ADN et active l'expression de gènes cibles, tels que des gènes codant pour une chitinase, un régulateur transcriptionnel, une guanine désaminase, la formation de biofilm, un gène impliqué dans le système de sécrétion de type VI et le gène *cviI*. La régulation de l'expression de *cviI* par CviR entraîne un rétrocontrôle positif (Stauff et Bassler, 2011).

Cette bactérie a également la capacité de synthétiser un pigment violet, la violacéine ([3-(1, 2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ilydene)-1, 3-dihydro-2H-indol-2-one]) (fig. 30) qui a différentes activités biologiques : antibactérienne (Lichstein *et al.*, 1945), trypanocide (Durán *et al.*, 1994) et antioxydante lui conférant une autoprotection contre les espèces réactives de l'oxygène (Azevedo *et al.*, 2000).

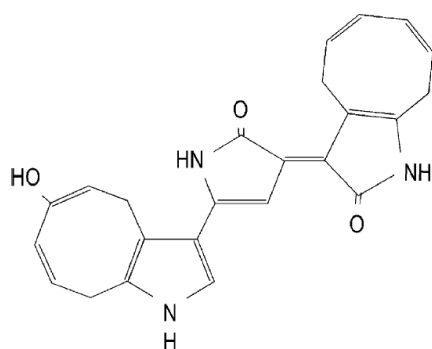


Figure 30 : Structure chimique de la violacéine (d'après Dessaux *et al.*, 2004)

C. violaceum est donc utilisée comme souche rapporteur du quorum sensing car la production de la violacéine est sous son contrôle. Le régulateur transcriptionnel CviR, une fois lié à la C₆-HSL, va pouvoir induire la synthèse du pigment à partir de L-Tryptophane (fig. 31).

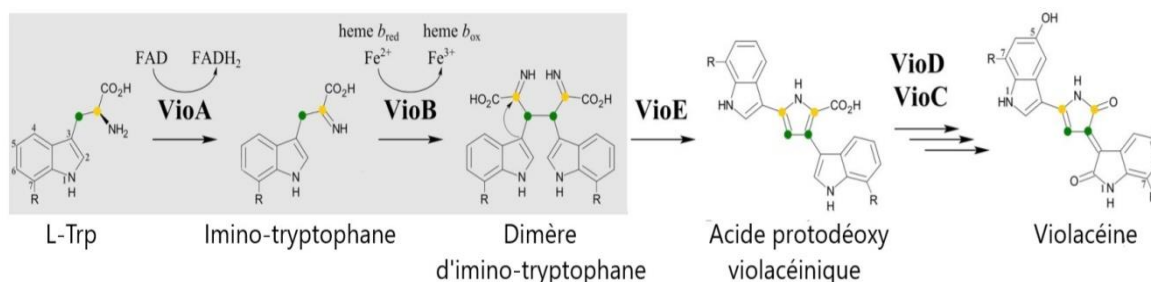


Figure 31 : Biosynthèse de la violacéine (adapté de Fuller *et al.*, 2016)

L'expression de la violacéine se traduit par la formation de colonies bactériennes violettes d'environ 1mm de diamètre. En présence d'un inhibiteur du quorum sensing, la perte de l'expression du pigment conduit à la formation de colonies blanches de même diamètre.

2.3.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie Gram négative, pathogène opportuniste des plantes, vecteur de la galle du collet chez certains végétaux supérieurs. Le plasmide oncogénique Ti (inducteur de tumeur) est transmis jusqu'au noyau des plantes par le mécanisme du quorum sensing qui transfère ce plasmide grâce à son système homologue *lux*, *traI/traR* (Piper *et al.*, 1993 ; Fuqua et Winans, 1994).

Des souches biosenseurs d'*A. tumefaciens* ont été « construites » via l'utilisation du gène rapporteur *lacZ*, codant pour la β -galactosidase, permettant ainsi la détection d'une large gamme d'AHL. En effet, *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ372), (pJZ384), (pJZ410) peut détecter les AHL de type 3-oxo avec une chaîne latérale de C₄ à C₁₈ et de même pour les C₄-HSL à C₁₈-HSL (Zhu *et al.*, 2003 ; Chu *et al.*, 2011)

2.3.3 Les inhibiteurs du quorum sensing

Différentes stratégies sont possibles afin d'inhiber le quorum sensing en inhibant la synthèse des auto-inducteurs, en dégradant ou en inhibant la formation du complexe auto-inducteur/récepteur.

Les premiers composés inhibiteurs du quorum sensing ont été isolés chez l'algue rouge *Delisea pulchra*. Il s'agit de furanones halogénées qui interfèrent avec le système de régulation des AHL de *Serratia liquefaciens* via une inhibition compétitive de ces dernières qui bloqueraient la formation du complexe auto-inducteur/récepteur (Givskov *et al.*, 1996 ; Manefield *et al.*, 1999 ; Rasmussen *et al.*, 2000). Ces composés peuvent également diminuer l'affinité du régulateur transcriptionnel à l'ADN (Defoirdt *et al.*, 2007) ou de dégradation de ce même régulateur (Manefield *et al.*, 2002). En plus de l'inhibition du rôle des auto-inducteurs, ces furanones peuvent également gêner leur synthèse. En effet, Zang *et al.* (2009) ont montré qu'elles interfèrent dans la production de l'AI-2 en modifiant et en inactivant LuxS.

Un autre procédé d'inhibition du quorum sensing consiste en la dégradation enzymatique des auto-inducteurs. Plusieurs enzymes peuvent s'attaquer aux AHL (fig. 32).

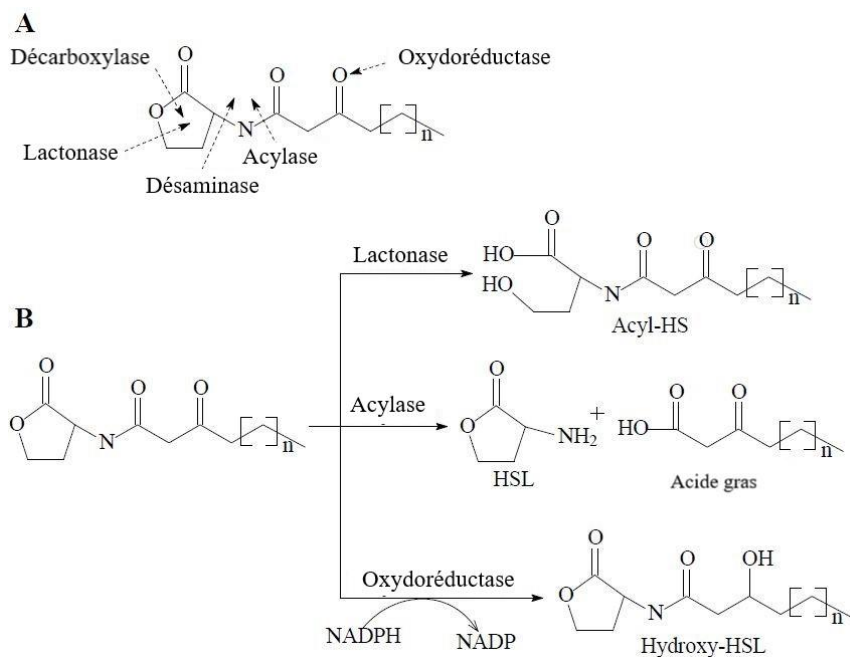


Figure 32 : Dégradation des AHL (A) et produits obtenus après action enzymatique (B) (d'après Chen *et al.*, 2013)

Certaines enzymes s'attaquent directement au cycle homosérine lactone par hydrolyse (lactonases et décarboxylases) ou par coupure, ce qui libère une homosérine lactone et un acide gras libre (désaminase ou acylase).

L'oxydoréductase substitue le groupement oxygéné en C₃ par un groupement hydroxyle pour dégrader ensuite l'AHL en homosérine lactone et en acide hydroxydécanoïque (Uroz *et al.*, 2005).

Des acylases hydrolysant la fraction amide des AHL ont été identifiées chez plusieurs microorganismes tels *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Kluyvera citrophila* (Sio *et al.*, 2006 ; Sunder *et al.*, 2012 ; Mukherji *et al.*, 2014). Des métallob- β -lactamases qui hydrolysent le cycle homosérine lactone de l'AHL ont été décrites chez *Acinetobacter* sp. ou *Agrobacterium tumefaciens* (Kang *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2007)

Plus récemment, l'algue *Asparagopsis taxiformis* a montré une activité antibactérienne ainsi qu'une activité anti-quorum sensing (Jha *et al.*, 2013). Les composés phénoliques et polyphénoliques, présents en forte concentration dans les extraits de plantes sont capables d'interférer avec le quorum sensing bactérien (Truchado *et al.*, 2009).

Des concentrations sous-létales d'anti-inflammatoires peuvent également avoir des effets anti-quorum sensing. L'aspirine, utilisée dans de telles conditions est en effet un

inhibiteur efficace du quorum sensing de *P. aeruginosa* grâce à une forte interaction π - π entre le groupement aryl de l'aspirine et la Tyr₈₈ du facteur de transcription LasR ce qui perturbe la voie de signalisation normale (El-Mowafy *et al.*, 2014).

Des molécules antagonistes des AIP ont été découvertes et sont connues pour inhiber le système *agr* de *S. aureus*. Elles se fixent sur AgrC, l'histidine kinase spécifique des AIP produits par la bactérie, bloquant ainsi l'opéron *agr* et *de facto* le quorum sensing (George *et al.*, 2008).

3. Les ressources naturelles dans la recherche de molécules antibactériennes innovantes

Les plantes sauvages offrent, de par leur très grande variabilité, un nombre incommensurable de molécules à intérêt biologique. Leurs molécules de défense, issues du métabolisme secondaire, permettent une grande protection contre les parasites, les bactéries et les maladies qu'ils provoquent. Mais d'autres produits naturels sont connus pour leurs activités biologiques. C'est le cas des productions animales comme les produits de la ruche. Ces derniers, notamment le miel, sont connus pour leurs nombreuses vertues et sont de plus en plus étudiés pour leurs propriétés biologiques.

3.1 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles isolés à partir des plantes par hydrodistillation ou expression mécanique (Kalemba et Kunicka, 2003). Différentes parties du végétal peuvent être utilisées telles les fleurs, les feuilles, les graines, les bourgeons, les gommes... (Burt, 2004).

3.1.1 Composition des huiles essentielles

Les composés majoritaires des huiles essentielles sont généralement classés en deux groupes : celui des terpènes ou terpénoïdes et les phénylpropanoïdes que l'on retrouve sous forme cyclique, aromatique et/ou aliphatique, tous de faible masse moléculaire (Bowles, 2003 ; Pichersky *et al.*, 2006).

La combinaison de différentes unités isoprène (C_5H_8) permet la production des terpènes par deux voies distinctes:

- la voie du méthyl-érythritol phosphate, dans les plastes, produira les hémi-, mono- et diterpènes (fig. 33a) ;
- la voie de l'acide mévalonique, dans le réticulum endoplasmique, le cytoplasme et la mitochondrie, produira les sesquiterpènes, les stérols et les ubiquinones (fig. 33b).

L'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et son isomère, le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) sont les structures de base des terpènes.

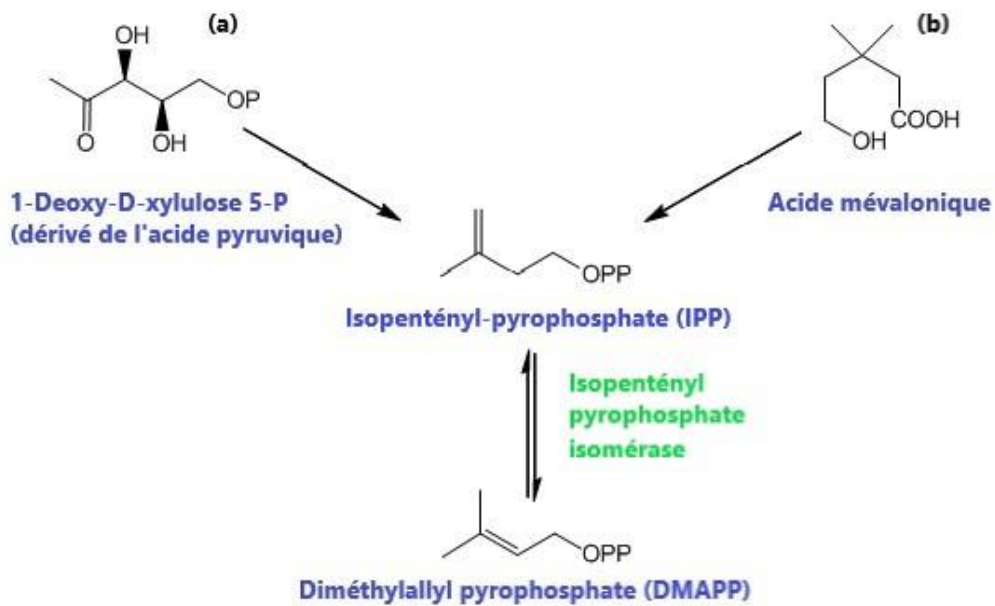
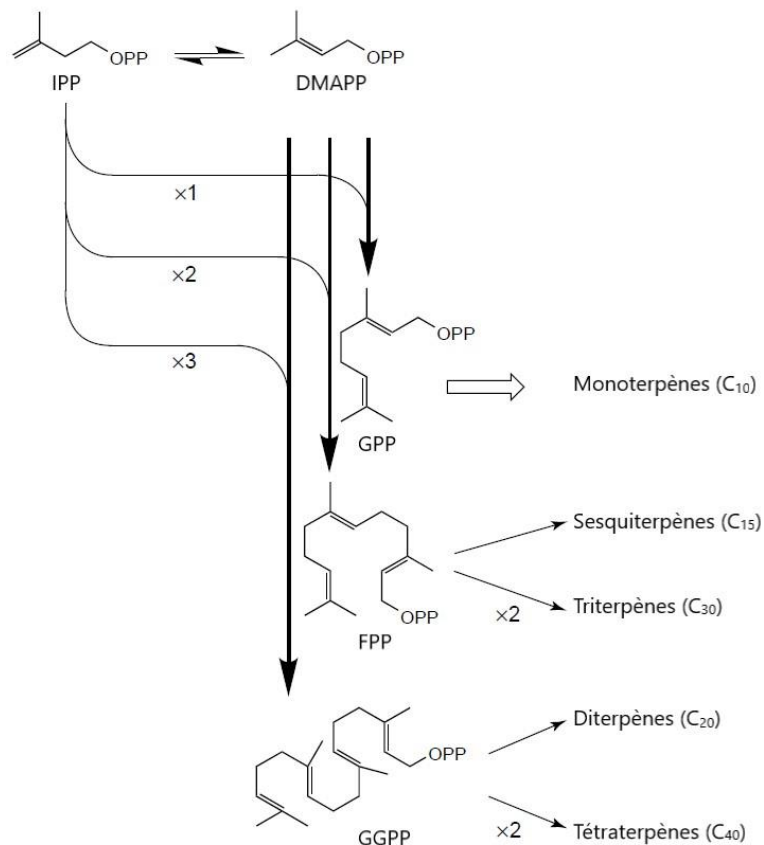


Figure 33 : Synthèse de l'IPP et du DMAPP par les voies du méthyl-érythritol phosphate et de l'acide mévalonique

L'IPP et le DMAPP serviront de précurseurs et leurs associations mèneront à la formation des différentes familles de terpènes (fig. 34).



**Figure 34 : Voie de la biosynthèse des terpènes
avec GPP : géranylpyrophosphate ; FPP : farnésylpyrophosphate et GGPP : géranyl géranyl
pyrophosphate
(d'après Mahmoud et Croteau, 2002)**

Dans les huiles essentielles, les familles moléculaires les plus fréquemment retrouvées sont celles des monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) et des sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$).

Viennent ensuite les phénylpropanoïdes qui sont des composés dérivés d'acides aminés aromatiques comme la phénylalanine ou la tyrosine. Cette classe comporte les acides et les aldéhydes cinnamiques, les coumarines, les flavonoïdes et les stilbénoloïdes. Leur biosynthèse s'effectue par la voie de l'acide shikimique (fig. 35).

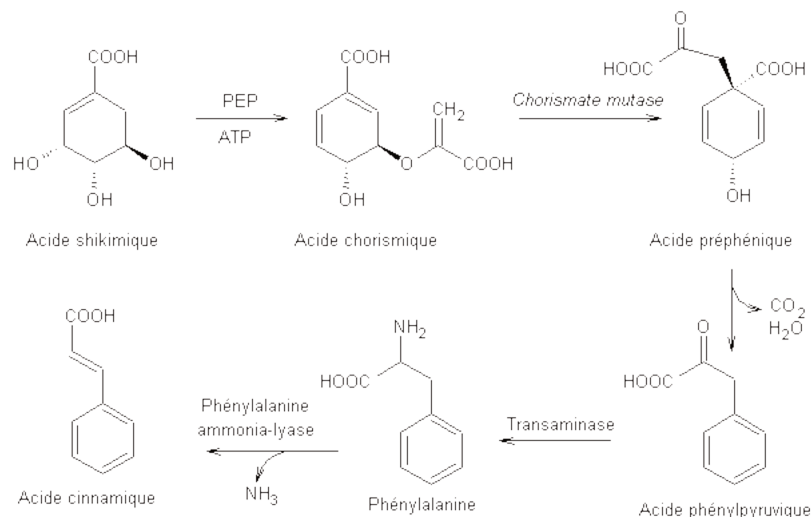


Figure 35 : Biosynthèse de l'acide cinnamique *via* la voie de l'acide shikimique

Une cinquantaine de phénylpropanoïdes sont décrits dans les huiles essentielles, on les retrouve dans celles d'*Apiaceae*, de *Myrtaceae*, de *Lamiaceae*, de *Piperaceae* et de *Rutaceae*.

Des composés contenant un ou plusieurs atomes de soufre (famille des *Alliaceae*) ou d'azote (agrumes) peuvent être trouvés dans les huiles essentielles (fig. 36).

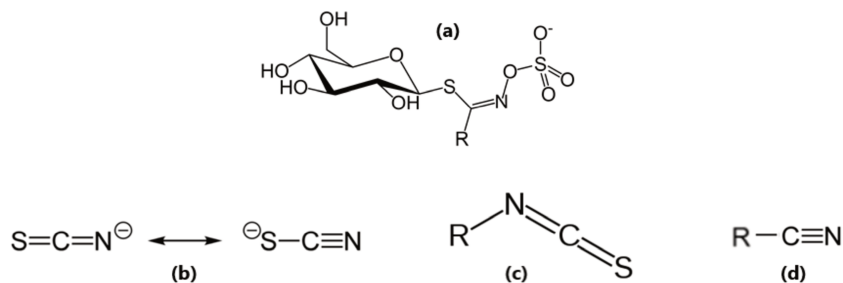


Figure 36 : Composés sulfurés et azotés retrouvés dans les huiles essentielles

On distinguera les aglycones (groupement non-glucidique d'un hétéroside), les glucosinolates (fig. 36a) ou leurs dérivés issus de coupures comme les thiocyanates (fig. 36b), les isothiocyanates (fig. 36c) et les nitriles (fig. 36d).

3.1.2 Activités biologiques

Les huiles essentielles présentent diverses activités biologiques bien connues. Elles peuvent exercer une action antifongique. L'huile essentielle de romarin présente des valeurs de CMI contre *C. albicans* et *Aspergillus niger* respectives de 0,25% et 1% (v/v) (Fu *et al.*,

2007). Cependant, de nombreuses autres huiles essentielles se montrent actives contre *C. albicans*. C'est notamment le cas des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* (Citronnelle), *Cinnamomum zeylandicum* (Cannelle), *Mentha* sp. (Menthe japonaise), *Pelargonium* sp. (Géranium) et *Syzygium aromaticum* (Clou de girofle) dont les concentrations minimales fongicides comprises entre 0,01% et 0,15% (Devkatte *et al.*, 2005 ; Hammer et Carson, 2010).

Les terpènes sont souvent les composés majoritaires des huiles essentielles de plantes médicinales. Ils sont considérés comme de puissants antioxydants naturels. L'huile essentielle de *Satureja macrostema* (sarriette) a montré une forte activité anti-radicalaire similaire à celle de l'hydroxytoluène butylé (BHT), un antioxydant synthétique *via* les méthodes au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et à l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), avec des résultats respectifs de 53,10% et 92,12% pour des concentrations de 1 mg.mL⁻¹ (Torres-Martínez *et al.*, 2017).

Bien que les mécanismes d'actions soient difficiles à définir clairement du fait de la grande variabilité chimique des huiles essentielles, des activités anticancéreuses sont retrouvées chez certaines d'entre elles. L'huile essentielle de *Cymbopogon flexuosus* (citronnelle) possède, dans ses composés majoritaires, un sesquiterpène, l'isointermédéol (fig. 37) qui induit l'apoptose des cellules HL-60 des leucémies humaines. Il va induire l'activité, notamment, de la caspase-8 et des facteurs de mort cellulaire TNRF1 et DR4 entraînant une cascade d'activation de la voie de l'apoptose (Kumar *et al.*, 2008).

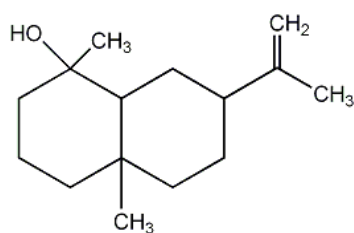


Figure 37 : Structure chimique de l'isointermédéol

Certaines encore présentent une action antivirale, directement dirigée contre l'ADN et l'ARN viraux (Swamy *et al.*, 2016). Le citral et le citronellal sont les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* (Mélisse officinale) (fig. 38).

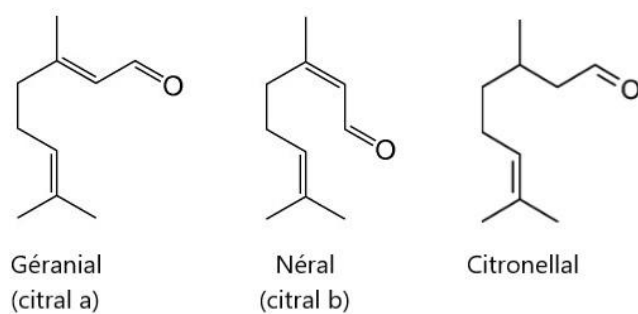


Figure 38 : Structures chimiques du citral et du citronellal

Ces molécules seraient responsables de l'inhibition de la réplication du virus Herpès de type 2 (Allahverdiyev *et al.*, 2004 ; Koch *et al.*, 2008 ; Reichling *et al.*, 2009).

3.1.3 Activités antibactériennes et mode d'action

De très nombreuses huiles essentielles sont aujourd'hui connues pour leurs activités antibactériennes. Du fait de la structure de leur enveloppe, les bactéries Gram négatif sont tout de même moins sensibles à leur action, notamment *P. aeruginosa* (Dorman et Deans, 2000 ; Burt, 2004). Cette activité est souvent due à leurs composés majoritaires dont un grand nombre a déjà été identifié dans des huiles essentielles actives (Tableau 4).

Tableau 4 : Constituants principaux des huiles essentielles (HEs) à activité antimicrobienne (adapté de Burt, 2004)

Nom commun des plantes	Nom latin des plantes	Composés majoritaires des HEs	Composition (%)
Cannelle	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	<i>Trans</i> -cinnamaldéhyde	65%
Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugénol	75 à 85%
		Acétate d'eugényle	8 à 15%
Coriandre	<i>Coriandrum sativum</i> (feuilles immatures)	Linalol	26%
		(<i>E</i>)-2-décanal	20%
	<i>Coriandrum sativum</i> (graines)	Linalol	70%
Origan	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	Traces à 80 %
		Thymol	Traces à 64%
		γ -terpinène	2 à 52%
		<i>p</i> -cymène	Traces à 52%
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pinène	2 à 25%
		acétate de bornyle	0 à 17%
		camphre	2 à 14%
		1,8-cinéole	3 à 89%
Sauge	<i>Salvia officinalis</i> L.	Camphre	6 à 15%
		α -pinène	4 à 5%
		β -pinène	2 à 10%
		1,8-cinéole	6 à 14%
		α -thujone	20 à 42%
Thym	<i>Thymus officinalis</i>	Thymol	10 à 64%
		Carvacrol	2 à 11%
		γ -terpinène	2 à 31%
		<i>p</i> -cymène	10 à 56%

Le spectre d'action des molécules actives est notamment défini par la grande variété structurale de ces dernières. Le mode d'action des composés actifs des huiles essentielles en général, n'est pas toujours bien connu. Néanmoins, l'action combinée des molécules actives des huiles essentielles permet de potentialiser l'effet antibactérien en agissant simultanément sur plusieurs cibles (fig. 39). Cette synergie d'action présente un réel intérêt par rapport aux antibiotiques conventionnels qui, sauf en cas de poly-thérapies, exercent généralement leur action sur une cible bien spécifique.

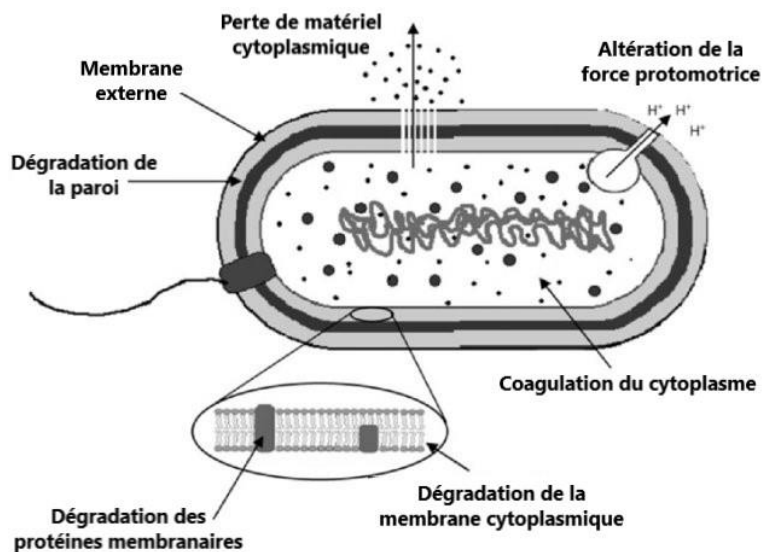


Figure 39 : Modes d'actions des huiles essentielles sur les bactéries (adapté de Burt, 2004)

La majorité des terpènes n'exercent que de faibles actions antibactériennes (Nazzaro *et al.*, 2013). Par exemple, utilisé seul, le *p*-cymène (fig. 40a) n'est pas actif, mais joue un rôle dans l'activité puisqu'il potentialise les effets du carvacrol (fig. 40b) contre *B. cereus* en facilitant sa pénétration dans la cellule (Ultee *et al.*, 2002).

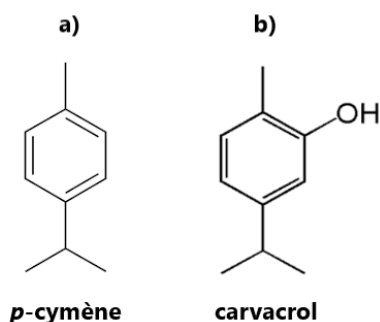


Figure 40 : Structures chimiques du *p*-cymène et du carvacrol

L'activité antibactérienne, en revanche, provient des terpénoïdes et phénylpropanoïdes. Les premiers sont des terpènes oxygénés dont les groupements méthyles ont été déplacés ou remplacés par des enzymes spécifiques. La majorité de leurs activités antibactériennes provient de leurs groupements fonctionnels, le groupement hydroxyle ainsi que la présence d'électrons délocalisés. Les composés les plus actifs sont les composés phénoliques comme le carvacrol, le thymol, l'eugénol et le chavicol (fig. 41a, b et c). Cela

s'explique par leur caractère acide provenant du groupement OH très actif. C'est pourquoi les huiles essentielles riches en phénols comptent parmi les plus actives.

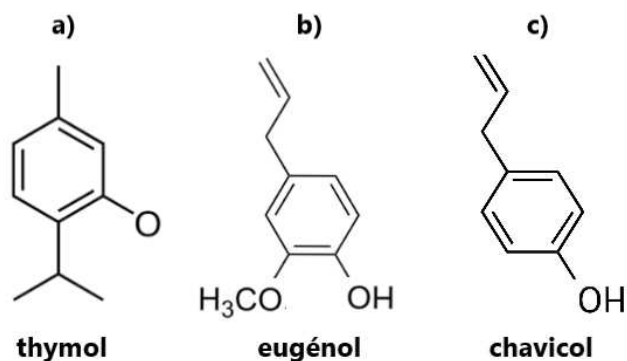


Figure 41 : Structures chimiques du thymol, de l'eugénol et du chavicol

Le carvacrol, par exemple, est connu pour son action contre la membrane externe en relarguant ainsi le LPS ou en augmentant, entre autres, la perméabilité à l'ATP de la membrane cytoplasmique (Helander *et al.*, 1998 ; Nazzaro *et al.*, 2013). Le thymol qui ne diffère du carvacrol que par la position de son groupement hydroxyle, présente également des actions d'altérations structurales et fonctionnelles de la membrane cytoplasmique interne ou externe, d'interaction avec les protéines membranaires ou de cibles intracellulaires (Sikkema *et al.*, 1995). Ces 2 composés peuvent également agir en synergie comme dans l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (Thym) qui est très efficace contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*. L'eugénol et le carvacrol pourront également se diriger contre des transporteurs membranaires ATP-dépendants ou encore l'ATP synthétase F₁F₀, impliquée dans la production d'ATP et la régulation du pH cellulaire (Sikkema *et al.*, 1995). Selon Gill et Holley (2006), l'inhibition des ATP synthétases jouerait un rôle secondaire dans la mort cellulaire ainsi que dans la réduction du taux de croissance des bactéries.

Les huiles essentielles peuvent également être couplées à des antibiotiques afin de potentialiser leur effet. C'est notamment le cas de synergies entre l'huile essentielle de *Lantana camara* (Lantanier) et des aminoglycosides. L'huile essentielle, couplée à l'administration d'amikacine, a permis de réduire drastiquement les valeurs de CMI contre *E. coli* et *S. aureus* en passant toutes deux de 1 250 µg.mL⁻¹ à, respectivement, 5 µg.mL⁻¹ et 40 µg.mL⁻¹ (Sousa *et al.*, 2010). Ces synergies fonctionnent même contre des germes multi-

résistants de *S. aureus*, qui se sont montrés beaucoup plus sensibles à une combinaison de tobramycine et d'huile essentielle de *M. alternifolia* (Arbre à thé) (D'Arrigo *et al.*, 2010).

Cependant, on peut également noter des effets antagonistes entre constituants. Le γ -terpinène (fig. 42a) réduit fortement la solubilité du terpinène-4-ol (fig. 42b) et son action antimicrobienne (Cox *et al.*, 2001).

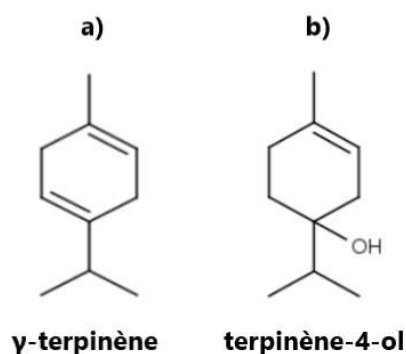


Figure 42 : Structures chimiques du γ -terpinène et du terpinène-4-ol

Les actions directes des huiles essentielles contre la paroi ou la membrane plasmique des bactéries sont les plus documentées. Néanmoins, il est intéressant de voir qu'elles peuvent également agir de façon indirecte. La virulence est atténuée par une altération du quorum sensing. Le traitement de *Vibrio harveyi* BB886 avec 60 μ M de cinnamaldéhyde permettrait de réduire la bioluminescence de 55% (Niu *et al.*, 2006) qui, comme la mise en biofilm ou la sporulation, est sous la gouvernance du quorum sensing.

La fraction alcoolique de l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* (Ciste) semble, grâce aux stéréoisomères viridiflorol et lédol (fig. 43a et b), induire un blocage de la division cellulaire de *S. aureus* (CIP 53.156).

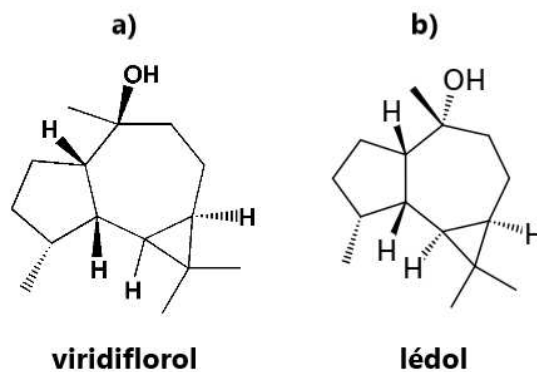
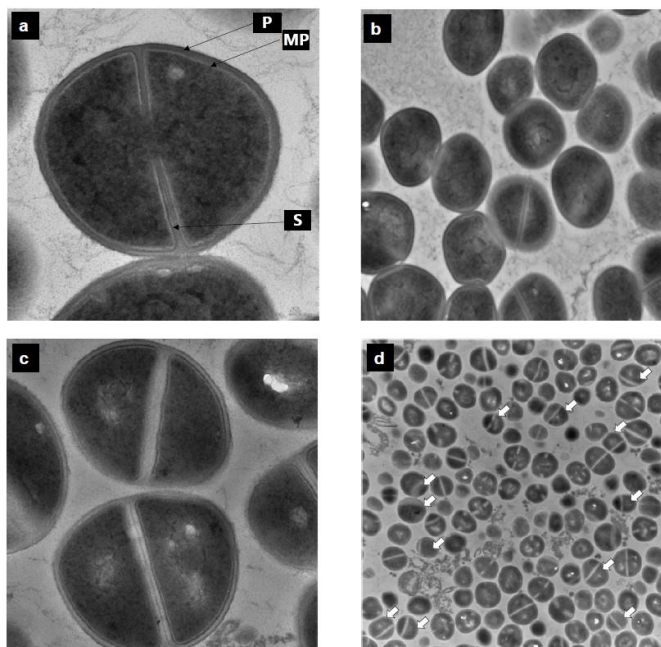


Figure 43 : Structures chimiques du viridiflorol et du lédol

En effet, comparé aux cellules témoins (fig. 44a), on peut observer un fort épaissement du septum de division (fig. 44c) qui peut, en plus, se retrouver mal positionné (flèches sur la fig. 44d). Sur les micrographies présentant une vue d'ensemble, on remarque une augmentation de cellules présentant cette irrégularité (fig. 44d), qui n'existe pas chez les bactéries témoins (fig. 44b). Cette action de blocage semblerait provenir de perturbations de la force protomotrice ou d'une inhibition ATPasique chez *S. aureus* (Guinoiseau *et al.*, 2015).



**Figure 44 : Micrographies obtenues au microscope électronique à transmission de *S. aureus* contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb
Avec P : paroi ; MP : membrane plasmique et S : septum de division
(adapté de Guinoiseau *et al.*, 2015)**

D'autre part, les phénylpropanoïdes sont des composés dérivés d'acides aminés aromatiques comme la phénylalanine ou la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un OH lié au cycle phényle comme par exemple l'eugénol ou l'estragol (fig. 45). L'eugénol est d'ailleurs intéressant car plus actif contre les bactéries Gram négatives que Gram positives (Hyldgaard *et al.*, 2012).

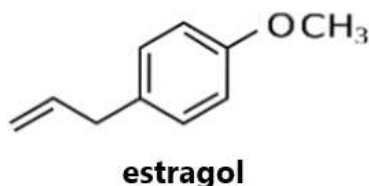


Figure 45 : Structure chimique de l'estragol

Les protéines peuvent également être touchées par l'action des huiles essentielles. L'huile essentielle de *Cinnamomum zeylandicum* (Cannelle) est majoritairement constituée de cinnamaldéhyde (fig. 46). Ce dernier est capable d'inhiber la division cellulaire chez *B. cereus*. Ce processus est régulé par la protéine FtsZ, un homologue de la tubuline, qui va pouvoir s'assembler en un anneau Z à l'endroit de la division cellulaire. Le cinnamaldéhyde réduit, *in vitro*, l'assemblage et la liaison des sous-unités FtsZ (Nazzaro *et al.*, 2013). Il peut également se fixer aux protéines cytoplasmiques *via* l'inactivation des aminoacides carboxylases (Wendakoon et Sakaguchi, 1995).

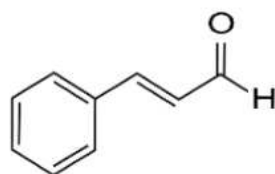


Figure 46 : Structure chimique du cinnamaldéhyde

Ce dernier est connu pour inhiber l'activité des ATP synthétases et agir au niveau de la membrane externe (Wendakoon et Sakaguchi, 1995).

D'autres modes d'action antibactériens ont été identifiés en présence de certaines huiles essentielles. Cependant, le ou les composés responsables de ces activités particulières n'ont pas encore été identifiés. Par exemple, le métabolisme bactérien peut être altéré par

l'action des huiles essentielles. Quand *E. coli* est traitée avec de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Arbre à thé), le processus de respiration glucose-dépendant est inhibé et la fuite d'ions potassium stimulée. Cette action mène à une forte inhibition de la croissance bactérienne (Cox *et al.*, 1998).

De par leur nature hydrophobe, les huiles essentielles et leurs composés peuvent facilement traverser la membrane plasmique et, ainsi, affecter le pourcentage d'acides gras insaturés de la membrane bactérienne en altérant leur structure (Burt et Reinders, 2003).

3.2 Les hydrolats

3.2.3 Définition et composition

L'eau florale ou hydrolat provient de la recondensation de la vapeur d'eau utilisée pour l'extraction des huiles essentielles (fig. 47).

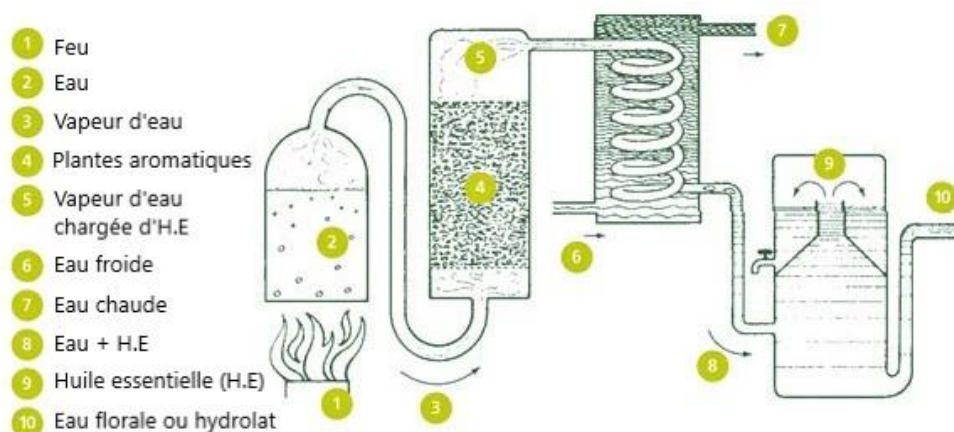


Figure 47 : Processus d'hydrodistillation
(d'après « Produits - CIHEF - Comité Interprofessionnel des Huiles Essentielles Françaises »)

Ces hydrolats contiennent des traces d'huile essentielle (en général moins de 1 g.L⁻¹) ainsi que des composés hydrophiles dissous. Ils peuvent être utilisés chez les personnes sensibles (enfants, personnes âgées). Ils sont moins irritants pour la peau et leur odeur est moins prononcée (D'Amato *et al.*, 2018). Ils sont souvent utilisés en cosmétiques ou en aromathérapie (Inouye *et al.*, 2009 ; Lante et Tinello, 2015)

Des cétones, des aldéhydes, des phénols, des esters et des alcools sont retrouvés dans les hydrolats.

3.2.2 Activités biologiques

L'hydrolat de *Tetragonia teragonioides*, composé majoritairement de tétratétracontane (29,5%), nonacosane (27,6%) et oléamide (17,1%), présente des activités anti-inflammatoires. L'incubation de macrophages en présence de cet hydrolat a mené à une diminution des niveaux d'expression de la protéine inductible NO synthase et de la cyclooxygénase-2 (Ko *et al.*, 2017).

On retrouve également des actions antioxydantes. Par exemple, les hydrolats de *Calendula arvensis* sont passés au test du DPPH et ont présenté une IC₅₀ de 25,1 mg.mL⁻¹, très proche de celles du BHT (17,3 mg.mL⁻¹). Ces propriétés seraient dues à la forte concentration en sesquiterpènes oxygénés (Belabbes *et al.*, 2017).

L'hydrolat de *Satureja hortensis* inhibe 100% de la croissance de *Rhizonia solani*, *Botrytis cinerea* et *alternaria citri* pour des solutions \geq 15% (v/v) (Boyras et Ozcan, 2005). Pour une inhibition totale de croissance d'*A. niger* et *Penicillium expansum*, l'utilisation de l'hydrolat de *C. arvensis* à 30 % (v/v) s'avère efficace mais de telles concentrations sont très élevées pour obtenir cette activité antifongique (Belabbes *et al.*, 2017).

Les actions antibactériennes des hydrolats, sont souvent observées à de fortes concentrations. Hussien *et al.* (2011) ont, par exemple, montré que l'hydrolat d'*Elettaria cardamomum* (cardamome) utilisé à 15% (v/v) pouvait inhiber la croissance de *Salmonella typhi*, *S. aureus* et *E. coli*. Néanmoins, cette concentration n'inhibe la croissance de *P. aeruginosa* que de 10%. Ces informations montrent, à ce jour, que l'action antimicrobienne des hydrolats reste limitée du fait de la forte concentration de produit nécessaire à l'obtention de l'effet désiré.

3.3. Le miel

Au cours de sa vie en rucher, l'abeille a besoin de différents composés qu'elle utilise ou produit (fig. 48). Trois produits issus du végétal sont transformés par l'abeille : le miel, le pollen et la propolis. Mais deux autres produits sont également issus des sécrétions de son système glandulaire : la cire la gelée royale et le venin.

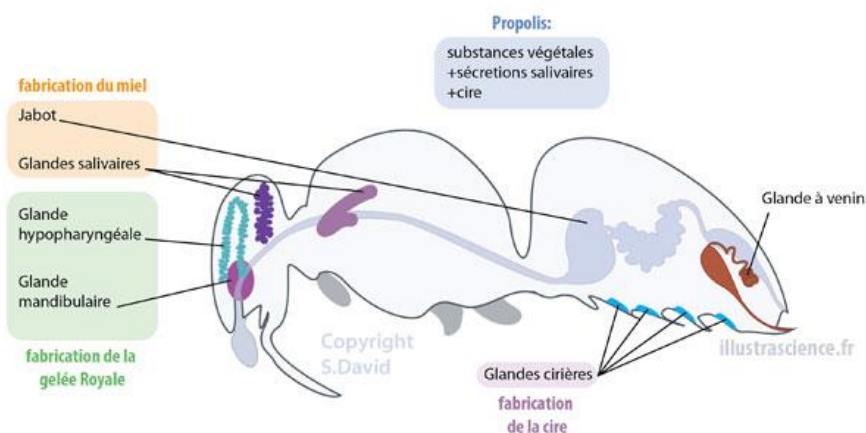


Figure 48 : Localisation de production anatomique des différents produits de la ruche par l'abeille (d'après S. David, illustrascience.fr)

Le miel est la substance sucrée naturelle élaborée par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* L. Ces dernières commencent par butiner le nectar des plantes ou encore les excréments laissés sur elles par des insectes suceurs. Il va servir de nourriture de réserve pour les abeilles qui ne l'utiliseront que si elles sont dans l'impossibilité de sortir se nourrir en dehors de la ruche (en cas de conditions météorologiques défavorables par exemple). Le miel est principalement composé de deux sucres, le fructose ($\approx 38\%$) et le glucose ($\approx 31\%$), ainsi que d'autres oligo- et polysaccharides. L'ensemble des carbohydrates représentent près de 95% du poids sec du miel (Bogdanov *et al.*, 2008). Des protéines, des vitamines, des minéraux, des lipides, des polyphénols, des enzymes représentent les 5% restant (Bogdanov *et al.*, 2008 ; Cornara *et al.*, 2017). Différents facteurs peuvent influencer sur sa composition chimique comme le climat, l'origine botanique ou encore entomologique (Bentabol Manzanares *et al.*, 2011 ; Olga *et al.*, 2012).

A ce jour, le miel demeure le produit de la ruche le plus étudié.

3.3.1 Action cicatrisante

Les miels sont connus pour leur capacité cicatrisante. Ils sont utilisés dans certains services hospitaliers pour traiter des plaies récalcitrantes. Majtan *et al.* (2010) ont montré qu'en présence de miel, l'activité des kératinocytes, cellules impliquées dans le processus de cicatrisation, augmente et favorise ainsi la régénération de l'épithélium. Néanmoins, ce processus de renouvellement varie selon l'origine botanique des miels (Ranzato *et al.*, 2012).

3.3.2 Action antibactérienne

Les molécules antibactériennes du miel peuvent être classées en 2 catégories : les « inhibines » de type peroxyde et les « inhibines » non peroxydes (polyphénols, protéines, méthylglyoxal,...).

3.3.2.1 Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit par l'action de la glucose oxydase sur le glucose en présence d'eau et de dioxygène. Pour fonctionner, cette enzyme a besoin de teneurs élevées en eau, c'est pourquoi son activité est plus intense dans le miel dilué que dans le miel mature. De plus, quand le miel n'est pas dilué, l'acide gluconique, qui est également produit par la réaction, va abaisser le pH et ainsi inhiber l'activité enzymatique, entraînant une baisse de la quantité de peroxyde d'hydrogène libéré. La production d'acide gluconique serait également due à une bactérie du genre *Gluconobacter* sp. qui, lors de la maturation du miel, jouerait un rôle dans la transformation du glucose en acide gluconique (Ruiz-Argueso et Rodriguez-Navarro, 1973).

Dans la plupart des miels, l'activité antibactérienne dépend fortement de la présence de peroxyde d'hydrogène (Brudzynski, 2006), qui joue également un rôle dans la stabilisation du nectar en cours de maturation (Jeffrey et Echazarreta, 1996). La production en continu de peroxyde d'hydrogène dans le miel dilué produit un effet antiseptique de longue durée (Manzoori *et al.*, 2006) ce qui est le plus recherché dans la lutte contre les infections des plaies.

Brudzynski (2006) a montré que certains miels canadiens de myrtille, sarrasin ou trèfle présentaient des valeurs de CMI contre *E. coli* très faibles pour des miels (6,2 %) et que cette action était directement corrélée à l' H_2O_2 provenant des miels.

3.3.2.2 Les peptides et protéines du miel

Les composés azotés ne représentent qu'une très faible proportion des composants du miel. On les retrouve sous forme d'acides aminés libres et de protéines, soit présents dans le nectar des fleurs butinées, soit provenant des sécrétions de l'abeille ou encore des grains de pollen. Les protéines sont présentes en très faible quantité, à hauteur de 0,26%, et la teneur en azote ($\approx 0,041\%$) est négligeable (Huchet *et al.*, 1996).

L'activité antibactérienne peut également être attribuée à des peptides antimicrobiens dont le plus connu est la « défensine-1 » (fig. 49). Elle est constituée de 51 acides aminés pour un poids moléculaire de 5,52 kDa (Bucekova *et al.*, 2017). Elle est surtout active contre les bactéries Gram positives (Fujiwara *et al.*, 1990 ; Bachanová *et al.*, 2002). Néanmoins, l'activité antibactérienne des miels ne dépend pas uniquement de ce seul peptide (Kwakman *et al.*, 2010).

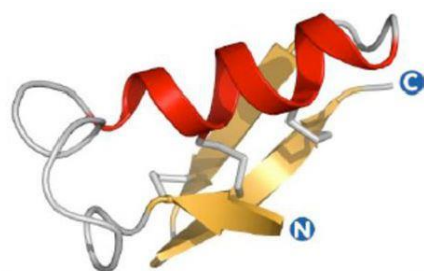


Figure 49 : Modèle structural de la défensine 1 d'*Apis mellifera* (d'après Alvarez-Suarez *et al.*, 2014)

Enfin, on trouve encore le lysozyme, dont l'action hydrolytique détruit les liaisons glycosidiques du peptidoglycane bactérien (Ellison et Giehl, 1991).

3.3.2.3 *Le méthylglyoxal*

Le méthylglyoxal (fig. 50) est produit par la conversion du dihydroxyacétone phosphate, présent à forte concentration dans les miels, par la méthylglyoxal synthase.

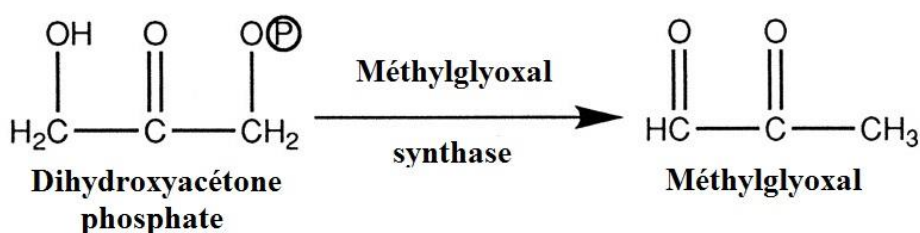


Figure 50 : Formation du méthylglyoxal

En 2008, Mavric *et al.* ont démontré qu'elle était principalement responsable de l'activité antibactérienne des miels Néo-Zélandais de Manuka (*Leptospermum scoparium*). D'après Krymkiewicz *et al.* (1971), le méthylglyoxal inhibe la synthèse d'ADN et d'ARN en agissant

sur les résidus guanines. Ces miels de Manuka sont actifs contre de nombreux pathogènes puisque l'on retrouve fréquemment des CMI très basses ($\leq 5\%$) contre *E. coli*, *S. aureus* résistant à la méticilline ou encore *Serratia marcescens* (Mandal et Mandal, 2011).

Cette activité non peroxyde est une propriété du miel de Manuka extrêmement importante également d'un point de vue marketing. La création d'un indice spécifique, l'UMF (Unique Manuka Factor), permet au consommateur d'être informé sur la qualité antibactérienne du miel. Cet indice, classé de 5+ à 25+, se base sur des tests microbiologiques. Par exemple, un miel de Manuka d'indice UMF 10+ possède la même activité qu'une solution antiseptique à 10% de phénols.

3.3.2.4 Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux que l'on retrouve dans les miels. Ils représentent le groupe le plus important et le plus largement distribué dans le règne végétal, avec plus de 8 000 structures phénoliques (Dziąło *et al.*, 2016). Ils sont caractérisés par la présence, au minimum, d'un noyau benzénique sur lequel se trouve, au moins, un groupement hydroxyle engagé avec d'autres fonctions (éther, ester...) ou libre (fig. 51). Ils se présentent sous petites molécules comme les acides phénoliques ou largement polymérisés comme les tanins (Lugasi *et al.*, 2003).

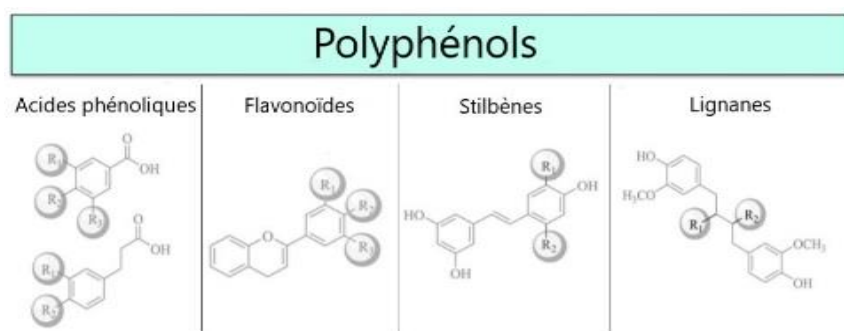


Figure 51 : Les grandes familles de polyphénols (adapté de Amawi *et al.*, 2017)

Les polyphénols sont connus pour leurs effets antioxydants (piégeage de radicaux libres et chélation de métaux). Ils affectent la perméabilité membranaire induisant ainsi le relargage de constituants intracellulaires dans le milieu extérieur. De plus, ils interfèrent également avec la chaîne respiratoire par inhibition de l'oxydation du NADH, la synthèse des acides nucléiques et des protéines et l'activité de certaines enzymes (Paul *et al.*, 2011).

Dans la famille des polyphénols, on distingue notamment les flavonoïdes, qui en représente la part la plus importante avec plus de 4 000 molécules référencées (Nijveldt *et al.*, 2001). Ce sont des substances phénoliques hydroxylées présentant une structure générale formée d'une unité C₆-C₃ liée à un cycle aromatique. Elles sont réparties en 6 classes principales présentant un même squelette primaire (fig. 52) : les flavonols, les flavanones, les flavanols, les flavones, les anthocyanes et les isoflavones.

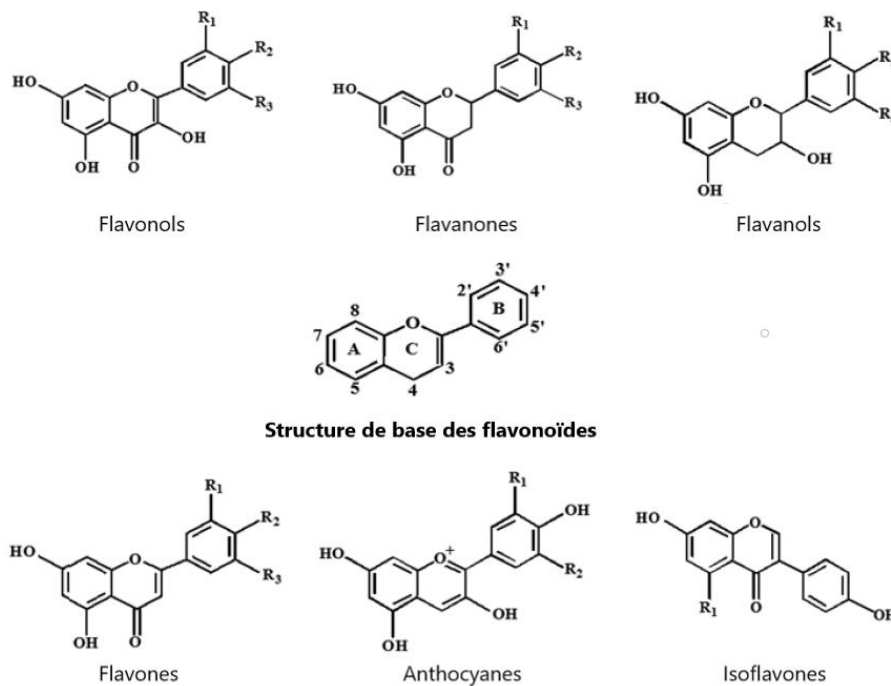


Figure 52 : Structures moléculaires des six classes de flavonoïdes (adapté de Pandey et Rizvi, 2009)

Les flavonoïdes sont des substances naturelles, généralement colorées, répandues chez les végétaux. On les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants des chromoplastes. Leur fonction principale semble être la coloration de la plante (en plus des pigments bien connus : chlorophylle et caroténoïdes) mais on leur attribue beaucoup d'autres propriétés : anti-inflammatoires, antivirales, anticarcinogènes... Les flavonoïdes sont connus pour être synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne, ce qui pourrait expliquer leur efficacité *in vitro* contre un large éventail de microorganismes (Cowan, 1999). Leur activité est due, en partie, à leur capacité à se complexer avec les acides aminés des protéines extracellulaires et solubles entraînant une inactivation et/ou une perte de fonction. Ainsi, leurs actions principales dans les cellules

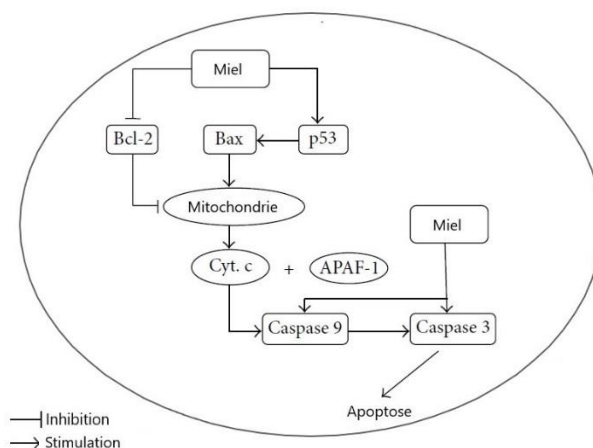
microbiennes sont : l'inhibition de cibles membranaires comme les adhésines de surface, les polypeptides de la paroi ainsi que les enzymes (Cowan, 1999), l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (Tsuchiya et Inuma, 2000), l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (Plaper *et al.*, 2003) ou l'inhibition du métabolisme énergétique (Haraguchi *et al.*, 1998).

3.3.2.5 Les facteurs physico-chimiques (pression osmotique, pH...)

Avec une concentration en sucres totaux supérieure à 80% en moyenne (Molan, 2012), le miel présente une osmolarité suffisante pour prévenir une éventuelle croissance bactérienne ou fongique. D'après Amor (1978), certains miels seraient détériorés par la présence de levures, qui peuvent s'y développer à la condition que la concentration en eau soit supérieure à 17,1% pour permettre la fermentation. Cependant, les bactéries sont beaucoup moins tolérantes que les champignons aux fortes concentrations en sucres. Beaucoup d'espèces bactériennes ne survivront pas à l'osmolarité induite par des dilutions de miel de 10%. Néanmoins, l'espèce la plus commune d'infections de plaies, *S. aureus*, a une tolérance exceptionnellement élevée à la pression osmotique et peut survivre à des concentrations en miel allant jusqu'à 30%.

3.3.2.6 Autres propriétés biologiques

Les miels sont de potentielles substances anticancéreuses (Othman, 2012). Cet effet viendrait principalement des composés phénoliques connus pour posséder des propriétés chémopréventives (Jaganathan et Mandal, 2009 ; Othman, 2012). Néanmoins, à ce jour, les mécanismes ne sont pas encore bien connus, comme par exemple son implication dans la voie apoptotique qui se ferait à plusieurs niveaux (fig. 53).



**Figure 53 : les effets du miel sur la voie de l'apoptose
Avec APAF-1 : apoptotic protease activating factor 1
(adapté de Ahmed et Othman, 2013)**

Le miel augmente l'expression de la protéine p53, de la caspase 3 et de la protéine proapoptotique Bax. De plus, il régule à la baisse l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-2. Les espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) générées par le miel entraînent l'activation de p53 qui, à son tour, va moduler l'expression de Bax et Bcl-2 (Jaganathan et Mandal, 2010). Le miel de Manuka exerce son effet apoptotique sur les cellules cancéreuses par l'induction de la caspase 9 qui active à son tour la caspase-3, la protéine exécutive. L'apoptose induite par le miel de Manuka implique également l'induction de la fragmentation de l'ADN et la perte de l'expression de Bcl-2 (Fernandez-Cabezudo *et al.*, 2013). Ces propriétés apoptotiques font du miel un bon candidat en tant qu'agent anticancéreux sachant que de nombreux agents chimiothérapeutiques actuellement utilisés sont inducteurs d'apoptose.

D'autre part, les miels agissent au niveau de nombreux autres mécanismes tels la régulation de l'activité anti-inflammatoire, de l'activité antioxydante ou de la cyclooxygénase-2 (Ahmed et Othman, 2013).

L'activation de NF- κ B joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire (Johnston *et al.*, 2005 ; Turkmen *et al.*, 2006). Il a été démontré que le miel de Gelam réduit le niveau de production de médiateurs de l'inflammation comme la cyclooxygénase-2 ou le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α). Cette action s'effectue grâce à l'atténuation de la translocation nucléaire de NF- κ B inhibant ainsi la voie de ce dernier (Al-Waili, 2004).

Les ROS sont connues pour induire des dommages sur la structure même de l'ADN et des dommages cellulaires, provoquant ainsi un vieillissement prématuré. Les antioxydants, en se liant à elles, préviennent leurs effets nocifs (Jaganathan et Mandal, 2009). De nombreux

constituants des miels apportent cette activité antioxydante. Parmi eux sont retrouvés, principalement, les composés phénoliques (Gheldof *et al.*, 2002 ; Petretto *et al.*, 2014). Du miel de sarrasin a, par exemple, montré une activité similaire à l'utilisation d' α -tocophérol (1mM) (Nagai *et al.*, 2006). Beretta *et al.* (2007) ont également mis en évidence qu'une solution de miel à 1% produisait une forte inhibition de l'activité des radicaux cumoxyle et cumpoperoxyle qui s'est traduite par une diminution, voire une suppression, des dommages cellulaires, ainsi qu'une totale inhibition de l'oxydation membranaire et de la production intracellulaire de ROS. De plus, une restauration complète de la quantité de glutathion réduit, nécessaire à la détoxification de l'organisme, est associée à ce premier résultat. Les auteurs ont mis en évidence que les principales molécules responsables de l'effet protecteur contre ce stress oxydant étaient les flavonoïdes et les acides phénoliques.

Des enzymes, telles la glucose oxydase ou la catalase, ou encore la vitamine C, joueront un rôle important dans cette action antioxydante (Khalil *et al.*, 2010).

Les miels peuvent également présenter des actions antiparasitaires. Des miels de différentes origines botaniques se sont montrés efficaces contre *Caenorhabditis elegans*. C'est un composé glycoconjugué de 5 511 kDa inconnu qui induit une mort cellulaire de la lumière intestinale ainsi que des gonades de *C. elegans* (Sajid et Azim, 2012).

Mohammed *et al.* (2015) ont fractionné des miels de *Ziziphus* sp. obtenant ainsi des peptides de tailles différentes (10 à < 200 kDa). Ces derniers ont montré des $IC_{50} \leq 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contre *Giardia lamblia*, un protozoaire flagellé responsable de la giardiase, une parasitose intestinale.

Irish *et al.* (2006) ont détecté une action de certains miels contre *C. albicans*, *Candida glabrata* ou encore *Candida dubliniensis*. Néanmoins, ces actions antifongiques sont à pondérer. Les miels floraux sont beaucoup plus actifs que les miels artificiels mais les CMI sont retrouvées à des concentrations minimales de 15,4 %. Plus récemment, des études sur différents miels algériens montraient des CMI encore plus élevées contre *C. albicans*, avec des *minima* de 81,16% pour des miels non dilués et de 56,14% contre *Rhodotorula* sp (Moussa *et al.*, 2012).

Certains miels de Manuka présentent également une activité antivirale contre le virus *Influenza*, capable de potentialiser des inhibiteurs de la neuraminidase tels le zanamivir ou l'oséltamivir (Watanabe *et al.*, 2014). D'autres virus sont également sensibles à l'action des miels de Manuka et de trèfle : c'est le cas du virus varicelle-zona. Les miels sont apparus très

actifs, présentant des EC_{50} d'environ 4,5% (w/v). Cette activité ouvre des perspectives intéressantes, les miels pouvant ainsi se montrer très efficaces, en application directe contre les éruptions cutanées de zona (Shahzad et Cohrs, 2012).

4. Problématique scientifique et objectifs

L'équipe de Biochimie Microbienne a développé, depuis 2004, une thématique de recherche sur les activités biologiques des huiles essentielles. La stratégie initiale visait à rechercher de nouvelles molécules à activité antibactérienne dans les huiles essentielles de Corse afin de valoriser les ressources de la biomasse insulaire. Ainsi, une première thèse a été soutenue en 2007 qui portait sur le criblage des activités antimicrobiennes de 28 huiles essentielles de Corse sur 5 pathogènes responsables d'infections nosocomiales ou d'intoxications alimentaires. L'huile essentielle de *Daucus carota* (carotte) présente une action antibactérienne contre de nombreuses espèces de *Campylobacter* sp., notamment *Campylobacter jejuni*. Les molécules responsables de l'activité ont été identifiées : l'(E)-méthylisoeugénol et, à moindre niveau, l'élémicine. De plus, des études de relation entre la leur structure et leur activité ont permis de déterminer les fonctions chimiques impliquées dans leur pouvoir antibactérien. D'autre part, ce travail a permis de montrer que les huiles essentielles de *Santolina corsica* et d'*Inula graveolens* se montrent particulièrement efficaces contre *S. aureus*.

Dans la continuité de ces recherches, une seconde thèse portant sur la séparation, l'identification et le mode d'action de ces huiles essentielles a été soutenue en 2010. Elle a permis de montrer que les huiles essentielles de *Santolina corsica* et d'*Inula graveolens* n'entraînent pas de lyse bactérienne mais agissent sur la paroi cellulaire et la membrane plasmique de *S. aureus*. D'autre part, l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* inhibe la croissance de cette souche. De plus, son spectre d'action est beaucoup plus large. En effet, d'autres pathogènes y sont sensibles. C'est notamment le cas de bactéries Gram négatives comme *Campylobacter jejuni*, *E. aerogenes* et le mutant multi-résistant EA289 ainsi que des Gram positives telles *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* et *B. cereus*. L'action antibactérienne de cette huile provient de sa fraction oxygénée riche en alcools terpéniques dont l'action est ciblée sur la paroi bactérienne.

Parallèlement à ces travaux, une deuxième stratégie de recherche a émergé consécutivement à un post-doctorat portant sur l'inhibition des mécanismes de résistance des bactéries par les huiles essentielles. Ce travail a ciblé plus spécifiquement la recherche d'inhibiteurs des pompes d'efflux. L'action des huiles essentielles de Corse a été principalement testée sur un isolat clinique, EA289, dont la surexpression de son système d'efflux AcrAB-TolC lui confère de fortes capacités de résistance à divers antibiotiques.

L'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* s'est montrée très efficace en restaurant l'activité du chloramphénicol et de certaines β -lactames et quinolones. Le fractionnement de cette huile a permis de montrer que le composé responsable de l'activité anti-efflux était le géraniol qui agit sur la sous-unité AcrB de la pompe d'efflux exprimée. Ces travaux ont conduit à l'obtention de deux brevets européens.

Afin d'étendre cette deuxième stratégie de recherche aux mécanismes de virulence bactériens, une nouvelle partie a été développée au cours de mon travail de thèse, concernant la recherche de molécules innovantes dans les huiles essentielles. Le but de mon travail a été, dans un premier temps, de cribler l'activité anti-quorum sensing de 12 huiles essentielles puis d'identifier la/les molécule(s) active(s).

D'autre part, nous avons pu élargir nos recherches de molécules antibactériennes à une autre catégorie de produits naturels, les miels. Une autre partie de mon travail de thèse a donc consisté à cribler l'action de six variétés de miels sur sept pathogènes problématiques aussi bien en milieu hospitalier que dans le secteur de l'agroalimentaire. Nous avons ensuite essayé de déterminer le mode d'action des molécules responsables de l'activité des miels.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1

Activités antibactériennes et mécanismes d'action des miels de Corse

CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MIELS DE CORSE

Les miels de Corse sont issus d'une végétation spontanée avec plus de 200 espèces. Ils sont caractérisés par la présence d'espèces endémiques et subendémiques, ce qui en fait une production originale pour la recherche d'activités antibactériennes. Nous avons donc travaillé, en accord avec Marie-Josée Battesti, spécialiste en palynologie à l'université de Corse, sur 11 miels. L'AOC « Miels de Corse – Mele di Corsica » a été obtenue en 1998, suivie, en 2000 de l'AOP et sont composées de 6 miels variés regroupés sous l'appellation : Miels de Corse.

L'échantillonnage sélectionné a été le suivant, en fonction des miels disponibles : deux miels de Printemps, un miel de Maquis d'Eté, trois miels de Châtaigneraie, un miel de Maquis d'Automne, deux Miellats du Maquis ainsi que deux miels « génériques » issus de plusieurs miellées successives.

Les bactéries choisies pour ce travail peuvent être classées en deux groupes :

- les bactéries responsables d'intoxications alimentaires : *L. monocytogenes*, *E. faecalis* et *B. cereus* ;
- les bactéries responsables d'infections nosocomiales : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, la souche sauvage d'*E. aerogenes* et son variant multi-résistant EA289.

Le but de ce travail est de cribler l'activité antibactérienne de ces différents miels. Nous avons donc déterminé leurs CMI.

Grâce aux mesures obtenues, nous avons pu réaliser une analyse en composantes principales qui nous a permis de mettre en évidence les miels actifs. On a pu voir que trois groupes présentaient une activité antimicrobienne sachant que l'on a défini un miel comme étant actif pour des CMI $\leq 10\%$: les miels génériques et de Châtaigneraie et les Miellats avec des valeurs moyennes de CMI respectives de 9,9%, 10,65% et 9,25%. Les Miellats sont, néanmoins, un peu à part. En effet, ils ne sont pas fabriqués par les abeilles, mais sont en fait des *excreta* de cicadelle blanche (*Metcalfa pruinosa*). *S. aureus* et *P. aeruginosa* semblent se montrer particulièrement sensibles à ces miels.



Investigating the antibacterial action of Corsican honeys on nosocomial and foodborne pathogens

Jean-Pierre Poli, Elodie Guinoiseau, Anne Luciani, Yin Yang, Marie-José Battesti, Julien Paolini, Jean Costa, Liliane Berti & Vannina Lorenzi

To cite this article: Jean-Pierre Poli, Elodie Guinoiseau, Anne Luciani, Yin Yang, Marie-José Battesti, Julien Paolini, Jean Costa, Liliane Berti & Vannina Lorenzi (2018) Investigating the antibacterial action of Corsican honeys on nosocomial and foodborne pathogens, Journal of Apicultural Research, 57:1, 186-194

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1412564>



Published online: 15 Jan 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Investigating the antibacterial action of Corsican honeys on nosocomial and foodborne pathogens

Jean-Pierre Poli^{a*}, Elodie Guinoiseau^a, Anne Luciani^a, Yin Yang^b, Marie-José Battesti^b, Julien Paolini^b, Jean Costa^b, Liliane Berti^a and Vannina Lorenzi^a

^aLaboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire du végétal UMR CNRS 6134, Université de CORSE, Corte, France; ^bLaboratoire Chimie des Produits Naturels UMR CNRS 6134, Université de CORSE, Corte, France

(Received 10 March 2017; accepted 19 August 2017)

Honey is known for its medicinal uses, with compounds such as hydrogen peroxide or phenolic compounds. For the first time, the antibacterial activity of protected designation of origin (PDO) “Miel de Corse – Mele di Corsica” commercial Corsican honeys was investigated. According to the PDO recommendation, melissopalynological analysis were used to classify 11 Corsican honeys. They have been tested for antimicrobial action on seven foodborne and nosocomial bacterial strains by Minimum Inhibitory Concentration (MIC₉₀) then statistical analyses helped to correlate their action on the different strains. The varietal range of honey samples were obtained by melissopalynological analysis leading to 2: “Spring”, 3 “Chestnut grove”, 1 “Summer maquis”, 2 “Honeydew maquis” and 1 “Autumn maquis” and 2 samples classified as “generic” Corsican honeys. 29 MIC values determined were under 10%. Only *Enterococcus faecalis* didn’t seem sensitive to the action of the honey. However, “Honeydew maquis”, “generic” Corsican honeys and 2 “Chestnut grove” honeys appeared as the most effective (MIC values ranging from under 5 to 9% on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*). The antimicrobial activity of PDO “Miel de Corse – Mele di Corsica” honeys demonstrate bacterial growth inhibition on 6 of the 7 bacterial strains. Now, an in-depth study must be performed to identify the mode of action of the active honeys.

Investigación de la acción antibacteriana de las mieles de Córcega sobre patógenos nosocomiales y transmitidos por los alimentos

La miel es conocida por sus usos medicinales por sus compuestos tales como el peróxido de hidrógeno o los compuestos fenólicos. Se ha investigado, por primera vez, la actividad antibacteriana de las mieles comerciales de denominación de origen protegida (DOP) “Miel de Córcega - Mele di Corsica”. De acuerdo con la recomendación de la DOP, se han utilizado el análisis melisopalinológicos para clasificar 11 mieles de Córcega. Se ha testado la acción antimicrobiana en 7 cepas bacterianas de transmisión alimentaria y nosocomiales (Concentración Inhibitoria Mínima : MIC₉₀), posteriormente los análisis estadísticos permitieron correlacionar su acción sobre las diferentes cepas. El rango varietal de las mieles se obtuvo por análisis melisopalinológico conduciendo a : 2 “Primavera”, 3 “Arboleda de castaños”, 1 “Maquis de verano”, 2 “Maquis de Ligamaza” y 1 “Maquis de otoño” y 2 muestras clasificadas como “genéricas” de miel de Córcega. 29 valores de CIM determinados fueron inferiores al 10%. Sólo *E. faecalis* no parecía sensible a la acción de la miel. Sin embargo, los “maquis de ligamaza”, las mieles “genéricas” de Córcega y 2 mieles de “Arboleda de castaños” aparecieron como los más eficaces (valores de CIM que oscilaban entre 5% y 9% en *P. aeruginosa* y *S. aureus*). La actividad antimicrobiana de las mieles de DOP de “Miel de Córcega - Mele di Corsica” demuestra la inhibición del crecimiento bacteriano en varias de las 7 cepas bacterianas. Ahora, se debe realizar un estudio en profundidad para identificar el modo de acción de las mieles activas.

Keywords: Corsican honeys; antibacterial activity; inhibitory concentration; melissopalynology; virulence

Introduction

Widespread introduction of antibiotics began in the 1940s, starting with penicillin (Fleming, 1929) and streptomycin (Schatz, Bugle, & Waksman, 1944) and led to huge improvement in care by offering an effective cure to most prevalent diseases. However, widespread overuse has driven the development of antibiotic resistance, cutting the lifespan of today’s antibiotics short. Consequently, there is a constant need for new antibiotic compounds. However, with the exception of oxazolidinones and lipopeptides that only target Gram-positive

infections, no new class of antibiotics has entered clinical practice in over two decades (Nathan, 2004). Honey bees (*Apis mellifera*) produce many natural products (venom, wax, propolis, pollen and honey) that have been useful for medicinal treatment throughout history.

Honey is a supersaturated solution of sugars, mainly fructose (38%) and glucose (31%), and a more minor complex fraction of phenolic compounds, minerals, proteins, free amino acids, enzymes and vitamins (Alvarez-Suarez, Tulipani, Romandini, Bertoli, & Battino, 2010). As a food product distributed worldwide, honey is

*Corresponding author. Email: poli_jp@univ-corse.fr

a complete and multi-potential human food. Honey was first known for its wound-healing ability, and even today is successfully used to treat chronic wound infections that are not responding to antibiotic therapy (Al-Waili, Salom, & Al-Ghamdi, 2011; Simon et al., 2006; Vandamme, Heyneman, Hoeksema, Verbelen, & Monstrey, 2013), but it is also used to treat skin ulcers, gastrointestinal disorders, asthma and severe burns (Al-Mamary, Al-Meerri, & Al-Habori, 2002; Orhan et al., 2003), and – crucially here – is renowned for its antibacterial activity (Gethin & Cowman, 2009; Molan, 1999). Melissopalynology research has turned to focus on the antimicrobial properties of honeys which likely stem from various factors including hydrogen peroxide content, phytochemistry, osmolarity and acidity (Carnwath, Graham, Reynolds, & Pollock, 2014; Kwakman et al., 2010). Moreover, the antibacterial activity of honeys may vary depending on floral source (Libonatti, Varela, & Basualdo, 2014).

Corsican honeys have long been used in traditional medicine to help cure wounds and various diseases, but their antibacterial activity has never been investigated. Corsican honeys, along with Vosges fir-tree honeys, are certified under an official geographic indication of traditional speciality scheme, the European Protected Designation of Origin (PDO), labeled as “Miel de Corse – Mele di Corsica”. They are classified into six ranges: “spring”, “spring maquis”, “chestnut grove”, “summer maquis”, “autumn maquis” and “honeydew maquis”, according to geographic location of the apiaries, botanical data, and season of harvest (Battesti, Gamisans, & Piana, 1997). The control of geographical and botanical origins of Corsican honeys takes into account the statistical treatment of melissopalynological data supplemented by the sensory characteristics and physicochemical parameters (Battesti, 1990; Battesti & Goeury, 1992; Von Der Ohe, Persano Oddo, Piana, Morlot, & Martin, 2004). The purpose of this study was to investigate, for the first time, the antimicrobial activity of commercial Corsican honeys classified according to PDO varietal ranges, and to analyze the results in terms of predominant origin of the different samples of honeys.

Materials and methods

Honey samples

A total of 11 honey samples from the year 2014 (Table 1) were retail-purchased from local apiarists and stored in the dark at 4 °C. Before analysis, the honey samples were examined by sensory analysis to check for suitable conservation conditions (in the dark at 4 °C).

Melissopalynological analysis

Analysis of pollen and solid constituents in honey paired (i) pollen extraction and microscopic preparation with (ii) qualitative and quantitative analysis using a microscopic method. Analyses were performed using the method described by Yang et al. (2012). The pollen was

Table 1. Localization of tested honeys.

Honey code	Producer code	Localization (altitude)
Sample 1	1	“Eastern plain”
Sample 2	2	“Ajaccio southern shore”
Sample 3	3	“Corte central Corsica”
Sample 4	2	“Gravona valley”
Sample 5	4	“Upper eastern plain”
Sample 6	2	“Gravona valley”
Sample 7	2	“Upper Gravona valley”
Sample 8	4	“Niolu region”
Sample 9	5	“Lower Gravona valley”
Sample 10	4	“Eastern plain”
Sample 11	2	“Gravona valley”

identified by comparison against a reference pollen-slides library produced in the “Chimie des Produits Naturels” unit at the University of Corsica and with the help of the expert palynological practice developed for the characterization and PDO control of Corsican honeys (Battesti, 1990; Battesti & Goeury, 1992). Total pollen spectrum (qualitative analysis) of each honey sample was established and expressed in terms of relative frequency (RF) of each identified taxon. Pollen density (quantitative analysis) is exemplified by the absolute number of pollen grains in 10 g of honey sample, and expressed as PK/10 g.

Bacterial strains and growth conditions

The *in vitro* antibacterial activity of Corsican honeys was tested against six laboratory control strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Listeria monocytogenes* (CIP 55.143), *Enterococcus faecalis* (CIP 76.117), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 13646), *Enterobacter aerogenes* wild-type (ATCC 13048) and multi-drug-resistant (MDR) strain *E. aerogenes* EA289. All strains were provided by the Institut Pasteur’s Biological Resource Center (Paris, France). EA289 is a kanamycin-sensitive derivative of clinical isolate EA27 (Mallea et al., 1998) and was provided by UMR-MDI of Aix-Marseille University (France). All strains were routinely grown at 37 °C on Mueller-Hinton 2 Agar (BioMérieux, France).

Antibacterial assay

Antibacterial activity was expressed as the minimum inhibitory concentration of honey that spectrophotometrically reduces bacterial growth by 90%. The test was adapted from Zainol, Yusoff, and Yusof (2013) with slight modifications. Working bacteria culture was adjusted to equal 0.5 McFarland standards (10^8 CFU/ml) and further diluted 200-fold in Mueller-Hinton broth (MHB, oxoid) to reach 0.5×10^6 CFU/ml. Honey samples were diluted (from 50 to 1%) in MHB then filtered through 0.2 µm filters (Sartorius AG, Germany). A volume of 190 µl of each honey dilution was aseptically transferred into 96-well microplates (Nunc™, Denmark) with 8 replicates per dilution. The first two wells of

each honey dilution served as dilution sterility controls (added with another 10 µl of respective honey dilution) and the 6 others were the test wells admixed with 10 µl of bacterial culture. The last two rows were reserved for batch sterility (200 µl of MHB) and growth (10 µl of bacterial culture in 190 µl of MHB) controls. Plates were incubated in a shaker incubator (Stuart, UK) at 120 rpm and at 37 °C for between 18 and 24 h. After incubation, absorbance of the wells was read at 620 nm using a microtiter plate reader (Sunrise, Tecan™). Percentages of the bacterial growth inhibition were calculated using the following formula:

$$\left(1 - \frac{(\text{absorbance of test well} - \text{absorbance of corresponding control well})}{(\text{absorbance of assay growth control} - \text{absorbance of sterility control})} \right) \times 100$$

Each experiment was performed in triplicate.

Statistical analysis

Data were analyzed using a Principal Component Analysis (PCA) method (Robinson, 2003) that aims to reduce the multivariate space in which objects are distributed but complementary in terms of ability to yield results (Deming, Michotte, Massart, Kaufman, & Vandeginste, 1988). Indeed, PCA provides the data for diagrams in which both objects (honey samples) and variables (bacterial strains) are plotted. PCA was carried out using the “PCA” function of statistical R software (V 2.13.1). The variables (bacterial strains) were selected using the function bundled with the software. The cluster analysis (CA) produced a dendrogram tree using Ward’s method of hierarchical clustering, based on Euclidean distance between pairs of honey samples.

Results and discussion

Melissopalynological analysis

The PDO recommendations, based on Battesti and Goeury (1992), serve to stratify the different samples into the 6 defined ranges according to pollen density and presence of specific plant taxa. As shown in Table 2, 71 plant taxa were determined in the 11 Corsican honeys with various pollen densities classified as low [samples 1, 2, 3, 8, 11], medium [samples 9, 10], high [samples 4, 5] to very high [samples 6 and 7].

Samples 1 and 2 showed lower pollen density (5.9×10^4 and 5.2×10^4 PK/10 g honey, respectively) and the characteristic association of spring species: *Citrus* sp., *Erica arborea*, *Rubus* sp., *Salix* sp., *Cytisus/Calicotome* and *Pyrus/Malus* form for sample 1 and *Asphodelus ramosus*, *E. arborea*, *Lavandula stoechas*, and *Crataegus monogyna* for sample 2. These characteristics allow to classify these two honey samples in the “spring” honey range (SPR).

Samples 5, 6 and 7 were classified as “chestnut grove” honeys (CG) based on their very high rates of *Castanea sativa* pollen with relative frequencies (RF) of 96.23, 97.94 and 91.07%, respectively, and their high pollen density (5.43×10^5 , 1.007×10^6 and 1.586×10^6 PK/10 g honey, respectively). Considering the “over-represented” characteristic of *C. sativa* pollen, *C. sativa* did not contribute to nectar composition for samples 4, 10 and 11, even if the RF of *C. sativa* was relatively higher in these samples (>50%) (Yang et al., 2012).

Sample 8 is a “summer maquis” (SM) defined by a low pollen density (78×10^3 PK/10 g honey), a predomi-

nance of *Anthyllis hermanniae* (44.9%), and a typically nectariferous association (*Genista* sp., *Jasione montana*, *Rubus* sp., *Rosa* sp.)

Very high proportions of fungus spores and microscopic algae (honeydew indicator) associated with a specific species association (*Asparagus* sp., *Chamaerops humilis*, *Chenopodiaceae*) classified sample 9 and 10 as “metcalfa honeydew maquis” (HDM).

Sample 11, characterized by significant amount of *Arbutus unedo* (14.73%) and an association of some specific autumnal taxa (*Smilax aspera*, *Hedera helix*, *Asparagus* sp., & *Asteraceae Dittrichia*) classified as “autumn maquis” (AM) range.

Samples 3 and 4 classified as “generic” Corsican honeys (CH), which can be commercialized as PDO honey but without specifying any one of the six ranges. In fact, these two honey samples did not possess a predominant nectariferous taxa but a diversity of nectariferous species associations such as *Rubus* sp., *C. sativa*, *E. arborea*, *Bupleureum fruticosum* and *Ilex aquifolium* for sample 3 and *C. sativa*, *A. hermanniae* and *E. arborea* for sample 4.

RF value of 27.9% of *Erica arborea* is the lowest limit needed to qualify a “spring maquis” honey (Yang et al., 2012). This minimum RF was not reached in the 2014 commercial range, as weather conditions did not allow *E. arborea* to be significantly represented.

Antibacterial assay

Manuka honeys are known to be some of the most active antibacterial honeys with MIC values under 10% (Tan et al., 2009). Indeed, the MIC values of Manuka honey Comvita UMF 18+ on *S. aureus* and *P. aeruginosa* are 7 and 10%, respectively (Zainol et al., 2013). We thus decided to qualify honeys with MIC values ≤10% concentration as highly biologically active and honeys with MIC values between 10 and 20% as moderately active.

As shown in Figure 1, antibacterial activity on the different bacterial strains is dose-related. Of the 11

Table 2. Melissopalynological analysis of Corsican honeys.

Type ^a	Taxa	Honey references										
		Sample 1 SPR 1	Sample 2 SPR 2	Sample 3 CH 1	Sample 4 CH 2	Sample 5 CG 1	Sample 6 CG 2	Sample 7 CG 3	Sample 8 SM	Sample 9 HDM 1	Sample 10 HDM 2	Sample 11 AM
		Relative Frequencies (RF)										
1	N, P	0.24										
2	N, P				0.18			0.93		0.19		
3	N, P		0.55	1.34	14.27	0.24	0.08	2.11	44.90		0.96	
4	N, P							0.17	0.16		14.73	
5	N, P									0.76		
6	N, P								11.80	0.19	0.41	
7	N, P		2.20									
8	N, P		0.28			0.02		0.07	0.17	0.33		
9	N, P	0.24									0.21	
10	N, P									0.16		
11	N, P										0.21	
12	N, P			0.27			0.03	0.07			0.38	2.49
13	N, P					0.02				0.16		
14	N, P			0.81						1.15		
15	P										0.96	
16	N, P							0.02				
17	N, P				0.05							
18	N, P	1.67	0.28	0.13	0.23							
19	N, P			6.99								
20	N, P			0.27			0.03	0.02	0.17			
21	N, P	12.14	8.26	13.84	55.70	96.23	97.94	91.07	33.50	27.38	53.92	50.62
22	N, P									5.41	0.19	6.22
23	P	0.24		0.13						0.82	1.15	
24	P	26.43	10.74	7.80	1.22	0.22	0.19	0.46	1.53	2.46	1.91	0.62
25	N, P	4.05					0.03					
26	N, P					0.28		0.02				
27	N, P	1.19	1.38	0.4	0.18			0.48	1.19			
28	P				0.14							
29	P		1.10	0.81						0.49		
30	N, P	3.10	0.28		0.14							
31	N, P	0.48				0.07	0.05	0.02			0.38	0.41
32	N, P		1.38				0.03				0.19	
33	N, P	12.38	25.62	11.02	11.80	0.28	0.60	0.22	0.17	0.16	0.57	0.62
34	N, P			0.13								
35	P	0.24							0.17	15.57	1.15	2.90
36	N, P		0.28	0.54	0.14			0.05	0.17			
37	P		0.83	4.17	0.36			0.37		0.33		
38	N, P			0.13					3.06			
39	N, P		0.28	2.42						8.03	29.45	1.66
40	N, P			0.54								

Table 2. (Continued).

Type ^a	Taxa	Honey references										
		Sample 1 SPR 1	Sample 2 SPR 2	Sample 3 CH 1	Sample 4 CH 2	Sample 5 CG 1	Sample 6 CG 2	Sample 7 CG 3	Sample 8 SM	Sample 9 HDM 1	Sample 10 HDM 2	Sample 11 AM
		Relative Frequencies (RF)										
41	N, P			4.44								
42	N, P				3.56		0.03	0.04	2.38			0.21
43	P									0.16		
44	N, P			0.13								
45	N, P				0.05	0.02		0.04				
46	N, P	0.24	7.99	0.94				0.02			0.19	
47	N, P	0.95			0.14	0.04						
48	P				0.23							
49	P	0.24					0.05			9.84	0.96	
50	P	0.71	3.58	1.34	0.59		0.05		0.34	0.66		
51	P									0.33		
52	P		0.83	0.27				0.05	0.34	0.33	0.19	
53	P				0.05			0.05				
54	P	4.29	0.55		0.05		0.03					
55	P	0.24	0.28						0.17	0.98	0.57	0.21
56	P				0.09						0.96	
57	P	1.19	1.10									
58	N, P				0.09				0.34			
59	N, P	2.38		1.61	0.77	0.09	0.03	0.22	1.02	0.33	0.19	
60	P	14.76	26.72	9.54	8.96	0.22	0.08	0.42	5.78	0.82	1.72	10.17
61	N, P								1.19			
62	N, P	0.24										
63	N, P	6.9	3.31	27.42	0.27	2.08	0.55	2.54	2.38	7.87	2.49	4.36
64	P			0.13	0.18							
65	N, P	4.05										
66	N, P									2.95		2.07
67	N, P			1.75					0.17			
68	N, P		0.55	0.13	0.59	0.02	0.16	0.70				0.21
69	N, P			0.13		0.11			0.17			
70	N, P	0.48										0.41
71	N, P			0.27								
	Unknown	0.95	1.65	0.13	0.05	0.04	0.03	0.02	0.51	1.31	0.38	1.24
	Pollen density (PK/10 g)	59000	52000	93000	521000	543000	1007000	1586000	78000	178100	121600	90000

^aNotes: Type of taxa: P, polleniferous taxa; N, nectariferous taxa.

Bold values were the significant ones that helped for honeys ranking.

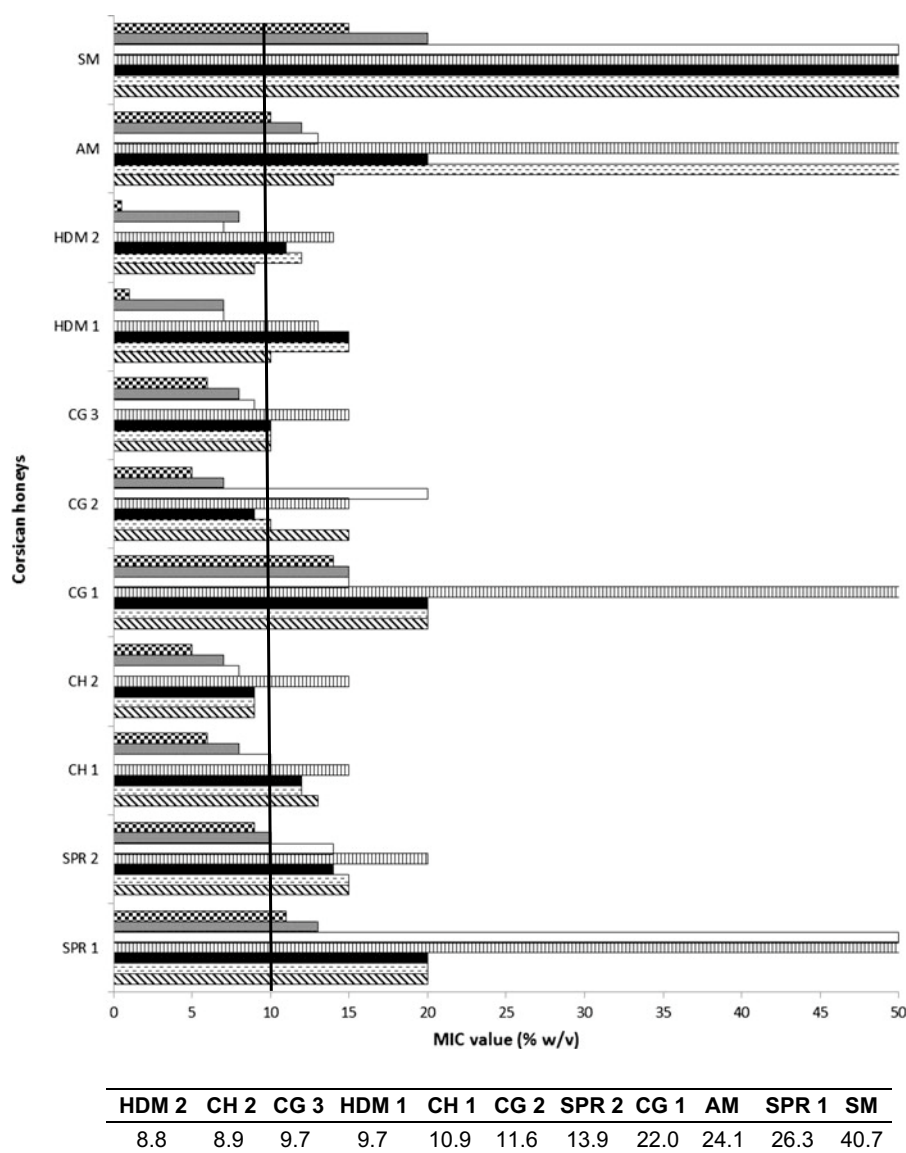


Figure 1. Determination of Corsican honeys MIC values on *S. aureus* (☒), *P. aeruginosa* (■), *L. monocytogenes* (□), *E. faecalis* (▤), EA289 (■), *E. aerogenes* (▥) and *B. cereus* (▧) and average values of MIC₉₀ for each honey (%).

honey tested against seven test organisms, only 10 combinations showed MIC values above 20%. This is first evidence that some varietal ranges of Corsican honeys present interesting antibacterial action. Indeed, CH 2 appears the most active as its MIC values were <10% on 6 of the 7 strains. Next came HDM 2 with an antibacterial activity on 4 strains, followed by HDM 1, CG 2 and CG 3 which were active on 3 bacterial strains. CH 1 was found to have a MIC value <10% on two strains and SPR 2 had antibacterial activity on one strain, whereas SPR 1, CG 1, AM and SM showed MIC values over 10%, indicating no real efficacy. Thus, Corsican honeys develop a promising antibacterial activity, since MIC values were ≤10% in 29 assays and between 11 and 15% in 27 assays.

To evaluate the correlations between the botanical origins of honeys and their antibacterial effects, the MIC

values were subjected to CA and PCA analysis. The CA based on the Euclidean distances between groups indicated two clusters (data not shown) and so these two defined groups, called I and II, were plotted in Figure 2 where total variance was explained at 79.20% by the PCA horizontal axis (Dim 1) and at 10.14% by the vertical axis (Dim 2). Group I, including AM, CG 1, SM, SPR 1 and SPR 2, was negatively correlated with antibacterial activity, meaning that these honeys are globally not or only moderately active. In contrast, group II, represented by CH 1, CH 2, CG 3, HDM 1, HDM 2 and CG 2, were positively correlated to antibacterial activity against the seven strains, and can thus be considered biologically active. Globally, honeys within a range show the same antibacterial efficacy except for one sample of the "Chestnut grove" range. CG 1 is moderately active (group I) whereas CG 2 and CG 3 are classified in the

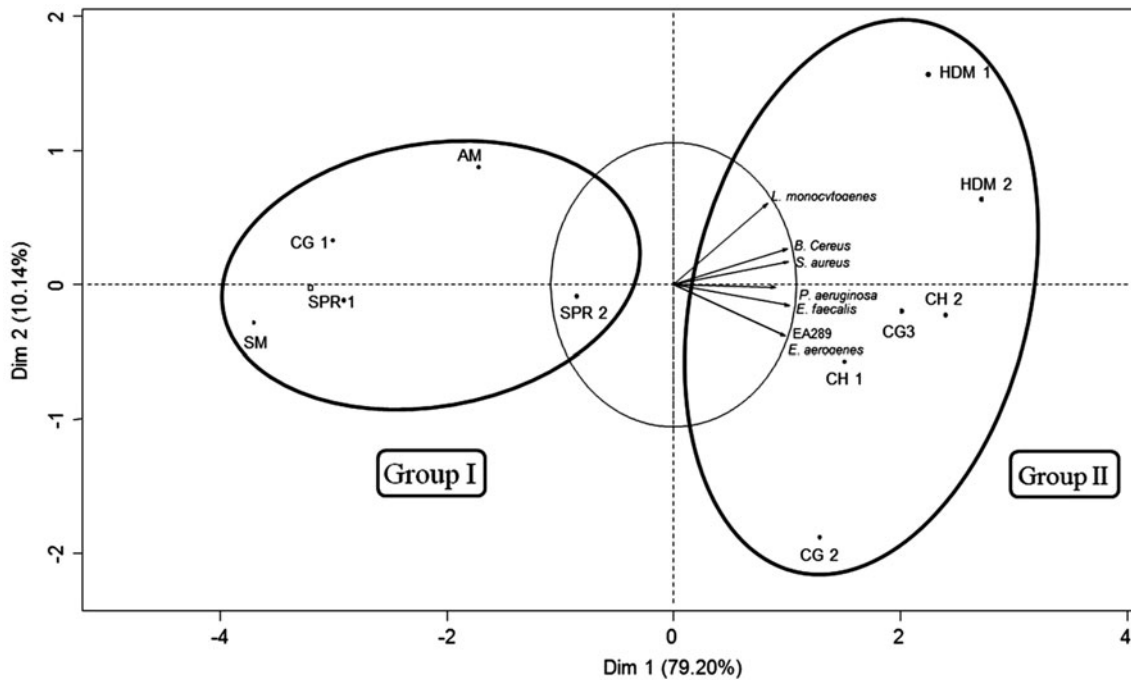


Figure 2. PCA of Corsican honeys action on 7 bacterial strains.

most active group. The observed difference in activity could be explained by several factors such as, hydrogen peroxide content, pH or variation in total phenolic compounds, which will be measured in an in-depth study. Knowing that other chestnuts groves monofloral honeys are active, its inability to exert antimicrobial action could also be explained by treatment or conservation process factors (Chen, Campbell, Blair, & Carter, 2012). Indeed, hydroxymethylfurfural (HMF), an indicator of honey heating and thereby its deterioration, could explain this lack of antibacterial action (Fallico, Zappalà, Arena, & Verzera, 2004). It would be informative to learn whether its concentration is above PDO recommendations (10 mg/kg). Moreover, CH 1 and CH 2 were among the most active honeys since they inhibited the bacterial growth of 3 and 6 bacterial strains, respectively. The review of their botanical origin shows an association of several nectariferous species from spring to summer, so this particular composition in relation with a long period of successive honeyflows may be related to its high biological activity. Both HDM 1 and HDM 2 showed antibacterial efficacy on 3 and 4 bacterial strains. These “honeydews” are excreta of *Metcalfa pruinosa*, and this specificity may explain why they are the only samples found above Dim 2.

The bacterial strains used in this study showed variable sensitivity to sample-range Corsican honeys. More precisely, there was a good separation between Gram-positive (above Dim 2) and Gram-negative bacteria (under Dim 2) except for *E. faecalis* (Figure 2), which appeared to be the most resistant strain with MIC values systematically above 10%. Then, *E. aerogenes*, its MDR derivative EA289, and *Bacillus cereus* were particu-

larly resistant to Corsican honey effect since they were sensitive to one or two honeys. *L. monocytogenes* was the third most affected strain (CH 3, CG 3, HDM 1 and HDM 2), just behind *S. aureus* and *P. aeruginosa* whose bacterial growth was inhibited by CH 1, CH 2, CG 2, CG 3, HDM 1 and HDM 2, plus SPR 2 for *S. aureus*.

The effects induced by the active Corsican honeys were stronger than the effects obtained with Malaysian Acacia, Gelam, Kelulut, Pineapple and Tualang honeys (Zainol et al., 2013). In contrast, our results are in agreement with MIC values (3.12 and 6.25%) described by Kuś, Szweđa, Jerković, and Tuberoso (2016) in some Polish honeys and by Anthimidou and Mossialos (2013) in some Greek honeys. However, even if several classes of honeys are active on *S. aureus* (lime tree, heather, buckwheat, thyme, cornflower, savoury, coriander, chestnut, among others), only a few can inhibit *P. aeruginosa* growth (buckwheat, thyme, cornflower, oregano and clover). This makes the effects induced by Corsican honeys especially interesting, as both *S. aureus* and *P. aeruginosa* are very likely to create new resistances to antibiotics (Roberts, Maddocks, & Cooper, 2012). Moreover both strains are notoriously difficult to control. For instance, mortality due to *P. aeruginosa* bacteremia among all patients has been found to be between 33 and 61% (Vitkauskienė, Skrodenienė, Dambrauskienė, Macas, & Sakalauskas, 2010).

Conclusion

We screened the antibacterial action of 11 PDO “Miel de Corse – Mele di Corsica” honeys. The most efficient (CH 1, CH 2, CG 2, CG 3, HDM 1 and HDM 2)

showed MIC values under 10% against Gram-positive and Gram-negative strains. Melissopalynological analysis of these samples showed that their various origins can explain the variability in their different antibacterial activities. *S. aureus* and *P. aeruginosa* appear to be the strains most sensitive to the action of Corsican honeys, which is an important finding, given the public health issues caused by these two strains. Considering the assessing of the storage conditions (time, temperature, light) as a potential factor of variability in the antibacterial activity of these honeys should also be interesting, but either way, an in-depth study is required to determine their mode of action and the molecules involved.

Acknowledgements

We thank the *Collectivité Territoriale de Corse* – Corsica's regional community council.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22(9), 1041–1047. doi:10.1016/S0271-5317(02)00406-2
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 15–23. doi:10.1007/s12349-009-0051-6
- Al-Waili, N., Salom, K., & Al-Ghamdi, A.A. (2011). Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice [Research article]. Retrieved July 6, 2017, from <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2011/526901/abs/>
- Anthimidou, E., & Mossialos, D. (2013). Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to manuka honey. *Journal of Medicinal Food*, 16(1), 42–47. doi:10.1089/jmf.2012.0042
- Battesti, M.-J. (1990). *Contribution à la méliissopalynologie méditerranéenne: les miels corses*. Aix-Marseille 3. Retrieved from <http://www.theses.fr/1990AIX30016>
- Battesti, M.-J., Gamsans, J., & Piana, L. (1997). *Définition du périmètre de production - Rapport des experts en vue de la mise à l'enquête. Demande de reconnaissance en A.O.C. "Miel de Corse-Mele di Corsica"*.
- Battesti, M.-J., & Goeury, C. (1992). Efficacité de l'analyse méli-topalynologique quantitative pour la certification des origines géographique et botanique des miels: le modèle des miels corses. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 75(1–2), 77–102. doi:10.1016/0034-6667(92)90151-6
- Carnwath, R., Graham, E.M., Reynolds, K., & Pollock, P.J. (2014). The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates. *The Veterinary Journal*, 199(1), 110–114. doi:10.1016/j.tvjl.2013.07.003
- Chen, C., Campbell, L., Blair, S.E., & Carter, D.A. (2012). The effect of standard heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey. *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 3, 265. doi:10.3389/fmicb.2012.00265
- Deming, S.N., Michotte, Y., Massart, D.L., Kaufman, L., & Vandeginste, B.G.M. (1988). *Chemometrics: A textbook*. Amsterdam: Elsevier.
- Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E., & Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85(2), 305–313. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.010
- 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*, 10(3), 226–236.
- Gethin, G., & Cowman, S. (2009). Retracted: Manuka honey vs. hydrogel – a prospective, open label, multicentre, randomized controlled trial to compare desloughing efficacy and healing outcomes in venous ulcers. *Journal of Clinical Nursing*, 18(3), 466–474. doi:10.1111/j.1365-2702.2008.02558.x
- Kuš, P.M., Szweda, P., Jerković, I., & Tuberoso, C.I.G. (2016). Activity of polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with color, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. *Letters in Applied Microbiology*, 62(3), 269–276. doi:10.1111/lam.12541
- Kwakman, P.H.S., te Velde, A.A., de Boer, L., Speijer, D., Vandendroucke-Grauls, C.M.J.E., & Zaat, S.A.J. (2010). How honey kills bacteria. *Faseb Journal*, 24(7), 2576–2582. doi:10.1096/fj.09-150789
- Libonatti, C., Varela, S., & Basualdo, M. (2014). Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 6(3), 51–56. doi:10.5897/JMA2014.0308
- Mallea, M., Chevalier, J., Bornet, C., Eyraud, A., Davin-Regli, A., Bollet, C., & Pages, J.M. (1998). Porin alteration and active efflux: Two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology*, 144, 3003–3009.
- Molan, P.C. (1999). Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine. *Bee World*, 80(2), 80–92. doi:10.1080/0005772X.1999.11099430
- Nathan, C. (2004). Antibiotics at the crossroads. *Nature*, 431(7011), 899–902. doi:10.1038/431899a
- Orhan, F., Sekerel, B.E., Kocabas, C.N., Sackesen, C., Adalioglu, G., & Tuncer, A. (2003). Complementary and alternative medicine in children with asthma. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*, 90(6), 611–615.
- Roberts, A.E.L., Maddocks, S.E., & Cooper, R.A. (2012). Manuka honey is bactericidal against *Pseudomonas aeruginosa* and results in differential expression of *oprF* and *algD*. *Microbiology*, 158(12), 3005–3013. doi:10.1099/mic.0.062794-0
- Robinson, D. (2003). Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. *Organic Process Research & Development*, 7(4), 611–611. doi:10.1021/op030005r
- Schatz, A., Bugle, E., & Waksman, S.A. (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram positive and gram-negative bacteria. *Experimental Biology and Medicine*, 55(1), 66–69.
- Simon, A., Sofka, K., Wiszniewsky, G., Blaser, G., Bode, U., & Fleischhack, G. (2006). Wound care with antibacterial honey (Medihoney) in pediatric hematology–oncology. *Supportive Care in Cancer*, 14(1), 91–97. doi:10.1007/s00520-005-0874-8
- Tan, H., Rahman, R., Gan, S., Halim, A., Hassan, S., Sulaiman, S., & Kirnpal-Kaur, B. (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 57. doi:10.1186/1472-6882-9-34
- Vandamme, L., Heyneman, A., Hoeksema, H., Verbelen, J., & Monstrey, S. (2013). Honey in modern wound care: A systematic review. *Burns*, 39(8), 1514–1525. doi:10.1016/j.burns.2013.06.014

- Vitkauskienė, A., Skrodenienė, E., Dambrauskienė, A., Macas, A., & Sakalauskas, R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: Resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. *Medicina-Lithuania*, 46(7), 490–495.
- Von Der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M.L., Morlot, M., & Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S18–S25. doi:10.1051/apido:2004050
- Yang, Y., Battesti, M.-J., Djabou, N., Muselli, A., Paolini, J., Tomi, P., & Costa, J. (2012). Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “chestnut grove” honeys. *Food Chemistry*, 132(4), 2144–2154. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.075
- Yang, Y., Battesti, M.-J., Paolini, J., Muselli, A., Tomi, P., & Costa, J. (2012). Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “Erica arborea spring maquis” honeys. *Food Chemistry*, 134(1), 37–47. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.026
- Zainol, M.I., Yusoff, K.M., & Yusof, M.Y.M. (2013). Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 57. doi:10.1186/1472-6882-13-129

DETERMINATION DU MECANISME D'ACTION ANTIBACTERIEN DES MIELS DE CORSE

Les premiers résultats ont montré que *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont les souches les plus sensibles aux miels d'origine Corse. Les analyses méliissopalynologiques montrent que l'origine variétale explique cette différence d'action.

Pseudomonas aeruginosa est une souche bactérienne responsable de la majorité des infections nosocomiales. En effet, elle présente une remarquable capacité des résistances aux antibiotiques et ce par de multiples moyens tels la surexpression de pompes d'efflux, de β -lactamases, la réduction de l'expression des porines, l'acquisition de résistances ou encore la mutation des cibles aux quinolones (Mesaros *et al.*, 2007). Toutes ces caractéristiques en font un pathogène de choix contre lequel travailler pour la recherche de nouvelles molécules antibiotiques.

Afin de déterminer le mode d'action primaire des miels actifs, nous avons voulu identifier la/les molécule(s) responsable(s) de leur pouvoir antimicrobien. Les miels présentent deux types d'activité antibactérienne : peroxyde et non peroxyde. L'activité non peroxyde a été rapidement écartée. Le traitement à la protéinase K n'induisant aucune différence, une action de peptides antimicrobiens n'a pas été envisagée. L'activité la plus fréquemment retrouvée dans les miels est l'action due au peroxyde d'hydrogène, molécule que nous avons pu quantifier. Les miels de Châtaigneraie et les Miellats du Maquis présentaient des concentrations d' H_2O_2 comprises entre 47,6 μM et 52,4 μM quand, pour les miels moins actifs, elles se situent globalement autour de 23 μM . Néanmoins, ces concentrations d' H_2O_2 sont habituellement considérées faibles. En effet, des miels actifs présentent fréquemment valeurs proches de 200 μM (Bucekova *et al.*, 2014).

Dans les miels, la production de radicaux hydroxyles, *via* la réaction de Fenton, couplée à l'inversion du pouvoir antioxydant des composés phénoliques des miels, peut mener à une dégradation de l'ADN. Nous avons choisi de déterminer, d'une part, la concentration en composés phénoliques totaux et d'autre part, l'activité antioxydante des miels. Comme pour le peroxyde d'hydrogène, les miels de Châtaigneraie et les Miellats du Maquis présentent les concentrations de composés phénoliques les plus élevées, entre 76,01 et 86,15 mg d'équivalents d'acide gallique/100 g de miel avec une forte activité antioxydante. Le miel de Printemps, quant à lui, contient beaucoup moins de phénols totaux (24,07 mg/100 g), pour une faible activité antioxydante.


Afin de vérifier si l'ADN bactérien pouvait être dégradé, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN plasmidique de *P. aeruginosa* en conditions normales ainsi qu'en présence des miels à leur CMI avec et sans catalase.

Les résultats des gels d'électrophorèses montrent, en conditions normales, une bande bien nette d'ADN d'environ 23 kb pour le témoin, correspondant bien à la taille de l'ADN plasmidique de *P. aeruginosa*. Celle-ci se retrouve également lorsque les bactéries sont traitées par les miels en présence de catalase ce qui met bien en évidence l'importance du peroxyde d'hydrogène dans l'activité antibactérienne des miels de Corse. A l'inverse, l'ADN de *P. aeruginosa*, mis en présence des miels à leur CMI, montre des « trainées » en dessous de la bande principale, démontrant des cassures irréversibles de l'ADN bactérien. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'une action synergique entre le peroxyde d'hydrogène et les composés phénoliques *via* la réaction de Fenton.

Ces résultats ont été confirmés par les études microscopiques réalisées avec la plateforme de microscopie électronique de l'université de Corse (UMR-CNRS 6134 SPE). L'action des miels a pu être observée sur l'enveloppe des bactéries. Aucun dommage n'est visible, seulement une nette diminution de la population, ce qui était attendu puisque l'on se place à une concentration d'inhibition de croissance.

ORIGINAL ARTICLE

Key role of hydrogen peroxide in antimicrobial activity of spring, Honeydew maquis and chestnut grove Corsican honeys on *Pseudomonas aeruginosa* DNA

J.-P. Poli¹ , E. Guinoiseau¹, A. Luciani¹, Y. Yang², M.-J. Battesti², J. Paolini², J. Costa², Y. Quilichini³, L. Berti¹ and V. Lorenzi¹

¹ Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire du végétal, UMR CNRS 6134, Université de Corse, Corte, France

² Laboratoire de Chimie des Produits Naturels UMR CNRS 6134, Université de Corse, Corte, France

³ Laboratoire Parasites et Ecosystèmes Méditerranéens, UMR CNRS 6134, Université de Corse, Corte, France

Significance and Impact of the Study: We started to determine the antibacterial efficiency of Corsican chestnut grove and honeydew maquis honeys on *Pseudomonas aeruginosa*. No morphological alteration of the bacterial surface was observed. Antimicrobial action seems to be related to the synergy between hydrogen peroxide and phenolic compounds. The exerted pro-oxidant activity leads to a degradation of *P. aeruginosa* plasmidic DNA. This is the first study that investigate the primary antibacterial mechanism of Corsican honeys.

Keywords

antimicrobials, honey, mechanism of action, oxidation, pseudomonas.

Correspondence

Jean-Pierre Poli, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal, University of Corsica, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France.
E-mail: poli_jp@univ-corse.fr

2018/0050: received 9 January 2018, revised 12 February 2018 and accepted 16 February 2018

doi:10.1111/lam.12868

Abstract

In honeys, several molecules have been known for their antibacterial or wound healing properties. Corsican honeys just began to be tested for their antimicrobial activity with promising results on *Pseudomonas aeruginosa*. So, identification of active molecules and their mode of action was determined. Hydrogen peroxide concentrations were evaluated and, in parallel, the minimal inhibitory concentrations (MIC) values were performed with and without catalase. More, the quantity of phenolic compounds and ORAC assay were measured. Observation of antibacterial action was done using scanning electron microscopy (SEM) followed by plasmidic DNA extraction. MIC values of chestnut grove and honeydew maquis honeys vary between 7 and 8%, showing a strong antimicrobial capacity, associated with a plasmidic DNA degradation. When catalase is added, MIC values significantly increase (25%) without damaging DNA, proving the importance of H₂O₂. This hypothesis is confirmed by SEM micrographies which did not show any morphological damages but a depletion in bacterial population. Although, such low concentrations of H₂O₂ (between 23 μmol l⁻¹ and 54 μmol l⁻¹) cannot explain antimicrobial activity and might be correlated with phenolic compounds concentration. Thus, Corsican honeys seem to induce DNA damage when H₂O₂ and phenolic compounds act in synergy by a putative pro-oxidant effect.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium found in soil, coastal marine habitats and marshes. It is known to be multidrug-resistant, notably due to its ability to acquire new resistance to antibacterial agents (Roberts *et al.* 2012). Its spontaneous mutation rate can be up to a

thousand times higher than usual values (10⁸/10⁹) (Maciá *et al.* 2005). Its ability to form biofilms on inert surfaces such as rock or medical apparatus further enhances its resistance (Stover *et al.* 2000; Campeau *et al.* 2014). *Pseudomonas aeruginosa* is a very common cause of nosocomial diseases, from 11 to 13.8% worldwide, and more in intensive care units, where infection rates range

from 13.2 to 22.6%. It is the second most frequent cause of hospital-acquired, ventilator- and healthcare-associated pneumonia, after *Staphylococcus aureus* infections (Driscoll *et al.* 2012). Researchers are currently seeking naturally occurring substances to produce new antibiotics or agents able to restore antibiotic action towards this bacterium.

The antibacterial activity of honeys can be attributed to various factors. In most samples, it relies greatly on levels of hydrogen peroxide (H₂O₂) (Brudzynski 2006), which is, along with gluconic acid, a by-product of glucose oxidation by the bee enzyme glucose oxidase (FAD-oxidoreductase, EC 1.1.3.4). Water plays a key role in the reaction, facilitating the enzyme's access to its substrate. Hydrogen peroxide production in diluted honeys is known to produce a long-lasting antiseptic effect (Manzoori *et al.* 2006). However, some New Zealand Manuka honeys have been shown to maintain their growth inhibitory levels even after removal of hydrogen peroxide (Molan and Russell 1988). Antibacterial action of those honeys was later related to methylglyoxal (Molan 1992). Nonperoxide activity is mostly due to acidity, osmolarity (Wahdan 1998; Molan 1992) or phenolic compounds (Aljadi and Yusoff 2003). Phenolic compounds are widespread in plants, being their most abundant secondary metabolites (over 8000 phenolic structures already discovered). They are known to be involved in defence against aggression by pathogens (Dai and Mumper 2010). Antibacterial activity can also be expressed by the action of antimicrobial peptides such as bee-defensin-I (Kwakman *et al.* 2010).

In a previous study, we tested the antibacterial activity of some protected designation of origin 'Miel de Corse – Mele di Corsica' Corsican honey samples on several strains (Poli *et al.* 2018). We showed that *P. aeruginosa* was very sensitive to some Corsican honeys. So, the work reported here focus on this particular strain: we set out to make a more thorough study of the entities involved and their mechanisms of action on this bacterium at the cell level.

Results and discussion

Antibacterial activity of 'spring', 'chestnut grove' and 'honeydew maquis' honeys on *P. aeruginosa*

Minimal inhibitory concentration (MIC₉₀) values of 'spring' (SPR), 'chestnut grove' (CG) and 'honeydew maquis' (HDM) samples for *P. aeruginosa* are given in Table 1: MIC₉₀ is the concentration of diluted honey that inhibits 90% of the bacterial growth.

Corsican honeys might offer a way to help fight the highly resistant strain *P. aeruginosa*. Indeed, both CG and

HDM Corsican honeys were particularly active on this Gram-negative bacterium: measured MIC₉₀ values (7 or 8%) were below those obtained with different Manuka honeys (12.5 or 14%) (Alzahrani *et al.* 2012; Kuś *et al.* 2016). Their activity was also higher than in acacia, lavender or wild carrot honeys (respectively 13, 21 and 12%) (Alzahrani *et al.* 2012), and in Gelam, Kelulut, pineapple and Tualang Malaysian honeys (respectively 10, 20, 25 and 12.5%) (Zainol *et al.* 2013). Despite a lower antimicrobial activity with an MIC value of 13%, SPR can still be considered as moderately active according to the literature. These results are supported by scanning electron microscopy (SEM) observations of CG 2 (Fig. 1).

Compared with the homogenous and very dense flora of the control (Fig. 1a), bacterial cells observed in the presence of CG 2 at its MIC₉₀ were dispersed throughout the support (Fig. 1b). However, no morphological alteration or structural damage appeared on micrographs. Furthermore, when honey concentration reached 2 MIC₉₀, *P. aeruginosa* cells were no longer able to survive (Fig. 1c). Similar results were observed in SEM micrographs of CG 1, HDM 1, HDM 2 and SPR (data not shown). As previously described in the literature (Brudzynski *et al.* 2012a), we investigated the putative link between the cell death observed and DNA damage.

P. aeruginosa plasmidic DNA degradation

As shown in Fig. 2, after incubating *P. aeruginosa* with active honeys diluted to their MIC₉₀ values, we observed plasmid DNA degradation.

The control shows a visible fragment of DNA corresponding to *c.* 23 kb of undamaged plasmid (Raja and Selvam 2009). Moreover, this DNA was digested by EcoRI restriction enzyme showing three visible strips and no sign of smear. In the presence of MIC₉₀ diluted honeys, a smear of lower intensity was identified under the control fragment. These phenomena were mostly visible for CG 2 and HDM 1, which had similar amounts of hydrogen peroxide (Table 1). The appearance of a smudge of small DNA fragments is known to indicate that its degradation has involved irreparable double-strand cuts, which are lethal for the cell (Brudzynski *et al.* 2012a). Also, incubating *P. aeruginosa* at twice the MIC₉₀ values showed no visible strip (data not shown).

In honeys, key factors in DNA damage are reactions of phenolic auto-oxidation and production of radical oxygen species (ROS) involving hydrogen peroxide as a central entity (Brudzynski *et al.* 2012b): MIC₉₀ values rose to 25% (Table 1) when H₂O₂ was removed by catalase in

Table 1 MIC₉₀ values and hydrogen peroxide concentrations obtained before and after catalase treatment

Honeys	MIC ₉₀ <i>P. aeruginosa</i> (%)	MIC ₉₀ <i>P. aeruginosa</i> after catalase treatment (%)	Hydrogen peroxide ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Hydrogen peroxide after catalase treatment ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
Moderately active honey				
SPR	13	25	23 ^c \pm 1.15	1.09 \times 10 ^{-2 a} \pm 0.02
Active honeys				
CG 1	7	25	47.6 ^b \pm 2.38	1.99 \times 10 ^{-2 a} \pm 0.002
CG 2	8	25	52.4 ^a \pm 2.62	2.96 \times 10 ^{-2 a} \pm 0.01
HDM 1	7	25	54 ^a \pm 2.7	5.84 \times 10 ^{-2 a} \pm 0.01
HDM 2	8	25	50 ^{ab} \pm 2.5	4.13 \times 10 ^{-2 a} \pm 0.02

CG 1, chestnut grove 1; CG 2, chestnut grove 2, SPR, spring; HDM 1, honeydew maquis 1; HDM 2, honeydew maquis 2.

Lowercase letters indicate significant differences between experimental conditions for hydrogen peroxide (concentration) according to a Kruskal-Wallis test at the 95% confidence level.

the five tested honeys, neutralizing their antibacterial efficiency. This data demonstrate the importance of hydrogen peroxide in antimicrobial activity. As shown in Fig. 2, the addition of catalase to the tested honeys showed a strip with the same size as the control, demonstrating that removing hydrogen peroxide abolished the antibacterial action. Measured concentrations of H₂O₂ (Table 1) provide further evidence: the hydrogen peroxide content did not differ substantially in the active CG and HDM honeys (from 47.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ to 54 $\mu\text{mol l}^{-1}$), but was significantly lower in the moderately active SPR honey (23 $\mu\text{mol l}^{-1}$). Similar concentrations were found in moderately active *Brassica napus* and *Castanea sativa* honeys with H₂O₂ concentration close to 40 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (MIC₉₀ values: 20%; Bucekova *et al.* 2014). These levels were still far from the H₂O₂ concentration in *Abies alba* active honeys, ranging around 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ for a 10% MIC₉₀ value.

Metal-catalysed H₂O₂ degradation by ions such as Cu⁺ or Fe²⁺, naturally present in honeys (Bogdanov *et al.* 2007), produces hydroxyl radicals. These radicals are generated via a Fenton reaction (H₂O₂ + Cu⁺ or Fe²⁺ \rightarrow Cu²⁺ or Fe³⁺ + OH + $\cdot\text{OH}^-$) and are, according to the literature (Storz and Imlay 1999), more often responsible for DNA damage than endogenous H₂O₂. Moreover, hydrogen peroxide hydrolysis also produces oxygen, which speeds up auto-oxidation processes of polyphenols with simple structures like coumarin identified in some honeys (Cowan 1999; Jerković *et al.* 2011). Those kind of molecules are known to exert antibacterial and fungicidal activities (Cowan 1999) because they tend to lose their antioxidant capacity and become pro-oxidant. Table 2 represents the concentration of phenolic compounds and oxygen radical absorbent capacity (ORAC) assay values in Corsican honeys.

In both cases, they were significantly higher in the active honeys (CG 1, CG 2, HDM 1 and HDM 2) than

in the moderately active (SPR) honey: the total phenolic content ranged from 73.62 mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g of honey in HDM 1, to 86.15 mg GAE/100 g of honey in HDM 2, whereas only 24.07 mg GAE/100 g of honey was detected in SPR. These results are in agreement with those of Ciappini and Stoppani (2014), although the overall range was greater (5–265 mg GAE/100 g of honey in various clover and multifloral honeys from Chile and Czech Republic). ORAC assay values lay between 5.89 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of trolox equivalents (TE)/g of honey for CG 1 and 8.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ TE/g of honey in HDM 2. In SPR, ORAC values were significantly lower (2.76 $\mu\text{mol l}^{-1}$ TE/g of honey). So, CG and HDM honeys have higher antioxidant capacity than SPR honey. The same range of ORAC values were found for monofloral honeys of clover (5.37 $\mu\text{mol l}^{-1}$ TE/g of honey), blueberry (4.59 $\mu\text{mol l}^{-1}$ TE/g of honey) or borage (1.99 $\mu\text{mol l}^{-1}$ TE/g of honey) (Brudzynski *et al.* 2012b). ORAC assay was preferred to the hydroxyl radical generating activity. Indeed, Brudzynski *et al.* (2012a) showed that it isn't possible to conclusively identify $\cdot\text{OH}$ radicals as the inducers of bacterial cell death.

According to Dai and Mumper (2010), under conditions that favour their auto-oxidation (high pH with high concentrations of transition metal ions and molecular oxygen) phenolic antioxidants behave like pro-oxidants. Despite a high antioxidant capacity (ORAC, Table 2), the high content of hydrogen peroxide in active honeys, which induces an elevated amount of ROS, explains the pro-oxidant behaviour of phenolic compounds. It seems that the presence of these two types of entity confers antibacterial activity on Corsican honeys via plasmid DNA degradation.

In conclusion, we showed that *P. aeruginosa* is sensitive to several Corsican honeys. Indeed, CG and HDM honeys are the most active (MIC₉₀ value between 7 and

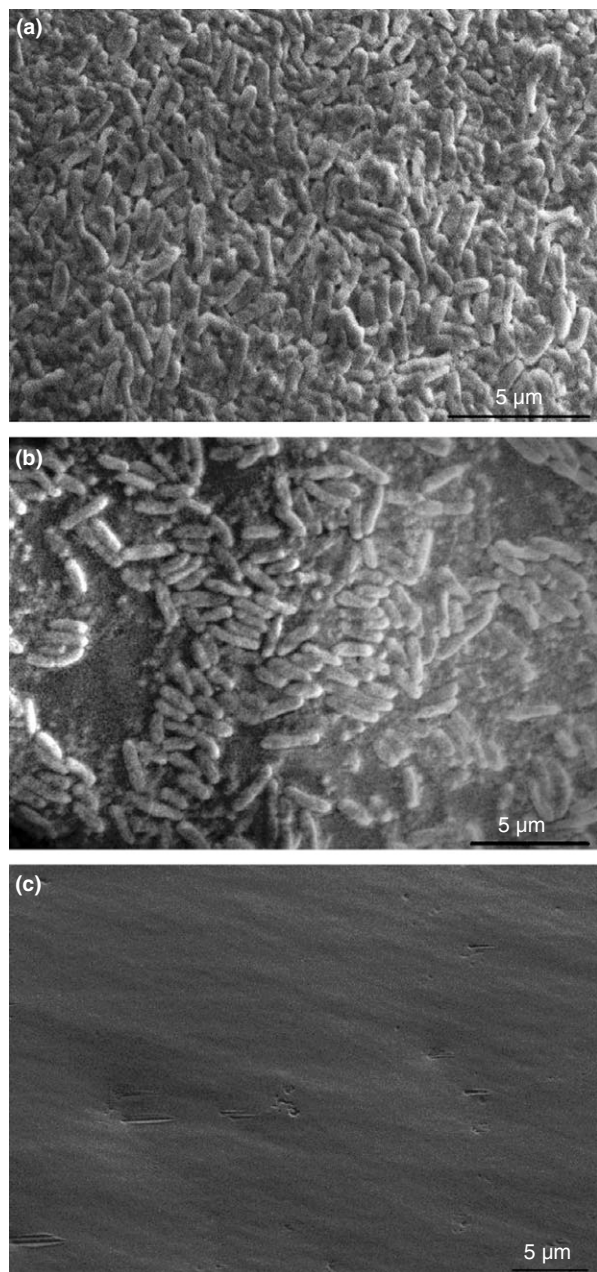


Figure 1 Scanning electron micrographies of *Pseudomonas aeruginosa* growth in absence (control: a) or in presence of CG 2 honey at MIC₉₀ (b) and twice MIC₉₀ (c). Scale bar = 5 µm.

8%), while SPR honey can be considered as a moderately active honey (MIC₉₀ value equal to 13%). Their antibacterial efficiency seems to arise from an interaction between hydrogen peroxide and phenolic compounds. However, H₂O₂ is a key factor in phenolic compound auto-oxidation and in Fenton's reaction, which lead to reactive oxygen species formation. These ROS may be responsible for the *P. aeruginosa* plasmid degradation we

highlight in this work. Since SEM micrographs showed no morphological degradation, this mechanism of action could be involved in Corsican honeys antibacterial activity. An in-depth study is now required to establish the complete phenolic profile for all the honeys and so identify active entities.

Materials and methods

Honey samples

Five honey samples from the year 2014, one 'spring' (SPR), two 'chestnut grove' (CG 1 and CG 1) and two HDM 1 and HDM 2, were purchased commercially from local apiarists and stored in darkness at 4°C. Sensory analyses were performed to check good conservation.

Bacterial strains and growth conditions

The *in vitro* antibacterial activity of Corsican honeys was tested against a laboratory-controlled strain of *P. aeruginosa* (CIP A22) routinely grown at 37°C on Mueller-Hinton 2 Agar (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Antibacterial assay

The antibacterial activity was expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) of honey that reduced bacterial growth spectrophotometrically by 90%. The test was adapted from Zainol *et al.* (2013) with slight modifications. Working bacteria culture was adjusted to be equal to 0.5 McFarland standard (10⁸ CFU per ml), and further diluted 200-fold in Mueller-Hinton broth (MHB, oxoid) to reach 0.5 × 10⁶ CFU per ml. Honey samples were diluted (from 50 to 1%) in MHB and then filtered through 0.2 µmol l⁻¹ filters (Sartorius AG, Göttingen, Germany). A volume of 190 µl of each honey dilution was aseptically transferred into 96-well microplates (Nunc™, Roskilde, Denmark) with eight replicates per dilution. The first two wells of each honey dilution served as dilution sterility controls (supplemented with another 10 µl of the respective honey dilution); six others were the test wells, in which 10 µl of bacteria culture was mixed. The last two rows were reserved for batch sterility (200 µl of MHB) and growth (10 µl of bacterial culture in 190 µl of MHB) controls. Plates were incubated in a shaker incubator (Stuart, Stone, UK) at 120 rev min⁻¹, at 37°C for 18–24 h. The absorbance of the wells was read at 620 nm using a microtitre plate reader (Sunrise, Tecan™) after incubation. Percentage bacterial growth inhibition was calculated using the following formula:

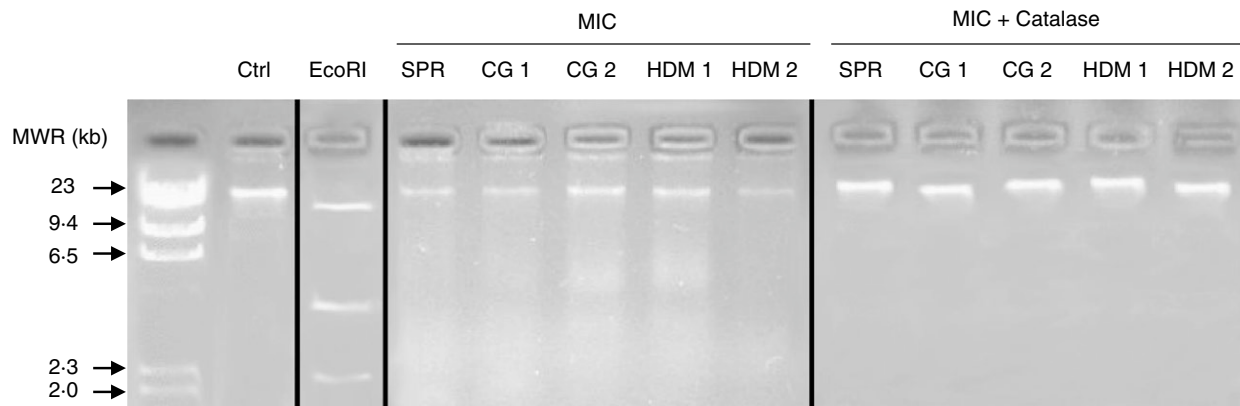


Figure 2 Action of 'Chestnut grove' (CG1 and CG2), 'Honeydew maquis' (HDM1 and HDM2) and 'Spring' (SPR) Corsican honeys on *Pseudomonas aeruginosa* plasmidic DNA (Ctrl: control; EcoRI: *P. aeruginosa* plasmidic DNA digested by EcoRI restriction enzyme).

Table 2 Total phenolic content and radical scavenging activity of Corsican honeys

Honeys	Total phenolic content (mg gallic acid equivalent/100 g of honey)	ORAC ($\mu\text{mol l}^{-1}$ of TE/g of honey)
Moderately active honey		
SPR	24.07 ^c ± 1.2	2.76 ^c ± 0.28
Active honeys		
CG 1	76.01 ^b ± 3.8	5.89 ^b ± 1.03
CG 2	78.41 ^b ± 3.92	6.98 ^b ± 1.47
HDM 1	73.62 ^b ± 3.68	7.2 ^{ab} ± 0
HDM 2	86.15 ^a ± 4.31	8.6 ^a ± 0

CG 1, chestnut grove 1; CG 2, chestnut grove 2, SPR, spring; HDM 1, honeydew maquis 1; HDM 2, honeydew maquis 2.

Lowercase letters indicate significant differences between experimental conditions for total phenolic content (concentration) or ORAC (concentration) assays according to a Kruskal–Wallis test at the 95% confidence level.

Throughput (HTP) Assay Innovotech Inc., Edmonton, AB, Canada) was fitted. These pegs allow bacterial development in a biofilm. The microplates were shaken at 37°C for 36 h. The pegs were immersed in 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Science™, Hatfield, PA, USA) fixing solution in sodium cacodylate (Sigma-Aldrich™, Saint-Louis, MO, USA) buffer 0.1 mol l⁻¹ (pH 7.2) for 2–3 h at 4°C; they were washed in two successive 10 min baths of sodium cacodylate buffer, dried out for 120 h, and then metallized using a gold/palladium mixture. The pegs were then examined under a scanning electron microscope (Hitachi™ s-3400n, Tokyo, Japan) with an accelerating voltage of 5 or 10 kV. Each experiment was performed in triplicate. Scanning electron microscopy micrographies are a representation of the homogenous observation of the entire pegs surface.

Plasmid DNA extraction

Bacteria cultures adjusted to 10⁷ CFU per ml were incubated overnight, and shaken at 37°C in MHB with most

$$\left(1 - \frac{(\text{absorbance of test well} - \text{absorbance of corresponding control well})}{(\text{absorbance of assay growth control} - \text{absorbance of sterility control})}\right) \times 100$$

Each experiment was performed in triplicate.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy allowed the behaviour of bacteria to be observed in solution with honey samples. For this purpose, 7.5 μl of each honey dilution was placed in a 96-well microplate containing 142.5 μl of a 0.5 McFarland standard diluted to reach 0.5 × 10⁶ CFU per ml. A plastic lid with 96 identical pegs protruding downward (MBEC™ High

active honeys used at concentrations of MIC and 2 × MIC. Plasmid DNA was isolated using Quantum® prep plasmid miniprep kit (Bio-Rad™, Hercules, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

Agarose gel electrophoresis

Aliquots of plasmid DNA (30 μl) were analysed by agarose gel (1%) electrophoresis with ethidium bromide in Tris base, acetic acid and EDTA 1X. Migration was

carried out at 85 V for 40 min. Plates were examined under UV light. EcoRI restriction enzyme was used as a digestion control of untreated plasmid.

H₂O₂ assay and catalase treatment

Hydrogen peroxide in honey was measured with the Amplex[®] Red hydrogen peroxide/peroxidase assay kit (Molecular Probes, Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The assay detects H₂O₂ using Amplex Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), which reacts with hydrogen peroxide to produce the red fluorescent oxidation product resorufin. The assay was conducted according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured with a spectrofluorimeter (FMP-850, Jasco[™] Oklahoma City, OK, USA) at an emission wavelength of 590 nm using an excitation wavelength of 545 nm. The H₂O₂ standard curve was plotted using dilutions of a 100 μmol l⁻¹ stock solution. Similarly, 40% honey dilutions were prepared extemporaneously (Bucekova *et al.* 2014), and were incubated with Amplex Red reagent for 30 min in the dark at room temperature. The blank was included in each plate and subtracted from the experimental measurements. Data were analysed with Jasco[™] SPECTRAMANAGER software. Statistical analyses were performed using R statistical software (www.R-project.org). Multiple mean comparisons were performed with the Kruskal–Wallis test at the 95% confidence level.

Honeys of known H₂O₂ concentration from Amplex Red assays were treated with catalase (Sigma-Aldrich[™]) at a ratio of 1000 U ml⁻¹ for 2 h at room temperature. Catalase-treated honey samples were then used in the antibacterial assay to determine the MIC. Each experiment was performed in triplicate.

Total soluble phenolic content

To determine the total soluble phenolic content in honey samples, a phosphowolframate-phosphomolybdate complex was reduced to blue products by the action of phenolic compounds (Ciappini and Stoppani 2014). Distilled water was used to obtain 25 ml of diluted honey sample (4.0 ± 0.01 g), which was then filtered through Whatman No. 1 paper. To 1 ml of this solution, 10 ml of distilled water with 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich) was added, and the mixture shaken gently. After 2 min, saturated sodium carbonate solution (2 ml) was added to the mixture, which was then adjusted to 25 ml with distilled water. The absorbance of the solution was read at 725 nm in a spectrophotometer (UV-1200, UVVisco Jasco[™]) after incubation in the dark at room temperature for 2 h. The calibration curve was plotted with gallic acid as standard. The mean of three

readings was used and expressed as milligrams of GAE per 100 g of honey. Statistical analyses were performed using R statistical software (ver. 2.13.1, www.R-project.org). Multiple mean comparisons were performed with the Kruskal–Wallis test at the 95% confidence level. Each experiment was performed in triplicate.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

The ORAC assay was carried out according to the method described by Dudonné *et al.* (2009). The reaction was run in 75 mmol l⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) in black 96-well microplates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) at 37°C on a Tecan Infinite[®] 200 PRO multimode reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Trolox (0–10 μmol l⁻¹ final concentration) was used as standard; 25 μl of honey solutions (0.1–1 mg ml⁻¹ final concentration) or trolox were mixed with 150 μl of fluorescein (70 nmol l⁻¹ final concentrations) in the microplate and incubated for 20 min at 37°C; 75 μl of APPH solution (12 mmol l⁻¹ final concentration) was then injected, and the fluorescence was measured every minute for 90 min at excitation and emission wavelengths 485 and 530 nm respectively. All samples were analysed in triplicate, and the ORAC values were expressed in μmol TE/g of honey. Statistical analyses were performed using R statistical software (www.R-project.org). Multiple mean comparisons were performed with the Kruskal–Wallis test at the 95% confidence level. Each experiment was performed in triplicate.

Acknowledgements

The authors are indebted to the 'Collectivité Territoriale de Corse'.

Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

References

- Aljadi, A.M. and Yusoff, K.M. (2003) Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turk J Med Sci* **33**, 229–236.
- Alzahrani, H.A., Alsabehi, R., Boukraâ, L., Abdellah, F., Bellik, Y. and Bakhomah, B.A. (2012) Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules* **17**, 10540–10549.
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbuehl, W. and Gallmann, P. (2007) Minerals in honey: environmental geographical and botanical aspects. *J Apic Res* **46**, 269–275.

- Brudzynski, K. (2006) Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Can J Microbiol* **52**, 1228–1237.
- Brudzynski, K., Abubaker, K. and Wang, T. (2012a) Powerful bacterial killing by buckwheat honeys is concentration-dependent, involves complete DNA degradation and requires hydrogen peroxide. *Front Microbiol* **3**, 242.
- Brudzynski, K., Abubaker, K. and Miotto, D. (2012b) Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chem* **133**, 329–336.
- Bucekova, M., Valachova, I., Kohutova, L., Prochazka, E., Klaudiny, J. and Majtan, J. (2014) Honeybee glucose oxidase-its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften* **101**, 661–670.
- Campeau, M.E.M., Patel, R., Campeau, M.E.M. and Patel, R. (2014) Antibiofilm activity of Manuka honey in combination with antibiotics, antibiofilm activity of Manuka honey in combination with antibiotics. *Int J Bacteriol* **2014**, e795281.
- Ciappini, M.C. and Stoppani, F.S. (2014) Determination of antioxidant capacity, flavonoids, and total phenolic content in eucalyptus and clover honeys. *J Apic Sci* **58**, 103–111.
- Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**, 564–582.
- Dai, J. and Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352.
- Driscoll, J.A., Brody, S.L. and Kollef, D.M.H. (2012) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**, 351–368.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. and Mérillon, J.-M. (2009) Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem* **57**, 1768–1774.
- Jerković, I., Marijanović, Z. and Staver, M.M. (2011) Screening of natural organic volatiles from *Prunus mahaleb* L. Honey: coumarin and vomifoliol as nonspecific biomarkers. *Molecules* **16**, 2507–2518.
- Kuš, P.M., Szweđa, P., Jerković, I. and Tuberoso, C.I.G. (2016) Activity of polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. *Lett Appl Microbiol* **62**, 269–276.
- Kwakman, P.H.S., te Velde, A.A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. and Zaat, S.A.J. (2010) How honey kills bacteria. *FASEB J* **24**, 2576–2582.
- Maciá, M.D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Pérez, J.L. and Oliver, A. (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3382–3386.
- Manzoori, J.L., Amjadi, M. and Orooji, M. (2006) Application of crude extract of kohlrabi (*Brassica oleracea* gongyloides) as a rich source of peroxidase in the spectrofluorometric determination of hydrogen peroxide in honey samples. *Anal Sci* **22**, 1201–1206.
- Molan, P.C. (1992) The Antibacterial Activity of Honey. *Bee World* **73**, 5–28.
- Molan, P. and Russell, K. (1988) Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *J Apic Res* **27**, 62–67.
- Poli, J.-P., Guinoiseau, E., Luciani, A., Yang, Y., Battesti, M.-J., Paolini, J., Costa, J., Berti, L. *et al.* (2018) Investigating the antibacterial action of Corsican honeys on nosocomial and foodborne pathogens. *J Apic Res* **57**, 186–194.
- Raja, C.E. and Selvam, G.S. (2009) Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* as metal resistant. *Int J Environ Sci Technol* **6**, 259–266.
- Roberts, A.E.L., Maddocks, S.E. and Cooper, R.A. (2012) Manuka honey is bactericidal against *Pseudomonas aeruginosa* and results in differential expression of oprF and algD. *Microbiology* **158**, 3005–3013.
- Storz, G. and Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**, 188–194.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O. *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964.
- Wahdan, H.A. (1998) Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* **26**, 26–31.
- Zainol, M.I., Yusoff, K.M. and Yusof, M.Y.M. (2013) Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complement Altern Med* **13**, 129.

CHAPITRE 2

Activité anti-quorum sensing des huiles essentielles et hydrolats

La perturbation du quorum sensing est une voie de recherche novatrice. En effet, de nombreux mécanismes de résistances, tels la formation de biofilms ou la production de toxines, sont soumis à son contrôle. En milieu hospitalier, la formation de biofilm sur les matériaux inertes, comme les cathéters ou les implants, sont des facteurs d'infections très problématiques sachant que leur élimination, même avec des détergents, est très compliquée.

Nous avons travaillé sur *Chromobacterium violaceum* une souche rapporteur très utilisée dans l'étude du quorum sensing. Grâce à ce dernier, la souche produit un pigment antibiotique coloré, la violacéine, très facilement quantifiable.

Les huiles essentielles sont bien connues pour leurs activités antibactériennes. Nous avons criblé l'action anti-quorum sensing de 12 huiles essentielles sur *C. violaceum*. Parallèlement à la mesure de la CMI, la concentration minimale inhibitrice du quorum sensing (CMIQS) a été mesurée. Elle représente la plus faible concentration de produit bioactif inhibant au moins 50% de la production de violacéine sans baisse significative de la quantité de bactéries. Le rapport CMIQS/CMI a été calculé afin de montrer l'huile essentielle qui présente la plus forte action anti-quorum sensing. Plus ce dernier est élevé, plus l'action sur la perturbation de production de violacéine est importante. L'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* montre le ratio le plus élevé (32) du panel étudié. Elle est composée majoritairement de pulégone (44,4%) et de *cis-cis-p*-menthénolide (27,3%).

Afin d'élucider le mode d'action de cette huile essentielle, nous avons évalué l'activité de ces deux composés majoritaires. La pulégone commerciale ne présente pas d'action anti-quorum sensing. La *cis-cis-p*-menthénolide, qui n'est pas produite commercialement, a été purifiée par l'équipe Chimie-Biomasse de l'université de Corse (UMR-CNRS 6134 SPE). Cette molécule se retrouve en grande quantité dans l'hydrolat restant lors de la production de l'huile essentielle, l'extraction de la molécule a été réalisée en partant de celui-ci.

Le rapport CMIQS/CMI de la *cis-cis-p*-menthénolide (64) est supérieur à celui de l'huile essentielle, ce qui démontre son implication dans l'activité anti-quorum sensing. De plus, sa configuration stéréochimique semble jouer un rôle dans l'action de perturbation du quorum sensing. En effet, son isomère commercial, la mentalactone, qui ne diffère que par le positionnement d'une double liaison (intracyclique dans cette dernière), ne perturbe pas le quorum sensing.

Afin de confirmer la perturbation de ce mécanisme de communication par la *cis-cis-p*-menthénolide, son impact sur la formation de biofilm a été évalué. Nous avons donc procédé à

des essais de développement de biofilm de *C. violaceum* soumis à l'action de l'huile essentielle et des deux isomères de la molécule active. Ces derniers ont ensuite été observés en microscopie électronique à balayage au sein de la plateforme de microscopie électronique de l'université (UMR-CNRS 6134 SPE) mettant en lumière des résultats significatifs. En effet, que ce soit en présence d'huile essentielle ou de *cis-cis-p*-menthénolide, le développement du biofilm est bien moins homogène qu'en conditions témoins en plus d'une apparente dégradation de la matrice. Les résultats sur la mentalactone sont eux complètement différents car la diminution de la densité de population montre un effet bactéricide.

Ces travaux mettent donc bien en évidence le pouvoir anti-quorum sensing de la *cis-cis-p*-menthénolide ainsi que sa capacité à altérer les biofilms.

Article

Anti-Quorum Sensing Activity of 12 Essential Oils on *chromobacterium violaceum* and Specific Action of *cis-cis-p*-Menthenolide from Corsican *Mentha suaveolens* ssp. *Insularis*

Jean-Pierre Poli , Elodie Guinoiseau *, Dominique de Rocca Serra, Sylvain Sutour , Mathieu Paoli, Félix Tomi, Yann Quilichini, Liliane Berti and Vannina Lorenzi

CNRS UMR 6134 SPE, Université de Corse, BP 52, 20250 Corte, France; poli_jp@univ-corse.fr (J.-P.P.); deroccaserra_d@univ-corse.fr (D.d.R.S.); sylvain.sutour@unine.ch (S.S.); paoli_m@univ-corse.fr (M.P.); tomi_f@univ-corse.fr (F.T.); quilichini_y@univ-corse.fr (Y.Q.); berti_l@univ-corse.fr (L.B.); lorenzi_v@univ-corse.fr (V.L.)

* Correspondence: guinoiseau_e@univ-corse.fr; Tel.: +33-495-450-128

Academic Editors: Daniela Rigano and Adriana Basile

Received: 13 July 2018; Accepted: 22 August 2018; Published: 23 August 2018



Abstract: Quorum sensing (QS) is a bacterial communication mechanism used to express various survival or virulence traits leading to enhanced resistance. *Chromobacterium violaceum* is a commonly used strain that highlights anti-QS action of bioactive substances. Here, we wanted to see if 12 selected essential oils (EO) could exert anti-QS activity. We measured the sublethal minimal QS inhibitory concentration (MQSIC) by assessing violacein production of *C. violaceum* along with bacterial growth. To confirm the QS disruption, we also proceed to surface bacterial observations using scanning electron microscopy (SEM). We showed that *cis-cis-p*-menthenolide extracted and isolated from a plant endemic to occidental Mediterranean Sea islands, *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*, acts as an inhibitor of violacein production and biofilm formation. Measured MQSIC was much lower than the minimal inhibitory concentration (MIC): $0.10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs. $3.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Moreover, disturbance of QS-related traits was confirmed by the degradation of *C. violaceum* biofilm matrix. There is a clear structure–activity relationship between *cis-cis-p*-menthenolide and anti-QS activity. Indeed, its isomer molecule (mintlactone) exerts a poor anti-QS action. These results indicate that inhibition of violacein production and biofilm formation by *cis-cis-p*-menthenolide might be related to a disruption in the QS mechanism.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*; quorum sensing; essential oils; *cis-cis-p*-menthenolide; biofilms

1. Introduction

Nowadays, bacterial resistance to antibiotics is a major public health issue. Development of new antibiotics with new modes of action is very limited. One potential strategy to override this problem is to restore antibiotic activity. Inhibition of quorum sensing (QS) may be a suitable solution.

QS is a bacterial cell-to-cell communication pathway. This specific signal-response system relies on the synthesis, release, and uptake of specific molecules known as autoinducers [1]. When a specific concentration is reached in the outer medium, which is correlated to population concentration, autoinducers are the starting point to trigger and synchronize QS-related behaviors or traits expression. QS regulation is mainly based on the production of three types of molecules [2]:

- *N*-acyl homoserine lactones, produced by Gram-negative bacteria, used to monitor the population density and thus trigger the process of QS-mediated gene expression;

- Oligopeptides or autoinducing peptides, which are the main autoinducers in Gram-positive bacteria. They are exported in the outer medium, modified post-translationally and retaken by other cells by a two-component regulatory system;
- Autoinducer 2 (AI-2), used for interspecies communication between Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Chromobacterium violaceum is a well-known bioindicator used to find substances that can block the QS mechanism [3]. It is a gram-negative β -proteobacterium commonly found in soil and water of tropical and subtropical regions [4,5]. QS influences various traits of *C. violaceum* such as elastase production [6], biofilm formation [7], chitinolytic activity [8], cyanide [9], or violacein production [7]. Violacein is an antibiotic, purple pigment produced under control of the *LuxR–LuxI* homolog system, *CviR–CviI* and the cognate molecule *N*-Hexanoyl-L-homoserine lactone [10–12]. Because it is easily observable and quantifiable, it is used as a tool to measure the impact of various substances on QS.

The search for QS disruptor could lead to new opportunities in fighting bacterial colonization. An anti-pathogenic action could be useful knowing the biofilm formation problems retrieved on catheters during the hospital treatment-time that lead to complication or even nosocomial infections.

But an anti-biofilm molecule could also found its use in the industry. Indeed, it could be used as an antifouling product as biofilm formation is the first necessary step of the biofouling formation that corresponds to the colonization of surface by macroorganisms such as, marine invertebrate larvae or macroalgae spores. Although it is a natural process, its formation on underwater material such as pipelines, port facilities or ship hulls can lead to enormous economic and ecologic damage [13,14].

Essential oils (EOs) are complex natural mixtures of volatile secondary metabolites and fragrant substances biosynthesized by plants. EOs are isolated by steam/hydro-distillation or by cold expression [15]. They are known to have multiple biological activities, such as antibacterial, antiviral, antifungal, antioxidant, wound healing, anti-inflammatory or immunomodulatory properties [16–19]. Given the wide spread of bacterial resistance, disrupting the QS mechanism seems to be an interesting alternative. For pathogenic organisms, virulence regulation is a crucial point in the infection process. Indeed, QS appears as a key factor, allowing, for example, bacteria population to growth substantially before expressing virulence factors, leading afterward to an overwhelming of the host defenses [20]. Unlike antibiotics, whose purpose is to destroy bacteria, which leads to the appearance of resistance, attenuation of the virulence via a QS disruptor might offer a new alternative for the development of new antimicrobial molecules; even if there are no actual proof that it'll reduce the risk of resistance apparition [21]. Some EOs like Mandarin or Marjoram have already been tested in the food industry and are known to have an anti-QS effect by preventing biofilm formation [22,23].

The purpose of this study was to investigate the anti-QS properties of 12 EOs on *C. violaceum*, which are known to exert several antibacterial activities [24,25]. To achieve this goal, we investigated one of the major molecules putatively responsible for the anti-QS activity, finding *cis-cis-p*-menthenolide was the most effective.

2. Results and Discussion

2.1. Inhibition of Violacein Production

Twelve EOs were tested for their anti-QS activity on *C. violaceum*. Their effects on the production of QS-related violacein pigment were evaluated along with bacterial density counts. We measured their minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal QS inhibiting concentration (MQSIC), which is the minimal EO concentration that inhibits the violacein production of *C. violaceum* by at least 50% (Table 1).

Table 1. Determination of anti-QS activities of tested essential oils.

Essential Oils	MIC Value (mg·mL ⁻¹)/MIC Dilution	MQSIC Value (mg·mL ⁻¹)/MQSIC Dilution	MQSIC/MIC Ratio	Major Compounds
<i>Mentha suaveolens</i> ssp. <i>insularis</i>	3.00 (16)	0.10 (512)	32	pulegone (44.4%), <i>cis-cis-p</i> -menthenolide (27.3%)
<i>Citrus limon</i>	6.00 (8)	0.40 (128)	16	limonene (66.4%), γ -terpinene (10.1%)
<i>Eucalyptus polybractea</i>	0.80 (64)	0.05 (1024)	16	<i>p</i> -cymene (25.5%), cryptone (11.42%)
<i>Helichrysum italicum</i>	12.50 (4)	0.80 (64)	16	neryl acetate (39.6%), α -curcumene (7.6%)
<i>Myrtus communis</i>	1.50 (32)	0.10 (512)	16	α -pinene (52.9%), 1,8-cineole (20.6%)
<i>Cedrus atlantica</i>	50.00 (1)	6.00 (8)	8	α -pinene (55%), himachalol (8.3%)
<i>Lavandula stoechas</i>	1.50 (32)	0.20 (256)	8	fenchone (34.9%), camphor (28.9%)
<i>Calamintha nepeta</i> ssp. <i>nepeta</i>	0.80 (64)	0.20 (256)	4	pulegone (49.0%), menthone (21.5%)
<i>Citrus clementina</i>	1.50 (32)	0.40 (128)	4	sabinene (31.4%), linalool (20.4%)
<i>Cymbopogon citratus</i>	0.80 (64)	0.20 (256)	4	geranial (44.0%), neral (31.1%)
<i>Foeniculum vulgare</i>	0.80 (64)	0.20 (256)	4	(<i>E</i>)-anethole (75.7%), limonene (8.5%)
<i>Xanthoxylum armatum</i>	0.40 (128)	0.20 (256)	2	linalool (52.9%), limonene (15.0%)

Tested EOs showed a range of antimicrobial activities. According to Djabou et al. [24], EOs can be classified in three categories according to their antimicrobial activity. *C. violaceum* is not sensitive to *Cedrus atlantica* EO with a MIC value of 50.00 mg·mL⁻¹. It is dominated by α -pinene (55%), a hydrocarbon molecule known to be less active than the oxygenated molecules [15]. The strain is moderately sensitive to *Helichrysum italicum*, *Citrus limon* and *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* with respective MIC values of 12.50 mg·mL⁻¹, 6.00 mg·mL⁻¹ and 3.00 mg·mL⁻¹. Lastly, *C. violaceum* appears to be sensitive to *Citrus clementina*, *Lavandula stoechas*, *Myrtus communis* (MIC values 1.50 mg·mL⁻¹); *Eucalyptus polybractea*, *Calamintha nepeta* ssp. *nepeta*, *Cymbopogon flexosus*, *Foeniculum vulgare* (MIC values 0.80 mg·mL⁻¹) and *Xanthoxylum armatum* (MIC value 0.40 mg·mL⁻¹). For this last group, we retrieved EOs from which some major compounds are already known to exert antimicrobial activity, such as 1,8-cineole [26], fenchone [27], citral (geranial and neral) [28], cryptone [29], camphor and linalool [30].

C. violaceum QS was disturbed differently depending on the used EO. The MQSIC for *Cedrus atlantica* is high (6.00 mg·mL⁻¹), thus it is not a relevant anti-QS EO. The EO of *Helichrysum italicum*, with MQSIC value of 0.80 mg·mL⁻¹, followed by both *Citrus* EOs (0.40 mg·mL⁻¹) are significantly lower but still a little high in comparison to the upcoming group. Next, there is a larger group of five EOs with MQSIC values of 0.20 mg·mL⁻¹. Even if EOs action on QS is not widely studied, some essential oils exerted similar effect on *C. violaceum* QS. For example, the MQSIC values of Rosemary and Tea Tree EOs can be compared to this last group (0.21 mg·mL⁻¹) [31]. At these concentrations, they are considered active against QS. Next are *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* and *Myrtus communis* with MQSIC values of 0.10 mg·mL⁻¹. Finally, the lowest MQSIC value was found for *Eucalyptus polybractea* (0.05 mg·mL⁻¹). Colombian *Lippia alba* EOs, extracted from the whole plants, also had anti-QS activity. MQSIC of the EO from the Santander region is 0.09 mg·mL⁻¹, which is similar to *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* and *Myrtus communis* [32]. However, the isolation methods were different, which may have affected the concentration of the distilled molecules. The most active ones were extracted by microwave-assisted distillation. This method is known to produce a higher ratio of oxygenated compounds [27], but is different from the usual steam distillation method, which was used to produce EOs tested in our work.

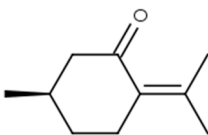
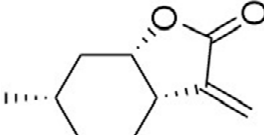
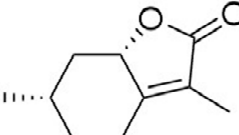
We choose to evaluate the MQSIC/MIC ratio using the dilution values (Table 1). The higher the ratio, the better the anti-QS activity will be. *Xanthoxylum armatum* appears to be the least efficient EO. The observed reduction of violacein production is more likely to be due to an antimicrobial action than an anti-QS effect. *Calamintha nepeta* ssp. *nepeta* and *Citrus clementina* EOs only have a ratio value of 4, followed by both *Cedrus atlantica* and *Lavandula stoechas* with a value of 8. Such low ratio values show, again, that the MQSIC and MIC dilutions are very close. With a MQSIC/MIC value of 16, *Citrus limon*, *Eucalyptus polybractea*, *Helichrysum italicum* and *Myrtus communis* have an effective action on *C. violaceum* QS. Major compounds of those EOs have not, to our knowledge, been tested in anti-QS assays. But, as previously seen, Rosemary and Tea Tree EOs seem to exert anti-QS activity. Their major compounds are camphor (\approx 30%), 1,8-cineole (\approx 14%) [33] and terpinen-4-ol (\approx 29%),

1,8-cineole ($\approx 17\%$) [34]. While 1,8-cineole is one of the major compounds of *Eucalyptus polybractea* and *Myrtus communis*, it was not found to be clearly responsible for anti-QS activity.

Only *M. suaveolens* ssp. *insularis* EO has an even higher MQSIC/MIC ratio of 32, making this EO the most attractive in terms of anti-QS activity. Since the sublethal anti-QS dilution is very different from the MIC one, this EO has the ability to inhibit preferentially the QS mechanism instead of inhibiting cell growth.

To find molecule(s) that could be responsible for the anti-QS activity of *M. suaveolens* ssp. *insularis* EO (Table 2), we tested both its major compounds: pulegone and *cis-cis-p*-menthenolide.

Table 2. Antimicrobial and anti-QS assays of pulegone, *cis-cis-p*-menthenolide and mintlactone.

	Pulegone	<i>cis-cis-p</i> -Menthenolide	Mintlactone
Chemical structure			
MIC value (mg·mL ⁻¹)/MIC dilution	0.40 (128)	3.00 (16)	3.00 (16)
MQSIC value (mg·mL ⁻¹)/MQSIC dilution	0.10 (512)	0.05 (1024)	0.40 (128)
MQSIC/MIC ratio	4	64	8

Pulegone is the most abundant compound of this EO, which is already known to exert an antimicrobial activity [35]. Experimentation on the commercial molecule showed that its MQSIC/MIC ratio value is 4, which is lower than the EO value by itself (32) and thus supporting its antibacterial action.

We then evaluated the anti-QS activity of *cis-cis-p*-menthenolide that we compared to the activity of mintlactone, its commercial isomer. This comparison was done to evaluate the structure-activity relationship of both molecules.

cis-cis-p-menthenolide((3a*S*,6*S*,7a*S*)-6-methyl-3-methylidenehexahydro-1-benzofuran-2(3*H*)-one)), a methylidene lactone bearing the menthane skeleton, is the second major component of this essential oil (27.3%). Nonetheless, this molecule is found in higher concentrations in the hydrolate extract (67.3%) [36]. As a water-soluble molecule, it is more likely to be found in this fraction of the plant hydrolate. For this reason, the hydrolate extract was used to isolate the molecule. *cis-cis-p*-menthenolide has a MQSIC/MIC ratio of 64, which is the highest found in our study, proving the anti-QS effect of that molecule. On the other hand, the mintlactone MQSIC/MIC ratio (8) is only slightly higher than pulegone (Table 2). Thus, its action can be considered more as antimicrobial than anti-QS. *cis-cis-p*-menthenolide and mintlactone exhibit the α,β unsaturated lactone substructure. However, they only differ by the double bond position (intracyclic or exocyclic), which is probably responsible for the difference in anti-QS activity between *cis-cis-p*-menthenolide and mintlactone.

Since Gram-negative bacteria use acyl-homoserine lactone as diffusible signal molecules for QS, we can suppose that the lactone skeleton of those molecules could be responsible for interfering with and disrupting the QS mechanism in *C. violaceum*. These results highlight the disruptive role of *cis-cis-p*-menthenolide on violacein production and possibly on the QS system.

As this study was about the primary anti-QS mode of action of tested EOs, it'll be interesting, in the future, to discover how *cis-cis-p*-menthenolide is interfering with QS. We could think about three main targets, acyl-homoserine-lactone synthase (*CviI*), the lactone itself (*N*-Hexanoyl-L-homoserine), or the transcriptional regulator (*CviR*). Knowing the homology found between lactone structure of *cis-cis-p*-menthenolide and *N*-Hexanoyl-L-homoserine, we might think to a competition between those

two compounds. This could lead to a blocking in the process of gene expression normally induced by the *CviR-N-Hexanoyl-L-homoserine* binding process, but this will need to be tested through the use of fluorescent quenching.

2.2. Anti-Biofilm Action

To confirm the anti-QS activity of *cis-cis-p*-menthenolide, we choose to evaluate the inhibition of biofilm formation by scanning electron microscopy because it is mediated by QS in *C. violaceum*. Biofilm formation is a multistage process that starts with bacterial adhesion to a surface followed by the production and accumulation of an extracellular polymeric matrix [37]. The action of *M. suaveolens* ssp. *insularis* EO, *cis-cis-p*-menthenolide and mintlactone on biofilm formation are shown in Figure 1.

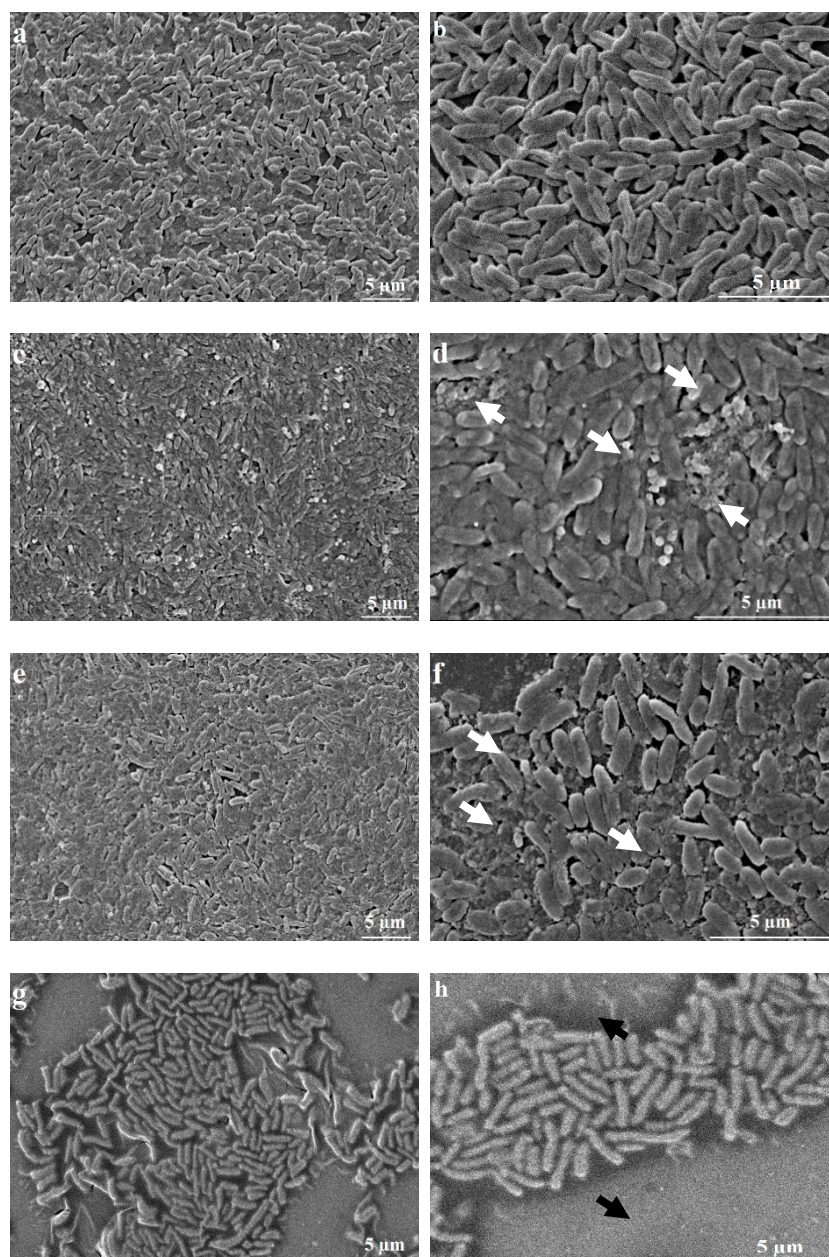


Figure 1. SEM images of *C. violaceum* growth in normal conditions (a,b), in the presence of *M. suaveolens* ssp. *insularis* at MIQSC (c,d), *cis-cis-p*-menthenolide at MIQSC (e,f) and mintlactone at MIQSC (g,h). White arrows in (d,f): biofilm matrix degradation; black arrows in (h): zones without bacterial development. Scale 5 µm.

In standard conditions, *C. violaceum* grows in a very dense and homogenous biofilm (Figure 1a,b). When *M. suaveolens* ssp. *insularis* EO (Figure 1c,d) is used at its MQSIC, bacterial density is similar to the control condition, but the matrix seems to be degraded and fragmented as shown in the Figure 1d. The same can be said when assessing *cis-cis-p*-menthenolide (Figure 1e,f), with even more disaggregation of the matrix. On the contrary, when mintlactone is used at its MQSIC (Figure 1g,h), there is visible reduction of the population density. This observation seems to be in agreement with the MQSIC/MIC ratios in Table 2, where we show this molecule has no influence on the QS but rather exerts a direct action on the bacterial cell.

We clearly showed, in the first part of the study, that *cis-cis-p*-menthenolide action lead to a strong decrease in violacein production, thus without impacting bacterial density which is implying a disruption of the QS. So, visible results of its action on *C. violaceum* biofilm matrix appear as one other proof of the implied action against QS.

Further investigations could be undertaken in the future to confirm this hypothesis. For example, we could determine the chitinolytic activity of *C. violaceum*. Indeed, when in presence of chitin in a low nutrient environment, *C. violaceum* can, under QS control, induce chitinase production [8].

3. Materials and Methods

3.1. Bioactive Substances

Twelve EOs were tested. Hydro-distillations were made from various parts of the plants of interest: the leaves for *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* and *Eucalyptus polybractea*, young leaves and green twigs for *Citrus clementina* and *Citrus limon*, aerial parts for *Myrtus communis*, *Cedrus atlantica*, *Calamintha nepeta* ssp. *nepeta* and *Cymbopogon citratus*, flowering tops for *Helichrysum italicum*, *Lavandula stoechas*, seeds for *Foeniculum vulgare* and dried fruits for *Xanthoxylum armatum*. They were mainly supplied by U Mandriolu Sarrola Carcopino (Corsica, France). Essential oil of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* was isolated from aerial part (leaves) of the plant by hydro-distillation in our laboratory.

Plant materials were dried one day at room temperature, away from direct sunlight, and submitted to water-distillation (3 h) using a Clevenger-type apparatus (yields: 0.14% *w/w*). The combined EO (10 mL) and the hydrolate (10 L) from the same distillation were stored in the dark at 4 °C. Three portions (3.3 L each) of the hydrolate were extracted with diethyl oxide (3 × 1 L) and the combined organic layer was dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure yielding the hydrolate extract (HE, 3.8 g).

Mintlactone and pulegone were purchased from Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO, USA).

All products were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich™). Antimicrobial activity of the DMSO solvent was tested beforehand and showed no effect on bacterial growth at the tested concentrations.

3.2. Gas Chromatography (GC) Analyses

Analyses were performed on a Clarus 500 PerkinElmer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) system equipped with a FID and two fused-silica capillary columns (50 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 μm), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal at 220 °C for 20 min; injector temperature: 250 °C; detector temperature: 250 °C; carrier gas: hydrogen (1 mL/min); split: 1/60; injected volume: 0.5 μL. The relative proportions of the oil constituents were expressed as percentages obtained by peak-area normalization, without using correction factors. Retention indices were determined relative to the retention times of a series of n-alkanes (C₇–C₂₈) with linear interpolation (Target Compounds software from PerkinElmer).

Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS) Analyses

The EOs were analyzed with a PerkinElmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a PerkinElmer Autosystem equipped with a fused-silica capillary column (50 m × 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm), BP-1 (dimethylpolysiloxane). Carrier gas, helium at 0.8 mL/min; split: 1/60; injection volume, 0.5 μL; injector temperature, 250 °C; oven temperature programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal (20 min); ion source temperature, 250 °C; energy ionization, 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range 40–400 Da.

3.3. Chromatographic Fractionation of the Hydrolate Extract

Hydrolate extracts were chromatographed using a Grace Reveleris® flash chromatography system using a linear gradient pentane/chloroform/methanol. The F19 fraction eluted with 20% chloroform in pentane contains 2.0813 g of *cis-cis-p*-menthenolide with a purity of 95% [36,38,39].

3.4. Bacterial Strains and Growth Conditions

Chromobacterium violaceum wild-type strain (CIP 103350T) was obtained from the Institut Pasteur's Biological Resource Center (Paris, France). The strain was grown under aerobic condition in trypticasein soy (TS) broth and agar (Conda™, Torrejón de Ardoz, Spain), incubated at 30 °C for 24 h.

3.5. Anti-QS Assay: Violacein Quantification and Measurement of Cell Growth

The anti-QS activity of Corsican EOs was assessed on *C. violaceum* (10⁶ CFU·mL⁻¹). Their concentrations ranged from 50.00 mg·mL⁻¹ (dilution: 1) to 1.25 × 10⁻² mg·mL⁻¹ (dilution: 4096) and were obtained by a two-fold serial dilution method. *C. violaceum* was incubated in culture tubes containing TS broth at 30 °C on an orbital shaker (Stuart™, Stone, UK). Violacein production was quantified using the Choo, Rukayadi, & Hwang protocol [18]. Briefly, 1 mL of overnight culture of each culture tube was centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes to precipitate the pigment. The pellet was resuspended in 1 mL of DMSO and homogenized by pipetting. Violacein absorbance at 585 nm was measured by an UV-visible spectrophotometer (Jasco™, Oklahoma City, CA, USA). The control samples consisted of incubating *C. violaceum* in TS broth without the addition of bioactive substances. Each test was performed in triplicate. Percentages of violacein production were expressed using the following formula:

$$(\text{absorbance of tested concentration at 585 nm} / \text{absorbance of the control at 585 nm}) \times 100 \quad (1)$$

Since a reduction of violacein production can be due to either blocking the QS mechanism or inhibiting bacterial growth [40], the bacterial concentration was evaluated in parallel: 10-fold serial dilutions were performed from each culture tube; 100 μL of each dilution was then plated on TS agar dishes and incubated at 30 °C for 24 h. Colonies were then counted and expressed as Log CFU·mL⁻¹. This assay also allows us to determine the minimal inhibitory concentration (MIC), which is the minimal dilution where at least 90% of the bacterial population has not grown compared to the control (when growth is <2 Log CFU·mL⁻¹ according to method sensitivity). According to Djabou et al. (2013) [24], a strain is considered as not sensitive for MIC value between 50.00 or above to 25.00 mg·mL⁻¹, moderately sensitive for value between 12.50 and 3.00 mg·mL⁻¹ and sensitive for value between 2.00 and 0.40 mg·mL⁻¹. Finally, the minimum QS inhibitory concentration (MQSIC) was defined as the effective concentration of EOs or bioactive agents which for at least 50% of the violacein production was reduced [41] in absence of significant effect on cell growth (Figure 2). Each test was performed in triplicate.

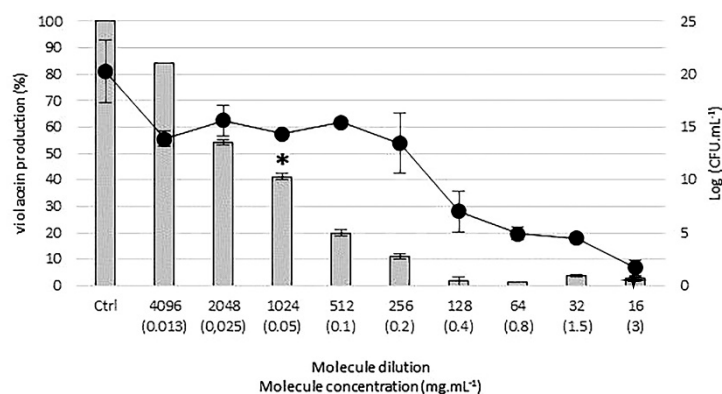


Figure 2. Effect of increasing molecule concentrations on *Chromobacterium violaceum* growth (●) and violacein production (■). The example of *cis-cis-p*-menthenolide was used to show how MIC (↔) and MQSIC (*) were determined.

3.6. Anti-Biofilm Assay: Scanning Electron Microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe bacterial behavior in solution with EOs and molecules samples. For this purpose, 7.5 μL of each sample dilution were placed in a 96-well microplate containing 142.5 μL of a 0.5 McFarland standard of *C. violaceum* diluted to reach 10^6 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$. A plastic lid with 96 identical pegs protruding downward (MBEC™ High Throughput (HTP) Assay Innovotech Inc., Edmonton, AB, Canada) was placed on top. These pegs allow bacterial development in a biofilm. The microplates were shaken at 30 °C for 36 hours. The pegs were immersed in a 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Science™, Hatfield, PA, USA) fixation solution in sodium cacodylate (Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO, USA) buffer 0.1 M (pH 7.2) for 2 to 3 h at 4 °C. They were washed in two successive 10 min baths of sodium cacodylate buffer, dried for 120 h, and then coated with gold/palladium sputter coating (Quorum Technologies SC7640, Lewes, UK). The pegs were then examined under a scanning electron microscope (Hitachi™ S3400N, Tokyo, Japan) with an accelerating voltage of 5 or 10 kV. Each test was performed in triplicate and the images are representative of the bacterial distribution on the whole peg surface.

4. Conclusions

In summary, *cis-cis-p*-menthenolide, a *p*-menthane exhibiting a characteristic exocyclic α,β unsaturated lactone substructure is of specific interest because it is only found in the endemic to the occidental Mediterranean Sea islands *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*. In this study, it appears that *cis-cis-p*-menthenolide, extracted from Corsican *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*, seems to act as a quencher of the QS signaling pathway. Its sublethal MQSIC dilution of 1024 ($0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) had no bactericidal effect, but considerably reduced violacein production. Moreover, anti-QS action was enlightened by scanning electron micrographies where biofilm matrix appears to be altered without affecting bacterial density.

Author Contributions: J.-P.P., E.G. and V.L. conceived and designed the experiments. S.S. and D.d.R.S. performed the extraction of *cis-cis-p*-menthenolide. Writing-Original Draft Preparation and Investigation was performed by J.-P.P. SEM was performed by Y.Q. GC-MS analysis were performed by M.P. Resources, Writing-Review & Editing were done by S.S., F.T. and L.B. V.L. and L.B. Supervised. All authors contributed to the data analysis and to the preparation of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors are grateful to the Collectivité territoriale de Corse (JP Poli research grant) and to the FEDER project 2014–2020, AGRIEX No. CO 0009204 for partial financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Waters, C.M.; Bassler, B.L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; Annual Reviews: Palo Alto, CA, USA, 2005; Volume 21, pp. 319–346. ISBN 978-0-8243-3121-4.
2. Asfour, H.Z. Antiquorum sensing natural compounds. *J. Microsc. Ultrastruct.* **2017**. [[CrossRef](#)]
3. McLean, R.J.C.; Pierson, L.S.; Fuqua, C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J. Microbiol. Methods* **2004**, *58*, 351–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Dessaux, Y.; Elmerich, C.; Faure, D. La violacéine: Une molécule d'intérêt biologique, issue de la bactérie tellurique *Chromobacterium violaceum*. *Rev. Méd. Interne* **2004**, *25*, 659–662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zinger-Yosovich, K.; Sudakevitz, D.; Imberly, A.; Garber, N.C.; Gilboa-Garber, N. Production and properties of the native *Chromobacterium violaceum* fucose-binding lectin (CV-III) compared to homologous lectins of *Pseudomonas aeruginosa* (PA-III) and *Ralstonia solanacearum* (RS-III). *Microbiology* **2006**, *152*, 457–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zins, M.M.; Zimprich, C.A.; Petermann, S.R.; Rust, L. Expression and partial characterization of an elastase from *Chromobacterium violaceum*. *Vet. Microbiol.* **2001**, *80*, 63–74. [[CrossRef](#)]
7. Durán, N.; Justo, G.Z.; Durán, M.; Brocchi, M.; Cordi, L.; Tasic, L.; Castro, G.R.; Nakazato, G. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 1030–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Chernin, L.S.; Winson, M.K.; Thompson, J.M.; Haran, S.; Bycroft, B.W.; Chet, I.; Williams, P.; Stewart, G. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4435–4441. [[PubMed](#)]
9. De Almeida, D.F.; Hungria, M.; Guimaraes, C.T.; Antonio, R.V.; Almeida, F.C.; de Almeida, L.G.P.; de Almeida, R.; Alves-Gomes, J.A.; Andrade, E.M.; Araripe, J.; et al. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11660–11665. [[CrossRef](#)]
10. McClean, K.H.; Winson, M.K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S.R.; Camara, M.; Daykin, M.; Lamb, J.H.; Swift, S.; Bycroft, B.W.; et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **1997**, *143*, 3703–3711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Morohoshi, T.; Kato, M.; Fukamachi, K.; Kato, N.; Ikeda, T. *N*-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS. Microbiol. Lett.* **2008**, *279*, 124–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kothari, V.; Sharma, S.; Padia, D. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, *10*, 744–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Champ, M.A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. *Mar. Pollut. Bull.* **2003**, *46*, 935–940. [[CrossRef](#)]
14. Yebra, D.M.; Kiil, S.; Dam-Johansen, K. Antifouling technology—Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.* **2004**, *50*, 75–104. [[CrossRef](#)]
15. Kalembe, D.; Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 813–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Orhan, F.; Sekerel, B.E.; Kocabas, C.N.; Sackesen, C.; Adalioglu, G.; Tuncer, A. Complementary and alternative medicine in children with asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2003**, *90*, 611–615. [[CrossRef](#)]
17. Bassole, I.H.N.; Juliani, H.R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* **2012**, *17*, 3989–4006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Azzimonti, B.; Cochis, A.; Beyrouthy, M.E.; Iriti, M.; Uberti, F.; Sorrentino, R.; Landini, M.M.; Rimondini, L.; Varoni, E.M. Essential Oil from Berries of Lebanese *Juniperus excelsa* M. Bieb Displays Similar Antibacterial Activity to Chlorhexidine but Higher Cytocompatibility with Human Oral Primary Cells. *Molecules* **2015**, *20*, 9344–9357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Scotti, F.; Decani, S.; Sardella, A.; Iriti, M.; Varoni, E.M.; Lodi, G. Anti-inflammatory and wound healing effects of an essential oils-based bioadhesive gel after oral mucosa biopsies: Preliminary results. *Cell. Mol. Biol.* **2018**, *64*, 78–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. De Kievit, T.R.; Iglewski, B.H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 4839–4849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Defoirdt, T.; Boon, N.; Bossier, P. Can Bacteria Evolve Resistance to Quorum Sensing Disruption? *PLoS Pathog.* **2010**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kerekes, E.-B.; Deák, É.; Takó, M.; Tserennadmid, R.; Petkovits, T.; Vágvölgyi, C.; Krisch, J. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 933–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Luciardi, M.C.; Blázquez, M.A.; Cartagena, E.; Bardón, A.; Arena, M.E. Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *68*, 373–380. [[CrossRef](#)]
24. Djabou, N.; Lorenzi, V.; Guinoiseau, E.; Andreani, S.; Giuliani, M.-C.; Desjobert, J.-M.; Bolla, J.-M.; Costa, J.; Berti, L.; Luciani, A.; et al. Phytochemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. *Food Control.* **2013**, *30*, 354–363. [[CrossRef](#)]
25. Guinoiseau, E.; Luciani, A.; Serra, D.D.R.; Quilichini, Y.; Berti, L.; Lorenzi, V. Primary Mode of Action of *Cistus ladaniferus* L. Essential Oil Active Fractions on *Staphylococcus aureus* Strain. *Adv. Microbiol.* **2015**, *5*, 881–890. [[CrossRef](#)]
26. Li, L.; Li, Z.-W.; Yin, Z.-Q.; Wei, Q.; Jia, R.-Y.; Zhou, L.-J.; Xu, J.; Song, X.; Zhou, Y.; Du, Y.-H.; et al. Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2014**, *7*, 1721–1727. [[PubMed](#)]
27. Kazemi, M.; Mousavi, E.; Kharestani, H. Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Varthemia persica*, *Foeniculum vulgare* and *Ferula lycia*. *Curr. Res. Bacteriol.* **2012**, *5*, 42–52. [[CrossRef](#)]
28. Onawunmi, G.O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett. Appl. Microbiol.* **1989**, *9*, 105–108. [[CrossRef](#)]
29. Agnani, H.; Makani, T.; Bikanga, R.; Obame, L.C.; Lebibi, J.; Menut, C. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Leaves, Roots and Bark of *Glossocalyx staudii*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1127–1132. [[PubMed](#)]
30. Sokovic, M.; Glamoclija, J.; Marin, P.D.; Brkic, D.; van Griensven, L.J.L.D. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules* **2010**, *15*, 7532–7546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Alvarez, M.V.; Moreira, M.R.; Ponce, A. Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. *J. Food Saf.* **2012**, *32*, 379–387. [[CrossRef](#)]
32. Olivero-Verbel, J.; Barreto-Maya, A.; Bertel-Sevilla, A.; Stashenko, E.E. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, 759–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Salido, S.; Altarejos, J.; Nogueras, M.; Saánchez, A.; Luque, P. Chemical Composition and Seasonal Variations of Rosemary Oil from Southern Spain. *J. Essent. Oil Res.* **2003**, *15*, 10–14. [[CrossRef](#)]
34. Swords, G.; Hunter, G. Composition of Australian Tea Tree Oil (*melaleuca-Alternifolia*). *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 734–737. [[CrossRef](#)]
35. Duru, M.E.; Öztürk, M.; Uğur, A.; Ceylan, Ö. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 43–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sutour, S.; Bradesi, P.; de Rocca-Serra, D.; Casanova, J.; Tomi, F. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (Req.) Greuter. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 107–114. [[CrossRef](#)]
37. Azeredo, J.; Azevedo, N.F.; Briandet, R.; Cerca, N.; Coenye, T.; Costa, A.R.; Desvaux, M.; Di Bonaventura, G.; Hebraud, M.; Jaglic, Z.; et al. Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *43*, 313–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sutour, S.; Bradesi, P.; Luro, F.; Casanova, J.; Tomi, F. Germacra-1,5-dien-4 α -ol in *Fortunella* sp. leaf oils. *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30*, 445–450. [[CrossRef](#)]
39. Sutour, S.; Therrien, B.; von Reuss, S.H.; Tomi, F. Halogenated C15 Acetogenin Analogues of Obtusallene III from a *Laurenciella* sp. Collected in Corsica. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 279–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Adonizio, A.L.; Downum, K.; Bennett, B.C.; Mathee, K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *105*, 427–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Pellegrini, M.C.; Alvarez, M.V.; Ponce, A.G.; Cugnata, N.M.; De Piano, F.G.; Fuselli, S.R. Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *J. Essent. Oil Res.* **2014**, *26*, 458–465. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not anymore available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au laboratoire de Biochimie Microbienne, deux stratégies ont été mises en place pour rechercher, dans les produits naturels, des molécules capables de pallier le désintérêt des firmes pharmaceutiques vis-à-vis de l'émergence de germes multirésistants.

La première stratégie vise à rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes. Tout d'abord, cette thématique a été développée en exploitant les propriétés biologiques des huiles essentielles. Après une recherche poussée de la compréhension des mécanismes d'action des molécules actives isolées de ces huiles essentielles, nous avons étendu nos travaux à un autre type de ressources naturelles : les produits de la ruche et en particulier le miel. Le territoire insulaire, caractérisé par la présence d'une abeille locale adaptée et d'une flore riche d'espèces endémiques, permet de proposer avec les miels de Corse des produits originaux dont le pouvoir antibactérien n'a jamais été évalué.

En Nouvelle-Zélande, la production de miels de Manuka a pu être mise en avant grâce à leur pouvoir antibactérien qui est directement relié à la concentration d'une molécule spécifique : le méthylglyoxal (Mavric *et al.*, 2008). Dans cette même optique, nous avons évalué l'activité des miels de Corse en vue de caractériser leurs effets sur un panel de 7 souches bactériennes, reconnues soit en tant que pathogènes à fort impact clinique, soit comme souches problématiques dans le domaine de l'alimentaire. La gamme variétale de l'AOP « Miels de Corse – Mele di Corsica » a ainsi été criblée. Avec des CMI variant entre 7% et 8%, les miels de Châtaigneraie et de Miellats du Maquis ont été sélectionnés pour la poursuite de l'étude qui a été menée sur *P. aeruginosa*. En effet, ce bacille Gram négatif est bien connu pour les nombreux problèmes qu'il pose en milieu hospitalier car il présente une forte capacité de mutation à l'origine du développement de nouvelles résistances. Nous avons ainsi pu déterminer que l'activité antibactérienne des miels de Châtaigneraie et de Miellats du Maquis était due à une synergie d'action entre le peroxyde d'hydrogène et les composés phénoliques. En effet, leur action combinée génère un effet pro-oxydant qui va dégrader l'ADN de manière irréversible. Ce résultat est novateur dans la mesure où l'activité de la majorité des miels décrits jusqu'à présent est différente car uniquement attribuée à leur forte teneur en peroxyde d'hydrogène.

Les polyphénols entrant dans la composition des miels varient fortement en fonction des conditions climatiques ou géographiques (Yao *et al.*, 2003 ; Beretta *et al.*, 2005 ; Dong *et al.*, 2013). Il serait donc intéressant d'affiner les résultats obtenus en déterminant le spectre des composés phénoliques présents dans ces miels. Cette identification pourrait être réalisée par

des extractions liquide-liquide à l'acétate d'éthyle ou à l'éthanol couplé à la technique de chromatographie liquide haute performance (Siess *et al.*, 1996 ; Cabras *et al.*, 1999). Une fois les principaux composés identifiés, il sera alors possible d'effectuer des combinaisons entre les composés phénoliques commerciaux et le peroxyde d'hydrogène afin de déterminer la/les molécule(s) impliquées dans l'action pro-oxydante des miels.

D'autre part, nous pourrions évaluer encore plus précisément l'importance de l'action pro-oxydante des miels en utilisant une souche beaucoup plus sensible à l'oxydation que *P. aeruginosa* comme le double mutant *msrA-msrB* de PAO1 (Romsang *et al.*, 2013).

L'étude que nous avons réalisée est la première portant sur le pouvoir antibactérien des miels de Corse et sera étendue à d'autres produits de la ruche, dans le cadre du projet FEDER « Activités biologiques des produits de la ruche ». En plus de nouveaux échantillonnages de miels, nous nous intéresserons également à la propolis et aux pollens dont les activités antibactériennes sont moins décrites. Des extraits de pollens d'origine lituanienne et slovaque sont actifs contre certaines bactéries pathogènes, comme *S. aureus* ou *S. epidermidis*, mais également contre des champignons microscopiques et levures comme *Aspergillus fumigatus* et *Candida glabrata* (Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Kacániová *et al.*, 2012). L'action du pollen semble être due à ses composés phénoliques et à l'activité de la glucose oxydase (Cornara *et al.*, 2017). La propolis est classée en plusieurs catégories (brune, rouge et verte) et certaines d'entre elles se sont montrées actives lors d'essais cliniques contre des souches bactériennes comme *S. aureus* résistant à la méticilline, des Entérocoques résistants à la vancomycine, *Helicobacter pylori* ou encore *Streptococcus* sp., (Kosalec *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2007; Noronha *et al.*, 2014). Néanmoins, pour les études à venir, des adaptations de protocoles seront à prévoir car la propolis est souvent fournie sous forme d'extraits (huile essentielle de propolis) ce qui rend leur solubilisation plus complexe que celle des miels.

Dans le cadre de la seconde stratégie de recherche développée au laboratoire, nous avons été amenés à travailler sur l'inhibition de la virulence bactérienne. En effet, que ce soit en milieu hospitalier ou plus généralement au niveau environnemental, les problèmes liés au développement des biofilms sont nombreux (infections liés aux biomatériaux implantés, biofouling sur les coques de bateaux ou dans les usines de traitement des eaux...). L'inhibition du quorum sensing, mécanisme de communication bactérien contrôlant la formation de ces biofilms, est une voie prometteuse pour lutter contre cette problématique.

Nous avons travaillé sur 12 huiles essentielles afin de tester leur capacité à inhiber des caractères sous le contrôle du quorum sensing tels que la formation de biofilms ou la production de pigments. Ce travail a été réalisé sur une souche biosenseur *C. violaceum* productrice d'un pigment violet, la violacéine. L'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* est celle qui a permis d'inhiber le plus fortement la production de ce pigment. En effet, elle présente le plus grand ratio CMIQS/CMI (32) ce qui indique une réelle perturbation du quorum sensing. Cette action semble directement reliée à un de ses composés majoritaires, la *cis-cis-p*-menthénolide, dotée d'un squelette lactone. Les résultats obtenus avec cette molécule purifiée montrent un ratio CMIQS/CMI (64) encore plus important que celui de l'huile essentielle seule. L'observation au microscope électronique à balayage des biofilms formés par *C. violaceum* en présence de l'huile essentielle et de la *cis-cis-p*-menthénolide révèle une altération significative de la matrice du biofilm sans diminution de la viabilité cellulaire. L'ensemble de ces travaux met en évidence le fort potentiel de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* et de la *cis-cis-p*-menthénolide à perturber la voie de signalisation du quorum sensing qui contrôle l'expression de ces caractères chez *C. violaceum*.

Afin d'approfondir la compréhension du mécanisme d'action de la *cis-cis-p*-menthénolide et de déterminer si elle altère la protéine inductrice des AHL, dégrade les AHL produits par la bactérie ou en entre en compétition avec les AHL pour la protéine réceptrice de nouveaux tests sont prévus. Ces derniers pourraient être réalisés par la technique de qRT-PCR afin d'évaluer l'influence de la *cis-cis-p*-menthénolide sur les niveaux d'expression des gènes *cviI* et *cviR*. D'autre part, il serait intéressant de faire exprimer et purifier le récepteur des AHL, CviR, en vue de visualiser la possible compétition entre les AHL et la *cis-cis-p*-menthénolide par « quenching » de fluorescence (Ravichandran *et al.*, 2018).

Afin de poursuivre l'étude sur l'action anti-quorum sensing des huiles essentielles de Corse, le criblage se poursuit actuellement au laboratoire et les premiers résultats obtenus avec l'huile essentielle d'*I. graveolens* semblent prometteurs. Néanmoins, l'activité ne semble pas être attribuable à ses 2 composés majoritaires : l'acétate de bornyle et le bornéol. Il serait donc intéressant d'identifier parmi les molécules restantes celle(s) impliquée(s) dans la perturbation du quorum sensing. Enfin, les huiles essentielles les plus actives sur *C. violaceum* pourraient être testées sur des souches pathogènes ou présentant d'autres systèmes de quorum sensing.

En parallèle, nous avons initié des tests d'altération des biofilms *in vivo*. Ces biofilms hétérogènes sont formés par des bactéries sur lesquelles viennent ensuite adhérer des macro-organismes marins, tels que les diatomées (microalgues, appelées aussi phytobenthos) et les protozoaires. L'UMS 3514 Stella Mare est particulièrement intéressée par cette problématique car elle rencontre des problèmes de colonisation par des biofilms dans leurs bassins d'aquaculture. L'étude en est à ces débuts et fait l'objet d'un projet de collaboration entre les deux équipes. Elle se réalise en deux temps. Tout d'abord, les huiles essentielles, présentant une activité anti-quorum sensing *in vitro*, sont testées directement sur des supports immergés dans des bassins où l'eau contaminée est acheminée. L'analyse de l'eau des bassins permettra d'identifier les bactéries impliquées dans la formation de ces biofilms. Nous allons filtrer, mettre en culture, isoler et déterminer les espèces impliquées grâce au séquençage des ARN 16S.

Tous ces travaux témoignent du potentiel des produits naturels de Corse que sont les huiles essentielles et le miel dans la recherche de molécules antibactériennes présentant des modes d'action innovants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ackermann, H.-W. et Prangishvili, D. (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch. Virol.* *157*, 1843–1849.

Ahmed, S., et Othman, N.H. (2013). Honey as a Potential Natural Anticancer Agent: A Review of Its Mechanisms.

Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M., et Koltas, S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* *11*, 657–661.

Alvarez-Suarez, J.M., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T.Y., Mazzoni, L. et Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods* *3*, 420–432.

Al-Waili, N.S. (2004). Natural honey lowers plasma glucose, C-reactive protein, homocysteine, and blood lipids in healthy, diabetic, and hyperlipidemic subjects: comparison with dextrose and sucrose. *J. Med. Food* *7*, 100–107.

Amawi, H., Ashby, C.R., Samuel, T., Peraman, R. et Tiwari, A.K. (2017). Polyphenolic Nutrients in Cancer Chemoprevention and Metastasis: Role of the Epithelial-to-Mesenchymal (EMT) Pathway. *Nutrients* *9*.

Amor, D.M. (1978). Composition, Properties and Uses of Honey: A Literature Survey (British Food Manufacturing Industries Research Association).

Avison, M.B., Higgins, C.S., Ford, P.J., Heldreich, V., J, C., Walsh, T.R. et Bennett, P.M. (2002). Differential regulation of L1 and L2 β -lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* *49*, 387–389.

Azevedo, M.B.M.D., Alderete, J., Rodriguez, J.A., Souza, A.O., Rettori, D., Torsoni, M.A., Faljoni-Alario, A., Haun, M. et Durân, N. (2000). Biological Activities of Violacein, a New Antitumoral Indole Derivative, in an Inclusion Complex with β -Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* *37*, 93–101.

Brevet européen n°11 305193.2 « Use of polyaminoisoprenyl derivatives in antibiotic or antiseptic treatment »

Bachanová, K., Kludiny, J., Kopernický, J. et Šimúth, J. (2002). Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* *33*, 259–269.

Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R. et Čeksterylė, V. (2007). Antibacterial Activity of Honey and Beebread of Different Origin Against *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Food Technol. Biotechnol.* *45*, 201–208.

Barbour, A. (1981). Properties of Penicillin-Binding Proteins in Neisseria-Gonorrhoeae. *Antimicrob. Agents Chemother.* *19*, 316–322.

Bassler, B.L. (2002). Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell* 109, 421–424.

Bax, B.D., Chan, P.F., Eggleston, D.S., Fosberry, A., Gentry, D.R., Gorrec, F., Giordano, I., Hann, M.M., Hennessy, A., Hibbs, M., *et al.* (2010). Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* 466, 935-U51.

Bay, D.C., Rommens, K.L. et Turner, R.J. (2008). Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1814–1838.

Belabbes, R., Dib, M.E.A., Djabou, N., Ilias, F., Tabti, B., Costa, J. et Muselli, A. (2017). Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chem. Biodivers.* 14.

Bentabol Manzanares, A., García, Z.H., Galdón, B.R., Rodríguez, E.R. et Romero, C.D. (2011). Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chem.* 126, 664–672.

Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M. et Maffei Facino, R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* 533, 185–191.

Beretta, G., Orioli, M. et Facino, R.M. (2007). Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Med.* 73, 1182–1189.

Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. et Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 27, 677–689.

Bordi, C. et de Bentzmann, S. (2011). Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Ann. Intensive Care* 1, 19.

Bowles, E.J. (2003). *The Chemistry of Aromatherapeutic Oils* (Allen & Unwin).

Boyras, N. et Ozcan, M. (2005). Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia* 76, 661–665.

Briers, Y., Walmagh, M., Puyenbroeck, V.V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., Oliveira, H., Azeredo, J., Verween, G., Pirnay, J.-P., *et al.* (2014). Engineered Endolysin-Based “Artilysins” To Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *MBio* 5, e01379-14.

Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.

Brown, M.H., Paulsen, I.T. et Skurray, R.A. (1999). The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol. Microbiol.* 31, 394–395.

Brudzynski, K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Can. J. Microbiol.* 52, 1228–1237.

- Bucekova, M., Valachova, I., Kohutova, L., Prochazka, E., Klaudiny, J. et Majtan, J. (2014). Honeybee glucose oxidase-its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften* *101*, 661–670.
- Bucekova, M., Sojka, M., Valachova, I., Martinotti, S., Ranzato, E., Szep, Z., Majtan, V., Klaudiny, J. et Majtan, J. (2017). Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* *7*.
- 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. et Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* *36*, 162–167.
- Cabras, P., Angioni, A., Tuberoso, C., Floris, I., Reniero, F., Guillou, C. et Ghelli, S. (1999). Homogentisic Acid: A Phenolic Acid as a Marker of Strawberry-Tree (*Arbutus unedo*) Honey. *J. Agric. Food Chem.* *47*, 4064–4067.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D. et Farrand, S.K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *11*, 1119–1129.
- Chan, B.K., Abedon, S.T. et Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* *8*, 769–783.
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z. et Li, X. (2013). Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 17477–17500.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L. et Hughson, F.M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* *415*, 545–549.
- Choi, S.H. et Greenberg, E.P. (1991). The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 11115–11119.
- Chollet, R., Chevalier, J., Bryskier, A. et Pagès, J.-M. (2004). The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 3621–3624.
- Chopra, I. (2002). New developments in tetracycline antibiotics: glycylicyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *5*, 119–125.
- Chow, J.W. et Shlaes, D.M. (1991). Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* *28*, 499–504.

- Chu, W., Vatter, D.A., Maitin, V., Barnes, M.B. et McLean, R.J.C. (2011). Bioassays of quorum sensing compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum*. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ *692*, 3–19.
- Churchill, M.E.A. et Chen, L. (2011). Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling. *Chem. Rev.* *111*, 68–85.
- Coelho, L.G.V., Bastos, E.M.A.F., Resende, C.C., Paula e Silva, C.M., Sanches, B.S.F., de Castro, F.J., Moretzsohn, L.D., Vieira, W.L. dos S. et Trindade, O.R. (2007). Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. a pilot clinical study. *Helicobacter* *12*, 572–574.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J. et Burlando, B. (2017). Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Front. Pharmacol.* *8*.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. et Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* *284*, 1318–1322.
- Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* *12*, 564–582.
- Cox, S.D., Gustafson, J.E., Mann, C.M., Markham, J.L., Liew, Y.C., Hartland, R.P., Bell, H.C., Warming, J.R. et Wyllie, S.G. (1998). Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* *26*, 355–358.
- Cox, S.D., Mann, C.M. et Markham, J.L. (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* *91*, 492–497.
- Cui, L., Ma, X.X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F.C., Mamizuka, E.M., Gemmell, C.G., Kim, M.N., Ploy, M.C., El Solh, N., et al. (2003). Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 5–14.
- D’Amato, S., Serio, A., López, C.C. et Paparella, A. (2018). Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control* *86*, 126–137.
- Dantas, G. et Sommer, M. (2014). How to Fight Back Against Antibiotic Resistance. *Am. Sci.* *102*, 42–51.
- D’Arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., Furneri, P.M. et Bisignano, G. (2010). Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* *17*, 317–322.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* *2*, 114–122.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* *264*, 375–382.

- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. et Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.
- Dé, E., Baslé, A., Jaquinod, M., Saint, N., Malléa, M., Molle, G. et Pagès, J.-M. (2001). A new mechanism of antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* induced by a structural modification of the major porin. *Mol. Microbiol.* 41, 189–198.
- De Almeida, D.F., Hungria, M., Guimaraes, C.T., Antonio, R.V., Almeida, F.C., de Almeida, L.G.P., de Almeida, R., Alves-Gomes, J.A. etrade, E.M., Araripe, J., et al. (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11660–11665.
- Defoirdt, T., Miyamoto, C.M., Wood, T.K., Meighen, E.A., Sorgeloos, P., Verstraete, W. et Bossier, P. (2007). The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. *Environ. Microbiol.* 9, 2486–2495.
- Dessaux, Y., Elmerich, C. et Faure, D. (2004). La violacéine : une molécule d'intérêt biologique, issue de la bactérie tellurique *Chromobacterium violaceum*. *Rev. Médecine Interne* 25, 659–662.
- Devkotte, A.N., Zore, G.B. et Karuppayil, S.M. (2005). Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Res.* 5, 867–873.
- Díaz, E., López, R. et García, J.L. (1990). Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8125–8129.
- Dong, R., Zheng, Y. et Xu, B. (2013). Phenolic Profiles and Antioxidant Capacities of Chinese Unifloral Honeys from Different Botanical and Geographical Sources. *Food Bioprocess Technol.* 6, 762–770.
- Dorman, H.J. et Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308–316.
- Dreier, J. et Ruggerone, P. (2015). Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 6, 660.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H.W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V. et Luisi, B.F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Durán, N., Antonio, R.V., Haun, M. et Pilli, R.A. (1994). Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 686–690.
- Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J. et Kulma, A. (2016). The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Ellison, R.T. et Giehl, T.J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88, 1080–1091.

- El-Mowafy, S.A., Abd El Galil, K.H., El-Messery, S.M. et Shaaban, M.I. (2014). Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* *74*, 25–32.
- Engbrecht, J. et Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 4154–4158.
- Engbrecht, J., Neelson, K. et Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* *32*, 773–781.
- Epp, S.F., Kohler, T., Plesiat, P., Michea-Hamzhepour, M., Frey, J. et Pechere, J.C. (2001). C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 1780–1787.
- Fernandez-Cabezudo, M.J., El-Kharrag, R., Torab, F., Bashir, G., George, J.A., El-Taji, H. et al-Ramadi, B.K. (2013). Intravenous administration of manuka honey inhibits tumor growth and improves host survival when used in combination with chemotherapy in a melanoma mouse model. *PloS One* *8*, e55993.
- Fischetti, V.A. (2005). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* *13*, 491–496.
- Fish, R., Kutter, E., Wheat, G., Blasdel, B., Kutateladze, M. et Kuhl, S. (2016). Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *J. Wound Care* *25 Suppl 7*, S27-33.
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzae. *Br. J. Exp. Pathol.* *10*, 226–236.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S. et Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phyther. Res. PTR* *21*, 989–994.
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T. et Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.* *265*, 11333–11337.
- Füller, J.J., Röpke, R., Krausze, J., Rennhack, K.E., Daniel, N.P., Blankenfeldt, W., Schulz, S., Jahn, D. et Moser, J. (2016). Biosynthesis of Violacein, Structure and Function of l-Tryptophan Oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. *J. Biol. Chem.* *291*, 20068–20084.
- Fuqua, C. et Greenberg, E.P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 685–695.
- Fuqua, W.C. et Winans, S.C. (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* *176*, 2796–2806.
- Fuqua, W., Winans, S. et Greenberg, E. (1994). Quorum Sensing in Bacteria - the Luxr-Luxi Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* *176*, 269–275.

- Galtier, M., De Sordi, L., Maura, D., Arachchi, H., Volant, S., Dillies, M.-A. et Debarbieux, L. (2016). Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environ. Microbiol.* *18*, 2237–2245.
- George, E.A. et Muir, T.W. (2007). Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent *staphylococci*. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* *8*, 847–855.
- George, E.A., Novick, R.P. et Muir, T.W. (2008). Cyclic peptide inhibitors of staphylococcal virulence prepared by Fmoc-based thiolactone peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 4914–4924.
- Gheldof, N., Wang, X.-H. et Engeseth, N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* *50*, 5870–5877.
- Gill, A.O. et Holley, R.A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* *108*, 1–9.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D. et Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bacteriol.* *178*, 6618–6622.
- Goossens, H., Guillemot, D., Ferech, M., Schlemmer, B., Costers, M., Breda, M. van, Baker, L.J., Cars, O. et Davey, P.G. (2006). National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *62*, 373–379.
- Guinoiseau, E., Luciani, A., Serra, D. de R., Quilichini, Y., Berti, L. et Lorenzi, V. (2015). Primary Mode of Action of *Cistus ladaniferus* L. Essential Oil Active Fractions on *Staphylococcus aureus* Strain. *Adv. Microbiol.* *05*, 881.
- Hammer, K.A. et Carson, C.F. (2010). Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils. In *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, (Wiley-Blackwell), pp. 255–306.
- Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K. et Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* *48*, 125–129.
- Harraghy, N., Kerdudou, S. et Herrmann, M. (2007). Quorum-sensing systems in *staphylococci* as therapeutic targets. *Anal. Bioanal. Chem.* *387*, 437–444.
- Hassan, K.A., Liu, Q., Henderson, P.J.F. et Paulsen, I.T. (2015). Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceI Transporter Represent a New Family of Bacterial Multidrug Efflux Systems. *MBio* *6*, e01982-14.
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. et von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* *46*, 3590–3595.

- Heng, J., Zhao, Y., Liu, M., Liu, Y., Fan, J., Wang, X., Zhao, Y. et Zhang, X.C. (2015). Substrate-bound structure of the *E. coli* multidrug resistance transporter MdfA. *Cell Res.* 25, 1060–1073.
- Hoffman, L.R., Kulasekara, H.D., Emerson, J., Houston, L.S., Burns, J.L., Ramsey, B.W. et Miller, S.I. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 8, 66–70.
- Hong, Y., Thimmapuram, J., Zhang, J., Collings, C.K., Bhide, K., Schmidt, K. et Ebner, P.D. (2016). The impact of orally administered phages on host immune response and surrounding microbial communities. *Bacteriophage* 6, e1211066.
- Hooper, D.C. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 2, 38–55.
- Hooper, D.C. (2001). Mechanisms of action of antimicrobials: Focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 32, S9–S15.
- Hover, B.M., Kim, S.-H., Katz, M., Charlop-Powers, Z., Owen, J.G., Ternei, M.A., Maniko, J., Estrela, A.B., Molina, H., Park, S., et al. (2018). Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Nat. Microbiol.* 3, 415–422.
- Huchet, E., Coustel, J. et Guinot, L. (1996). Les constituants chimiques du miel. Méthode d'analyse chimique. *Dép. Sci. Aliment Ecole Natl. Supér. Ind.*
- Hussien, J., Teshale, C. et Mohammed, J. (2011). Assessment of the Antimicrobial Effects of Some Ethiopian Aromatic Spice and Herb Hydrosols. *Int. J. Pharmacol.* 7, 635–640.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. et Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 12.
- Inouye, S., Takahashi, M. et Abe, S. (2009). Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi Jpn. J. Med. Mycol.* 50, 243–251.
- Irish, J., Carter, D.A., Shokohi, T. et Blair, S.E. (2006). Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Med. Mycol.* 44, 289–291.
- Jaganathan, S.K. et Mandal, M. (2009). Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review.
- Jaganathan, S.K. et Mandal, M. (2010). Involvement of non-protein thiols, mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species and p53 in honey-induced apoptosis. *Invest. New Drugs* 28, 624–633.
- Jeffrey, A.E. et Echazarreta, C.M. (1996). Medical uses of honey. *Rev Biomed* 43–49.

- Jha, B., Kavita, K., Westphal, J., Hartmann, A. et Schmitt-Kopplin, P. (2013). Quorum Sensing Inhibition by *Asparagopsis taxiformis*, a Marine Macro Alga: Separation of the Compound that Interrupts Bacterial Communication. *Mar. Drugs* *11*, 253–265.
- Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H. et Quax, W.J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *76*, 46–65.
- Johnston, J.E., Sepe, H.A., Miano, C.L., Brannan, R.G. et Alderton, A.L. (2005). Honey inhibits lipid oxidation in ready-to-eat ground beef patties. *Meat Sci.* *70*, 627–631.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Cox, A.J., Golby, P., Reeves, P.J. et Stephens, S. (1993). The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* *12*, 2477–2482.
- Jun, J.W., Shin, T.H., Kim, J.H., Shin, S.P., Han, J.E., Heo, G.J., De Zoysa, M., Shin, G.W., Chai, J.Y. et Park, S.C. (2014). Bacteriophage therapy of a *Vibrio parahaemolyticus* infection caused by a multiple-antibiotic-resistant O3:K6 pandemic clinical strain. *J. Infect. Dis.* *210*, 72–78.
- Kacániová, M., Vukovic, N., Chlebo, R., Hascík, P., Rovná, K., Cubon, J., Dzugan, M. et Pasternakiewicz, A. (2012). The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Arch. Biol. Sci.* *64*, 927–934.
- Kalemba, D. et Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* *10*, 813–829.
- Kamio, Y. et Nikaido, H. (1976). Outer Membrane of Salmonella-Typhimurium - Accessibility of Phospholipid Head Groups to Phospholipase-C and Cyanogen-Bromide Activated Dextran in External Medium. *Biochemistry* *15*, 2561–2570.
- Kang, B.R., Lee, J.H., Ko, S.J., Lee, Y.H., Cha, J.S., Cho, B.H. et Kim, Y.C. (2004). Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010. *Can. J. Microbiol.* *50*, 935–941.
- Khalil, M.I., Sulaiman, S.A. et Boukraa, L. (2010). Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. *Open Nutraceuticals J.* *3*.
- de Kievit, T.R. et Iglewski, B.H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* *68*, 4839–4849.
- Kim, S.H., Chang, A.B. et Saier, M.H. (2004). Sequence similarity between multidrug resistance efflux pumps of the ABC and RND superfamilies. *Microbiol. Read. Engl.* *150*, 2493–2495.
- Ko, E.-Y., Cho, S.-H., Kang, K., Kim, G., Lee, J.-H., Jeon, Y.-J., Kim, D., Ahn, G. et Kim, K.-N. (2017). Anti-inflammatory activity of hydrosols from *Tetragonia tetragonoides* in LPS-induced RAW 264.7 cells. *EXCLI J.* *16*, 521–530.

- Koch, C., Reichling, J., Schnee, J. et Schnitzler, P. (2008). Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* *15*, 71–78.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J. et Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 423–435.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M. et Vladimir-Knezević, S. (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm. Zagreb Croat.* *55*, 423–430.
- Krymkiewicz, N., Diéguez, E., Rekarte, U.D. et Zwaig, N. (1971). Properties and mode of action of a bactericidal compound (=methylglyoxal) produced by a mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *108*, 1338–1347.
- Kumar, A. et Schweizer, H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 1486–1513.
- Kumar, S. et Varela, M.F. (2013). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Chemotherapy* *14*, 18.
- Kumar, A., Malik, F., Bhushan, S., Sethi, V.K., Shahi, A.K., Kaur, J., Taneja, S.C., Qazi, G.N. et Singh, J. (2008). An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chem. Biol. Interact.* *171*, 332–347.
- Kwakman, P.H.S., te Velde, A.A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. et Zaat, S.A.J. (2010). How honey kills bacteria. *Faseb J.* *24*, 2576–2582.
- Lam, S.J., O'Brien-Simpson, N.M., Pantarat, N., Sulistio, A., Wong, E.H.H., Chen, Y.-Y., Lenzo, J.C., Holden, J.A., Blencowe, A., Reynolds, E.C., *et al.* (2016a). Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nat. Microbiol.* *1*, 16162.
- Lam, S.J., Wong, E.H.H., O'Brien-Simpson, N.M., Pantarat, N., Blencowe, A., Reynolds, E.C. et Qiao, G.G. (2016b). Bionano Interaction Study on Antimicrobial Star-Shaped Peptide Polymer Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* *8*, 33446–33456.
- Lambert, P.A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 1471–1485.
- Lante, A. et Tinello, F. (2015). Citrus hydrosols as useful by-products for tyrosinase inhibition. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* *27*, 154–159.
- Laub, G. (1986). Discovery of the Sulfa Drugs. *South. Med. J.* *79*, 782–782.
- Leach, K.L., Brickner, S.J., Noe, M.C. et Miller, P.F. (2011). Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1222*, 49–54.
- Lee, J. et Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* *6*, 26–41.

- Lenz, D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S. et Bassler, B.L. (2004). The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* 118, 69–82.
- Levy, S. et McMurry, L. (1978). Plasmid-Determined Tetracycline Resistance Involves New Transport-Systems for Tetracycline. *Nature* 276, 90–92.
- Levy, S.B. et Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, S122–S129.
- Lewis, K. (2017). New approaches to antimicrobial discovery. *Biochem. Pharmacol.* 134, 87–98.
- Lewis, K. et Ausubel, F.M. (2006). Prospects for plant-derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* 24, 1504–1507.
- Li, X.-Z. et Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69, 1555–1623.
- Lichstein, H.C., Sand, V.D. et F, V. (1945). Violacein, an Antibiotic Pigment Produced by *Chromobacterium Violaceum*. *J. Infect. Dis.* 76, 47–51.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., *et al.* (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517, 455–459.
- Lister, P.D., Wolter, D.J. et Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610.
- Liu, D., Thomas, P.W., Momb, J., Hoang, Q.Q., Petsko, G.A., Ringe, D. et Fast, W. (2007). Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemistry* 46, 11789–11799.
- Lorenzi, V., Muselli, A., Bernardini, A.F., Berti, L., Pages, J.-M., Amaral, L. et Bolla, J.-M. (2009). Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2209–2211.
- Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K.V. et Bíró, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biol. Szeged.* 47, 119–125.
- Lyon, G.J. et Novick, R.P. (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* 25, 1389–1403.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H. et Hearst, J.E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16, 45–55.
- Maciá, M.D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Pérez, J.L. et Oliver, A. (2005). Hypermutation Is a Key Factor in Development of Multiple-Antimicrobial Resistance in

Pseudomonas aeruginosa Strains Causing Chronic Lung Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 3382–3386.

Mahmoud, S.S. et Croteau, R.B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* *7*, 366–373.

Mai, V., Ukhanova, M., Reinhard, M.K., Li, M. et Sulakvelidze, A. (2015). Bacteriophage administration significantly reduces *Shigella* colonization and shedding by *Shigella*-challenged mice without deleterious side effects and distortions in the gut microbiota. *Bacteriophage* *5*, e1088124.

Majtan, J., Kumar, P., Majtan, T., Walls, A.F. et Klaudiny, J. (2010). Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* *19*, e73–e79.

Makarov, V., Manina, G., Mikusova, K., Moellmann, U., Ryabova, O., Saint-Joanis, B., Dhar, N., Pasca, M.R., Buroni, S., Lucarelli, A.P., *et al.* (2009). Benzothiazinones Kill *Mycobacterium tuberculosis* by Blocking Arabinan Synthesis. *Science* *324*, 801–804.

Mallea, M., Chevalier, J., Bornet, C., Eyraud, A., Davin-Regli, A., Bollet, C. et Pages, J.M. (1998). Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiol.-Uk* *144*, 3003–3009.

Mamelli, L., Amoros, J.-P., Pagès, J.-M. et Bolla, J.-M. (2003). A phenylalanine-arginine beta-naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance of *Campylobacter* to macrolides. *Int. J. Antimicrob. Agents* *22*, 237–241.

Mandal, M.D. et Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* *1*, 154–160.

Manefield, M., de Nys, R., Naresh, K., Roger, R., Givskov, M., Peter, S. et Kjelleberg, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* *145*, 283–291.

Manefield, M., Rasmussen, T.B., Henzter, M., Andersen, J.B., Steinberg, P., Kjelleberg, S. et Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* *148*, 1119–1127.

Manzoori, J.L., Amjadi, M. et Orooji, M. (2006). Application of crude extract of kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*) as a rich source of peroxidase in the spectrofluorometric determination of hydrogen peroxide in honey samples. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* *22*, 1201–1206.

Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Imai, S., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., *et al.* (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* *11*, 211–219.

- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G. et Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol. Nutr. Food Res.* *52*, 483–489.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., *et al.* (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiol.-Uk* *143*, 3703–3711.
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H. et Pesci, E.C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *182*, 2702–2708.
- Mei, L., Lu, Z., Zhang, W., Wu, Z., Zhang, X., Wang, Y., Luo, Y., Li, C. et Jia, Y. (2013). Bioconjugated nanoparticles for attachment and penetration into pathogenic bacteria. *Biomaterials* *34*, 10328–10337.
- Meng, J., Bai, H., Jia, M., Ma, X., Hou, Z., Xue, X., Zhou, Y. et Luo, X. (2012). Restoration of antibiotic susceptibility in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* by targeting *acrB* with antisense phosphorothioate oligonucleotide encapsulated in novel anion liposome. *J. Antibiot. (Tokyo)* *65*, 129–134.
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., *et al.* (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.* *13*, 560–578.
- Mohammed, S.E.A., Kabashi, A.S., Koko, W.S. et Azim, M.K. (2015). Antigiardial activity of glycoproteins and glycopeptides from *Ziziphus* honey. *Nat. Prod. Res.* *29*, 2100–2102.
- Mohanty, A.K.B. and P. (2012). Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy.
- Molan, P. (2012). The antibacterial activity of honey and its role in treating diseases.
- Moore, I.F., Hughes, D.W. et Wright, G.D. (2005). Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX. *Biochemistry* *44*, 11829–11835.
- Moussa, A., Noureddine, D., Saad, A., Abdelmelek, M. et Abdelkader, B. (2012). Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* *2*, 554–557.
- Mukherji, R., Varshney, N.K., Panigrahi, P., Suresh, C.G. et Prabhune, A. (2014). A new role for penicillin acylases: degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Technol.* *56*, 1–7.
- Murray, I.A., Lewendon, A., Williams, J.A., Cullis, P.M., Shaw, W.V. et Leslie, A.G. (1991). Alternative binding modes for chloramphenicol and 1-substituted chloramphenicol analogues revealed by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of chloramphenicol acetyltransferase. *Biochemistry* *30*, 3763–3770.

- Nagai, T., Inoue, R., Kanamori, N., Suzuki, N. et Nagashima, T. (2006). Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chem.* *97*, 256–262.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. et De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* *6*, 1451–1474.
- Nealson, K.H., Platt, T. et Hastings, J.W. (1970). Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System I. *J. Bacteriol.* *104*, 313–322.
- Nelson, M.L. et Levy, S.B. (1999). Reversal of Tetracycline Resistance Mediated by Different Bacterial Tetracycline Resistance Determinants by an Inhibitor of the Tet(B) Antiport Protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 1719–1724.
- Nelson, D., Loomis, L. et Fischetti, V.A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4107–4112.
- Nelson, M.L., Park, B.H., Andrews, J.S., Georgian, V.A., Thomas, R.C. et Levy, S.B. (1993). Inhibition of the tetracycline efflux antiport protein by 13-thio-substituted 5-hydroxy-6-deoxytetracyclines. *J. Med. Chem.* *36*, 370–377.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. et Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* *66*, 1022–1037.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K. et van Leeuwen, P.A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* *74*, 418–425.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *67*, 593-+.
- Niu, C., Afre, S. et Gilbert, E.S. (2006). Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Lett. Appl. Microbiol.* *43*, 489–494.
- Njoroge, J. et Sperandio, V. (2009). Jamming bacterial communication: New approaches for the treatment of infectious diseases. *EMBO Mol. Med.* *1*, 201–210.
- Normark, B.H. et Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* *252*, 91–106.
- Noronha, V.R.A.S., Araujo, G.S., Gomes, R.T., Iwanaga, S.H., Barbosa, M.C., Abdo, E.N., Ferreira e Ferreira, E., Viana Campos, A.C., Souza, A.A., Abreu, S.R.L., *et al.* (2014). Mucoadhesive propolis gel for prevention of radiation-induced oral mucositis. *Curr. Clin. Pharmacol.* *9*, 359–364.
- Novick, R.P. et Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in *staphylococci*. *Annu. Rev. Genet.* *42*, 541–564.

Ochsner, U.A. et Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 6424–6428.

Olga, E., María, F.-G. et Carmen, S.M. (2012). Differentiation of Blossom Honey and Honeydew Honey from Northwest Spain. Agriculture 2, 25–37.

O’Neill, J. (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations (The Review on Antimicrobial Resistance, Wellcome Trust & UK Government, 2016). Home | AMR Review.

Othman, N.H. (2012). Honey and cancer: sustainable inverse relationship particularly for developing nations-a review. Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2012, 410406.

Pagès, J.-M. et Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta 1794, 826–833.

Pandey, K.B. et Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid. Med. Cell. Longev. 2, 270–278.

Papenfort, K. et Bassler, B.L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 14, 576–588.

Papenfort, K. et Vogel, J. (2010). Regulatory RNA in bacterial pathogens. Cell Host Microbe 8, 116–127.

Park, B.H. et Levy, S.B. (1988). The cryptic tetracycline resistance determinant on Tn4400 mediates tetracycline degradation as well as tetracycline efflux. Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1797–1800.

Parker, C.T. et Sperandio, V. (2009). Cell-to-cell signalling during pathogenesis. Cell. Microbiol. 11, 363–369.

Parmar, A., Lakshminarayanan, R., Iyer, A., Mayandi, V., Leng Goh, E.T., Lloyd, D.G., Chalasani, M.L.S., Verma, N.K., Prior, S.H., Beuerman, R.W., et al. (2018). Design and Syntheses of Highly Potent Teixobactin Analogues against *Staphylococcus aureus*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and Vancomycin-Resistant *Enterococci* (VRE) in Vitro and in Vivo. J. Med. Chem. 61, 2009–2017.

Pascale, G.D. et Wright, G.D. (2010). Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. ChemBioChem 11, 1325–1334.

Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. et Iglewski, B.H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. Science 260, 1127–1130.

Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V.A. et Huang, D.B. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. J. Med. Microbiol. 62, 1506–1516.

Paul, S., Dubey, R.C., Maheswari, D.K. et Kang, S.C. (2011). *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Control* 22, 725–731.

Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R., Saier, M.H., Turner, R.J., Weiner, J.H., Goldberg, E.B. et Grinius, L.L. (1996). The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* 19, 1167–1175.

Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. et Greenberg, E.P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 197–201.

Pearson, J.P., Pesci, E.C. et Iglewski, B.H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179, 5756–5767.

Pereira, C.S., Thompson, J.A. et Xavier, K.B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 156–181.

Peterson, M.M., Mack, J.L., Hall, P.R., Alsup, A.A., Alexander, S.M., Sully, E.K., Sawires, Y.S., Cheung, A.L., Otto, M. et Gresham, H.D. (2008). Apolipoprotein B Is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe* 4, 555–566.

Petretto, G., Cossu, M. et C. Alamanni, M. (2014). Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian monofloral honeys. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50.

Phillips, J.W., Goetz, M.A., Smith, S.K., Zink, D.L., Polishook, J., Onishi, R., Salowe, S., Wiltsie, J., Allocco, J., Sigmund, J., *et al.* (2011). Discovery of Kibdelomycin, A Potent New Class of Bacterial Type II Topoisomerase Inhibitor by Chemical-Genetic Profiling in *Staphylococcus aureus*. *Chem. Biol.* 18, 955–965.

Pichersky, E., Noel, J.P. et Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311, 808–811.

Piper, K.R., Beck von Bodman, S. et Farrand, S.K. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* 362, 448–450.

Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T. et Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 530–536.

Pouillot, F., Chomton, M., Blois, H., Courroux, C., Noelig, J., Bidet, P., Bingen, E. et Bonacorsi, S. (2012). Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3568–3575.

Pradel, E. et Pagès, J.-M. (2002). The AcrAB-TolC Efflux Pump Contributes to Multidrug Resistance in the Nosocomial Pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2640–2643.

- Prescott, L., Harley, J. et Klein, D. (1995). Microbiologie.
- Raetz, C.R.H. et Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 635–700.
- Ranzato, E., Martinotti, S. et Burlando, B. (2012). Epithelial mesenchymal transition traits in honey-driven keratinocyte wound healing: Comparison among different honeys. *Wound Repair Regen.* *20*, 778–785.
- Rasmussen, T.B. et Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *296*, 149–161.
- Rasmussen, T.B., Manefield, M., Andersen, J.B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S. et Givskov, M. (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiol. Read. Engl.* *146 Pt 12*, 3237–3244.
- Ravat, F., Jault, P. et Gabard, J. (2015). Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann. Burns Fire Disasters* *28*, 13–20.
- Ravichandran, V., Zhong, L., Wang, H., Yu, G., Zhang, Y. et Li, A. (2018). Virtual Screening and Biomolecular Interactions of CviR-Based Quorum Sensing Inhibitors Against *Chromobacterium violaceum*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *8*.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U. et Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral et cytotoxic properties--an overview. *Forsch. Komplementarmedizin* *2006 16*, 79–90.
- Richard, C. (1993). [*Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* *1990 86*, 169–173.
- Romsang, A., Atichartpongkul, S., Trinachartvanit, W., Vattanaviboon, P. et Mongkolsuk, S. (2013). Gene Expression and Physiological Role of *Pseudomonas aeruginosa* Methionine Sulfoxide Reductases during Oxidative Stress. *J. Bacteriol.* *195*, 3299–3308.
- Ropp, P.A., Hu, M., Olesky, M. et Nicholas, R.A. (2002). Mutations in ponA, the Gene Encoding Penicillin-Binding Protein 1, and a Novel Locus, penC, Are Required for High-Level Chromosomally Mediated Penicillin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 769–777.
- Ruiz-Argueso, T. et Rodriguez-Navarro, A. (1973). Gluconic Acid-producing Bacteria from Honey Bees and Ripening Honey. *J. Gen. Microbiol.* *76*, 211–216.
- Rutherford, S.T. et Bassler, B.L. (2012). Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a012427.
- Saier, M.H., Tam, R., Reizer, A. et Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* *11*, 841–847.

- Sajid, M. et Azim, M.K. (2012). Characterization of the nematicidal activity of natural honey. *J. Agric. Food Chem.* *60*, 7428–7434.
- Salmond, G.P.C. et Fineran, P.C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 777–786.
- Salton, M.R.J. et Kim, K.-S. (1996). Structure. In *Medical Microbiology*, S. Baron, ed. (Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston), p.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G. et Bassler, B.L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* *41*, 463–476.
- Schuch, R., Nelson, D. et Fischetti, V.A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* *418*, 884–889.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. et Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* *28*, 519–542.
- Scorciapino, M.A., Serra, I., Manzo, G. et Rinaldi, A.C. (2017). Antimicrobial Dendrimeric Peptides: Structure, Activity and New Therapeutic Applications. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 542.
- Shahzad, A. et Cohrs, R.J. (2012). In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. *Transl. Biomed.* *3*.
- Siess, M.-H., Le Bon, A.-M., Canivenc-Lavier, M.-C., Amiot, M.-J., Sabatier, S., Aubert, S.Y. et Suschetet, M. (1996). Flavonoids of Honey and Propolis: Characterization and Effects on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Benzo[a]pyrene–DNA Binding in Rats. *J. Agric. Food Chem.* *44*, 2297–2301.
- Sikkema, J., de Bont, J.A. et Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* *59*, 201–222.
- Singh, S.B. et Barrett, J.F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* *71*, 1006–1015.
- Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., Daykin, M., Cámara, M., Williams, P. et Quax, W.J. (2006). Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect. Immun.* *74*, 1673–1682.
- Soothill, J.S. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J. Med. Microbiol.* *37*, 258–261.
- Soto, S.M. (2014). Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches.
- Sousa, E.O., Silva, N.F., Rodrigues, F.F.G., Campos, A.R., Lima, S.G. et Costa, J.G.M. (2010). Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* Linn. *Pharmacogn. Mag.* *6*, 79–82.

- Spratt, B.G. (1988). Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature* 332, 173–176.
- Stauff, D.L. et Bassler, B.L. (2011). Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA Recognition and Gene Regulation by the CviR Receptor ∇ . *J. Bacteriol.* 193, 3871–3878.
- Stevens, A.M., Dolan, K.M. et Greenberg, E.P. (1994). Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12619–12623.
- Sturme, M.H.J., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A.D.L., Vaughn, E.E. et de Vos, W.M. (2002). Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 233–243.
- Sulakvelidze, A. (2011). Bacteriophage. *Bacteriophage* 1, 1–2.
- Sunder, A.V., Kumar, A., Naik, N. et Pundle, A.V. (2012). Characterization of a new *Bacillus cereus* ATUAVP1846 strain producing penicillin V acylase, and optimization of fermentation parameters. *Ann. Microbiol.* 62, 1287–1293.
- Suttle, C.A. (2007). Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 801–812.
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S. et Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review.
- Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y.M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A. et Garciglia, R.S. (2017). Antioxidant Activity of the Essential Oil and its Major Terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacogn. Mag.* 13, S875–S880.
- Truchado, P., López-Gálvez, F., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A. et Allende, A. (2009). Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem.* 115, 1337–1344.
- Trudil, D. (2015). Phage lytic enzymes: a history. *Virol. Sin.* 30, 26–32.
- Tsuchiya, H. et Inuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 7, 161–165.
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. et Velioglu, Y. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.* 95, 653–657.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J. et 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.
- Uroz, S., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P. et Dessaux, Y. (2005). N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by

Rhodococcus erythropolis W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. Microbiol. Read. Engl. 151, 3313–3322.

van Veen, H.W. et Konings, W.N. (1998). The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 1365, 31–36.

Watanabe, K., Rahmasari, R., Matsunaga, A., Haruyama, T. et Kobayashi, N. (2014). Anti-influenza Viral Effects of Honey In Vitro: Potent High Activity of Manuka Honey. Arch. Med. Res. 45, 359–365.

Watanabe, R., Matsumoto, T., Sano, G., Ishii, Y., Tateda, K., Sumiyama, Y., Uchiyama, J., Sakurai, S., Matsuzaki, S., Imai, S., et al. (2007). Efficacy of Bacteriophage Therapy against Gut-Derived Sepsis Caused by *Pseudomonas aeruginosa* in Mice. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 446–452.

Waters, C.M. et Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. In Annual Review of Cell and Developmental Biology, (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 319–346.

Watnick, P.I. et Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol. Microbiol. 34, 586–595.

Wendakoon, C.N. et Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of *Enterobacter aerogenes* by Active Components in Spices. J. Food Prot. 58, 280–283.

Wright, G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 1451–1470.

Yang, W., Moore, I.F., Koteva, K.P., Bareich, D.C., Hughes, D.W. et Wright, G.D. (2004). TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. J. Biol. Chem. 279, 52346–52352.

Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., Martos, I. et Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. Food Chem. 81, 159–168.

Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K. et Konno, M. (1990). Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. J. Bacteriol. 172, 6942–6949.

Zang, T., Lee, B.W.K., Cannon, L.M., Ritter, K.A., Dai, S., Ren, D., Wood, T.K. et Zhou, Z.S. (2009). A naturally occurring brominated furanone covalently modifies and inactivates LuxS. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 6200–6204.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415, 389–395.

Zechini, B. et Versace, I. (2009). Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc. 4, 37–50.

Zhu, J. et Winans, S.C. (1999). Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 4832–4837.

Zhu, J. et Winans, S.C. (2001). The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1507–1512.

Zhu, J., Beaber, J.W., Moré, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A. et Winans, S.C. (1998). Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* *180*, 5398–5405.

Zhu, J., Chai, Y., Zhong, Z., Li, S. et Winans, S.C. (2003). *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 6949–6953.

ANNEXES

Communications par affiche

JP. Poli, E. Guinoiseau, A Luciani, Y. Quilicchini, L. Berti, V. Lorenzi. Action des huiles essentielles sur un mécanisme de communication bactérien, le quorum sensing. Journée des doctorants, Corte, le 16 juin 2016.

JP. Poli, E. Guinoiseau, A Luciani, Y. Quilicchini, L. Berti, V. Lorenzi. Inhibition of *Chromobacterium violaceum* Quorum Sensing by Corsican essential oils. 47th International Symposium on Essential Oils, Nice, 13 septembre 2016.

JP. Poli, E. Guinoiseau, A Luciani, Y. Quilicchini, L. Berti, V. Lorenzi. Inhibition du quorum sensing par les huiles essentielles de Corse. Journée des doctorants, Corte, le 15 juin 2017.

JP. Poli, E. Guinoiseau, A. Luciani, Y. Quilicchini, Y. Yang, MJ. Battesti, J. Paolini, J. Costa, L. Berti, V. Lorenzi. The synergy between hydrogen peroxide and phenolic compounds from Corsican honeys damage *Pseudomonas aeruginosa* plasmidic DNA. ANTIMIC 2017, Symposium Franco-Canadien sur les antimicrobiens naturels : applications alimentaires, médicales et vétérinaires. Québec, 21-23 juin 2017.

JP. Poli, E. Guinoiseau, A Luciani, Y. Quilicchini, L. Berti, V. Lorenzi. Inhibition of *Chromobacterium violaceum* Quorum Sensing by Corsican essential oils. ANTIMIC 2017, Symposium Franco-Canadien sur les antimicrobiens naturels : applications alimentaires, médicales et vétérinaires. Québec, 21-23 juin 2017.

Communication orale

JP. Poli. Lauréat du prix de la communication orale scientifique. Le pouvoir antibactérien des miels de Corse. Journée des doctorants, Corte, le 5 juin 2018.

Résumé

De nos jours, l'expansion de la résistance et de la virulence des bactéries ne cesse de croître devenant, ainsi, une des préoccupations majeures dans le domaine médical. En effet, on estime que, d'ici à 2050, le taux d'infections non-traitables pourrait augmenter d'un facteur 10. Afin de pallier ce problème, il apparaît urgent de trouver de nouvelles molécules antibactériennes. Pour ce faire, la recherche se tourne de plus en plus vers les produits naturels. L'objectif de cette thèse est de déterminer si, dans les produits naturels de Corse peuvent se retrouver des molécules d'intérêt et quels sont leurs mécanismes d'action. Pour répondre à cet objectif, nous avons travaillé sur deux types de produits : les miels ainsi que les huiles essentielles. Dans un premier temps, nous avons étudié l'action antibactérienne directe des différentes variétés de miels de Corse sur des pathogènes connus pour poser problème en milieu hospitalier ou dans l'agroalimentaire. *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène extrêmement enclin à créer de nouvelles résistances se montre très sensible à l'action des miels de Châtaigneraie et des Miellats du Maquis. En effet, leur concentration minimale inhibitrice (CMI) varie entre 7% et 8%. Le peroxyde d'hydrogène semble être la molécule clé dans l'action antibactérienne. Sa concentration est plus élevée dans les miels actifs et semble engendrer une dégradation irréversible de l'ADN bactérien. Néanmoins les concentrations en H₂O₂ des miels de Corse sont faibles. De plus, on sait que sa combinaison avec les composés phénoliques peut renforcer l'action menée contre l'ADN. En effet, dans certaines conditions retrouvées dans les miels, le peroxyde d'hydrogène peut aider à l'auto-oxydation des polyphénols. Ces derniers vont alors devenir pro-oxydants et induire également une action contre l'ADN. Cette dégradation de l'information génétique microbienne est confirmée par l'observation de la structure bactérienne en microscopie électronique à balayage. En effet, à l'incubation de la souche avec les miels à leur CMI, aucun dommage sur l'enveloppe bactérienne n'est observé confirmant bien l'action en profondeur des miels. La deuxième partie de cette étude a été réalisée à partir des huiles essentielles. Ces dernières sont bien connues pour leurs divers modes d'action antimicrobiens de façon directe. Nous avons eu une approche différente, puisque nous avons recherché une éventuelle action indirecte. Pour ce faire, nous avons voulu voir si ces dernières ne pouvaient pas induire de perturbation au niveau du quorum sensing (QS), un mécanisme de communication bactérien responsable notamment de différentes formes de virulence. L'action de différentes huiles essentielles a été criblée *via* une souche rapporteur du QS, *Chromobacterium violaceum*. Sous l'influence du QS, cette dernière va produire un pigment antibiotique violet quantifiable, permettant ainsi la détermination de la concentration minimale d'inhibition du QS (CMIQS). Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence la forte action de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*. Les activités biologiques des huiles essentielles proviennent généralement de leurs composés majoritaires. Cela semble être le cas ici aussi puisque nous avons déterminé que la *cis-cis-p*-menthenolide (le second majoritaire, 27,3%) est responsable de la perturbation du QS. C'est cette dernière qui présente le ratio CMIQS/CMI le plus élevé de l'étude (64). De plus, cette action anti-QS semble se confirmer par l'étude de la formation du biofilm bactérien. En effet, la matrice du biofilm apparaît dégradée lors des observations effectuées en microscopie électronique à balayage. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche montre clairement le potentiel antibactérien des molécules issues des produits naturels de Corse. De plus, Cette action peut se faire de façon directe ou indirecte sur les bactéries offrant ainsi de multiples possibilités pour compléter un arsenal thérapeutique de plus en plus limité.

Mots clés : Antibactérien, huiles essentielles, quorum sensing, miels, mécanisme d'action

Abstract

Nowadays, the expansion of bacterial resistance and virulence continues to grow in the medical field. Indeed, by 2050, the rate of non-treatable infections could increase by a factor 10. To overcome this problem, it is urgent to find new antibacterial molecules. In order to do so, research is turning more and more towards natural products. The purpose of this study is to determine if, in Corsican natural products, some molecule of interest and their mode of action could be found. To meet this objective, we worked on two types of products: honeys and essential oils. First of all, we studied the direct antibacterial action of different varieties of Corsican honeys on pathogens known to cause problems in hospitals or food. *Pseudomonas aeruginosa*, a pathogen which has the ability to easily create new resistance appears to be really sensitive to Chestnut grove and Honeydew Maquis honeys. Indeed, their minimum inhibitory concentration (MIC) varies between 7% and 8%. Hydrogen peroxide appears to be the key molecule in their antibacterial action. Its concentration is higher in the most active ones and leads to bacterial DNA degradation. Nevertheless, H₂O₂ concentrations of Corsican honeys are low. In addition, it is known that its combination with phenolic compounds may enhance the action against DNA. Indeed, under certain conditions retrieved in honeys, hydrogen peroxide can help polyphenols auto-oxidation. These will then become pro-oxidants which will also induce DNA degradation. This destruction of the microbial genetic information is confirmed by the observation of the bacterial structure by scanning electron microscopy. Indeed, when the strain was incubated with the honeys at their MIC, no damage to the bacterial envelope was observed, confirming honeys deep action. The second part of this study was carried out using essential oils. They are well known for their various antimicrobial modes of action in a direct way. We had a different approach, since we looked for a possible indirect action. To do so, we wanted to see if essential oils were able to induce a disturbance in quorum sensing (QS), a bacterial communication mechanism responsible in particular for various virulence forms. The action of different essential oils was screened using a QS reporter strain, *Chromobacterium violaceum*. Under the control of QS, this bacterium will produce a quantifiable violet antibiotic pigment, thus allowing the determination of the minimum QS inhibition concentration (MQSIC). The tests carried out highlight the strong action of the essential oil of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*. The biological activities of essential oils generally come from their major compounds. It seems to be the same in our study, since we have determined that *cis-cis-p*-menthenolide (the second major compound, 27.3%) is responsible for QS disturbance. It has the highest MQSIC/MIC ratio in the study (64). Moreover, this anti-QS action seems to be confirmed by the study of the formation of the bacterial biofilm. Indeed, biofilm matrix appears altered during observations made by scanning electron microscopy. All the results obtained during this work clearly show the antibacterial potential of the molecules produced by natural products from Corsica. This action can, in addition, be done directly or indirectly, thus offering multiple possibilities in order to complete therapeutic arsenal which shows its limit.

Keywords antibacterial, essential oils, quorum sensing, honeys, mode of action

Riassuntu

A resistenza batteriana hè diventata un fenomenu assai capatoghju in lu duminiu di a salute pubblica. L'arsanale chì permette di cumbatte l'infizzioni batteriane hè di più in più ridottu. Dunque, a scienza deve sempre circa molecole contrabatteriane nove in la natura. U scopu di sta tesa hè di diterminà s'è, dentru i prudutti naturali di Corsica chì sò u mele è l'olii essenziali, si trovanu molecole chì anu un'attività contrabatteriana. In un primu tempu, avemu travagliatu nant'à i meli di Corsica. Infatti, oghje, nisunu travagliu nant'à u so potenziale contrabatterianu ùn hè statu fattu. A so attività hè stata cuncitrata nant'à batterii rispunsivuli d'infizzioni chjappate in mezu ospidaleru o nifasti in lu duminiu di l'agroalimentariu. I meli castagnini è di a machja si sò mustrati veramente efficaci contr'à *Pseudomonas aeruginosa*. Stu batteriu pone gravi prublemi d'infizzioni chjappate in mezu ospidaleru, principalmente à causa di a so forte capacità à sviluppà resistenze. In più, ci hè pocu di prudutti naturali chì parenu, oghje, avè un'azione contr'à ellu. A molecola centrale implicata in l'azione di i meli hè u perossidu d'idrogenu. Quessa, digià bè cunnisciuta pè a so azione contrabatteriana accintua l'effetti d'altri cumpunenti di u mele, i « polyphénols ». U so associu porta à una degradazione irrevirsibile di l'ADN batteriu. In un secondu tempu, avemu travagliatu nant'à l'olii essenziali. Quessi sò assai cunnisciuti pè a so azione contrabatteriana ma menu contr'à i fenomeni di virulenza. Avemu dunque vulsutu sapè ne di più di i so effetti nant'à u quorum sensing, meccanismu utilizatu da i batterii pè cumunicà trà elli. Stu quorum sensing li permette particularmente di sprimà certe cause di resistenze (furmazione di biofilmi) o di virulenza (pruduzione di tossine). Pè a totalità di l'olii essenziali studiati, quellu di *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* impedisce assai u quorum sensing di *Chromobacterium violaceum*. Stu batteriu produce un pigmentu viulettu, a viulaceina, chì a sintesi hè cuntrollata da a via di u quorum sensing. Avemu mustratu chì l'oliu essenziale di *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* cala assai a pruduzione di viulaceina è què, senza affettà a viabilità cillulare. Pè determinà u modu d'azione di st'oliu avemu circatu à identificà u/i cumpostu/i rispunsivule/i di l'effetti usservati. A *cis-cis-p*-menthenolide, u secondu cumpostu magiuritariu (27,3%) purificatu, s'hè mustratu più efficace chì l'oliu essenziale. A perturbazione di u quorum sensing da st'ultima hè stata validata da usservazioni microscopiche. Infatti, pare interferisce incù a furmazione di u biofilmu postu chì certi cenni di degradazione di a matrice cunstituante lu sò usservabili in microscopia elettronica à spazzera. I risultati ottenuti mentre sti travaglii di ricerca mustranu veramente u potenziale contrabatterianu di e molecole esciute di i prudutti naturali di Corsica. In più, st'azione si pò fà di manera diretta o indiretta nant'à batterii ciò chì permette d'avè parechje pussibilità pè perfeziunà un'arsanale chì permette di cumbatte l'infezioni batteriane di più in più ridottu.

Parolle chjave Contrabatterianu, olii essenziali, quorum sensing, meli, meccanismu d'azione

Résumé

De nos jours, l'expansion de la résistance et de la virulence des bactéries ne cesse de croître devenant, ainsi, une des préoccupations majeures dans le domaine médical. En effet, on estime que, d'ici à 2050, le taux d'infections non-traitables pourrait augmenter d'un facteur 10. Afin de pallier ce problème, il apparaît urgent de trouver de nouvelles molécules antibactériennes. Pour ce faire, la recherche se tourne de plus en plus vers les produits naturels. L'objectif de cette thèse est de déterminer si, dans les produits naturels de Corse peuvent se retrouver des molécules d'intérêt et quels sont leurs mécanismes d'action. Pour répondre à cet objectif, nous avons travaillé sur deux types de produits : les miels ainsi que les huiles essentielles. Dans un premier temps, nous avons étudié l'action antibactérienne directe des différentes variétés de miels de Corse sur des pathogènes connus pour poser problème en milieu hospitalier ou dans l'agroalimentaire. *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène extrêmement enclin à créer de nouvelles résistances se montre très sensible à l'action des miels de Châtaigneraie et des Miellats du Maquis. En effet, leur concentration minimale inhibitrice (CMI) varie entre 7% et 8%. Le peroxyde d'hydrogène semble être la molécule clé dans l'action antibactérienne. Sa concentration est plus élevée dans les miels actifs et semble engendrer une dégradation irréversible de l'ADN bactérien. Néanmoins les concentrations en H₂O₂ des miels de Corse sont faibles. De plus, on sait que sa combinaison avec les composés phénoliques peut renforcer l'action menée contre l'ADN. En effet, dans certaines conditions retrouvées dans les miels, le peroxyde d'hydrogène peut aider à l'auto-oxydation des polyphénols. Ces derniers vont alors devenir pro-oxydants et induire également une action contre l'ADN. Cette dégradation de l'information génétique microbienne est confirmée par l'observation de la structure bactérienne en microscopie électronique à balayage. En effet, à l'incubation de la souche avec les miels à leur CMI, aucun dommage sur l'enveloppe bactérienne n'est observé confirmant bien l'action en profondeur des miels. La deuxième partie de cette étude a été réalisée à partir des huiles essentielles. Ces dernières sont bien connues pour leurs divers modes d'action antimicrobiens de façon directe. Nous avons eu une approche différente, puisque nous avons recherché une éventuelle action indirecte. Pour ce faire, nous avons voulu voir si ces dernières ne pouvaient pas induire de perturbation au niveau du quorum sensing (QS), un mécanisme de communication bactérien responsable notamment de différentes formes de virulence. L'action de différentes huiles essentielles a été criblée *via* une souche rapporteur du QS, *Chromobacterium violaceum*. Sous l'influence du QS, cette dernière va produire un pigment antibiotique violet quantifiable, permettant ainsi la détermination de la concentration minimale d'inhibition du QS (CMIQS). Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence la forte action de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*. Les activités biologiques des huiles essentielles proviennent généralement de leurs composés majoritaires. Cela semble être le cas ici aussi puisque nous avons déterminé que la *cis-cis-p*-menthenolide (le second majoritaire, 27,3%) est responsable de la perturbation du QS. C'est cette dernière qui présente le ratio CMIQS/CMI le plus élevé de l'étude (64). De plus, cette action anti-QS semble se confirmer par l'étude de la formation du biofilm bactérien. En effet, la matrice du biofilm apparaît dégradée lors des observations effectuées en microscopie électronique à balayage. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche montre clairement le potentiel antibactérien des molécules issues des produits naturels de Corse. De plus, Cette action peut se faire de façon directe ou indirecte sur les bactéries offrant ainsi de multiples possibilités pour compléter un arsenal thérapeutique de plus en plus limité.

Mots clés : Antibactérien, huiles essentielles, quorum sensing, miels, mécanisme d'action