



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à
l'environnement « LAMAABE »

Mémoire

Présenté par

Mlle : Bendahmane Mayssa

Mlle : Oudghiri Sanaa

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie fondamentale

**L'évaluation de la Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* isolé à
partir des infections nosocomiales aux huiles essentielles de quelques
plantes médicinales**

Soutenu le : 30-6-2020

Devant le jury

Président :	M. BENDAHOU	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur :	M.S. Barka	Maitre de conférences A	U. de Tlemcen
Encadreur :	A. khadir	Maitre de conférences A	U. d'Oran.

Année Universitaire 2019-2020

Remerciements

En préambule nous remercions DIEU le tout puissant de nous avoir donné le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science, et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Ce travail a été effectué au laboratoire de microbiologie appliquée à L'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE) de l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

Nous voulons adresser tous nos remerciements aux personnes qui nous ont accompagné, aidé et soutenu tout au long de la réalisation de ce mémoire, en commençant par notre encadreur KHADIR ABDELMOUNAIM, maître de conférences A à l'université Oran 1 Ahmed Ben Bella, de nous avoir encouragé, orienté et conseillé. Et pour sa disponibilité, et l'aide précieuse qu'il nous a apporté chaque fois.

Nos sincères remerciements vont aussi à monsieur le professeur BENDAHOU MOURAD, chef d'équipe de substance naturelle antimicrobienne pour avoir accepté de présider le jury :

Un grand merci à monsieur BARKA MOHAMED SALIH pour avoir accepté d'examiner ce travail

Nous tenons à remercier aussi Mme HASSAINE HAFIDA directrice du laboratoire LAMAABE pour avoir facilité l'accès au laboratoire, et Monsieur REBIAHI responsable de formation.

On tient à remercier également Mme : ASMA et M : YASSINE BENZIANE de nous avoir donné les souches clinique et de leurs aides lors de la pratique.

Dédicace

D'un profond amour et d'une immense gratitude et reconnaissance,

Je dédie ce mémoire a :

Mes chers parents qui m'ont toujours poussés et motivés dans mes études, pour leurs amour, leurs patience et leurs présence.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, et le fruit de vos sacrifices

A mes précieuses sœurs je suis très reconnaissante pour leurs aides et leurs encouragements

A mes grands-parents, mon fiancé, ainsi que toute ma famille, je vous remercie pour votre soutient et votre confiance en moi

A Sanaa, j'avais l'honneur de travailler avec toi. Je te remercie pour l'énorme effort que tu as fait pour réussir ce travail

MAYSSA

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail tout d'abord à mon cher grand père
« SIDI » que dieu te garde et te protège.*

*À l'être le plus cher à mes yeux ma mère. Aucune dédicace ne
saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma
considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon
instruction et mon bonheur.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés,
J'aurais tant aimé que tu sois présente. Que Dieu ait ton âme dans
sa sainte miséricorde.*

*A mon père je t'exprime toute ma gratitude pour ton soutien tout
au long de mes études. Et je te remercie pour tout l'amour que tu
me porte.*

*A mes frères et sœurs : Zahra, Said, Housseem, Mohammed, Faiza,
Imad, Malek. En témoignage de mon affection fraternelle, de ma
profonde reconnaissance, que Dieu le tout puissant, vous protège et
vous garde.*

*À mes chers petits neveux, nièces et ma chère cousine **Faty**.*

*A mes amis Imene et Asma, j'ai souvent eu besoin de votre aide et
soutien et à chaque fois vous avez su répondre présentes. Vous êtes
toujours là pour moi dans les bons et mauvais moments de ma vie,
une présence chaleureuse, bienveillante. Merci beaucoup*

*A Mayssa, je te remercie pour ton dévouement et ta persévérance
ainsi que tes efforts et ton sérieux.*

TABLE DES MATIERE

Introduction.....	1
Chapitre 1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
I. Bactéries à gram négatifs.....	17
I.1 Infections nosocomiales.....	17
II. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
II.1 Description générale.....	17
II.2 Classification.....	19
II.3 Habitat.....	19
II.4 Caractéristiques morphologique.....	19
II.5 Caractéristiques biochimiques.....	20
II.6 Caractéristiques culturaux.....	20
II.7 Pouvoir pathogène.....	21
II.8 Colonisation.....	21
II.9 Facteurs de virulence.....	22
II.9.1 Facteurs de virulence de surface.....	22
a) Le Flagelle.....	22
b) Pili de type IV.....	22
c) Pili de type fimbriae ou (Cup).....	22
d) Lipopolysaccharide (LPS).....	22
II.9.2 Facteurs extra cellulaires.....	23
a) L'exotoxine A.....	23
b) L'élastase.....	23
c) La pyocyanine.....	24
d) La pyoverdine.....	24
II.9.3 Formation du biofilm.....	24

II.9.3.1 L'adhésion des bactéries.....	25
II.9.3.2 Maturation du biofilm.....	25
II.9.3.3 Détachement.....	25
III. Antibiotiques.....	26
III.1 Définition.....	26
III.2 Antibiotique bactériostatique ou bactéricide.....	27
III.3 Les classes d'antibiotiques.....	27
III.3.1 Les bêta-lactamines.....	27
III.3.2 Les aminosides.....	27
III.3.3 Les quinolones.....	28
III.3.4 Les polymixines.....	28
III.4 Mode d'action.....	28
III.5 La résistance aux antibiotiques.....	28
III.5.1 Types de résistance.....	29
III.5.1.1 La résistance intrinsèque (ou naturelle).....	29
III.5.1.2 la résistance acquise.....	29
III.6 La résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux différents antibiotiques.....	29
III.6.1 Les β -lactamines.....	29
III.6.1.1 La résistance enzymatique.....	30
III.6.1.2 La résistance non enzymatique.....	30
• Diminution de la perméabilité de la membrane.....	30
• Les pompes d'efflux.....	30
• Modification des cibles d'ATB.....	30

Chapitre 2 : Les huiles essentielles

I. Usage des plantes médicinales contre les maladies infectieuses.....	33
I.1 La phytothérapie.....	33

II. Les huiles essentielles.....	34
II.1 Définition.....	34
II.2 Composition chimique.....	35
II.3 Répartition.....	35
II.4 Propriétés.....	36
II.5 Les procédés d'extraction des huiles essentielles.....	36
II.5.1 Extraction par hydrodistillation.....	36
II.5.2 Autres systèmes d'extraction.....	38
II.6 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	38
II.6.1 Activité antibactérienne des huiles essentielles sur <i>P. aeruginosa</i>	39
III. <i>Cistus munbyi</i>	39
III.1 Classification scientifique.....	40
III.2 Composition chimique.....	41
IV. Clou de girofle.....	41
IV.1 Le giroflier.....	41
IV.2 Classification.....	42
IV.3 L'huile de Clou de girofle.....	42
IV.3.1 Composition chimique de l'huile de clou de girofle.....	42
IV.3.2 Caractéristiques de l'huile de clou de girofle.....	43
IV.3.3 L'activité de l'huile essentielle de clou de girofle contre <i>P. aeruginosa</i> ..	43
Chapitre 3 : Matériel et Méthodes	
I. Matériel.....	46
1. Matériels biologique.....	46
1.1 Les souches utilisées.....	46
1.2 Les plante utilisées.....	46
1.3 Milieux de culture liquides.....	47

1.4 Milieux de culture solides.....	47
1.5 Produits chimiques.....	47
1.6 Les antibiotiques en disque utilisés.....	47
II. Méthodes.....	47
1. Extraction des huiles essentielles.....	47
2. L'hydrodistillation.....	48
3. Préparation de la suspension bactérienne.....	49
4. Identification.....	49
4.1. Test oxydase.....	50
4.2. Test catalase.....	50
5. Coloration de Gram.....	51
5.1 Principe.....	51
6. L'antibiogramme.....	51
7. L'aromatogramme (Méthode de diffusion en milieu solide).....	53
8. Méthode de micro dilution sur milieu liquide.....	54
Chapitre 4 : Résultats et discussion	
1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites.....	58
2. L'antibiogramme.....	58
3. Aromatogramme.....	61
Conclusion.....	64
Références bibliographiques.....	66
Annexe.....	73

Liste d'abréviations

C° : degré Celsius

µl : microlitre

ATB : Antibiotique

BHIB : bouillon cœur cerveau

BN : bouillon nutritif

C. munbyi : *Cistus munbyi*

Cm : centimètre

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

D : densité

DO : densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

ETA : Exotoxine A

GN : gélose nutritive

H : heure

H₂O : eau

HE : huile essentielle

KDa : kilodalton

Kg : kilogramme

LAMAABE : Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et l'environnement

LPS: lipopolysaccharide

MAC: Mac conkey

MH: Mueller Hinton

ml : millilitre

mm : millimètre

nm : nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S : Souche

TSB : Bouillon Tryptone Soja

UFC : unité formant colonie

UV : Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vue au microscope électronique.....	18
Figure 2 : Photographie de boîtes de pétri montrant les différents types de mobilité de <i>P. aeruginosa</i> sauvage (noté WT).....	18
Figure 3 : Colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figure 4 : Facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Figure 5 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien.....	25
Figure 6 : Mode d'action des antibiotiques.....	28
Figure 7 : Appareil d'hydrodistillation des huiles essentielles (Clevenger)...	37
Figure 8 : La plante <i>Cistus munbyi</i> au moment de la fluorescence.....	40
Figure 9 : Le giroflier.....	42
Figure 10 : Clou de girofle.....	42
Figure 11 : Structures des principaux constituants de l'huile essentielle issue du clou de girofle.....	43
Figure 12 : Appareil d'hydrodistillation type Clevenger.....	49
Figure 13 : Les bacilles à Gram négatif de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à objectif 100X.....	51
Figure 14 : Le principe d'un test d'aromatogramme méthode de diffusion sur disque.....	54
Figure 15 : Schéma de préparations des dilutions d'HE.....	55
Figure 16 : Schéma représentatif de la méthode de microdilution par Microplaque 96 puits.....	56
Figure 17 : Zone d'inhibition de S 209 par les antibiotiques utilisés.....	59
Figure 18 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des ATB vis-à-vis de S209.....	60
Figure 19 : La zone d'inhibition d'HE de clou de girofle vis-à-vis de PAr...	62

Figure 20 : La zone d'inhibition d'HE de *Cistus munbyi* vis-à-vis de Psc.... 62

Figure 21 : Histogramme des diamètres (mm) d'aromatogramme de *P. aeruginosa*..... 63

Annexes :

Figure 22 : Structure du flagelle bactérien..... 80

Figure 23 : Structure du lyopolysaccharide..... 81

Figure 24 : Huile essentielle de clou de girofle extraite au laboratoire..... 81

Les étapes de la coloration de Gram..... 82

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques tests biochimiques sur <i>P. aeruginosa</i>	20
Tableau 2 : Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques.....	26
Tableau 3 : Antibiotiques bactériostatiques et bactéricides.....	27
Tableau 4 : Les différentes méthodes d'extraction d'huile des plantes.....	38
Tableau 5 : Les plantes utilisées pour l'extraction.....	47
Tableau 6 : Caractères organoleptiques des huiles essentielles.....	58
Tableau 7 : Diamètres (mm) de sensibilité de la souche S 209 aux antibiotiques...58	
Tableau 8 : Résultat des diamètres d'inhibition en (mm) des HE.....	61

Introduction :

Durant les dernières années, des milliers de personnes meurent avec des infections nosocomiales liées aux structures de soins incluant les hôpitaux, les cliniques, et tous lieux de soins, et aux dispositifs médicaux, ces infections se transmettant facilement dans les bureaux, les locaux publics, les écoles et constituent un danger potentiel pour la santé publique.

Plusieurs espèces de bactéries sont incriminées dans ce problème parmi lesquels « *Pseudomonas aeruginosa* » c'est un bacille à Gram négatif opportuniste, retrouvé dans la plupart des niches écologiques, considéré longtemps comme un organisme pathogène responsable d'infections chez les patients immunodéprimés ou affaiblis, les brûlés et les cancéreux ayant subi une chimiothérapie ainsi que dans le cadre de la mucoviscidose en occupant le 1er rang des bactéries responsables d'infections respiratoires.

Les pneumopathies nosocomiales sont particulièrement élevées dans les services de réanimation, dans l'enquête nationale de prévalence de 2001, leur fréquence atteint 11% de l'ensemble des infections nosocomiales.

Depuis la brillante découverte de la pénicilline par Fleming en 1928, les antibiotiques sont toujours utilisés comme traitement pour les épidémies infectieuses mais leur usage abusif les rend inefficace.

P. aeruginosa a toujours été considéré comme une cible difficile, qui développe plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques, et se manifeste par un pouvoir d'adaptation qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus, ce qui a laissé les scientifiques pensés à multiplier les recherches de nouveaux remèdes à partir de produits naturels en l'occurrence d'origine végétale, qui vont permettre probablement à enrichir la liste des antibiotiques actifs et réduire les taux des résistances, en tirant profit de la richesse des huiles essentielles et des épices méditerranéennes.

Les extraits de plantes médicinales telles que les huiles essentielles ont été utilisées depuis longtemps et constituent une source inépuisable de molécules à propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, ou fongiques

Introduction

comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes en limitant la propagation des germes microbiens, et aussi elles ont des actions remarquables contre le biofilm.

L'objectif de ce travail est l'étude de l'effet antimicrobien de certaines huiles qui ont des activités intéressantes sur des souches de *P. aeruginosa* comme l'HE de clou de girofle qui va être testée sur des souches isolées d'infections urinaires dont certaines sont résistantes aux antibiotiques, nous allons également tester l'HE d'une plante endémique *Cistus munbyi* et comparer son effet à l'HE citée précédemment.

***CHAPITRE 1 : PSEUDOMONAS
AERUGINOSA***

I : Bactéries à gram négatifs :

Les bactéries à gram négatif représentent un groupe bactérien hétérogène, sont mises en évidence par une technique de coloration appelée coloration de gram, classées selon la couleur qu'elles prennent au microscope. Les Gram négatives se colorent en rose tandis que les Gram positifs se colorent en violet, et cela dépend de la structure de la paroi. (Amils, 2014).

La majorité de ces bactéries sont de forme bâtonnet et comprend les entérobactéries et d'autres genres non fermentaire comme *Pseudomonas*, ils sont enfermés dans une capsule protectrice et possèdent une membrane externe qui les protège contre certains antibiotiques. (Tuwairqi, 2016).

P. aeruginosa est la cause principale d'infections nosocomiales et constitue la troisième cause d'Infections urinaires dans le monde après *E.coli* et *S.aureus*. (Denis et al., 2016).

I.1 : Infections nosocomiales :

On appelle une infection nosocomiale toute maladie due à un microorganisme, contractée après 48 heures au cours ou au décours d'une hospitalisation par un patient, elle est donc absente au moment de l'admission du patient dans l'établissement. (Kakupa et al., 2016).

On enregistre chaque année en France 750 000 infections nosocomiales contractées pendant ou à la suite d'une hospitalisation.

Selon les résultats d'une enquête nationale de prévalence de ces infections nosocomiales conduite par l'Institut de veille sanitaire, la part de ces infections causées par la bactérie *P. aeruginosa* est supérieure à 8 %. (Poole, 2001)

II. *Pseudomonas aeruginosa* :

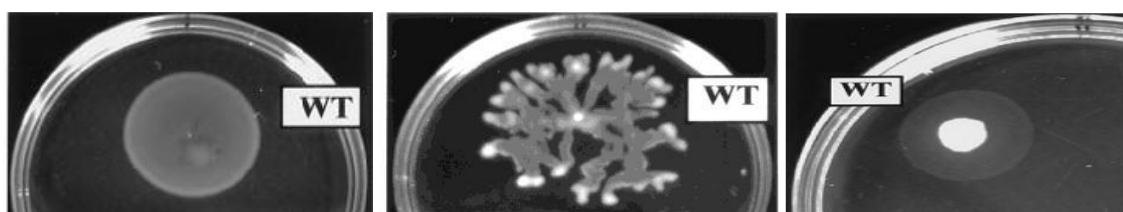
II.1 : Description générale : *P. aeruginosa* fut découverte par Carle GESSARD (1850-1925), un jeune pharmacien parisien suivait ses recherches sur les bacilles pathogènes et qui lui a donné le nom de bacille pyocyanique par rapport à sa morphologie (bâtonnets) et de sa capacité à produire des pigments de couleur bleue-verte (la pyocyanine et la pyoverdine). (Lyczak et al., 2000).

Cette bactérie fut l'agent responsable des surinfections des plaies au cours de la 1^{ère} guerre mondiale, les soldats montrèrent de pus bleu au niveau de leurs plaies.

Etymologiquement, le mot issu du grec pseudo (=simili ou imitation) et monas (=unité) désignait les germes du début de la microbiologie. Le mot aeruginosa, qui signifie, en latin, vert de gris, fait référence au pigment produit par la bactérie et qui donne à la colonie sa couleur caractéristique. (Boudouda, 2015).



Figure 1 : *Pseudomonas aeruginosa* vue au microscope électronique (kamer, 2013)



Swimming (0.3 agar)

Swarming (0.5 agar)

twitching (0.3 agar)

Figure 2 : Photographie de boîtes de pétri montrant les différents types de mobilité de *P. aeruginosa* sauvage (noté WT), d'après (Rashid et al., 2000)

Comme illustré par ce cliché de microscopie (**Figure 2**). *P. aeruginosa* est mobile à la fois en milieu liquide, grâce à son unique flagelle polaire qui lui permet de nager (swimming), et en milieu semi-solides par « swarming », elle peut également se déplacer dans des milieux solides, grâce aux pili qui lui permettent de se déplacer par glissement (twitching).

P. aeruginosa est un bacille aérobie stricte, mésophiles, chimio-organotrophes, non fermentaire, ces exigences nutritives modestes lui permettent de survivre et de se multiplier sur des surfaces humides (**Husson et al., 1994**).

II.2 : Classification : (Chaker, 2012)

Règne	Bacteria
Embranchement	Prokaryota
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonales
Famille	Pseudomonaceae
Genre	Pseudomonas
Espèce	Aeruginosa

II.3 : Habitat :

Chez l'humain : ces bactéries rencontrées au niveau intestinal, constituent pour la plupart, une flore commensale, et peuvent survivre et se multiplier dans l'appareil respiratoire, le tractus urinaire ou certaines plaies cutanées. (**Minchella et al., 2010**)

Environnement : Cette espèce ubiquiste peut croître dans les eaux de rivières, eaux usées, les toilettes, les piscines insuffisamment traitées par le chlore,

Matériel hospitalier : (sonde, cathéters...), (matériel de prothèse), solutions antiseptiques périmées ou inactivées. (**Yashavantha, 2013**)

Végétaux : légumes frais, salade, fruits.

II.4 : Caractéristiques morphologique :

C'est un bacille droit ou légèrement incurvé, en forme de bâtonnet, aux extrémités arrondies de 0.5 à 0.8µm de diamètre sur 1 à 3µm de long, mobile grâce à une flagelle polaire généralement unique, ciliature monotriche, dépourvu de spores et de capsules, et n'exige aucun facteur de croissance. (**Hafiane et Ravaoarino, 2008**) (**Garnacho, 2012**)

II.5: Caractéristiques biochimiques :

Pseudomonas n'est pas capable de fermenter le glucose, mais il a la capacité de dégrader des composés complexes, tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose. Les bactéries appartenant à ce genre sont caractérisées par un métabolisme oxydatif. **(Boudouda, 2015)**

Pseudomonas est capable d'utiliser de nombreux substrats carbonés comme seule source de carbone et d'énergie : (glucose, acide lactique, acide acétique, citrate...).

La réalisation d'un test d'assimilation des substrats carbonés est utile pour reconnaître l'espèce et différencier les biotypes, voici un tableau qui montre quelques tests :

Tableau 1 : Quelques tests biochimiques sur *P. aeruginosa*

Catalase / oxydase	Positive
Nitrate réductase	Positive
Indole	Négative

II -6 : Caractéristiques culturaux :

P. aeruginosa pousse sur de nombreux milieux solides, et peut se croître sur des milieux non enrichis. **(Paterson et Kim, 2009)**. Elle est donc très versatile, Sa température optimale de croissance est de 37°C mais elle peut se développer entre 25 et 42°C, et dans une gamme de pH entre 6 et 9. **(Rahman et al., 2005)**.

Lors de la respiration, elle utilise préférentiellement l'oxygène, mais dans des environnements dépourvus d'oxygène elle utilise les nitrates **(Vasil, 1986)**.

Les 2 milieux d'identifications de *P. aeruginosa* sont *King A et King B*, qui facilite la production fréquente d'une molécule aromatique (*o*-aminoacetophenone) ayant une odeur caractéristique d'acacia, et il y a aussi le milieu cétrimide qui assure la sélectivité grâce à la présence d'ammonium quaternaire. **(Denis et al., 2016)**



Figure 3 : colonies de *Pseudomonas aeruginosa*

II.7 : Pouvoir pathogène :

P. aeruginosa est un germe doté de multiples facteurs de virulence qui sont soit directement associés à la cellule (flagelle, pili...) soit excrétés dans le milieu extracellulaire (exotoxines, exo-protéase, hémolysines...) (Nicas et Iglewski, 1985), et l'une de ses capacités originales est la sécrétion d'un biofilm d'alginate, le rendant peu accessible aux défenses immunitaires et aux antibiotiques.

Cette bactérie est impliquée dans des pathologies multiples : infections respiratoires au cours de la mucoviscidose, pneumopathies nosocomiales en réanimation, infections urinaires... (Mital et al., 2008)

Les infections à *P. aeruginosa* peuvent être aiguës ou chroniques. Le type d'infection est indépendant du génotype de l'agent pathogène, mais peut-être lié à l'état de santé de l'hôte et au mode de vie adopté. (Valentini et al., 2018).

II.8 : Colonisation :

La colonisation de l'hôte par un agent pathogène et sa capacité à modifier sa réponse est un phénomène important menant à une infection réussie avec la destruction des tissus de l'hôte par inflammation (Mayaud, 2007), en impliquant plusieurs facteurs, et elle a la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales (colonisation initiale) puis de s'organiser en structures complexes évoluant de simples micro-colonies à des macro-colonies dans un biofilm structuré favorisant la colonisation chronique. (Kumar et al., 2009).

II.9 : Facteurs de virulence :

II.9.1 : Facteurs de virulence de surface :

a) **Le Flagelle** : Le flagelle de *P. aeruginosa* est nécessaire à la motilité de la nage, mais joue également un rôle crucial dans la dispersion du biofilm et l'adhésion à la surface des cellules hôtes au cours de l'infection, la flagelline, le principal composant structurel du flagelle, est reconnue par le récepteur Toll-like 5 à la surface des cellules hôtes. (Anis et al., 2011)

b) **Pili de type IV** : Sont des organelles filamenteuses longues, présentes sur la surface de *P. aeruginosa* et *Neisseria meningitidis*. Il est également le principal acteur de l'adhésion avec les cellules épithéliales, puisqu'il interagit avec des récepteurs de ces cellules (les glycolipides asialo-GM1 et GM2) (Sheth et al, 1994 ; Gupta et al, 1994). L'adhérence des bactéries médiées par le pilus est plus importante sur des cellules épithéliales pulmonaires possédant la mutation responsable de la mucoviscidose que sur des cellules épithéliales normales (Sophie et al., 1996).

Les bactéries sont capables de se déplacer à des interfaces solides/liquides grâce aux Pili de type IV. Cet appendice a donc un rôle dans l'invasion de l'hôte (Sato et al., 1988).

c) **Pili de type fimbriae ou (Cup)** : Récemment, d'autres structures superficielles chez *P. aeruginosa* ont été mises en évidence, à l'exemple des pili de type fimbriae qui permettent à la bactérie de s'ancrer à des récepteurs cellulaires pendant la phase de colonisation et de développer des communautés multicellulaires appelées biofilms.

Chez cette bactérie trois systèmes Cup appelés *CupA*, *CupB* et *CupC* ont été identifiés, Chacune de ces copies serait activée pendant une seule étape de l'infection ou bien dans un environnement spécifique (chez un seul hôte ou dans un seul foyer infectieux) (Mikkelsen et al, 2009 ; Bricha, 2009 ; Vallet et al, 2001).(Sophie et Patrick, 2011)

d) **Lipopolysaccharide (LPS)** :Les LPS, présents à la surface de la membrane externe des bactéries à gram négatif sont d'une part, connu pour leur rôles protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et d'autre part, pour leur activité endotoxique (Rochetta, 1999), ils ont un rôle dans la réponse immunitaire de l'hôte et conduisent à l'apparition de symptômes tels que la fièvre, l'hypotension...(Gibson et al, 2003 ; Pier, 2007).

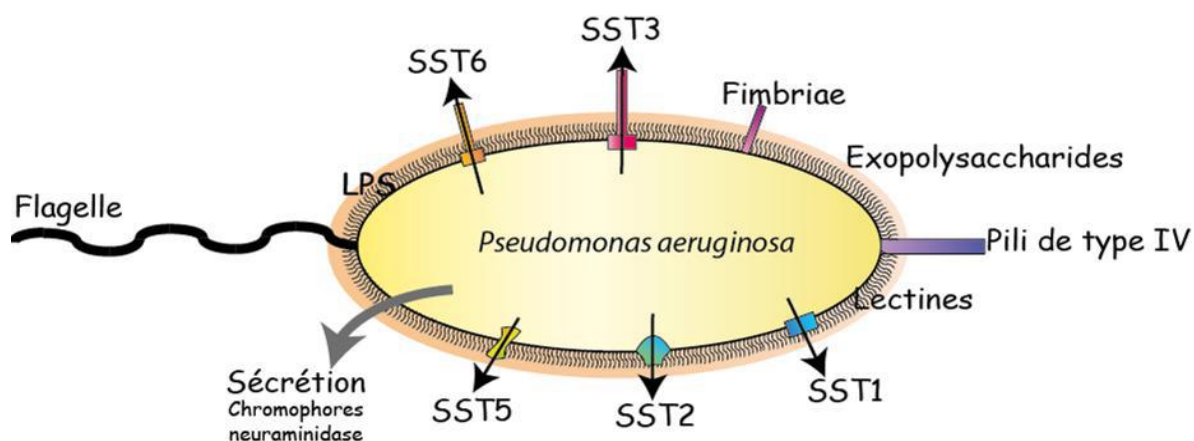


Figure 4 : Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* (Van et al., 1998)

II.9.2 : Facteurs extra cellulaires :

La production d'un grand nombre des facteurs de virulence extracellulaires est contrôlée par un système quorum-sensing. (Mayaud, 2007)

a) L'exotoxine A :

ETA est le composé protéique le plus toxique produit par *P. aeruginosa*, est une enzyme ADP-ribosylation puissante qui pénètre dans les cellules eucaryotes par endocytose médiée par des récepteurs, elle est sécrétée sous la forme d'une pro-toxine inactive comme la toxine diphtérique.

L'ETA est composée de deux domaines : le domaine A (26 kDa) qui possède l'activité mono-ADP-ribosyltransférase et le domaine B (45 kDa) qui interagit spécifiquement avec le récepteur présent à la surface de la cellule hôte cela inhibe les protéines et provoque la mort de la cellule cible par nécrose (Anis et al., 2011)

b) L'élastase :

L'élastase (également nommée protéase LasB ou pseudolysine) est une métallo-protéase à zinc qui nécessite des ions calcium pour sa stabilité et qui a une activité protéolytique très importante (Fiordiligie, 2016), ils déséquilibrent l'intégrité de la barrière épithéliale en perturbant les jonctions serrées des cellules épithéliales, et inactive des constituants majeurs de la matrice de l'épithélium pulmonaire comme l'élastine, le collagène et la fibrine. Son activité est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB, qui agissent en synergie.

LasA dégrade l'élastine, et la rend ainsi plus accessible à l'action d'autres protéases comme LasB. (Anis et al., 2011), LasB a un pouvoir envahissant chez les patients présentant des plaies par brûlure, (Haripriyan et al., 2018).

c) La pyocyanine :

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie, qui donne une couleur bleu-vert aux colonies bactériennes qui est impliquée dans la virulence, elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte. (Sadikot et al., 2009)

La pyocyanine, perturbe l'épithélium bronchique et altère la fonction ciliaire, interfère également avec les défenses anti-oxydantes et anti-inflammatoires du poumon et facilite les dommages oxydatifs à l'épithélium pulmonaire en inhibant l'activité de la catalase, entraînant une nécrose du tissu respiratoire. (Sophie et Patrick, 2011)

d) La pyoverdine :

La pyoverdine est un sidérophore d'une couleur jaune-vert et fluorescente, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme, nécessaire au métabolisme de *P. aeruginosa*, elle joue un rôle régulateur dans la sécrétion de certains facteurs de virulence (exotoxine A, les protéases) ainsi que sa propre sécrétion (tableau 2). (David et al., 2018).

Son rôle principal, agir comme un sidérophore en collectant le fer produit par *P. aeruginosa*, bien que le fer soit important pour la virulence.

La pyoverdine chargée de fer est transportée dans le milieu extérieur via le récepteur membranaire *FpvA*. (Mirella et al., 2009)

II.9.3 : Formation du biofilm :

Le biofilm bactérien correspond à l'agrégation des bactéries sur une surface naturelle ou synthétique, c'est une communauté d'organismes enveloppée dans une matrice extracellulaire. (Characklis, 1981).

C'est un mode de vie privilégié des bactéries où elles peuvent communiquer grâce à un système de communication intra et inter espèce, qui répond au nom de *quorum sensing* (Li et Tian, 2012) et lui confère plusieurs caractéristiques importantes, dont une augmentation importante de la résistance aux antibiotiques, la stabilité, la protection contre les facteurs environnementaux tels que la salinité, l'exposition aux rayons UV, la phagocytose et par conséquent sont difficiles à éradiquer. (Mah et O'Toole, 2001)

(Espinasse et Cottard, 2010)

II.9.3.1 : L'adhésion des bactéries :

L'adsorption des bactéries ou l'adhésion réversible sur le support constitue la première étape de formation du biofilm, l'adhésion est d'abord réversible, les bactéries établissent des interactions faibles de type Van der Waals et électrostatiques avec la surface conditionnée, puis irréversible avec des liaisons covalentes (**Haras, 2005**).

II.9.3.2 : Maturation du biofilm :

Une fois les bactéries adhérentes de manière irréversible, elles se multiplient et se prolifèrent aboutissant à la formation de micro-colonies qui recouvrent tout ou une partie de la surface. Cette étape peut être atteinte sous 24 heures selon les cas et peut durer jusqu'à dix jours en fonction des souches (**Heydorn et al., 2000**).

C'est également au cours de la maturation que la bactérie développe la résistance aux antibiotiques et la production d'alginate. (**Anwar et al., 1992**).

II.9.3.3 : Détachement :

Finalement la dispersion des cellules de la surface induit par le vieillissement du biofilm, certains stress ou carences, Ces micro-organismes retournent à l'état dit « planctonique » de libre circulation et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces. (**Haras, 2005**).

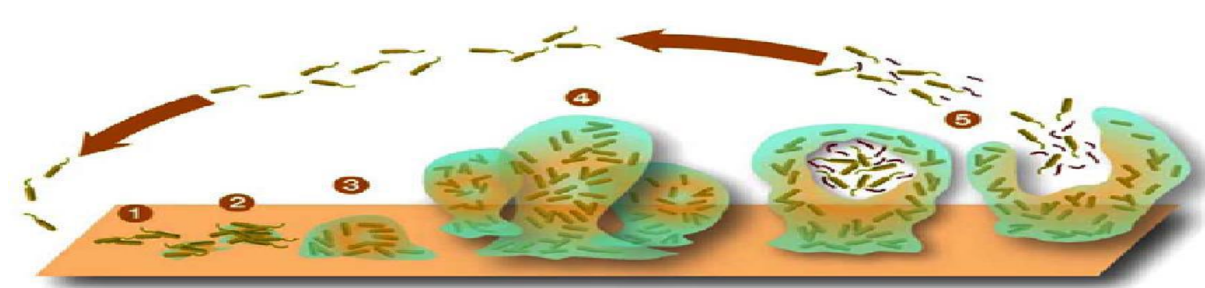


Figure 5 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Stoodley et al., 2002).

Tableau 2 : Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques. (khalifa et al., 2011)

Lipopolysaccharide Lps	Stimulation de la production de cytokines choc	Choc
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire
Flagelle	Adhésion aux mucines Mobilité	Diffusion bactérienne
Alginate	Inhibition de la phagocytose, et l'action des antibiotiques et au système immunitaire	-Pathogénicité respiratoire -Résistance aux défenses de l'hôte
Exotoxine A	Inhibition de la synthèse protéique des cellules cibles	-Mort cellulaire -Nécrose tissulaire
Élastase (Las A+ Las B)	Dégradation de l'élastine, la fibrine et le collagène	-Destruction des tissus - contenant l'élastine -Rôle important dans la virulence
Pyoverdine + Pyocyanine	-Augmentation de la libération d'élastase -Captage du fer	Rôle dans la survenue de vascularité d'artères pulmonaires

III. Antibiotiques :

III.1 : Définition :

Découvert en 1928 par Alexander Fleming. **WAKSMAN** a défini les antibiotiques comme " toutes substances chimiques produites par les micro-organismes capables d'inhiber la prolifération des bactéries ou les détruire, ils peuvent être distingués sur la base du type d'activité qu'ils exercent : Un antibiotique bactériostatique arrête la

croissance des bactéries, un antibiotique bactéricide tue les bactéries à des doses très faibles.

Les antibiotiques sont utilisés comme outil thérapeutique à titre curatif ou aussi comme facteur de croissance afin d'améliorer la productivité des élevages. (**Mohamed et al., 2001**).

III.2 : Antibiotique bactériostatique ou bactéricide :

La distinction entre les deux types d'activité d'antibiotiques peut se faire en comparant in vitro la CMI et la CMB, un antibiotique peut être considéré comme bactéricide lorsque sa CMB est sensiblement égale à sa CMI, un antibiotique dont la CMB est très supérieur à la CMI, de telle sorte que sa concentration au site d'infection in vivo ne permet pas d'atteindre la valeur de la CMB, sera considéré comme bactériostatique. (**Ouarda et al., 2019**)

Tableau 3: antibiotiques bactériostatiques et bactéricides

Antibiotiques bactériostatiques	Antibiotiques bactéricides
Macrolide	beta lactamine
Sulfamide	Fluoroquinolone
Tetracycline	Polymixine

III.3 : Les classes d'antibiotiques :

Il existe plusieurs classes d'antibiotiques en usage actuellement, ceux appartenant à la même classe ont en général, la même cible dans la cellule et par là le même mode d'action. Ils sont donc soumis aux mêmes mécanismes de résistance. (**Patrice, 2008**)

III.3.1 : Les bêta-lactamines avec un large spectre d'action (comme la pénicilline) inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine) au cours de la multiplication cellulaire.

III.3.2 : Les aminosides (comme la gentamycine) interfèrent avec le ribosome, entraînent l'arrêt de la biosynthèse des protéines en empêchant la traduction de l'ARN messager (**Hermann, 2005**) ou en bloquant la formation des liaisons peptidiques et l'élongation de la chaîne (**Flandrois et al., 1997**).

III.3.3 : les quinolones leur cible est l'ADN ,ce sont des antibiotiques synthétiques empêchent la réplication de l'ADN bactérien en bloquant l'ADN gyrase et le topoisomérase responsable du surenroulement et déroulement de l'ADN.

III.3.4 : Les polymyxines certains antibiotiques ont pour cible la membrane plasmique, ils désorganisent sa structure et son fonctionnement, ce qui produit de grave troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur ». (Taha Ahmed, 2012)

III.4 : Mode d'action :

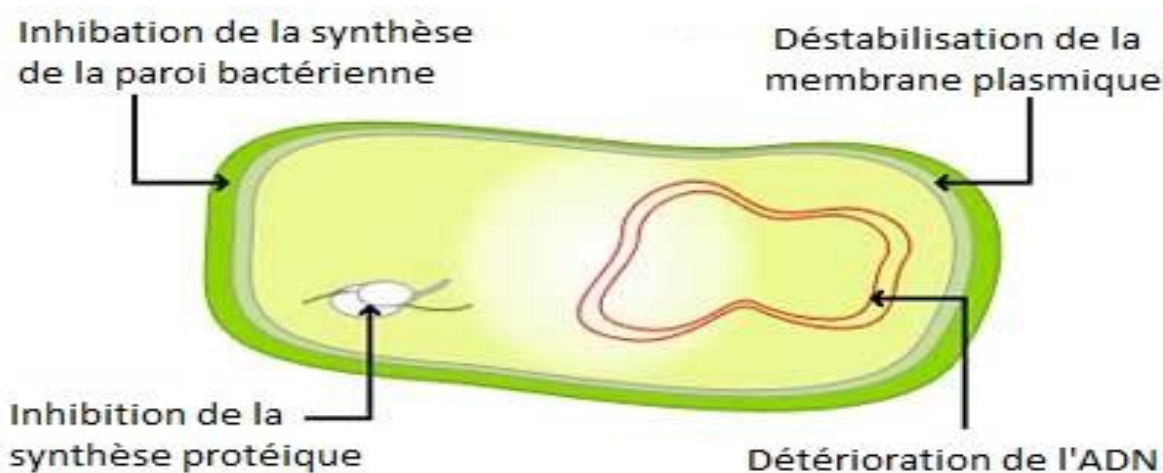


Figure 6 : mode d'action des antibiotiques (Michel et al., 2010)

III.5 : La résistance aux antibiotiques :

Les conséquences de la résistance bactérienne aux antibiotiques sont considérables : augmentation de la morbidité et dans certains cas, de la mortalité, augmentation des coûts du système de santé (Karl, 2002).

La résistance microbiologique se traduit par la croissance ou l'absence de croissance d'une souche bactérienne en présence d'un antibiotique, de nombreuses bactéries sont intrinsèquement résistantes comme *Pseudomonas* à l'ampicilline, et cette résistance est habituellement stable, et peu transmissible à d'autres espèces.(Karl, 2002).

III.5.1 : Types de résistance :

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques :

III.5.1.1 : La résistance intrinsèque (ou naturelle) :

Présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien, programmée au niveau du génome dû essentiellement à la présence de gènes. **(Doyle et al., 2013). (Davies, 2010)**

P. aeruginosa présente une résistance naturelle aux antibiotiques, elle est conférée par la faible perméabilité de sa membrane externe, l'expression constitutive de mécanismes d'efflux et la production d'enzymes inactivant les antibiotiques. **(Marie, 2011)**

III.5.1.2 : la résistance acquise :

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau de certaines souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. **(Patrice, 2007)**

Elle est due à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles ou acquises, ce processus attribue aux bactéries un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent. **(Springman et al., 2009)**

III.6 : La résistance de *P. aeruginosa* aux différents antibiotiques :

III.6.1 : Les β -lactamines :

Sont parmi les antibiotiques les plus couramment utilisés en médecine humaine. Ils doivent ce fait à leur bonne efficacité antibactérienne, à leur excellente tolérance et à leur grande variabilité pour surmonter les facteurs de résistance bactérienne. **(Jurgan, 1993)** pour *P. aeruginosa* les cibles sont des enzymes appelées protéines liant la pénicilline (PLP) présentes sur la membrane cytoplasmique, qui permettent l'assemblage des chaînes peptidiques **(Helene et al., 2013)**, elles ne peuvent être atteintes qu'après franchissement de la membrane externe après avoir traversé la couche externe polysaccharidique, leur diffusion se fait par l'intermédiaire de canaux protéiques (les porines). **(Guglielmo et al., 2006)**

III.6.1.1 : La résistance enzymatique :

P. aeruginosa résiste par différents mécanismes, notamment la production d'enzymes (**Drawz et Bonomo, 2010**) appelées β -lactamases qui hydrolysent la liaison amide du cycle Beta-lactame des bêta-lactamines pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. L'hydrolyse irréversible du noyau bêta-lactame entraîne alors l'inactivation de l'antibiotique et la perte totale de son activité antibactérienne. (**Van et al., 2010**).

III.6.1.2 : La résistance non enzymatique :

Chez les Gram -, la diffusion est bien plus compliquée : la membrane externe est composée de phospholipide et de LPS rendant impossible le passage des produits hydrophiles. A noter que souvent il y a présence de porines, canaux permettant quand même le passage de certain produit y compris des antibiotiques. C'est le cas des β -lactamines et des aminosides par exemple. (**Hiroshi et Marti, 1985**).

Il existe trois mécanismes de base par lesquels les organismes résistent à l'action des agents antimicrobiens :

Diminution de la perméabilité de la membrane : La membrane externe de *P. aeruginosa* présente une importante barrière à la pénétration des antibiotiques, limitant le taux de pénétration de petites molécules hydrophiles qui se fait par l'intermédiaire de canaux protéiques et porines et excluant les plus grosses molécules. (**Poole, 2001**)

Les pompes d'efflux : sont formés de l'association de trois protéines, les systèmes d'efflux Mex (Multiple efflux) se distinguent des autres mécanismes de résistance par leur poly spécificité, c'est-à-dire leur capacité à transporter des molécules ayant des structures chimiques très différentes les unes des autres, et les deux systèmes majeurs, MexAB-OprM et MexXY(OprM), peuvent entraîner une résistance significative aux β -lactamines ainsi qu'aux aminosides, aux (fluoro) quinolones... (**Katy et al., 2016**).

Modification des cibles d'ATB : ce mécanisme implique la modification des cibles cellulaires des β -lactamines par la surproduction de certains PLP, qui va réduire l'affinité pour les antibiotiques et confère aux bactéries une résistance sélective aux β -lactamines.

CHAPITRE 2 : LES HUILES ESSENTIELLES

I : Usage des plantes médicinales contre les maladies infectieuses :

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et sont considérées comme une ressource importante dans divers domaines. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de médicaments pharmacologiques antimicrobiens et en tant que source de composés naturels agissant comme agents anti-infectieux **(Dubey et Sao, 2018)**.

Selon l'O.M.S 60% des maladies actuelles seraient dues aux médicaments synthétiques. Cela a entraîné une prise de conscience et un retour à la phytothérapie. **(Ncube et al., 2008)**.

I.1 : La phytothérapie :

La phytothérapie vient du grec et signifie « soigner par les plantes ». Elle repose en partie sur une pratique traditionnelle consiste principalement à utiliser des plantes médicinales pour prévenir ou guérir des maladies ou pour améliorer les conditions de santé. **(Wichtl et Anton, 2003)**.

Le premier texte connu sur la médecine en Chine ,en Inde et en Égypte par les plantes est gravé sur une tablette d'argile, rédigé par les sumériens, ils utilisaient des plantes telles le myrte, le chanvre, le thym, le saule en décoctions filtrées.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 80% des populations africaines ont recours à la médecine et à la pharmacopée.

Le continent africain regorge de plantes médicinales très diversifiées. En effet, sur les 300.000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200.000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique et ont des vertus médicinales **(Sofowora, 1993)**.

La phytothérapie est très répandue dans la société algérienne, et on utilise de nombreuses plantes et leurs extraits, la famille des labiées a été connue depuis longtemps, caractérisée comme l'une des plus répandues dans le bassin méditerranéen et spécialement en Algérie et comprenant plusieurs espèces utilisées en médecine traditionnelle comme l'origan (Zaàtar) et le thym (Zaiitra). **(Amel, 2016)**.

II : Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles « HE » sont des extraits naturels de plantes aromatiques d'une extraordinaire efficacité, leurs propriétés antibactériennes aient été reconnu depuis longtemps, l'intérêt récent pour les antimicrobiens alternatifs d'origine naturelle a conduit à un regain d'intérêt scientifique pour ces substances. Ainsi, les combinaisons d'extraits de plantes peuvent répondre à des besoins ciblés comme, par exemple, le renforcement des défenses immunitaires, la relaxation, la stimulation, le soulagement de douleurs articulaires et musculaires.

En outre, ces combinaisons peuvent également contrôler certaines bactéries connues pour leur résistance élevée et constante aux antimicrobiens végétaux, comme les *Pseudomonas*. (**Hammer et al, 1999 ; Holley et Patel, 2005**).

II.1 : Définition :

Le terme "huile essentielle" dérive du nom inventé au 16ème siècle par le réformateur suisse de la médecine, Paracelsus von Hohenheim. (**Guenther, 2005**).

Les huiles essentielles sont des liquides huileux aromatiques et volatils obtenus à partir de matières végétales, elles sont normalement formées dans des cellules ou groupes de cellules spéciales, que l'on trouve dans (les feuilles, fleurs, bourgeons, graines, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines et qui sont généralement concentrées dans une région particulière comme les feuilles, l'écorce ou les fruits (**Oussalah et al., 2006**).

Les huiles essentielles (également appelées huiles volatiles ou étherées peuvent être obtenus par extraction, fermentation ou enfleurage, mais la méthode de distillation à la vapeur d'eau est la plus couramment utilisée pour la production commerciale d'HE. (**Burt, 2004**).

Les espèces productrices d'huiles essentielles ne sont pas limitées à un groupe taxonomique spécifique, mais sont plutôt largement présentes dans le règne végétal.

La production d'huiles essentielles dépend de l'état métabolique et du programme de différenciation préétabli du tissu de synthèse, mais elle est également fortement intégrée à la physiologie de la plante entière. En outre, la productivité de l'huile est favorable aux facteurs écophysiologicals, environnementaux et autres. (**Sangwan et al ., 2001**).

Les HE sont des gouttelettes très parfumées que l'on trouve en quantités infimes dans les fleurs, les tiges, les feuilles, les racines et les écorces des plantes aromatiques, ce ne sont pas de véritables huiles à la manière des huiles végétales lubrifiantes, mais elles sont très fluides et exceptionnellement volatiles.

II.2 : Composition chimique :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et volatils de 20-60 différentes molécules organiques : terpènes, alcools, esters, aldéhydes, cétones et les phénols, et comprennent principalement des terpénoïdes et des phénylpropènes. **(Bakkali et al., 2008).**

Elles sont généralement fabriquées à partir d'un ou de plusieurs constituants prédominants au sein d'une huile essentielle ; le menthol, par exemple, remplace souvent la menthe et l'eucalyptol pour l'eucalyptus. **(Huang et al., 2015).**

La composition chimique des HE varie encore de façon appréciable avec le milieu et la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation. **(Mundina et al, 2001 ;Azevedo et al, 2001).**

En général, les terpénoïdes sont un constituant essentiel des huiles essentielles des plantes, sont des hydrocarbures classés par le nombre d'unités d'isoprène (C₅H₈), les plus courants étant les monoterpènes, biosynthétisés dans les plastes, et les sesquiterpènes : (15-carbone) sont synthétisés dans le cytosol, mais beaucoup de ces huiles sont également composées d'autres produits chimiques comme les phénylpropanoïdes.

II.3 : Répartition :

Les HE n'ont pas une présence générale chez les végétaux **(Bruneton, 1999 ; Benayad, 2008 ; Degryse et al., 2008).**

Elle peut être biosynthétisés et stockés dans différents organes de la plante tels que :

Les fleurs (oranger, rose, lavande, le bouton floral (girofle).

Les feuilles (eucalyptus, menthe, thym, laurier, sauge, aiguilles de pin et sapin).

Les racines (vétiver), rhizomes (gingembre), les fruits (anis, fenouil, badiane), le bois et les écorces (cannelle, santal, bois de rose.) et les graines (noix de muscade, coriandre) **(Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005).**

II.4 : Propriétés :

Généralement on trouve les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire, peu solubles dans l'eau et plus ou moins solubles dans l'alcool et dans la plupart des solvants organiques. **(Bruneton, 2008).**

Les huiles essentielles s'oxydent à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène en même temps que leur odeur se modifie.

À température ambiante, les huiles essentielles sont liquides et volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Leur coloration varie de l'incolore au brun clair.

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0,850 à 0,950 sauf pour les huiles essentielles de cannelle, girofle et sassafras. **(Yap et Lim, 2014)**

II.5 : Les procédés d'extraction des huiles essentielles :

Les plantes sont des ressources inestimables, utiles dans la médecine. Cette utilisation des plantes à une longue histoire dans le monde entier, et au fil des siècles, l'humanité a développé de meilleures méthodes pour l'extraction des huiles essentielles de ces matières. **(Marie et al., 2004).**

Avant que ces substances puissent être analysées, elles doivent être extraites de la matrice. Différentes méthodes peuvent être utilisées : l'extraction par solvant organique volatil, l'extraction à l'eau surchauffée, par ultrasons, par micro-ondes, par l'entraînement à la vapeur d'eau et par l'hydrodistillation. Cette dernière est la plus employée à l'échelle industrielle pour la production des HE. **(Wang et Li, 2008).**

II.5.1 : Extraction par hydrodistillation :

La méthode la plus simple et anciennement utilisée pour la détermination de la teneur en huile essentielle, l'hydrodistillation. **(Jana et Ingo, 2007).**

Elle a été effectuée dans un appareil circulaire de type Clevenger (capacité de 2 litres) et l'extraction a été arrêtée après s'être assurée qu'il n'y avait plus d'huile essentielle **(Majda et al., 2019).**

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène.

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont

contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. **(Bakkali et Idaomar, 2008)**.

Cette méthode protège dans une certaine mesure les huiles ainsi extraites, car l'eau environnante agit comme une barrière pour les empêcher de surchauffer **(Helena et Slavcho, 2006)**

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter.

La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

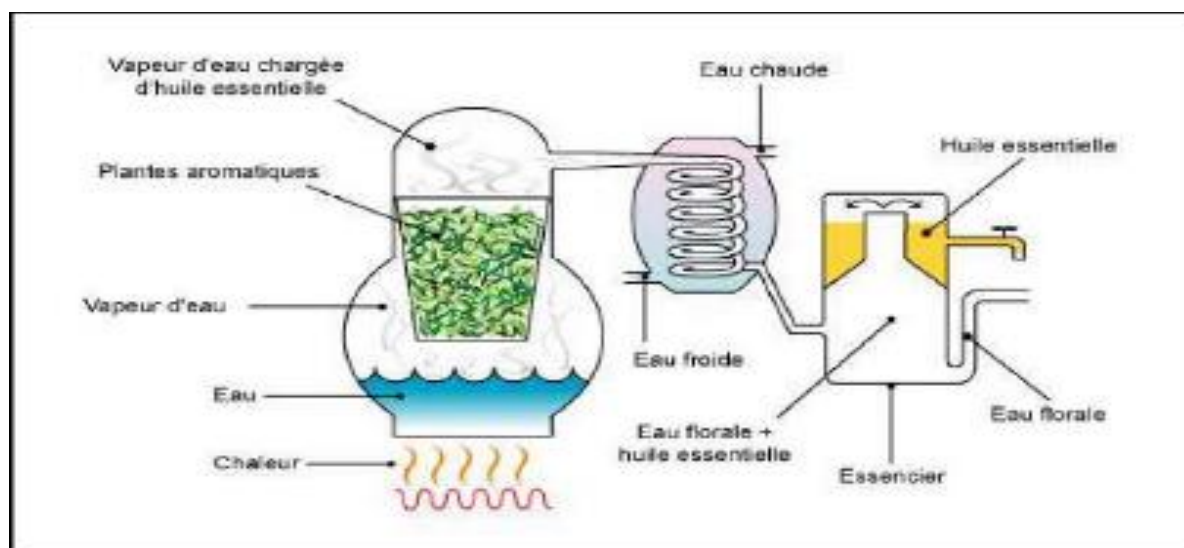


Figure 7 : Appareil d'hydrodistillation des huiles essentielles (Clevenger)
(Gavahian et al., 2012)

II.5.2 : Autres systèmes d'extraction :

Tableau 4 : Les différentes méthodes d'extraction d'huile des plantes (khayat et Roselin, 2018)

Méthode d'extraction	Principe
Méthodes traditionnelles	
Extraction par solvant	Le solvant volatil aidé à dissoudre l'HE
Enfleurage	Application des graisses absorbant l'HE puis séparer par l'alcool suivi d'une évaporation
Pressage à froid	Le principe est basé sur une compression de l'agrumes à T ambiante pour la libération d'HE
Distillation à la vapeur	Les composants volatils ayant une T° d'ébullition supérieur à 100c°
Méthodes innovantes	
Extraction fluide supercritique	Les fluides supercritiques comme solvants d'extraction
Extraction par ultrasons	Elle est soumise au travail des ultrasons, ce qui donne des micro-jets pour détruire les glandes libérant les HE

II.6 : Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles :

De nos jours, les huiles essentielles sont utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (Maruyama et al., 2005), et peuvent aider à lutter contre les infections grâce à leurs

propriétés antimicrobiennes, l'effet microbicide de certaines HE a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques, et elles ont un champ d'action très large.

Une caractéristique importante des HE et de leurs composants c'est leur hydrophobicité, qui leur permet de se répartir dans les lipides de la membrane cellulaire bactérienne et mitochondriale en perturbant les structures et les rendant plus perméables ce qui provoque des fuites d'ions et autres contenus cellulaires. (Cox et al, 2000 ; Dorman et Deans, 2000).

Il existe plusieurs cibles des HE pour inhiber les bactéries, elles peuvent induire la coagulation, agir sur la paroi, agir sur des protéines et les acides gras membranaires, et agir sur les médiateurs du *quorum sensing*. Ces mécanismes peuvent être appliqués en même temps, générant ainsi une action amplificatrice (Bouyahya et al., 2017)

II.6.1 : Activité antibactérienne des huiles essentielles sur *P. aeruginosa* :

La propagation d'agents pathogènes microbiens résistants aux médicaments est l'une des menaces les plus graves pour le traitement efficace des maladies infectieuses. (Owlia et al., 2009).

D'après Eva (2007), *P. aeruginosa* est résistante à 20 huiles essentielles, 10 huiles essentielles manifestent une activité de niveau intermédiaire (Trachyspermum verticillata, cannelle de Chine, Helichryse, menthe poivrée, origan, santal, térébenthine, thym à bornéol, thym à géraniol et thym à carvacrol) et 10 huiles essentielles ont une activité de niveau sensible sur cette souche (Cataire, Eucalyptus citronné, Eucalyptus mentholé, Géranium, Girofle, Mandravasarotra, Niaouli, Sauge à petites feuilles et Sarriette).

III : *Cistus munbyi* :

Le genre *Cistus* (Cistaceae) comprend 21 espèces distribué principalement dans la région méditerranéenne. (Guzman et Vargas, 2005).

Giles Munby a donné une description de cette espèce sous le nom de *Cistus sericeus* en 1847, le nom avait déjà été publié par Martin Val en 1790, de sorte que le nom de Munby est illégitime .

Cistus munbyi (*C. munbyi*) est l'une de ces espèces endémiques, également connue sous le nom de *Cistus sericeus Munbyi*, retrouvée au nord-ouest et au nord-est de

l'Algérie et le Maroc, se produisant à des altitudes allant jusqu'à 100 mètres (330 pieds) dans des endroits secs et ensoleillés, généralement dans des sols alcalins.

Cette espèce est connue sous le nom de «Chaboba el fediya » (**Quezel et Santa, 1962**).

Cistus munbyi est une plante très rameuse, dressée ou ascendante, à feuilles linéaires, lisses en dessus, tomenteuses-canescents en dessous, et nettement révolutes, caractérisée par inflorescence d'abord compacte au sommet des rameaux et entourée par des bractées, puis s'allongeant en ombelle de 3 à 5 fleurs accompagnée souvent à la base par deux autres fleurs. Elle possède des pétales obovales-cunéiformes, une capsule ovale, à poils étoilés courts, des sépales longuement acuminés, dépassant la capsule, et des graines brunes et lisses. Comme, elle est spécifiée par des pédoncules, des pédicelles et des sépales soyeux-villeux et argentés.

C. munbyi est une plante médicinale largement utilisée par les populations locales contre une variété de maladies infectieuses telles que les infections pulmonaires et les infections urinaires (**Benbelaïd et al., 2017**).



Figure 8 : La plante *Cistus munbyi* au moment de la fluorescence (Benbelaïd et al., 2017)

III.1 : Classification scientifique :

Royaume : planta

Famille : cistaceae

Genre : cistus

Espèce : *Cistus munbyi*

III.2 : Composition chimique :

L'HE de *C. munbyi* est constituée principalement de monoterpènes, en particulier d'hydrocarbures (plus que la moitié du volume total d'huile), et oxygène (plus que le quart de l'huile), et d'autres composés comprennent les phénylpropanoïdes, les hydrocarbures sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés. En général, Il n'y a pas de composé principal dans l'huile essentielle mais plutôt un mélange équivalent de Terpinen-4-ol (23,75%), méta-Cymène (17,30%) et Sabinène (12,38%). Il y a une quantité significative d'hydrate de trans-Sabinène (5,62%), d'alpha-Thujène (5,22%) et l'hydrate de cis-Sabinène (4%) et a un degré moindre, l'acétate d'alpha-terpinyle (2,63%), Camphene (2,60%) et l'oxyde de caryophyllène (2,35%).(Benbelaïd et al., 2017).

IV : Clou de girofle :

IV.1 : Le giroflier :

Le giroflier « *Syzygium aromaticum* » est un arbre de la famille des Myrtaceae, originaire des petites îles des Moluques en Indonésie, élancé, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres, qui peut atteindre jusqu'à 20 mètres et au tronc gris clair ridé (Max et robert, 2003) , ses feuilles de 8 à 10 cm de long, sont coriaces, persistantes, opposées, pétiolées, ovales, la face supérieure vert rougeâtre et à la face inférieure vert sombre, légèrement ponctuée, elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement.

« *Syzygium aromaticum* » pousse dans des terres profondes, fraîches, riches, mais bien drainées. Peu de sensibilité aux attaques et aux maladies, peut-être grâce à ses propriétés aromatiques et antiseptiques

Pour obtenir les "clous de girofle", il faut récolter les fleurs avant leur épanouissement, deux fois par an (juillet à décembre) et après six à huit années de mise en culture de l'arbre. Ces boutons sont manuellement privés de leur pédicelle et mis à sécher au soleil pour qu'ils durcissent et prennent une teinte brun-rouge. Il est possible d'en récolter annuellement 3 à 4 kg par arbre pendant plus de 25 ans. (Eberhard et al., 2005)



**Figure 9 : Le giroflier
(Lobstein et al., 2017)**



**Figure 10 : Clou de girofle
(Lobstein et al., 2017)**

IV.2 : Classification : (Annelise et al., 2017)

Règne : plantae

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Syzygium*

IV.3 : L'huile de Clou de girofle :

C'est une épice très appréciée pour ses qualités alimentaires. Il en est extrait une huile essentielle connue surtout en médecine dentaire. Il s'agit d'une HE renfermant en grande majorité de l'eugénol, un phénol considéré comme doux mais anti-infectieux puissant et à large spectre. (Annelise et al., 2017)

IV.3.1 : Composition chimique de l'huile de clou de girofle :

L'HE des clous de girofle, extraite par hydrodistillation, contient principalement deux composés : l'eugénol et l'acétyl-eugénol, et l'une des caractéristiques fondamentales de cette huile est sa densité élevée ($d = 1,066 > d_{\text{eau}} = 1,00$), ce qui nous permet de les séparer par simple décantation.

- 75 à 88 % d'eugénol
- 4 à 15 % d'acétylougénol

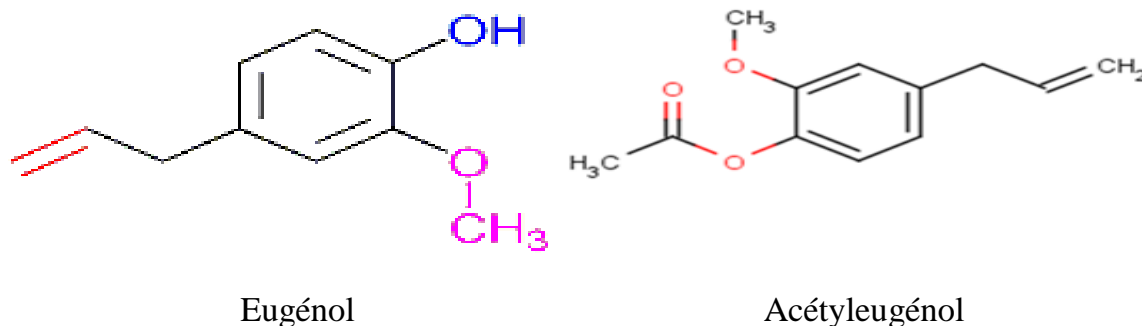


Figure 11 : Structures des principaux constituants de l'huile essentielle issue du clou de girofle.

IV.3.2 : Caractéristiques de l'huile de clou de girofle :

- **Autres appellations** : Clove oil, Eugenia caryophyllus oil, Syzygium aromaticum oil.
- **Organes producteurs** : boutons floraux non encore épanouis "clous" séchés à l'air.
- **Rendement** : 15 à 20 %, après 16 à 18 heures de distillation, soit environ 150 mL d'HE par kg de clous de girofle.
- **Caractères organoleptiques** : liquide jaune limpide, au parfum puissant et caractéristique, chaud, épicé et sucré, de saveur brûlante, légèrement amère et fortement aromatique. (Annelise et al., 2017)

IV.3.3 : L'activité de l'huile essentielle de clou de girofle contre *P. aeruginosa* :

L'huile de girofle à des activités biologiques, telles que des propriétés antibactériennes, antifongiques, insecticides et anti-oxydantes, est traditionnellement utilisée comme agent de saveur et matériau antimicrobien dans les aliments. (Huang et al., 2002) (Lee et Takayuki, 2001 ; Nuñez et al., 2001).

En outre, l'huile de girofle est utilisée comme antiseptique dans les infections buccales. Il a été rapporté que cette huile essentielle inhibe la croissance des moisissures, des levures et des bactéries (Narumol et al., 2006).

Les niveaux élevés d'eugénol contenus dans l'huile essentielle de clou de girofle sont responsables de ses fortes activités biologiques et antimicrobiennes. Il est bien connu que tant l'eugénol que les composés phénoliques de l'huile essentielle de clou de girofle peuvent dénaturer les protéines et réagir avec les phospholipides de la membrane cellulaire, modifiant leur perméabilité et inhibant un grand nombre de bactéries Gram-négatives tel que *P. aeruginosa* et Gram-positives ainsi que différents types de levures. **(Karim et al ., 2007 ; susannah et al ., 2003).**

CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I : Matériel

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen, entre février et mars 2020.

1 : Matériel biologique :

1-1 Les souches utilisées :

Cinq souches de *P. aeruginosa* ont fait l'objet de ce travail, ces souches sont d'origines cliniques provenant de la collection de LAMAAB, ils ont été isolées dans les différents services au CHU de Tlemcen, les souches sont ensuite, purifiées et identifiées au niveau du laboratoire d'analyses microbiologiques au CHU de Tlemcen. Ensuite après leurs identifications sont récupérées et transférées au laboratoire LAMAABE.

L'espèce bactérienne	Les références des souches	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souche de référence	ATCC 27853
	Souche 1	209
	Souche 2	FC207
	Souche 3	PSC
	Souche 4	Par

1-2 : Les plantes utilisées :

Le choix des espèces végétales était sur le fait qu'elles ont été déjà citées pour leurs propriétés antimicrobiennes sur des souches à gram négatifs et sur *P. aeruginosa*, pour cela deux plantes ont été sélectionnées « clou de girofle » *Syzygium aromaticum* et « Chaboba » *Cistus munbyi*.

Des parties aériennes de *C. munbyi* ont été récoltées en fin février dans la région de Honaine / Tlemcen. Tandis que pour la plante clou de girofle les bourgeons sont achetés chez des herboristes.

Tableau 5 : Les plantes utilisées pour l'extraction

La plante	La famille de la plante	La partie utilisée	Origine
Clou de girofle <i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	Bourgeons	Achetés d'herboriste
<i>Cistus munbyi</i>	Cistaceae	Feuilles	Ouest d'Algérie (Honaine)

1-3 : Milieux de culture liquides :

BN : bouillon nutritif

BHIB : bouillon cœur cerveau

TSB : bouillon de trypticase soja

1-4 : Milieux de culture solides :

GN : gélose nutritive

MH : Mueller Hinton bouillon et gélose

MAC : Mac conkey

1-5 : Produits chimiques :

Tween-80

1-6 : Les antibiotiques en disque utilisés :

Ils sont de marque « Liofilchem » et ce sont :

Imipenème (IMP), ciprofloxacine (CIP), amoxicilline (AML), norfloxacine (NOR), ticarcilline (TIC), amikacine (AN), ofloxacine (OFX), netilmicine (NET).

II : Méthodes

1 : Extraction des huiles essentielles :

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé par l'acétone puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil et aussi pour éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction. **(Baby et George, 2009).**

2 : L'hydrodistillation :

Pour l'extraction de clou de girofle sec, l'opération consiste à introduire 200g de matière végétale dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon, après l'eau qui s'évapore du ballon devient opaque et après une heure d'extraction l'eau florale s'éclaircit et les vapeurs chargées d'huiles essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation.

Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. Le liquide récupéré est passé à l'ampoule à décanter.

Au niveau de l'ampoule à décanter apparaissent trois phases : une phase supérieure et une phase inférieure transparente et entre ces deux phase un liquide blanc (eau florale). Ce qui veut dire que l'huile contient des différents composés qui peut être soit moins dense que l'eau ce qui lui permet de flotter sur la surface ou bien plus dense que l'eau (occupe le fond de l'ampoule), l'huile ainsi obtenue est récupérée et conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5°C).

L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition (jusqu'à ce que l'on n'obtienne plus d'huile essentielle).



Figure 12 : Appareil d'hydrodistillation type « Clevenger »

3 : Préparation de la suspension bactérienne :

- a) **Revivification des souches :** devant un bec bunsen, l'ensemencement a été effectué dans des tubes contenant 5ml de bouillon nutritif TSB à partir des souches conservées à l'aide d'une anse de platine, puis sont incubés pendant 24h à 37°C.
- b) **Repiquage :** Afin de confirmer la pureté des souches, on a réalisé des ensemencements en strie sur la surface d'une gélose Mac Conkey dans des boîtes de pétri, l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h.
- c) **Conservation :** Les différentes cultures jeunes ont été ensemencées dans des tubes à gélose inclinés à l'aide d'une anse de platine.
Après incubation de 24h à 37°C les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

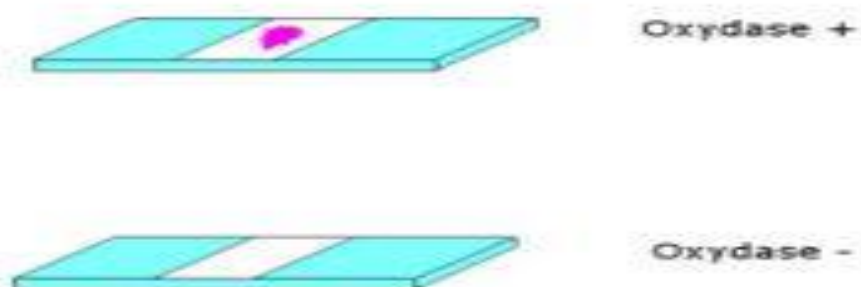
4 : Identification :

4.1 : Test Oxydase :

- Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
- Déposer une goutte de réactif sur le disque.
- Avec une pipette pasteur prélever une colonie sur milieu solide et la déposer doucement sur le disque.

Lecture :

Après 30 secondes environ : L'apparition d'une tache rose violette



4.2 : Test Catalase :

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à l'aide d'une pipette pasteur.
- Prélever une colonie à l'aide de la pipette pasteur toujours.
- Dissocier la colonie dans la goutte.

Lecture :

L'apparition des bulles d'oxygène (Reiner ,2010)



5 : Coloration de Gram :

5.1 Principe :

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en : Bactéries à Gram positif et à Gram négatif. (Dennis, 2007).

En effet quand les bactéries sont mises au contact du violet de gentiane puis soumises à l'action du Lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet toute la couche de peptidoglycane de la membrane des bactéries. Cependant, lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules celles à Gram négatif (présence de membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la Fushine.

Les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violette.

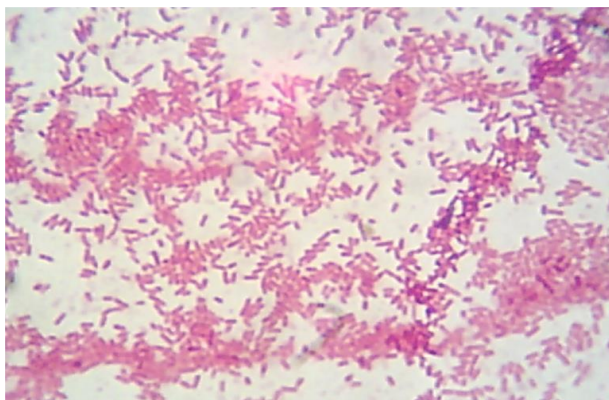


Figure 13 : Les bacilles à Gram négatif de *P. aeruginosa* à objectif 100X

6 : L'antibiogramme :

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Dans notre travail on a utilisé la méthode de CA-SFM.

Elle peut se faire en milieu liquide (dans une culture bactérienne liquide) ou en milieu solide (sur une boîte de Pétri gélosée) en ajoutant une concentration connue d'antibiotique.

- D'abord la gélose Mueller Hinton (MH) est coulée dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- **Inoculum** : A partir d'une culture jeune et pure, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
 - Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique.
 - Homogénéiser bien la suspension bactérienne, sa densité optique (DO) doit être entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 625nm ce qui correspond approximativement de 10^8 UFC/ml.
 - L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.

Ensemencement :

- L'ensemencement de l'inoculum se fait par écouvillonnage, plonger l'écouvillon dans la suspension et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Ensemencer toute la surface du milieu (3 passages à orientation décalée de 60° pour la boîte et l'écouvillon).
- Puis à l'aide d'une pince stérile les différents disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface gélifiée et ensemencer avec la souche en respectant une certaine distance entre les disques de 25 jusqu'à 30mm.
- Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer le contact uniforme avec la gélose.
- Les boîtes ainsi préparées sont laissées quelques minutes à la température ambiante pour permettre la diffusion de l'antibiotique puis les incuber à 37° pendant 18 à 24h.

Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition autour des disques à l'extérieur de la boîte fermée puis comparer ces résultats aux valeurs critiques de la **CASFM / EUCAST 2019**.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : **Sensible**, **Intermédiaire** ou **Résistante**.

7 : L'aromatogramme (Méthode de diffusion en milieu solide): (Once et al, 2007)

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé ou aromatoigramme pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de nos huiles essentielles sur des souches cliniques de *P. aeruginosa*.

- **Préparation de l'inoculum** : on a prélevé une à plusieurs colonies bien isolées à l'aide d'une pipette pasteur et on les a mis en suspension dans des tubes à hémolyse contenant un bouillon nutritif, et à l'aide d'un colorimètre on règle la charge bactérienne de façon à obtenir 10^8 UFC /ml.
- **Inoculation des boîtes de pétri** : le milieu de culture (Muller-Hinton) a été versé dans une boîte de Pétri stérile et laissé se solidifier, puis on a plongé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, et on a bien étalé l'inoculum sur la totalité de la surface de la boîte, les stries d'ensemencement doit être très serrées, cette action est refaite trois fois, en tournant à chaque fois la boîte par un angle de 60° il faut aussi pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- **Dépôt des disques** : Cette méthode a été effectuée par dépôt des disques de papier filtre Whatman stérile de 6 mm de diamètre au centre de la gélose imprégné d'une quantité d'huile essentielle de $10\mu\text{l}$ à l'aide d'une micropipette et on incube 24H à 37°C .
- Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition.

Lecture :

La lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres. Généralement, les microorganismes seront classés selon le diamètre de la zone d'inhibition qui traduit l'activité antibactérienne d'huile essentielle sur la souche étudiée. (Wilkinson et Ahmad, 2006).

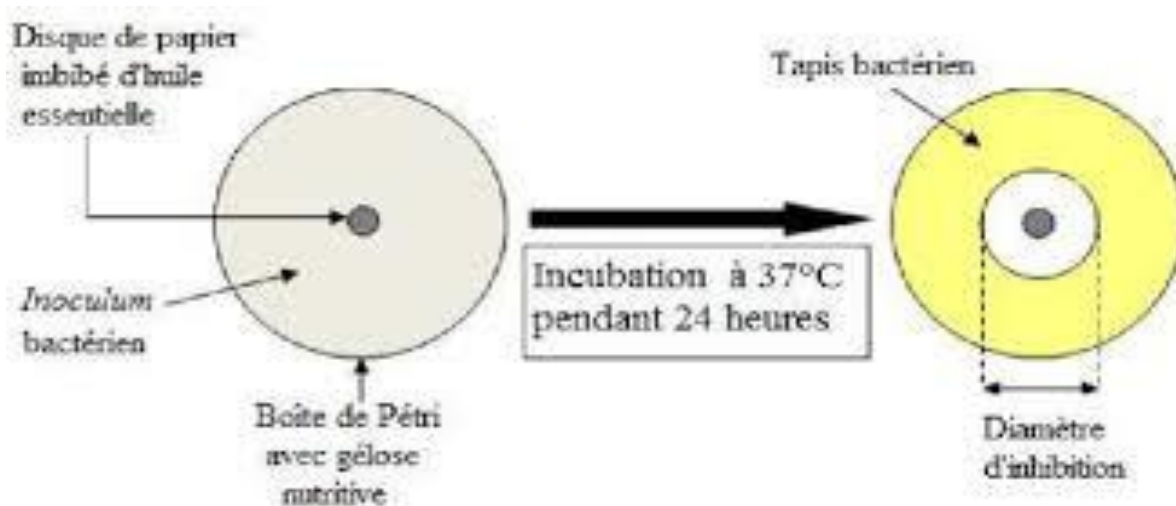


Figure 14 : Le principe d'un test d'aromatogramme méthode de diffusion sur disque (Guinoiseau, 2010)

8 : Méthode de micro dilution sur milieu liquide :

Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI

C'est une méthode qui permet la mise en contact entre les HE à tester et les souches bactériennes utilisées, La CMI a été calculée par la méthode de microplaque à 96puits qui contient 12 puits horizontaux et 8 verticaux.

➤ **Préparation de l'inoculum**

-Dans des tubes à hémolyse on met quelques gouttes de la solution mère d'inoculum déjà incubé pendant 24h ou 48h et on ajoute le bouillon nutritif (BN).

-Standardisation de cet inoculum avec le colorimètre à une densité optique DO= 0.08 à 0.1nm.

-On met dans des tubes qui contiennent 9.9ml de BN 0.1ml de cette solution d'inoculum de chaque souche. Pour obtenir une dilution de 10^{-1} .

➤ Dans un tube à hémolyse on prépare une concentration de 40% en huile essentielle qui va par la suite subir des dilutions successives de l'ordre de $\frac{1}{2}$ dans le BN contenant le tween 80 avec une concentration de 10%, à fin d'avoir une miscibilité totale de l'huile dans le bouillon. Une deuxième solution a été préparée de bouillon nutritif et tween 80 à concentration de 10% dite solution blanche, dans le but de gardé la même concentration de tween 80, Cette

solution a été utilisée pour compléter les dilutions successives de la première solution qui contient l'huile essentielle.

- L'inoculum à 10^8 UFC /ml a été dilué à fin d'obtenir une concentration de 10^5 UFC/ml, Puis 180 μ l de la suspension bactérienne à 10^5 UFC/ml a été déposé à l'intérieur des puits de la microplaque, et on a ajouté 20 μ l d'huile essentiel pour chaque concentration. **(Khadir et al., 2016)**

Pour les 2 témoins négatif et positif sont testés dans les puits respectivement :

- Témoins négatifs ne contient que le milieu de culture 200 μ l
 - Témoins positifs contient uniquement 200 μ l d'inoculum
- la microplaque est couverte est incubée à 37°C pendant 24h.

La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration d'HE à laquelle aucun trouble n'est observé. **(Ncube et al., 2008).**

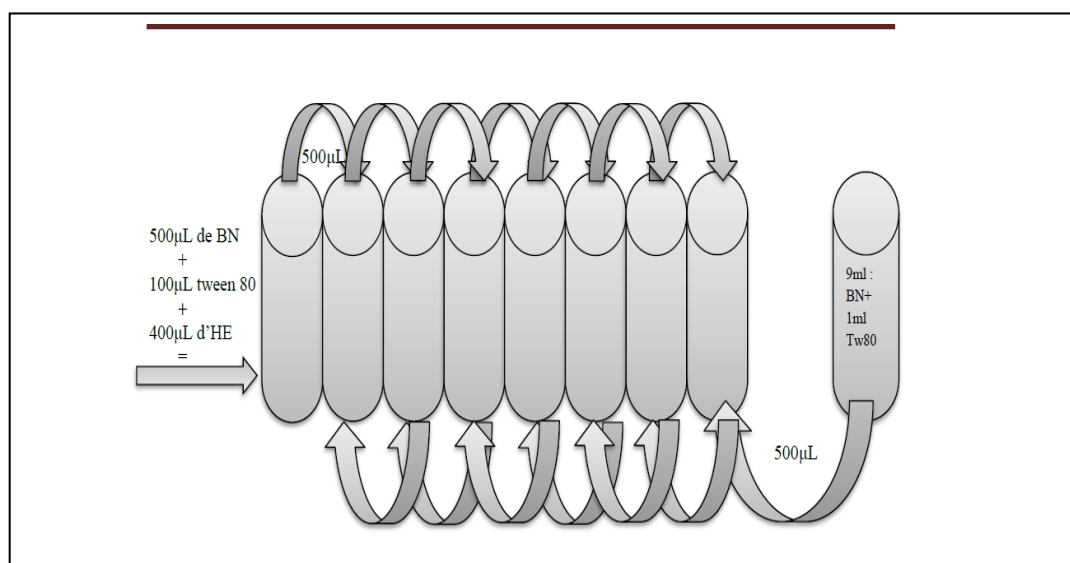
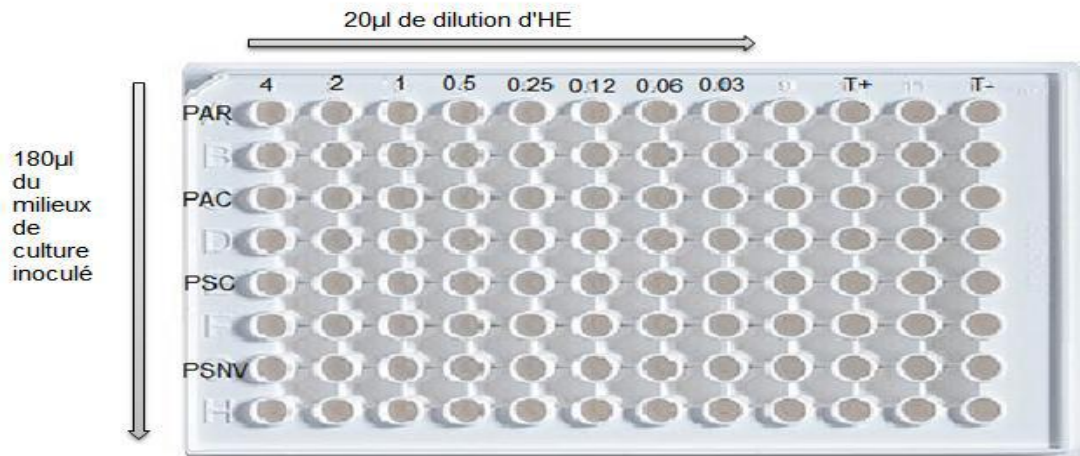


Figure 15 : Schéma de préparations des dilutions d'HE



T-: milieu de culture (solution blanche) 200µl

T+: 200µl d'inoculum

Figure 16 : Schéma représentatif la méthode de microdilution par microplaque a 96 puits

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1 : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites :

Tableau 6 : Caractères organoleptiques des huiles essentielles

HE	couleur	odeur	saveur
<i>Syzygium aromaticum</i>	Jaune très clair	Fraiche et parfumée	amère
<i>Cistus munbyi</i>	Jaune clair	Aromatique	Légèrement piquante

2 : L'antibiogramme :

Nous avons fait uniquement l'antibiogramme de la souche **209**.

D'après les résultats obtenus (**Tableau 7**), cette souche est fortement sensible aux **Netilmicin(NET)**, **Amikacin(AN)** et **Norfloxacin(NOR)** avec une zone d'inhibition allant de (21-22 mm) de diamètre, par contre en présence de **Ofloxacin(OFX)** et **Ciprofloxacine (CIP)** elle est moins sensible (Intermédiaire) avec une zone d'inhibition allant de (6-9 mm) de diamètre, et résistante en présence de **Amoxicilline (AML)**, **Imipenème (IMP)** et **Ticarcilline (TIC)**.

Sensible : $D > 13$, Intermédiaire : $6 < D < 13$, Résistante : $D < 6$

Ces résultats sont illustrés en histogramme (**Figure 18**).

Tableau 7 : Diamètres (mm) de sensibilité de la souche 209 aux antibiotiques

ATB Souche	AN	NET	OFX	TIC	NOR	CIP	AML	IMP
S 209	21	22	9	≤ 0	22	6	≤ 0	≤ 0

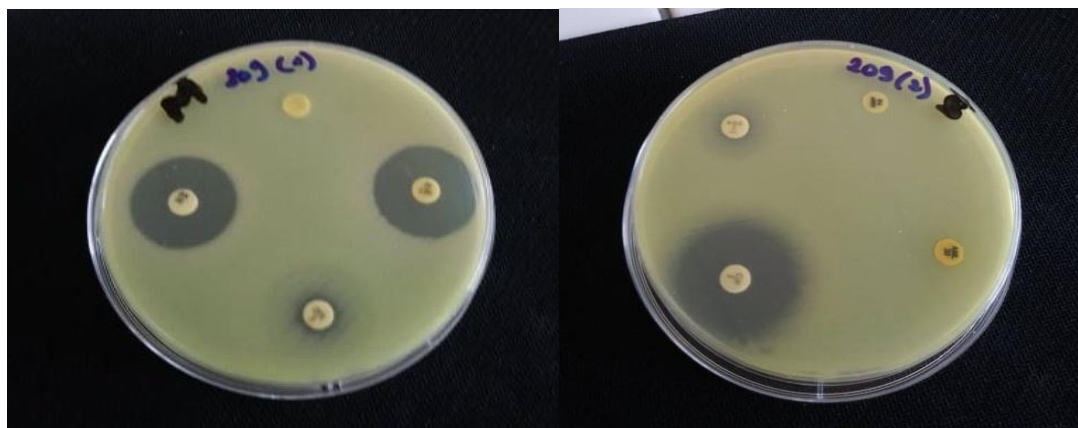


Figure 17 : Zones d'inhibition de la souche 209 par les antibiotiques utilisés

En Algérie, *P. aeruginosa* est le troisième agent le plus incriminé dans les infections associées aux soins (**Benslimani et Meieddine, 2012 ; Amrouni et al, 2014**).

Si on compare notre résultat de l'antibiogramme effectué avec des travaux antérieurs, on s'aperçoit qu'il existe des résultats similaires qui ont été rapportés dans l'étude de (**Cazals .N et al., 2015**), montrant ainsi une forte sensibilité des bactéries isolées d'infection urinaire qui sont révélées sensible à l'action de AN,IMP et NOR, OFX et CIP.

Par contre, les travaux de la même équipe dans une autre étude en **2016** sur la même espèce montrent une résistance complète à l'action d'AMP et l'AMX (**Leotard et al., 2019**), Ainsi l'étude de la société française de microbiologie de comité de l'antibiogramme réalisée par (**Madec.J et al., 2018**) où des souches de *P. aeruginosa* sont révélées résistantes à l'action d'ampicilline (AMP).

Dans une autre étude menée par (**Barika et al., 2019**), la souche de *P. aeruginosa* isolée a exprimé une résistance aux différents antibiotiques utilisés mais à des degrés variables. Elle a montré des taux de résistance remarquables pour Amikacine (66,6%) et une faible résistance le Netilmicine (20%). Une bonne activité a été maintenue sur la souche pour la Ciprofloxacine.

De plus, (Chimezie et al., 2018) ont montrés que cette souche a révélé une résistance à la gentamicine et ciprofloxacine. Ces résultats sont en accord avec celles obtenus par Al-Marjani et Khadam (2016). En fait, ils ont isolé *P. aeruginosa* à partir de différents sites d'infection. Ce taux élevé de la multirésistance pourrait être due à la production des enzymes hydrolytiques et l'acquisition de la résistance par les souches de *P. aeruginosa* tandis que Moazami-Goudarzi et Eftekhar (2013) ont signalés que 94,7 % des isolats étaient résistants à l'imipénème.

Par ailleurs, l'analyse de l'antibiogramme de (Koridak et al., 2019) montre que *P. aeruginosa* et *Echerichia coli* présentent des réponses différentes vis-à-vis les antibiotiques testés (Ampicilline, Imipénème, Ciprofloxacine, Tobramycine, Ceftazidime, Colistine).Par contre elles sont sensibles aux antibiotiques : Colistin, Ofloxacin et Ciprofloxacine et intermédiaires à l'imipénème.

D'après (Gupta et Mishra, 2020) *P. aeruginosa* s'est révélé être la plus sensible à la Gentamicine (83,3%), à la Ciprofloxacine (61,1%), à l'Imipénème (38,9%) et à l'Amikacine.

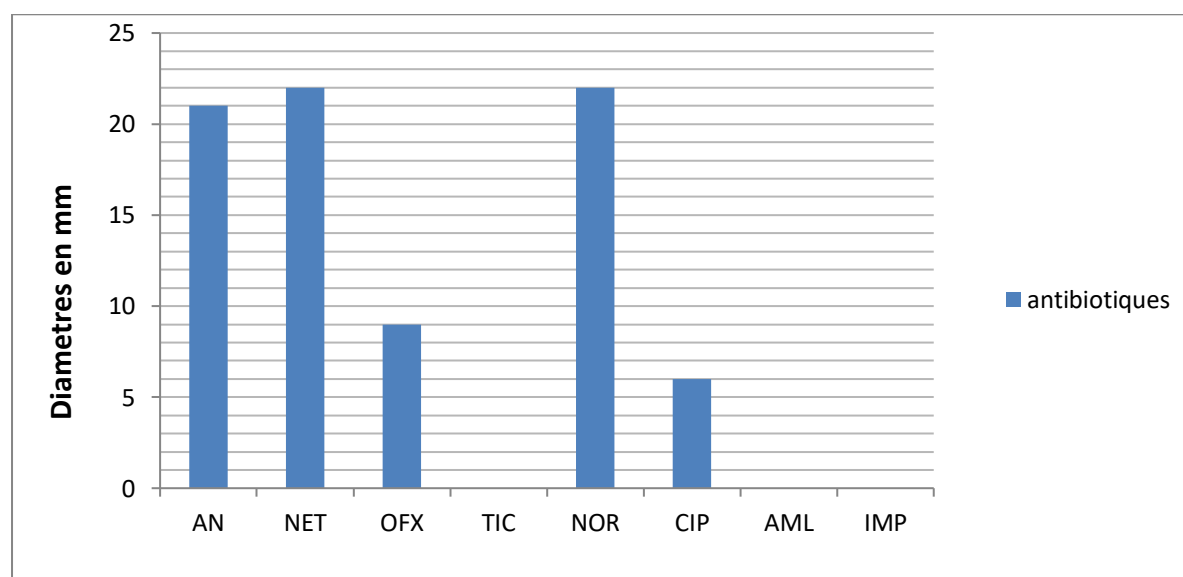


Figure 18 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des ATB vis-à-vis de la souche 209

3 : Aromatogramme :

Quatre souches cliniques et une souche de référence ont été utilisées dans ce travail pour évaluer l'activité antibactérienne des HE.

Les résultats des tests d'aromatogramme de ces huiles essentielles sont consignés dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Résultat des diamètres d'inhibition en (mm) des HE

Souches	Diamètres d'inhibition	
	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Cistus munbyi</i>
Souche de référence ATCC 27853	13	08
Souche clinique PAr	11	07
Souche clinique 01	10	07
Souche clinique 02	10	08
Souche clinique PSC	11	09

Les résultats expérimentaux présentés dans (**Figure 19**) et (**Figure 20**) ci-dessous montrent que les deux huiles : Clou de girofle et *Cistus munbyi*, ont une activité antimicrobienne vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

Les résultats de zones d'inhibition de l'HE de Clou de girofle montrent une très bonne activité antimicrobienne sur toutes les différentes souches étudiées de *P. aeruginosa*.

La sensibilité de ces souches était variable avec des diamètres d'inhibition comprise entre 10 mm et 13 mm, la souche de référence est la plus sensible à l'HE de clou de girofle par rapport aux souches restantes avec 13mm comme zone d'inhibition, alors que les souches 1 et 2 sont les moins sensibles avec 10 mm.



Figure 19 : La zone d'inhibition d'HE de clou de girofle vis à vis de PAr

Concernant les résultats du test d'activité antimicrobienne de l'HE de *Cistus munbyi* sur *P. aeruginosa* les zones d'inhibition sont variables d'une souche à une autre ,de plus cette HE présente une activité moins importante que celle de clou de girofle avec des diamètres comprises entre 7 et 9mm, la souche PSC est la plus sensible avec 9mm et les souches 1 et PAr sont les moins sensibles avec un diamètre de 7mm.



Figure 20 : La zone d'inhibition d'HE de *Cistus munbyi* vis-à-vis de PSC

De nombreuses études, ont démontré que l'HE de clou de girofle inhibe l'activité de *P. aeruginosa*, ces résultats se rapprochent aux résultats rapportés par (Nzeako et al., 2006) qui avait enregistré un diamètre de la zone d'inhibition de 14,7mm et a montré que l'HE de girofle exerce son activité bactéricide principalement grâce à son

constituant majoritaire « l'eugénol » qui conduit à l'inhibition du fonctionnement enzymatique et à la dégradation de la membrane des bactéries.

Par ailleurs une autre étude de (Faiza, 2015) a aussi prouvé que l'HE de clou de girofle est doté de propriétés antimicrobiennes qui inhibent la croissance de *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 8mm.

concernant l'HE de *Cistus munbyi*, une étude menée par (Benbelaid et al., 2017) sur l'effet antimicrobien de l'HE de *Cistus*, a affirmé que cette huile était active sur plusieurs souches microbiennes et a exercé un effet inhibiteur sur *P. aeruginosa* qui s'est traduit par des zones d'inhibition de l'ordre de 8 mm, bien que cette bactérie résiste à beaucoup d'huiles essentielles connue, car elle possède une résistance intrinsèque qui est due à la nature de sa membrane externe. (Khadir et al., 2013)

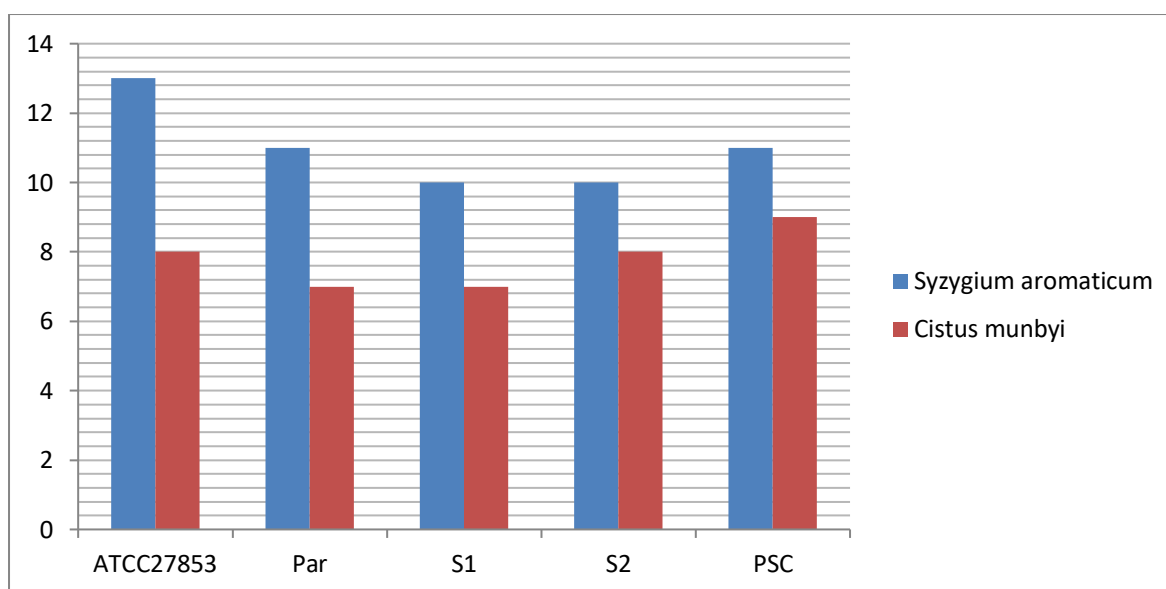


Figure21 : Histogramme des diamètres (mm) d'aromatogramme de *P. aeruginosa*

Conclusion :

Face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des bactéries à gram négatifs aux antibiotiques, l'une des alternatives à l'usage de ces médicaments anti-infectieux pourrait être celle des composés d'origine naturelle et en particulier les huiles essentielles. Connue de façon empirique depuis des siècles, la propriété antibactérienne de certaines molécules est mise à profit dans la phytothérapie chez de nombreuses pathogènes dans le monde.

P. aeruginosa est responsable des infections nosocomiales et devient résistant presque à tous les antibiotiques.

Cette étude laisse entrevoir une voie de recherche pour objectif afin de voir les effets antimicrobiens des HE de deux plantes sur la bactérie *P. aeruginosa* isolée des infections hospitalières au niveau de CHU de Tlemcen.

Les plantes utilisées *Syzygium aromaticum* et *Cistus munbyi* ont été testées sur cinq souches de *P. aeruginosa* selon une méthode de diffusion sur disque.

Les résultats de notre étude tendent à prouver une action sur *P. aeruginosa* et ils ont montrés que les deux huiles de Clou de girofle et *Cistus munbyi*, ont une activité antimicrobienne vis-à-vis de cette bactérie.

Parmi les deux HE qui ont un effet inhibiteur, Les meilleures valeurs enregistrées était pour l'HE de Clou de girofle avec une zone d'inhibition de 13 mm de diamètre sur toutes les souches contrairement à l'HE de *Cistus munbyi* qui a enregistré une faible zone d'inhibition de 7mm de diamètre qui est variable d'une souche à une autre.

Donc l'HE de *Cistus munbyi* à une activité antimicrobienne moins importante que celle de clou de girofle.

Récemment, des chercheurs anglais de la Manchester Metropolitan University ont également testés pendant neuf mois l'effet des HE sur les bactéries à la source d'infections nosocomiales à l'unité des grands brûlés de l'hôpital de Wythenshave en Angleterre (**Morissette, 2007**). Dans deux chambres où un diffuseur d'huiles essentielles a été installé, ils ont noté une diminution de 90 % des bactéries dans l'air et une réduction du nombre d'infections dans le service.

Conclusion

Enfin, nous espérons par ce travail que nous avons mis en évidence l'importance des HE issues de quelques plantes médicinales, qui ont une très grande efficacité dans des divers domaines.

Il serait fort judicieux de reconduire cette étude afin de confirmer les résultats trouvés. Il est aussi très intéressant d'essayer d'approfondir nos connaissances sur :

-Le mécanisme d'action bactéricide et/ou bactériostatique des principaux composants extraits de la plante *Cistus munbyi* et Clou de girofle vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

-Tester l'activité antimicrobienne d'autres parties du *Cistus munbyi* (racines par exemple) et Clou de girofle (feuilles par exemple) et faire des applications cliniques de nos échantillons (essais in vivo).

Références bibliographiques :

Andremont , A. (2000). "Impact des antibiotiques sur l'écologie de la résistance bactérienne: rôle du tube digestif." *Médecine et Maladies Infectieuses* 30: s178-s184.

Anthoni, J. (2007). Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes, Institut National Polytechnique de Lorraine.

Anton R. et Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.

Azevedo, N. r. R., I. F. Campos, H. D. Ferreira, T. A. Portes, S. C. Santos, J. C. Seraphin, J. R. Paula & P. H. Ferri (2001) Chemical variability in the essential oil of *Hyptissuaveolens*. *Phytochemistry*, 57, 733-736.

Bakchiche, B. and A. Gherib (2014). "Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie [Antioxidant activities of polyphenol extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia]." *International Journal of Innovation and Applied Studies* 9(1): 167.

Barbier, F. and M. Wolff (2010). "Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*-Vers l'impassé thérapeutique" *médecine/sciences* 26(11): 960-968.

Basli, A., et al. (2012). "Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf." *Phytothérapie* 10(1): 2-9.

Benayad N., (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Rapport d'étude. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.

Ben-David, Y., et al. (2018). "SawR a new regulator controlling pyomelanin synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiological research* 206: 91-98.

Boudouda R. « Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *Pseudomonas aeruginosa* ». Mémoire de master : Génétique Moléculaire, Constantine: Université des Frères Mentouri Constantine.2015.

Références

- Bouzabata, A.** (2017). "Les médicaments à base de plantes en Algérie: réglementation et enregistrement." *Phytothérapie* 15(6): 401-408.
- Burt, S.**, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (3), 223–253.
- Bricha, S. O., K. ; Oulkheir, S. ; EL Haloui, N. E. ; Attarassi B.** (2009). "Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*." *Revue Tunisienne d'Infectiologie* 2: 7.
- Bruneton J.**, (1993). *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales*. Tec. & Doc. Lavoisier, 2ème édition, Paris. 915p.
- Bruneton J.** (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- Bruneton, J.** *Pharmacognosie - phytochimie, plantes médicinales*, 2eme ed, Paris. Tec & Doc Editions médicales internationales.2008, p, 1188.
- Casilag, F., et al.** (2016). "The LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition." *Infection and immunity* 84(1): 162-171.
- Cazals,C. Leotard,S. Etienne,C.**(2019). « Impact de l'antibiogramme ciblé dans le traitement des infections urinaires masculines à Entérobactéries », Vol.49, n°4, P.57-58.
- Chaker H.** « Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane ». Thèse de doctorat : Grenoble: Université de Grenoble: Science agricole.2012.
- Chaussade, H., et al.** (2013). "Les médicaments antibiotiques en urologie." *Progrès en urologie* 23(15): 1327-1341
- Couvralin, P.** (2008). "La résistance des bactéries aux antibiotiques: Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques." *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- De Bentzmann, S. and P. Plésiat** (2011). "The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections." *Environmental microbiology* 13(7): 1655-1665

Références

Degryse A.C., Delpla I. et Voinier M.A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS- EHESP, 87p.

DENIS F., M-C POLY., C MARTIN., E BINGEN., RQUENTIN.2007.Bactériologie médicale,techniques usuelles .MASSON, Cedex. P333-335.

Denis, F., Le Hello, S., &Barraud, O. (2016). Chapitre 30 - Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies. In F. Denis, M.-C. Ploy, C. Martin & V. Cattoir (Eds.), *Bactériologie Médicale (Troisième Édition)* (pp. 301-387).

Frikh, M., et al. (2017). "Pseudomonas aeruginosa: Epidémiologie et état actuel des résistances Etude retrospective sur trois ans." *Journal Marocain des Sciences Médicales* 21(2): 34-40.

Garnacho-Montero, J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*. In J.-L. Vincent & J. B. Hall (Eds.), *Encyclopedia of Intensive Care Medicine* (pp. 1868-1873). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Gavahian, M., Farahnaky, A., Javidnia, K., & Majzoobi, M. (2012). Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 85-91.

Gibson, R. L., J. L. Burns and B. W. Ramsey (2003)."Pathophysiology and management of pulmonary infections in cysticfibrosis." *Am J RespirCrit Care Med* 168(8): 918-51.

Guenther, E. (1948). *The Essential Oils: history, origin in plants, production and analysis*. New York: D Van Nostrand.

Gupta, S. K., R. S. Berk, S. Masinick and L. D. Hazlett (1994). "Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1." *Infect Immun* 62(10): 4572-9.5.

Hafiane, A. & M. Ravaoarinoro (2008) Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cysticfibrosis patients. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 38, 238-247.

Références

- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985–990.
- Helena Sovová and Slavcho A. Aleksovski.** FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL, *FlavourFragr.J.*(2006); 21: 881–889.
- Holley, R.A., Patel, D., 2005.** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22, 273–292.
- Huang, Y.; Ho, S.H.; Lee, H.C.; Yap, Y.L. (2002).** Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. *J. Stored Prod. Research* 38, 403-412.
- Huang, B., Xiao, D., Tan, B., Xiao, H., Wang, J., Yin, J., Yin, Y. (2015).** Chitosan oligosaccharide reduces intestinal inflammation that involves calcium-sensing receptor (CaSR) activation in lipopolysaccharide (LPS)-challenged piglets. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(1), 245-252.
- Husson MO, Izard D, Hansen W.** *Pseudomonas* et genres apparentés. In : Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet S, editors. *Manuel de bactériologie clinique*. Paris: Elsevier. 1994; 3:1141–63.
- Jana Richter & Ingo Schellenberg.** *Anal Bioanal Chem* (2007) ,387:2207–2217 DOI 10.1007/s00216-006-1045-6.
- Jeannot, K. & P. Plésiat (2016)** Épidémiologie de la résistance aux β -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal des Anti-infectieux*, 18, 52-63
- Khalifa, A. B. H., et al. (2011).** Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. *Annales de biologie clinique*.
- Khayyat, S. A., & Roselin, L. S. (2018).** Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. *Journal of Saudi Chemical Society*.
- Kumar, R., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009).** Quorum sensing is necessary for the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infection. *Kidney international*, 76(3), 286-292.

Références

Lee, K.G.; Shibamoto, T. (2001). Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds. *Food Chem.* 74, 443-448.

Lobstein, A., Couic-Marinier, F., & Barbelet, S. (2017). Huile essentielle de Clou de girofle. *Actualités Pharmaceutiques*, 56(569), 59–61.

Lyczak, J. B., C. L. Cannon and G. B. Pier (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist." *Microbes Infect* 2(9):105160.

Majda Elyemni ; Bouchra Louaste ; Imane Nechad ; Taha Elkamli ; Abdelhak Bouia ; Mustapha Taleb ; Mahdi Chaouch ; and Nouredine Eloutassi. *Scientific World Journal*. Volume (2019), Article ID 3659432, P6

Mamoudou, S., et al. (2015). "Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* au service des maladies infectieuses du CHU YO, Burkina Faso: à propos deux cas." *Pan African Medical Journal* 21(1).

Marie E. Lucchesi, Farid Chemat, Jacqueline Smadja. (2004). *Journal of Chromatography A*, 1043, 323–327.

Medec, J.Y., Decousser, J.W., Fortine, N., Haenni, M., Joy, E., Kempe, I., Laurentie, M., Lupo, A., Morvan, H., Pinsard, J.L., Sanders, P., Woronoff, R.N. (2018). « l'antibiogramme », Comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie, Vol.1, P.3-4.

Mikkelsen, H., G. Ball, C. Giraud and A. Filloux (2009). "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators." *PLoS One* 4(6): e6018.

Nader, M. (2009). Assimilation du fer chez *Pseudomonas aeruginosa*: étude du mécanisme de transport de la Pyoverdine ferrique à travers la membrane externe, Strasbourg.

Nicas, T. I. & B. H. Iglewski (1985) The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 387-392.

Nuñez, L.; D'Aquino, M.; Chirife, J. (2001). Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. *Braz. J. Microbiol.* 32, 123-126.

Références

- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2006. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18 (5), 414–420.
- Pagès, J.-M., et al. (2011). "Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*." *Revue francophone des laboratoires* 2011(435): 63-72.
- Paterson, D. L., & Kim, B.-N. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*. In D. L. Mayers (Ed.), *Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects* (pp. 811-817). Totowa, NJ: Humana Press.
- Pier, G. B. (2007). "Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity." *Int J Med Microbiol* 297(5): 277-95.
- Rashid, M. H. and A. Kornberg (2000). "Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4885-90.
- Reiner, K. (2010). Protocole de test de Catalase. *ASM Microbe Library*.
- Rocchetta H. L., Burrows L. L. Lam J. S. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999; 63:523-553.
- Sadikot, R. T., et al. (2005). "Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." *American journal of respiratory and critical care medicine* 171(11): 1209-1223.
- Sangwan N.S., Arora B. and Sangwan R.S. 2001. Spectral modulation of essential oils synthesis in *Pelargonium graveolens* L.J. *Herbs.Spices.Med.Plants*. (in press). 34: 3-21.
- Sheth, H. B. K. Lee, W. Y. Wong, G. Srivastava, O. Hindsgaul, S. Hodges, W. Paranchych and R. T. Irvin (1994). "The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO binds specifically to the carbohydrate sequence beta GalNAc(1-4)beta Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2." *Mol Microbiol* 11(4): 715-23.

Références

- Sophie de Bentzmann, S., P. Roger, F. Dupuit, O. Bajolet-Laudinat, C. Fuchey, M. C. Plotkowski and E. Puchelle (1996). "Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells." *Infect Immun* 64(5): 1582-8.
- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa* : identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 6911-6.
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A. I., & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology*, 41, 15-20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.006>.
- Van bambeke F., PAGES JM., LEE VJ. 2010. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibacterial therapy and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Frontiers in Anti Infective Drug Discovery* 2010;1:138–175.
- Van Delden, C. and B. H. Iglewski (1998). "Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Emerg Infect Dis* 4(4): 551-60.
- Vasil, M. L. (1986). "*Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology." *J Pediatr* 108(5 Pt 2): 800-5.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106(2), 804-810.
- Wilkinson J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII. pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
- You Essoh, C. (2013). Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique, Paris 11.
- Yu, Y., Huang, T., Yang, B., Liu, X., & Duan, G. (2007). Development of gas chromatography–mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous

Références

solid-phase microextraction for rapid determination of volatile constituents in ginger. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43(1), 24-3

Annexes :

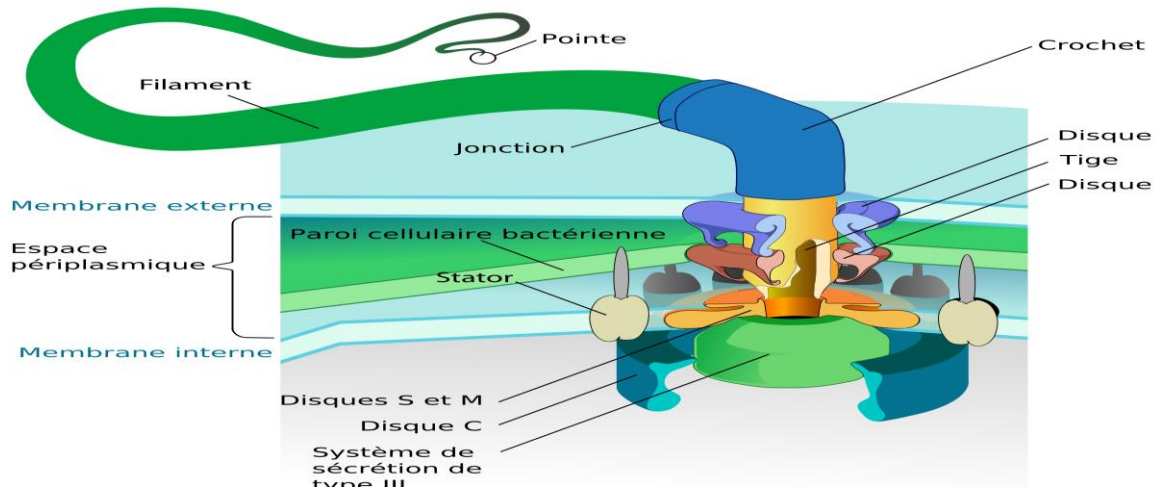


Figure 22 : Structure du flagelle bactérien. (Perrin, 2015)

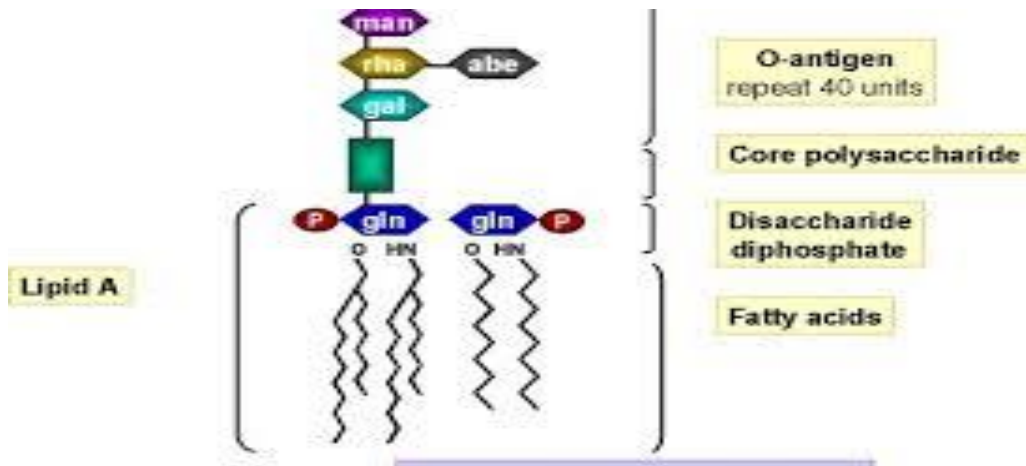


Figure 23 : Structure du lipopolysaccharide. (Miller et al, 2005)

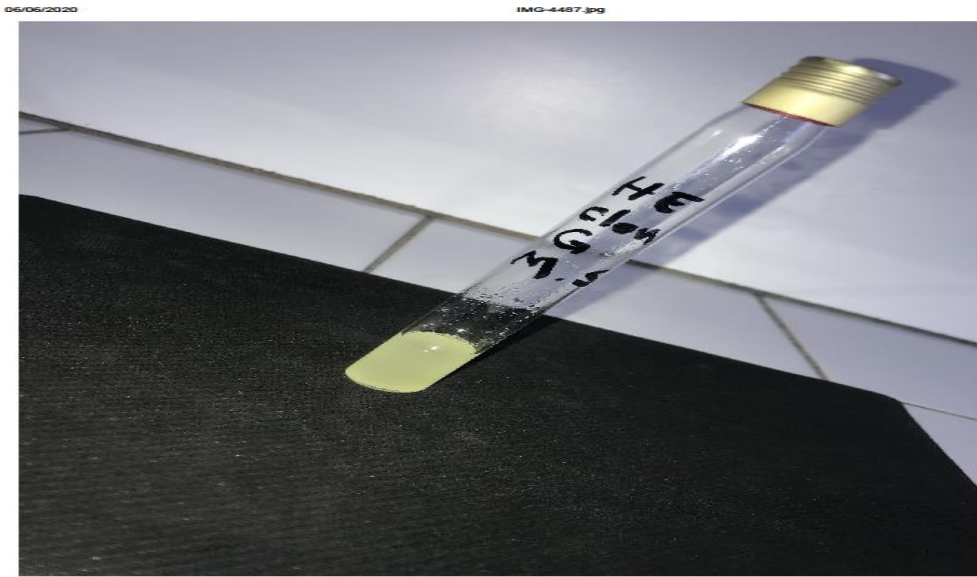


Figure 24 : Huile essentielle de clou de girofle extraite au laboratoire

❖ **Les étapes de la coloration de Gram :**

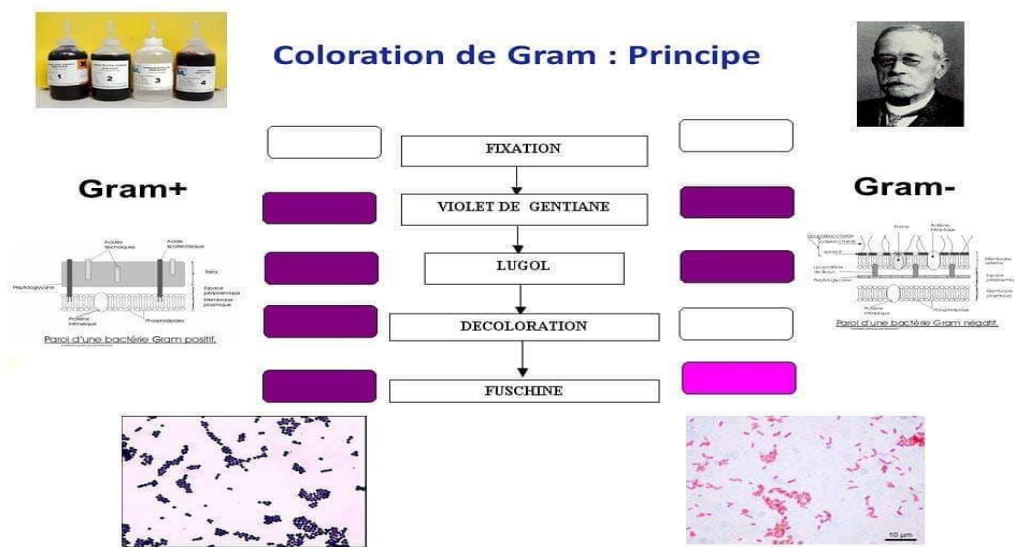
A) Fixation du frottis :

- A l'aide d'une pipette pasteur stérile, on dépose une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Ensuite on prélève une colonie bien isolée avec la pipette pasteur boutonnée et dissociée dans la goutte.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

B) Réalisation de la coloration :

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).

- Déposer quelques gouttes de Lugol sur le frottis.
- Laisser agir 1 minute et rincer brièvement à l'H₂O
- Décolorer en faisant couler l'alcool sur la lame verticalement ou en position très inclinée, jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes).
- Rincer à l'eau.
- Recolorer à nouveau avec la solution de fuchsine diluée pendant 1 min.
- Laver à l'eau et Laisser sécher à l'air.
- A la fin on observe à l'objectif X100, à l'aide d'huile d'immersion.



الملخص

البكتيريا سالبة الجرام هي مسببات الأمراض المسؤولة عن عدة أنواع من العدوى بما في ذلك عدوى المستشفيات في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة.

Pseudomonas aeruginosa هي بكتيريا انتهازية سلبية الغرام مقاومة للمضادات الحيوية المختلفة ، مما أدى إلى استخدام الأدوية العشبية.

تم تحضير الزيوت الأساسية للنباتات الطبية من الجزء الهوائي لنباتين يحتويان على مواد ، ومصدرًا ضخمًا للجزيئات النشطة بيولوجيًا ، والتي تتمتع بالعديد من الأنشطة المضادة للميكروبات والمضادة للعدوى ، والتي يمكن استخدامها لأغراض علاجية.

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري لـ *Syzygium aromaticum* الذي له تأثير مثبط على *P. aeruginosa* ومقارنته بتأثير *Cistus munbyi*.

أظهرت هذه الزيوت العطرية أنشطة مختلفة، وسجل معمل القرنفل أنشطة جيدة جدًا مضادة للميكروبات على جميع السلالات الميكروبية التي تم اختبارها. ومع ذلك ، كان تأثير *Cistus munbyi* أقل أهمية.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas aeruginosa* ، الزيوت الأساسية ، القرنفل ، *cistus munbyi* ، تأثير مضاد للميكروبات.

Résumé :

Les bactéries à Gram négatifs sont des pathogènes responsables de plusieurs types d'infections y compris les infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif opportuniste multirésistante à divers antibiotiques ce qui a conduit à l'utilisation de la phytothérapie.

Les huiles essentielles des plantes médicinales ont été préparées de la partie aérienne de deux plantes qui contiennent des substances, et une immense source de molécules bioactives, doté de nombreuses activités antimicrobiennes et anti-infectieuses, pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques.

La présente étude a pour but d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* qui a un effet inhibiteur sur *P.aeruginosa* et la comparer à l'HE de *Cistus munbyi*.

Ces huiles essentielles ont montré des activités différentes, l'HE de clou de girofle a enregistré de très bonnes activités antimicrobiennes sur toutes les souches microbiennes testées. Par contre l'effet de *Cistus munbyi* était moins important.

Mots clé : *Pseudomonas aeruginosa*, huiles essentielles, clou de girofle, *cistus munbyi*, effet antimicrobien.

Abstract:

The negative Gram bacteria are pathogens responsible of several types of infections including hospital-acquired infections in immune compromised patients.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative bacterium that is multi-resistant to various antibiotics, which has led to the use of phytotherapy.

The essential oils of medicinal plants were prepared from the aerial part of two plants that contain substances, and a huge source of bioactive molecules, with numerous antimicrobial and anti-infectious activities, that can be used for therapeutic purposes.

The aim of this study is to evaluate the antimicrobial activity of clove essential oil, which has an inhibitory effect on *P. aeruginosa*, and to compare it with EO from *Cistus munbyi*, a little studied plant from western Algeria.

These essential oils showed different activities, the OE of cloves recorded very good antimicrobial activities on all the microbial strains tested. However, the effect of *Cistusmunbyi* was less significant.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, essential oils, clove, *cistus munbyi*, antimicrobial effect.