

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Université de Ferhat abbas
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

جامعة فرحات عباس، سطيف
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Microbiologie appliquée

N°...../SNV /2024

THESE

Présentée par

BOUAOUINA sarah

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN 3^{EME} CYCLE L.M.D

Filière : **Biologie**

Spécialité : **Microbiologie appliquée**

THEME

Prévalence de la résistance aux antibiotiques des souches bactériennes cliniques , et effet des extraits de plantes et des biomolécules microbiennes sur les souches multirésistantes

Soutenu publiquement le..... 2024

DEVANT LE JURY:

Président
Promoteur
Examineur
Examineur
Examineur

Yahiaoui Bilal
Aouf Abdelhakim
El Koli Meriem
Sekhri-Arafa Nedjoud
Boubendir Abdelhafid

Professeur .UFA .Sétif
Professeur .UFA .Sétif
Professeur .UFA .Sétif
MCA . UFM.Constantine
Professeur UAB .Mila

Laboratoire de Microbiologie appliquée

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 32

Active
Accéder

اللهم إنا نسألك علما نافعا وقلبا خاشعا
وشفاء من كل داء وسقم

Dédicaces

Je dédie cette thèse à :

*A la mémoire de mon très cher et regretté père, mon plier, ma force
ma joie que dieu t'accueille dans son vaste paradis*

A ma chère maman

*Je ne trouverai jamais assez de mots pour t'exprimer toute ma
gratitude et mon affection. Qu'Allah t'accorde une longue et heureuse
vie*

Mes frères et sœur

*En témoignage de mon affection et ma profonde estime ; Je vous
souhaite beaucoup de bonheur et de réussite*

A mes belles sœurs Amel et Yasmine et à toute ma famille

*Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé durant toutes ces
années je vous souhaite le meilleur*

A mes amies et collègues

*En témoignage de mon attachement, et ma gratitude pour votre
soutien.*

Remerciement

Avant toute chose, Je remercie **DIEU** Tout Puissant, maître des cieux et de la terre, pour m'avoir donné la force, le courage, la patience et la santé pour mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Mr **Aouf Adbelhakim** de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail sans jamais épargner aucun effort et de m'avoir guidé dans le chemin de la recherche.

Sans votre clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables. Votre gentillesse et la disponibilité dont vous avez fait preuve en toutes circonstances.

Veillez cher Maître, trouvez dans ce travail l'expression de ma grande estime, mon respect et ma reconnaissance les plus sincères .

A tous mes collègues de laboratoire de microbiologie appliquée de Sétif, pour leur aide et collaboration et à tous mes collègues de laboratoire centrale de l'hôpital militaire de Constantine et particulièrement ; le Dr Khemissi Salim et Dr Meziani Amine pour leur disponibilité et leur aide précieuse.

A Mr Meziti Hichem pour sa patience et son aide.

A Mr Bariz Karim pour son aide si précieuse et ses conseils.

A Mr Yahiaoui , le directeur du laboratoire de microbiologie appliquée qui a toujours veillé au bon déroulement et fonctionnement de notre formation doctorale .

Mes sincère remerciement à Mr Yahiaoui Bilal , Mme Sekhri Nedjouda et Mme el Koli Meriem ainsi qu'au professeur Boubendir Abdelhafid d'avoir bien accepté de bien vouloir juger et présider ce travail et de nous avoir honoré de leur présence , leur conseils , et savoir , pour leur temps précieux.

Je remercie également le :

-Département de biologie, Université Princesse Nourah bint Abdulrahman, Riyadh , Arabie Saoudite.

-Food Science and Nutrition Département des sciences alimentaire et nutrition, Riyadh , Arabie Saoudite.

-Département des sciences alimentaires et de la nutrition, Faculté d'économie domestiqu ,Université Helwan , Égypte.

-Département de chimie des arômes, Centre national de recherche, Le Caire , Égypte.

-Le laboratoire centrale de l'hôpital régional universitaire de Constantine

Liste des abréviations

- ADN:** Acide Désoxyribonucléique
- ARN:** Acide Ribonucléotidique
- ATB :** Antibiotique
- ATCC:** American type culture collection
- BES:** Belgium extended-spectrum β -lactamase
- BGN-NF :** Bacille a Gram négatif non fermentaire
- BHI :** Brain heart infusion (milieu cœur cerveau)
- BHIB:** Brain heart infusion broth
- BL :** Bactéries lactiques
- BLSE :** β -lactamase à spectre élargie
- BMR:** Bactérie multi-résistante
- C1G :** Céphalosporine de première génération
- C2G :** Céphalosporine de deuxième génération
- C3G :** Céphalosporine de troisième génération
- C3G :** Céphalosporine de quatrième génération
- CASE :** Céphalosporinase
- CBN :** Céphalosporinase bas niveau
- CCM:** Chromatographie en couche mince
- CHN :** Céphalosporinase de haut niveau
- CLED :** Cystine-lactose-électrolyte déficient
- CLSI :** Cliniciel laboratory standards institut
- CMB :** Concentration minimale bactéricide
- CMI:** Concentration minimale inhibitrice
- CMY :** Cephamecinase
- CPG/SM :** Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- CTX-M:** Céfotaximase-Munich
- CV:** Cristal violet
- DD-test:** double disc test
- DHA:** Dhahran
- DHPS :** Dihydroptéroate synthétase

DLS: Dynamic light scattering

DMSO: Dimethyl sulfoxyde

DO : Densité optique

E-BLSE : Entérobactérie productrice de β -lactamase à spectre élargi

ECBU : Examen cytbactériologique des urines

FEC: Fécal *Escherichia coli*

g : Gramme

G+C%: Pourcentage en Guanine et Cytosine

GES: Guyana extended spectrum β -lactamase

GSC: Gélose au sang cuit

GSF: Gélose au sang frais

HD : Hydrodistillé

HE: Huiles essentielles

HPH: High pressure Homogenization

HPH: High speed Homogenization

HPLC: High performance liquid chromatography

I : Intermédiaire

LCR: Liquide céphalorachidien

LDH: Lactate déshydrogénase

LPS: lipopolysaccharide

MH: Mueller Hinton

MLS : Macrolides, lincosamides , streptogramines

mm : Millimètre

MRS: Man, Rogosa, sharpe

NDM: New Deli métallob- β -lactamases

nm: Nanomètre

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OXA: Oxacillinase

PABA: Acide papa-aminobenzoïque

Pase: pénicillinase

PBN: Pénicillinase bas niveau

PBP: Penicillin binding protein

PDI: indice de polydispersité

PER: *Pseudomonas* extended resistant

PHN: Pénicillinase haut niveau

PLP2a: Protéines liant les pénicillines

QS: Quorum sensing

R : Résistant

S : Sensible

SARM: *Staphylocoque aureus* résistant à la méticilline

SFM: Société française de microbiologie

SFO: *Serratia fonticola*

SHU: Syndrome hémolytique urémique

SHV: Sulfhydryl variable

TEM-1: TEMONEIRA

TLA: Tlahuicas - tribu indienne

TRI: TEM résistant aux inhibiteurs

TTC: Diphenyl-tetrazolium chloride

UFC :Unité formant colonies

VEB:Vietnam extended spectrum β -lactamase

VRE: Enterocoque résistant à la voncomycine

Sommaire	
Liste des abréviations	
List des figures	
List des tableaux	
Introduction.....	2

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Les antibiotiques	3
1.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques	3
1.2. Principales classes d'antibiotiques et leurs principales cibles bactériennes	
1.3. Résistance bactérienne	4
1.3.1. Résistance naturelle.....	6
1.3.2. Résistance acquise	6
1.4.1. Support et mécanismes génétiques de la résistance acquise.....	6
2-Chronologie de la résistance aux antibiotiques et découverte des mécanismes de résistance.....	8
3-Mécanismes de résistance	
biochimiqu multi-résistantes (BMR)	11
3.1. Les bactéries multirésistantes d'intérêt cliniques	11
4-Les infections nosocomiales	13
5-Situation épidémiologique en	
Algérie.....	13
7. Plantes aromatiques médicinales.....	15
7.1. Monographie des plantes étudiées.....	15
7.1.1. Le Thym.....	15
7.1.2. Description botanique	15
7.1.3. Position systématique.....	16
7.2.1. L'origan.....	16
7.2.2 Description botanique.....	16
7.2.3. Position systématique selon.....	16
7.3.1. La Menthe.....	17
7.3.2. Description botanique	17
7.3.3. Position systématique.....	17
7.4.1. Le Romarin	18

7.4.2. Description botanique.....	18
7.4.3. Position systématique selon.....	18
7.5.1. La Sauge	18
7.5.2. Description botanique.....	18
7.5.3. Position systématique	19
7.6.1. Le Géranium	19
7.6.2. Description botanique.....	19
7.6.3. Position systématique	19
7.2. Les huiles essentielles	20
7.2.1. Méthode d'extraction	20
7.3. Activité biologique des huiles essentielles ...	21
7.4. Les constituants des huiles essentiels.....	22
7.5. Mode d'action des huiles essentielles.....	24
7.6. Techniques d'analyses des huiles essentiels.....	25
7.6.2. Chromatographie en phase gazeuse.....	25
7.6.3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	25
7.6.4. Chromatographie liquide à haute performance.....	25
8. L'encapsulation.....	26
8.1. Principe de la nanoencapsulation.....	27
8.2. Techniques d'encapsulation et matériaux utilisés	27
9-Batéries lactiques et effet antibactérien	28
9.1. Bactéries lactiques	28
9.1.1. Bactéries lactiques homofermentaires.....	28
9.1.2. Bactéries lactiques hétérogermentaires	28
9.2. Taxonomie des bactéries lactiques.....	29
9.3. Le genre <i>Lactobacillus</i>	30
9.4. Composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques.....	30

9.5. Classification des bactériocines	31
---	----

MATERIAL ET METHODES

Contexte d'étude et lieu de stage

1.2. Souches de référence.....	34
1.3. Souches cliniques	34
1.4. Critères d'inclusion.....	34
1.5. Critères d'exclusions.....	35
1.6. Techniques de prélèvement	35
1.7. Démarche diagnostique.....	36
1.7.1. Examen macroscopique	36
1.8. Mise en culture des prélèvements.....	39
1.9. Identification des bactéries	39
1.9.1. Principe des plaquettes RapID™ ONE	
1.9.2. Tests biologique	40
IV.10.1. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	40
1.10.2. Test de synergie.....	42
1.10.3. Test du double disque (test espagnol)	43
1.10.4. Test sur gélose à la cloxacilline.....	43
1.11. Conservation des souches	44
1.12. Extraction des huiles essentielles.....	44
1.12.1. Matériels végétales	45
1.12.2. Extraction de l'huile essentielle	45
1.13. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	46
1.13.1. Méthode de la ligne radiale (radial streak method)	47
1.14. Formulation de la nanoencapsulation et la nanoémulsion de l'huile essentielle de l'origan (<i>Origanum glandulosum</i>)	47
1.14.1. Analyse de la taille et charge des particules des nanoformulations.....	47

1.15. Etude de la composition chimique des huiles essentielles hydrodistillées (HD) et des nano-formulations.....	48
1.15.1. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	48
1.16 .Détermination de l'activité antibacteriennes.....	49
1.16.1. Test de diffusion en milieu solide (Aromatogramme).....	49
1.16.2. Test de diffusion en milieu liquide (evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par la technique de microdilution)	49
1.16.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide.....	50
1.17. Mise en évidence de la formation de biofilm.....	51
1.18. Activité antibiofilm de l'huile essentielle(HD) et des nanoformulations de l'origan.....	52
1.19. Isolement et caractérisation des bactéries lactiques	53
1.18.1. Examen macroscopique	53
1.18.2. Examen microscopique	53
1.19. Recherche de la catalase.....	53
1.20. Production de CO ₂ à partir du glucose.....	53
1.21. Évaluation de la cinétique de croissance et de production.....	53
1.22. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	53
1.22.1. Technique direct	54
1.22.2. Technique indirect.....	54
1.22.3. Mise en évidence de l'agent inhibiteur	54
1.23. Analyse statistique.....	54

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude prospective.....	56
1.1 Souches bactériennes	56
1.2. Répartition des souches par service.....	56
1.3. Répartition des souches en fonction du type de prélèvement.....	57
1.4. Répartition des souches par sexe.....	57
2.1. Fréquence et répartition des BMR par famille bactérienne	58
2. Fréquence d'isolement des bactéries multi-résistantes (BMR).....	59
2.2. Caractéristiques de la population	59

2.2.1. Facteurs de risques de portage de BMR.....	59
2.4. Répartition des BMR en fonction du service d'hospitalisation	61
2.5. Répartition des souches résistantes par type de prélèvements.....	62
2.6. Répartition des BMR en fonction du sexe	63
2.3. Répartition des BMR isolées par catégorie d'âge.....	63
2.2.2 .Taux de décès chez les patients hospitalisés.....	64
3. Profil de résistance aux antibiotiques... ..	65
3.1. Résistance des entérobactéries (BLSE)	65
3.2. Résistance des souches de <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. baumannii</i> aux différentes classes d'antibiotiques	66
3.3. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
4. Phénotypes probables de résistance des entérobactéries aux bêta-actamines.....	69
4.1. Phénotypes du groupe I	69
4.2. Répartition des phénotypes de résistance du groupe II.....	70
4.3. Répartition des phénotypes des résistance du groupe III	71
4.4. Répartition des phénotypes de résistance du groupe V.....	71
5. Etude rétrospective.....	72
5.1 Fréquence d'isolement et identification des souches par famille bactérienne.....	72
5.2 Répartition des souches par espèces.....	72
5.3. Répartition des souches isolées par type de service.....	73
5.4. Répartition des souches en fonction du type de prélèvement.....	74
5.5. Répartition des souches par sexe.....	74
5.6. Fréquence d'isolement des souches par mois	75
6. Résistance aux antibiotiques... ..	75
6.1. Résistance des entérobactéries aux différentes familles d'antibiotiques	75
6.2. Résistance aux antibiotiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	76
6.3. Fréquence de résistance aux antibiotiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Acinetobacter baumannii</i>	77
7. Répartition des entérobactéries BLSE par espèce	78
7. Rendements des huiles essentielles	79
8. Résultats du screening primaire (radial streak line).....	80
9. Taille et charge des particules.....	81
10. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles	82
11. Composition chimique des nanoformulations (nanoémulsion et nanoencapsulation).....	85
12. Activité antibactérienne	88

12.1. Résultats de l'activité antibactérienne des trois huiles essentielles (<i>Salvia officinalis</i> , <i>Origanum glandulasom</i> et <i>Thymus vulgaris</i>) testé en milieu solide (Aromatogramme)	88
12.2. Résultats de l'activité antibactérienne des nano-formulations en milieu solide (Aromatogramme).....	90
12.3. Résultats de l'activité antibactériennes des huiles essentielles en milieu liquide et solide (CMI et CMB).....	91
12.4. Résultats de l'activité antibactérienne de la nanoemulsion et nanoencapsulation en milieu liquide.....	93
13. Mise en évidence des souches formatrices de biofilm.....	94
14. Activité antibiofilm de l'huile essentielle de l'origan et ces nanoformulations sur les souches cliniques et de références	95
15. Caractérisation macroscopique des bactéries lactiques	97
16. Caractérisation microscopique des bactéries lactiques	97
17. Test biochimique.....	97
17.1. Recherche de catalase.....	97
17.2. Production de CO ₂ à partir de glucose.....	97
18. Cinétique de l'acidité et mesure de la croissance.....	98
19. Activité antibactérienne	99
19.1. Technique direct.....	99
19.2. Technique indirecte (Surnageant brute).....	101
19.3. Test indirect (Surnageant traité).....	102
.Conclusion.....	103

List des figures	
Figure	pages
Figure 1 : Chronologie de la découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle (vert) et d'origine synthétique (orange)	3
Figure 2 : Cibles bactérienne des principales classes d'antibiotiques	6
Figure 3 : Modes d'acquisition des gènes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries	7
Figure 4 : Mode d'action des bêta-lactamases a serine (a) et des métallo-bêta-lactamases contre l'amoxicilline	10
Figure 5 : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques	11
Figure 6 : Répartition des différents mécanismes et gènes de résistances aux antibiotiques sur le territoire algérien	14
Figure 7 : Photo de A : <i>Thymus vulgaris</i> , B: <i>Mentha pulegium</i> et C: <i>Origanum glandulosum</i>	17
Figure 8 : Photo de A: <i>Pelargonium roseum</i> , B : <i>Rosemarinus officinalis</i> et C : <i>Salvia officinalis</i>	20
Figure 9 : Schéma descriptive du dispositif d'une extraction par hydrodistillation	21
Figure 10 : Structure chimique des principaux composés des huiles essentielles	23
Figure 11 : Actions des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	24
Figure 12 : Les différentes étapes de formation de la nanoemulsion	27
Figure 13 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques	29
Figure 14 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i>	30
Figure 15 : Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique	38
Figure 16 : Résultat de la galerie rapid one après inoculation par une suspension Bactérienne	40
Figure 17 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie	42
Figure 18 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque	43
Figure 19 : Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type clavenger	45
Figure 20 : Test préliminaire (radial streak method) de l'huiles essentielle du thym sur une gamme de bactérie résistante	47
Figure 21 : Dispositive du DLS utilisé pour l'analyse de la taille et la charge des particules de la nanoemulsion et nanoencapsulation	48
Figure 22 : Plan d'une microplaque pour la réalisation de la CMI en milieu liquide	50
Figure 23 : Détermination de CMB en milieu solide	51
Figure 24 : Mise en évidence de la formation de biofilm chez <i>A.baumannii</i> par le cristal violet (CV)	52
Figure 25 : Méthode de mise en évidence de l'activité antibactérienne en milieu solide a : Technique de spot agar et b : Technique des puits	54
Figure 26 : Fréquence d'isolement des différentes espèces bactériennes en fonction des services	57

Figure 27 : Fréquence d'isolement des BMR en fonction de la famille bactérienne	58
Figure 28 : Répartition globale des BMR selon les espèces bactériennes.	59
Figure 29 : Répartition des BMR selon les services hospitaliers.	62
Figure 30 : Répartition des BMR selon la nature des prélèvements	62
Figure 31 : Répartition des souches des BMR selon le sexe.	63
Figure 32 : Répartition des BMR selon la nature des prélèvements	64
Figure 33 : Taux de décès chez les patients admis à HMRUC	64
Figure 34 : Détection des souche sécretrices de BLSE par le test de synergie	68
Figure 35 : Détection des céphalosporinaes en absence de cloxacilline (A) et en absence de la cloxacilline (B) chez une souche de <i>K.pneumoniae</i>	69
Figure36 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines du groupe I	70
Figure 37 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines du groupe II	70
Figure 38 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines du groupe III	71
Figure 39 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines du groupe V	71
Figure 40 : Fréquence d'isolement par famille bactérienne	72
Figure 41 : Fréquence d'isolement des souches par espèce	73
Figure 42 : Fréquence d'isolement des souches en fonction du type de service	73
Figure 43 : Fréquence d'isolement des souches par type de prélèvement	74
Figure 44 : Fréquence d'isolement par sexe	74
Figure 45 : Fréquence d'isolement des bactéries par mois	75
Figure 46 : Fréquence d'isolement des E-BLSE en fonction de l'espèces	78
Figure 47 : Aspect et couleur de l'huile essentielle de l'origan (<i>Origanum glandulosum</i>)	80
Figure 48 : Screening primaire de l'huile essentielle du thym (<i>Thymus vulgaris</i>).....	81
Figure 49 : Distribution de la charge et la taille des particules de l'huile essentielle de l'origan (A) : nanocapsule et (B) nanoemulsion	82
Figure 50 : Pourcentage des principales familles chimique de HE de <i>Origanum glandulosum</i>	84
Figure 51 : Pourcentage des principales famille chimique de HE du <i>Thymus vulgaris</i>	84

Figure 52: Pourcentage des principale famille chimique de HE de la <i>Salvia officinalis</i>	85
Figure 53 : Détection des principale familles chimique dans la nano-émulsion	87
Figure 54 : Détection des principales familles chimique dans la nano-encapsulation	87
Figure 55 : Diamètre d'inhibition obtenu avec l'huile essentielle de <i>T. vulgaris</i> vis a vis de la souche <i>A.baumannii</i>	89
Figure 56: Diamètre d'inhibition obtenu avec l'huile essentielle de <i>T. vulgaris</i> vis a vis de la souche <i>P.aeruginosa</i>	89
Figure 57 : Diamètre d'inhibition de la nano-émulsion vis-à-vis des souches (A) : <i>A.baumannii</i> et (B) : <i>E.coli</i>	90
Figure 58 : Microplaque de 96 puits inoculé par une souche de <i>E.coli</i> et l'huile essentielle de l'origan	92
Figure 59 : Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) chez une souche de <i>E .coli</i>	93
Figure 60: Mise en évidence de la formation de biofilm par la méthode de coloration au CV chez la souche de <i>A.baumannii</i>	94
Figure 61 : Effet inhibiteur de la formation de biofilm de la nanoemulsion sur les souches sélectionnées	95
Figure 62 : Effet inhibiteur de la formation de biofilm de l'huile essentielles de l' <i>O.glandulosum</i> HD sur les souches sélectionnées	95
Figure 63 : Effet inhibiteur de la formation de biofilm de la nanoencapsulation sur les souches sélectionnées	96
Figure 64 : Aspect des colonies de <i>Lb.plantarum</i> obtenus sur milieu MRS solide	97
Figure 65 : Absence de la production de gaz dans la cloche à partir du glucose en milieu MRS liquide	98
Figure 66 : Détermination des paramètres (A) Ph et (B) DO d'une culture de souche de <i>Lb.plantarum</i>	99
Figure 67 : Activité antibactérienne de <i>L.plantarum</i> par méthode de spot contre <i>L.innocua</i> CLIP 74915	100
Figure 68: Activité antibactérienne de <i>L.plantarum</i> par méthode de spot contre <i>A.baumannii</i>	101
Figure 69 : Activité antibactérienne du surnageant traité vis a- vis de <i>A.baumannii</i>	102

Liste des tableaux

Liste des tableaux	
Titre	pages
Tableau 1 : Modes d'action des principales classes d'antibiotiques	5
Tableau 2 : Développement des agents antimicrobiens et émergences des souches résistantes	9
Tableau 3 : Les principaux constituants des huiles essentielles (HEs) à activité antibactérienne	26
Tableau 4 : Principales bactériocines et leurs cibles bactériennes	33
Tableau 5 : Antibiotiques testés	41
Tableau 6 : Concentration en cloxacilline en fonction du groupe bactérien	44
Tableau 7 : Différents plantes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles	45
Tableau 8 : Les souches bactérienne utilisées pour déterminé l'activité antibactérienne des huiles essentielles	46
Tableau 9 : Répartition des souches bactériennes par espèce	56
Tableau 10 : Répartition des souches bactérienne isolées en fonction du sexe	57
Tableau 11 : Caractéristiques des patients ayant développées une infection nosocomiale	60
Tableau 12 : Fréquence de résistance des différentes souches d'entérobactéries isolées	65
Tableau 13 : Fréquence de résistance des souches de <i>P.aeruginosa</i> et <i>A.baumannii</i>	67
Tableau 14 : Taux de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis de différents antibiotiques	68
Tableau 15 : Fréquence de résistance aux antibiotiques des entérobactéries	76
Tableau 16 : Fréquence de résistance des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> aux différents antibiotiques	77
Tableau 17 : Fréquence de résistance des souches de <i>A.baumannii</i> et <i>P.aeruginosa</i>	78
Tableau 18 : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles hydro-distillées	79
Tableau 19 : Résultat du test préliminaire des six différentes huiles essentielles sur une gamme de souches pathogènes	80
Tableau 20 : Taille et charges des particules obtenus des nano-émulsion et nano-encapsulation	81
Tableau 21 : Composition chimique des huiles essentielles de (<i>O.glandulosum</i> , <i>T.vulgaris</i> et <i>S. officinalis</i>)...	83
Tableau 22 : Composition chimique de la nanoémulsion et la nanoencapsulation de <i>Origanum glandulosum</i>	86
Tableau 23 : Activité antibactérienne des huiles essentielles hydrodistillée (<i>T. vulagaris</i> , <i>O. glandulosum</i> et <i>S. officinalis</i>) en milieu solide exprimé en zone d'inhibition	88

Tableau 24 : Activité antibactérienne de la nano-émulsion et nano-encapsulation en milieu solide vis -à vis des souches pathogènes exprimé en zone d'inhibition	90
Tableau 25 : Activité antibactérienne des trois huiles essentielles (<i>O.glandulasum</i> , <i>T.vulagaris</i> et <i>S.officinalis</i>) vis-à-vis des souches pathogènes en milieu liquide et solide	91
Tableau 26 : Résultats de l'activité antibactérienne des nano-formulations en milieu liquide	93
Tableau 27 : Evaluation de la formation de biofilm in vitro	94
Tableau 28 : Diamètres d'inhibition obtenu par la méthode spot sur milieu MRS solide	100
Tableau 29 : Diamètres d'inhibition obtenu par la technique indirecte (cas du surnageant brute) sur milieu MRS solide	101
Tableau 30 : Diamètres d'inhibition obtenu par la méthode indirecte (cas du surnageant traité)	102

Résumé

Les antibiotiques, utilisés dans le traitement des infections bactériennes, sont l'une des avancées majeures de la médecine humaine du 20^{ème} siècle. Cependant cette découverte s'est accompagnée par l'émergence et la dissémination de souches résistantes aux antibiotiques. Les principales espèces de bactéries pathogènes rencontrées dans les milieux hospitaliers et dans la communauté sont principalement : les entérobactéries productrices de bêta-lactamases, les bactéries à Gram négatif non-fermentaires résistantes à l'imipénem, et la ceftazidime ainsi que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline; la recherche d'alternative devient plus que nécessaire dans le but de lutter contre ce problème de santé majeur. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits de quelques plantes médicinales (*Origanum glandulosum*, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Pelargonium roseum*, *Rosemarinus officinalis* et la *Menthe pouliot*) et des biomolécules microbiennes sur des souches des références et multi-résistantes, et la recherche de molécules inhibitrices de la formation des biofilms. Un total de 323 prélèvements a été effectué, et 196 souches ont été collectées durant 3 mois à partir de différents prélèvements reçus au laboratoire centrale de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine; le groupe bactérien prédominant est représenté principalement par les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (E-BLSE) avec un taux de (27.47%) et une résistance marquée aux β -lactamines (ampicilline : 100%, amoxicilline 100% et l'amoxicilline-acide clavulanique). Une importante résistance vis-à-vis des aminosides et quinolones a été également observée, concernant les souches de *P.aeruginosa* et *A.baumannii*, la résistance aux antibiotiques a englobé les carboxypénicillines, les ureidopénicillines, les céphalosporines, et même les carbapénèmes. L'hydrodistillation des parties aériennes des 6 espèces de plantes médicinales (*O.glandulosum*, *T.vulgaris*, *S.officinalis*, *P.roseum*, *R.officinalis* et la *M. pouliot*) a donné des rendements en HE qui varient entre 0.15 et 2.09% (m/m). L'évaluation préliminaire de l'activité antibactérienne nous a permis de sélectionner les huiles essentielles (HEs) les plus actives dont : *O.glandulosum*, *T.vulgaris* et *S. officinalis*. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) a permis l'identification de 9 composés pour HE de l'origan; ainsi que pour le HE du thym et 14 composés pour HE de la sauge; l'HE de l'origan était caractérisé par une richesse en thymol (49.52%); alors que pour l'HE du thym et de la sauge, les composés chimiques majoritaires étaient représentées par le borneol (76.42%) et le camphor (39.62%) respectivement. Dans le but de maintenir la stabilité de l'HE contre certains facteurs environnementaux, l'encapsulation de HE de l'origan a été réalisée par homogénéisation à grande vitesse (HSH) en nanocapsules et par homogénéisation à haute pression (HPH) en nanoémulsion. Les deux formulations ont montré une activité relativement significative contre la forme sessile et à l'état de biofilm à des concentrations sub-inhibitrices. La recherche de l'antagonisme bactérien par les souches de *Lb.plantarum* dans le milieu solide a été réalisée suivant la méthode de double couche et la diffusion en puits. Cette étude a permis de mettre en évidence les fréquences et niveaux de résistance des BMR en milieu hospitalier, les résultats obtenus suggèrent que les HEs notamment celle de l'origan peuvent servir dans la prévention et le traitement des infections bactériennes.

Mots clés : huiles essentielles, CPG/SM, résistance bactérienne, bactérie lactique, activité antibactérienne, nanocapsules

ملخص

المضادات الحيوية، المستخدمة لعلاج الالتهابات البكتيرية، هي واحدة من أهم التطورات في الطب البشري في القرن العشرين. ومع ذلك، فقد رافق هذا الاكتشاف ظهور وانتشار سلالات مقاومة للمضادات الحيوية. الأنواع الرئيسية من البكتيريا المسببة للأمراض الموجودة في المستشفيات وفي المجتمع هي بشكل أساسي: Enterobacteriaceae التي تنتج (BLSE)، وعصيات غير مخمرة سلبية الغرام مقاومة لـ imipinème ، و ceftazidime بالإضافة إلى *Staphylococcus aureus* المقاومة لـ methicillin، في هذا السياق، يتمثل الهدف الرئيسي من هذا العمل في تقييم تأثير ستة نباتات طبية *S. glandulosum*, *T. vulgaris* , *O. glandulosum*, *T. vulgaris* , *S. officinalis*; *P. Roseum*; *R. officinalis* *M. pouliot* والأغشية الحيوية، على مدار ثلاثة أشهر، تم استقبال 323 عينة مختلفة من المرضى في المختبر المركزي للمستشفى العسكري الجامعي الإقليمي بقسنطينة ، أظهرت تحاليل هذه العينات أن أكثر من 60% (196) كانت إيجابية. وشكلت البكتيريا المعوية المجموعة السائدة من البكتيريا (27,47%) وكانت هذه المجموعة مقاومة بشكل كبير لـ quinolones و aminoglycosides وكانت العصيات غير المتخمرة (*P. aeruginosa* و *A. baumannii*) مقاومة مع وجود نسبة مقاومة كبيرة *S. aureus* مقاومة عالية لـ *tétracycline* و *bêta-lactamines* (*penicilline G*, *oxacilline*, *céfotaxime*) و *gentamicine*، تم استخلاص الزيوت العطرية عن طريق التقطير المائي من الأجزاء الهوائية للنباتات الطبية التي تم جمعها. تراوحت عوائد التي تم الحصول عليها من 0.5 إلى 2.09% (م/م). وأظهر تقييم النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام اختبار الانتقائية ان *O. glandulosum*, *T. vulgaris*, *S. officinalis* كانت الأكثر فعالية واتسم تحليل الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بقياس الطيف الكتلي (GC/MS) بتحديد الكتلي أن المركب الرئيسي ذو نشاط بيولوجياً في زيت *Origan* (49.52%) هو *thymol*؛ و بينما واتسم زيت *la sauge* و *thym* بالمركبات الكيميائية الرئيسية ممثلة في *Borneol* (76.42%) و *Camphre* (39.62%) على التوالي ؛ من أجل الحفاظ على استقرار الزيوت ضد عوامل بيئية معينة، تم إجراء تغليف زيت *origan* عن طريق التجانس عالي السرعة (HSH) في الكبسولات النانوية وتجانس الضغط العالي (HPH) في المستحلب النانوي، أظهرت كلتا التركيبتين نشاطاً مهماً نسبياً ضد الخلية البكتيرية والأغشية الحيوية عند التركيزات *sub-inhibitrice*. تم إجراء التحقيق في العداء البكتيري بواسطة سلالات *Lb. plantarum* في الوسط الصلب بطريقة الطبقة مزدوجة والانتشار البئر ؛ وهذه الدراسة تسمح بإظهار تواتر ومستوى مقاومة سلالات BMR . نتيج نتائج الدراسة الحالية إمكانية التوصية باستخدام زيوت *origan* الأساسية وتركيباتها النانوية كبديل لعلاج ومكافحة المقاومة سلالات مقاومة للمضادات الحيوية .

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية ؛ GC/SM, مقاومة البكتيريا ؛ بكتيريا حمض اللبنيك ، نشاط مضاد للبكتيريا , الكبسولات النانوية.

Abstract

Antibiotics, used to treat bacterial infections, are one of the most important advances in human medicine in the 20th century. However, this discovery has been accompanied by the emergence and spread of antibiotic-resistant strains. The main species of pathogenic bacteria found in hospital settings and in the community are mainly: *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases ESBL, Gram-negative non-fermenting bacilli resistant to imipenem, and ceftazidim as well as *Staphylococcus aureus* resistant to méthicilline, the search for an alternative becomes more than necessary ; in order to combat this major health problem .In this context, the objective of this work is to demonstrate the antibacterial activity of the extracts of some medicinal plants (*Origanum glandulosum* , *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Pelargonium .roseum* , *Rosemarinus officinalis* and *Menthe pulegium*)and microbial biomolecules on reference and multi-resistant strains, and the search for molecules inhibiting the formation of biofilms. A total of 323 samples were perform, and 196 strains were collected over 3 months from various samples received at the central laboratory of the military regional university hospital of Constantine; the predominant bacterial group is mainly represented by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (E-BLSEs) with a level of (27.47%) and marked resistance to betalactams (Ampicillin: 100%, Amoxicillin 100% and Amoxicillin –clavulanate) .

A significant resistance against quinolones and aminosides were also observed , concerning the strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* resistance to antibiotics include carboxypenicillins,ureidopenicillins,cephalosporins, and even carbapenems . Hydrodistillation of the aerial parts of the 6 species of medicinal plants (*Origanum glandulosum* *Thymus vulgaris* , *Salvia officinalis* *Pelargonium .roseum* , *Rosemarinus officinalis* and *Menthe pulegium*) gave essential oil (EO) yields range from 0.5 to 2.09% (m/m).Preliminary evaluation of antibacterial activity allowed us to select the most active EOs :*O.glandulosum*, *T.vulgaris* and *S. officinalis* . Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) allowed the identification of 9 compounds for oregano EO and thyme EO , and 14 compounds for sage EO ; oregano essential oil was characterized by thymol richness (49.52); while thyme and sage EO, the major chemical compounds were represented by borneol (76.42%) and camphor (39.62%) respectively. In order to maintain the stability of the EO against certain environmental factors, the encapsulation of EO oregano was carried out by high-speed homogenization (HSH) in nanocapsules and by high-pressure homogenization (HPH) in nanoemulsion, both formulations exhibited relatively significant activity against the sessile form and in the biofilm state at sub-inhibitory concentrations.

The investigation of bacterial antagonism by *Lb. plantarum* strains in the solid medium was carried out by the double layer method and diffusion in the well .This study made it possible to demonstrate the frequency and level of resistance of the MDR strains in a hospital environment, the results obtained suggest that the EOs, in particular the EO of oregano, could be used in the prevention and treatment of bacterial infections.

Key words: essential oils , GC/MS, bacterial resistance , lactic acid bacteria , antibacterial activity , nanocapsule

INTRODUCTION

Introduction générale

A l'aube du XXe siècle, la découverte des antibiotiques a permis une réduction massive de la mortalité due aux infections autrefois incurables, et contribue à révolutionner la médecine moderne. Cependant suite à la multi-exposition fréquente des germes à différents antibiotiques à usage thérapeutique notamment, et l'usage inapproprié en milieu agro-alimentaire ou environnemental (Aouni et *al.*, 2013). les bactéries sont devenues résistantes aux diverses classes d'antibiotiques disponibles sur le marché, cette résistance s'est généralisée quelle que soit l'espèce bactérienne concernée, certaines bactéries sont devenues multi-résistantes, telles que les staphylocoques notamment *S. aureus* et les entérobactéries ainsi que les bacilles à Gram négatif non fermentaires (*P. aeruginosa* et *A. baumannii*). Ces pathogènes sont capables de provoquer des symptômes variés allant de l'atteinte localisée bénigne à la septicémie potentiellement létale (Amri et *al.*, 2014).

Parmi les bactéries multi-résistantes (BMR), les bactéries sécrétrices des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), prennent une place de plus en plus importante. Depuis leur première mise en évidence en 1983, elles ont largement été diffusées dans le monde (Paterson et Bonomo, 2005). L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie et a conduit à une impasse thérapeutique (Guinoiseau, 2010). A l'heure actuelle le corps médical se trouve confronté à une augmentation critique du phénomène de la résistance bactérienne ; et la synthèse industrielle médicamenteuse révèle aujourd'hui sa principale limite : notamment due au développement bien trop lent de nouvelles molécules thérapeutiques par rapport aux capacités d'adaptation bactérienne. Pour sortir de ce cercle vicieux, la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques devient indispensable (Amri et *al.*, 2014). La biodiversité étant la plus grande et variée des sources de substances actives, l'exploitation des ressources naturelles semble une alternative prometteuse (Amri et *al.*, 2014). Les molécules bioactives d'origine naturelle reçoivent une grande attention (Tajkarimi et *al.*, 2010). En particulier les extraits des plantes aromatiques et médicinales qui ont été largement utilisés à des fins thérapeutiques, dans la parfumerie, la cosmétique ou comme agents aromatisants (Hyldgaard et *al.*, 2012).

Dans divers pays, les plantes aromatiques et médicinales continuent de représenter une part importante des moyens thérapeutiques utilisés dans la médecine traditionnelle. La flore algérienne est extrêmement riche et variée en plantes aromatiques et médicinales qui poussent spontanément et dont un grand nombre est endémique. Les huiles essentielles en particulier font l'objet de nombreuses études. Du fait de leur diversification et de la nature chimique de leurs constituants et de leurs actions multiples, elles trouvent de grandes perspectives d'application dans divers domaines (Lang et Buchbauer, 2011).

Plusieurs études ont confirmé leurs activités anticancéreuses, antivirales, anti-acariens, antioxydantes, antifongiques et antibactériennes avec un large spectre (Burt, 2004; Bakkali et *al.*, 2008; Lang et Buchbauer, 2011). Cependant la détérioration oxydative et la perte de composés volatils contenus dans les huiles essentielles, notamment lorsque ils sont exposés à la lumière, la chaleur, et l'oxygène limite leur stabilité et leurs activités biologiques, l'incorporation de ces derniers dans un système d'encapsulation pourrait être une bonne approche pour préserver ces composés et maintenir leurs caractéristiques biologiques et fonctionnelles (Bakry et *al.*, 2016 ; Velasco et *al.*, 2003).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à étudier six plantes endémiques de la flore algérienne, représentée par *Origanum glandulosum* Desf., *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Pelargonium roseum*, et *Mentha pulegium* L. (menthe pouliot), collectées dans différentes localités en Algérie (Sétif, Constantine et Béjaia).

Les objectifs fixés par la présente étude sont :

1. Détermination du niveau de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries ; les bacilles à gram négatif non fermentaires et les souches de *Staphylococcus aureus* au niveau de différents services à l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC).
2. Détermination phénotypique des souches multi-résistantes représentées par les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM), les entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre étendu (E-BLSE) ; ainsi que *P. aeruginosa* et *A. baumannii* multi-résistants.
3. Extraction des huiles essentielles à partir de six plantes médicinales aromatiques et la sélection des huiles les plus actives sur les souches multi-résistantes.
4. Détermination de la composition chimique des HEs sélectionnées par CPG/SM.
5. Évaluation du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (HE) sélectionnées sur une collection de souches multi-résistantes (BMR).
6. Évaluation de l'activité antibactérienne, antibiofilm, et détermination de la composition chimique par CPG/SM des nanoformulations de l'huile la plus active sur les BMR.

CHAPITRE I
RESISTANCE BACTERIENNE ET
INFECTION NOSOCOMIALE

Chapitre I - Résistance bactérienne et infections nosocomiales

1-Les antibiotiques :

Le terme « antibiotique » fait référence à tous les dérivés souvent produits naturellement par le métabolisme des microorganismes. Ces molécules sont des métabolites secondaires possédant une activité antibactérienne à faible dose. Leur action est soit bactéricide ou bactériostatique. Leurs cibles sont souvent des structures bactériennes (Paroi, Ribosomes, ADN, etc.). Elles ont une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes (Cellules de l'hôte) (Bryskier,2005)

1.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques

La pénicilline est le premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium* sp. (Fig. 1), marque le début de l'ère antibiotique. Elle appartient à la classe des β -lactamines. Sa découverte a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les phénylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogramines et les β -lactamines de deuxième génération. Une troisième génération de β -lactamines a été commercialisée à la fin des années 1970 : les carbapénèmes.

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

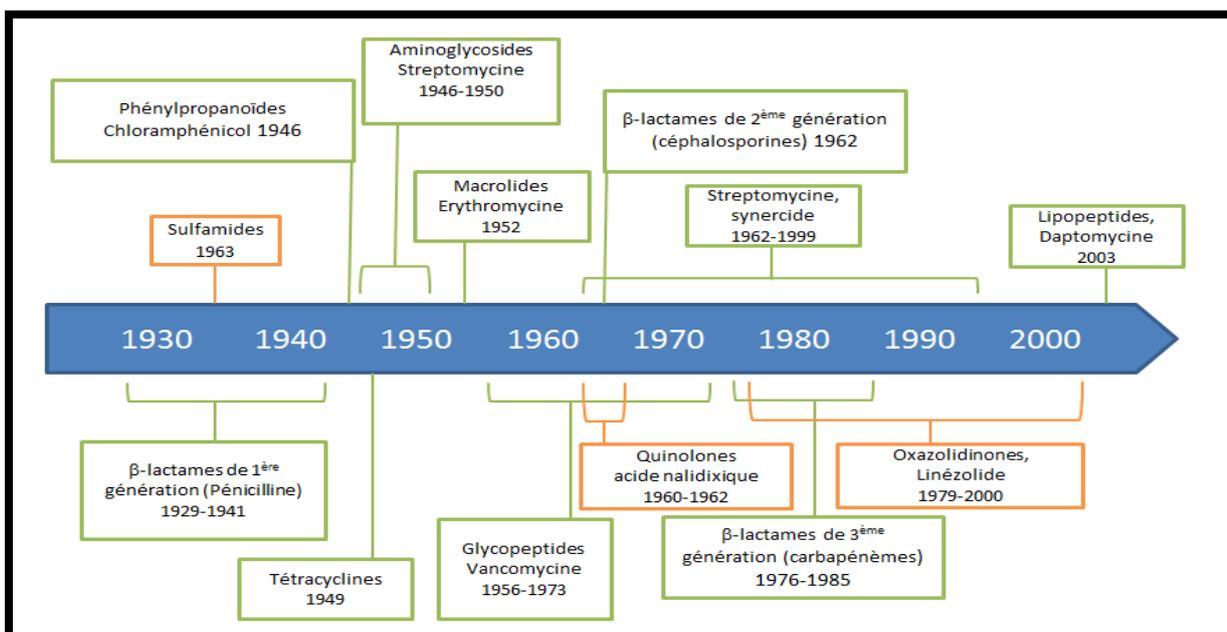


Figure 1: Chronologie de la découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle (vert) et d'origine synthétique (orange) (Singh et Barrett, 2006)

1.2. Principales classes d'antibiotiques et leurs principales cibles bactériennes :

La classification des antibiotiques peut se faire selon leur origine (naturelle ou synthétique), leur mécanisme d'action sur la bactérie, leur spectre d'activité ou encore leur nature chimique. Les principaux mécanismes d'action diffèrent selon la molécule considérée. Ainsi, les antibiotiques peuvent agir sur : (1) la paroi bactérienne ; (2) la membrane interne ; (3) le génome bactérien ; (4) la synthèse protéique ; ou (5) la synthèse des folates (**Tab.1**).

A-Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne :

Certains antibiotiques bloquent la synthèse d'éléments de la paroi bactérienne, dont le rôle est de maintenir la pression osmotique et protéger la bactérie du monde extérieur. La membrane de la cellule est alors fragilisée, et la lyse bactérienne survient. Ce blocage confère une activité bactéricide. Ce mécanisme est assuré par les β -lactamines (les pénicillines ou les céphalosporin), la fosfomycine, ou encore les glycopeptides (la vancomycine) (Rhayour, 2002).

B-Antibiotiques agissant sur membrane cytoplasmique de la bactérie :

Les polymyxines sont parmi les antibiotiques agissant sur la membrane. Elles diffusent à travers la paroi externe et interagissent avec les phospholipides membranaires en désorganisant la structure globale, provoquant la fuite du cytoplasme dans le milieu extracellulaire et la mort cellulaire (Rhayour, 2002).

C-Antibiotiques agissant sur la réplication de l'ADN :

Les quinolones ou la rifamycine pénètrent dans la cellule et interrompent ou bloquent la réplication de l'ADN bactérien ou la transcription de l'ADN en ARN, suivant différents mécanismes (Opatowski, 2020).

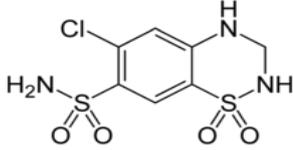
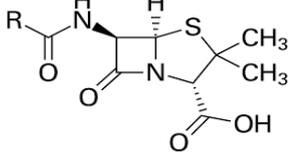
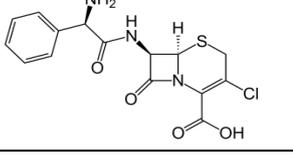
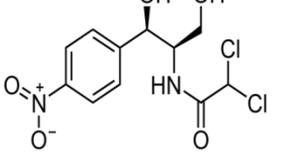
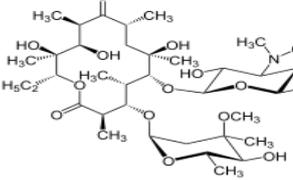
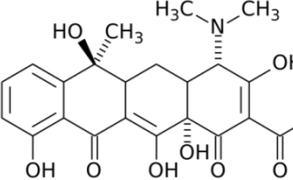
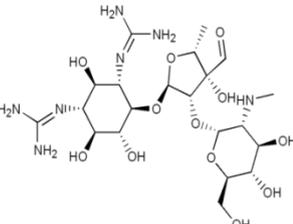
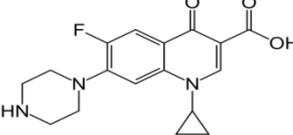
D-Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique :

Les antibiotiques interférant avec la synthèse protéique agissent soit sur la grande sous unité ribosomale (50S) comme les macrolides (erythro-, azithro-, clarithro- mycines), les lincosamides (clindamycine) et les phénicolés (chloramphénicol), ou sur la petite sous unité ribosomale (30S) comme les aminosides. L'action conduit à une inhibition de la synthèse protéique (initiation, formation de la liaison peptidique, erreurs de lecture, etc.) (Gazengel, 2007 ; Opatowski, 2020).

E- Antibiotiques agissant sur la synthèse d'acide nucléiques :

Les sulfamides agissent par inhibition compétitive de la DHPS (Dihydroptéroate synthétase ou dihydrofolate synthétase), enzyme de la voie métabolique de l'acide folique, en se substituant au PABA (par analogie structurale). Ils inhibent la dihydroptéroate synthétase, enzyme microbienne responsable de l'incorporation de l'acide para-aminobenzoïque dans l'acide dihydroptéroïque, précurseur de l'acide folique (Coyle,2005).

Tableau 1 : Modes d'action des principales classes d'antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

Classe	Origine	Exemple	Mode d'action	Structure
Sulfamide	Synthétique	Sulfa-méthoxazole	Inhibe la synthèse de l'acide folique	
β-lactamines de 1^{re} génération	Naturelle (<i>Penicillium notatum</i>)	Pénicillines	Inhibe la synthèse du peptidoglycane par blocage de la transpeptidation	
β-lactamines de 2^{eme} génération	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Céphalosporines		
Phénicolés.	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphénicol	Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	
Macrolides	<i>Streptomyces erythreus</i>	Érythro-mycine		
Tétracyclines	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tétracycline	Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome	
Aminoglycosid es	<i>Streptomyces</i> ou <i>Micromonospora</i>	- Stryptomycine - Gentamycine	Se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et bloquent en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture	
Quinolones et fluoroquinolones	Synthétiques	- Acide nalidixique - Ciprofloxacine	Inhibent la gyrase bactérienne	

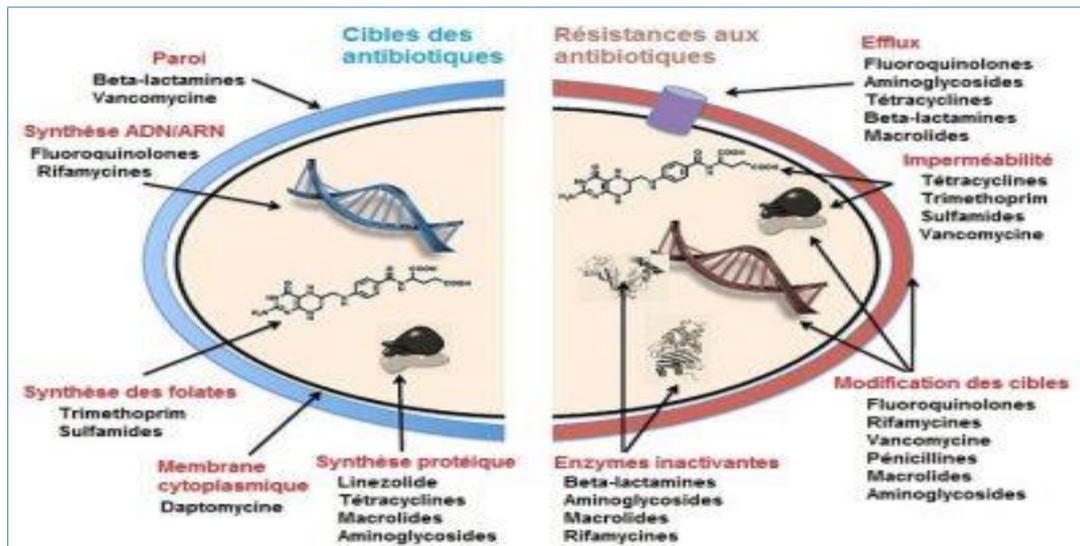


Figure 2 : Cibles bactériennes des principales classes d'antibiotiques (Max , 2018)

1.3. Résistance bactérienne :

L'introduction des antibiotiques en thérapeutique a représenté une révolution de la médecine ; Cependant, l'utilisation massive et parfois mal contrôlée de ces agents antibactériens a conduit à la sélection de bactéries résistantes à la plus part des antibiotiques, selon L'OMS ; une souche est dite « résistante » quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce, on distingue deux principaux type de résistance :

1.3.1. Résistance naturelle (ou intrinsèque) :

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou bien à l'absence de la cible. Par exemple, la résistance des entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* aux macrolides ou des bactéries à Gram négatif à la vancomycine. La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. Elle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale), lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable horizontalement d'une bactérie à l'autre (Yamashita et *al.*, 2000).

1.3.2. Résistance acquise :

La résistance acquise est présente seulement chez certaines souches de l'espèce. Cette résistance est souvent instable. Elle peut être due soit à une mutation spontanée, soit à l'acquisition des gènes par un autre microorganisme (Yamashita et *al.*, 2000).

1.4.1. Support et mécanismes génétiques de la résistance acquise :

Selon le support de la résistance acquise on distingue la résistance chromosomique ou extra chromosomique via des éléments mobiles (plasmides, transposons, intégrons) (Lozniewski et Rabaud, 2010)

A-Résistance par mutation chromosomique :

La résistance par mutation est peu répandue en clinique (moins de 20% des résistances acquises). Ce type de résistance est observé souvent chez les mycobactéries. Les résistances mutationnelles se caractérisent par les critères suivants :

- ✓ Spontanées : elles préexistent à l'utilisation de l'antibiotique.
- ✓ Stables : elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien.
- ✓ Spécifiques : elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une seule famille d'antibiotique.
- ✓ Rares : le taux de mutation se situe habituellement entre 10^{-7} et 10^{-8} (Leclerc, Gaillard, Simonet, 1995).

B-Résistance extra-chromosomique :

Les résistances extra-chromosomiques sont fréquentes (plus de 80% des résistances sont acquises). Les supports de ces résistances peuvent être des plasmides qualifiés plasmides R (R: résistance) ou des transposons acquis par conjugaison ou plus rarement par transduction. Ces résistances se transmettent horizontalement entre bactéries cohabitant donatrices et réceptrices de la même espèce et même entre différentes espèces (Leclerc, Gaillard, Simonet, 1995).

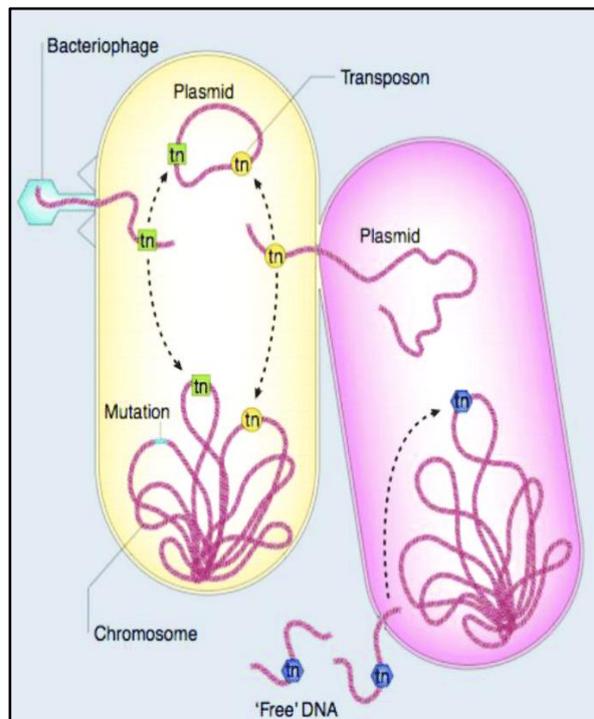


Figure 3 : Modes d'acquisition des gènes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004)

2-Chronologie de la résistance aux antibiotiques et découverte des mécanismes de résistance :

De nombreuses molécules d'antibiotiques ont permis d'offrir un arsenal thérapeutique diversifié pour traiter les maladies bactériennes. Le développement de molécules nouvelles a été motivé par l'apparition de résistance aux anciennes molécules chez des bactéries naturellement sensibles, les résistances aux antibiotiques ont suivi de près leur mise sur le marché (Davies et Davies , 2010).

En 1950 plus de 50% des souches résistantes à la pénicilline ont été décrites. Afin de contrer l'action de ces enzymes, de nouvelles molécules sont mises au point, il s'agit d'une part de nouveaux antibiotiques résistants à leur action tel que la méticilline dans le cas de *S. aureus*, cependant suite à la commercialisation de la méticilline, des souches résistantes sont signalées, 20 ans après le gène *mecA* codant pour les protéines de liaison de faible affinité à la pénicilline (PLP2a) a été identifié. Dans les années 60 et jusqu'au début des années 70, des épidémies hospitalières à SARM sont observées régulièrement en Europe.

Chez les entérobactéries, la première β -lactamine efficace fut l'ampicilline dont le spectre couvrait les entérobactéries ne produisant ni pénicillinase ou céphalosporinase. Malheureusement, peu de temps après l'introduction de l'ampicilline dans les années 60, la bêta-lactamase TEM-1 est mise en évidence chez une souche d'*E. coli* résistante. Le gène TEM-1 porté par un plasmide conjugatif diffuse rapidement au sein des entérobactéries mais également d'autres espèces bactériennes (Matthew, 1979).

Pour contrer la résistance liée à la production de bêta-lactamases TEM-1, plus de 20 molécules de céphalosporines sont mises au point, elles sont regroupées en 4 générations selon leurs spectre d'activité . En 1985, une épidémie à *Klebsiella pneumoniae* multi-résistante est déclarée dans un service de soin intensif et une nouvelle bêta-lactamase est mise en évidence, Il s'agit de la 1^{re} bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE). Des variants résistants à l'action des inhibiteurs de bêta-lactamase sont apparus peu de temps après ; afin de pouvoir traiter les patients de manière efficace ,de nouvelles molécules sont développées telles que les céphalosporines de 4^{ème} génération et les carbapénèmes dont l'imipénème .

Cependant, dès le début des années 90, les premières bêta-lactamases plasmidiques capables d'hydrolyser l'imipénème sont décrites d'abord chez *Pseudomonas aeruginosa* puis chez des entérobactéries (Briand, 2009).

Mais cette résistance n'atteint pas que les β -lactamines. La résistance aux aminosides fréquemment utilisées en association avec les β -lactamines pour leur action synergique apparait également peu de temps après leur mise sur le marché. Il en va ainsi de tous les antibiotiques et de toutes les espèces bactériennes. A l'heure actuelle, certaines souches sont si résistantes qu'il est impossible de trouver un traitement adapté.

Tableau 2 : Développement des agents antimicrobiens et émergence des souches résistantes (Saga et Yamaguchi , 2009)

Émergence des souches résistantes	Développement des antibiotiques
Emergence de <i>S.aureus</i> sécretrice de pénicillinase	1928 découverte de la pénicilline
	1935 découverte du sulfonamide
	1940 utilisation clinique de la pénicilline
Emergence des souches de <i>S.aureus</i> multirésistantes	1950 découverte des aminosides ,tetracycline,chloramphenicol et macrolide
	1956 découverte de la vancomycine
1961 SARM Souches de pneumocoque de sensibilité reduite a pénicilline	1960 synthèse de la méticilline
	1962 synthèse de l'acide nalidixique
1967 1974 souche <i>H. influenzae</i> productrices de pénicillinase	Développement des cephalosporine de 1ère génération
1977 souches de pneumocoque resistant a la penicilline	Développement des cephalosporines de 2 ^{ème} génération
1980 souche de <i>H.influenzae</i> productrices de β -lactamases	Développement des cephalosporines de 3 ^{ème} génération
1983 souches des enterobacteries productrices de BLSE	-Monobactames -Quinolones
1986 enterocoque resistant a la vancomycine -Augmentation des infections de BLSE, ERV et SARM	
Année 1990 -Augmentation de la résistance du gonocoque -Augmentation de la résistance aux fluoroquinolones	Utilisation croissante des cephalosporines de 3 ^{ème} generation , cephalosporine orale, carbapénèmes et fluoroquinolones
Année 2000 -Augmenation des nombres de souches de <i>P.aeruginosa</i> multirésistant	Dimunution du développement de nouveaux agents antimicrobiens

3-Mécanismes de résistance biochimique :

Afin de contrer l'action des antibiotiques, les bactéries ont développé plusieurs mécanismes, quatre principaux mécanismes sont décrits :

- **Inhibition enzymatique :**

De nombreux antibiotiques possèdent, dans leur structure, des liaisons chimiques sensibles à l'hydrolyse. Des enzymes du métabolisme bactérien ont évolué pour cliver ces liaisons, entraînant ainsi l'apparition de souches résistantes. Les bêta-lactamases, qui clivent le noyau bêta-lactame des pénicillines et des céphalosporines, en détruisant le lien amide sur le cycle lactame ; pour exercer leur action, les bêta-lactamases à sérine requièrent la présence d'un résidu de sérine au niveau de leur site catalytique, tandis que les métallo-bêta-lactamases nécessitent l'intervention d'un ou plusieurs ions métalliques, comme le zinc Zn^{2+} (Wright, 2005).

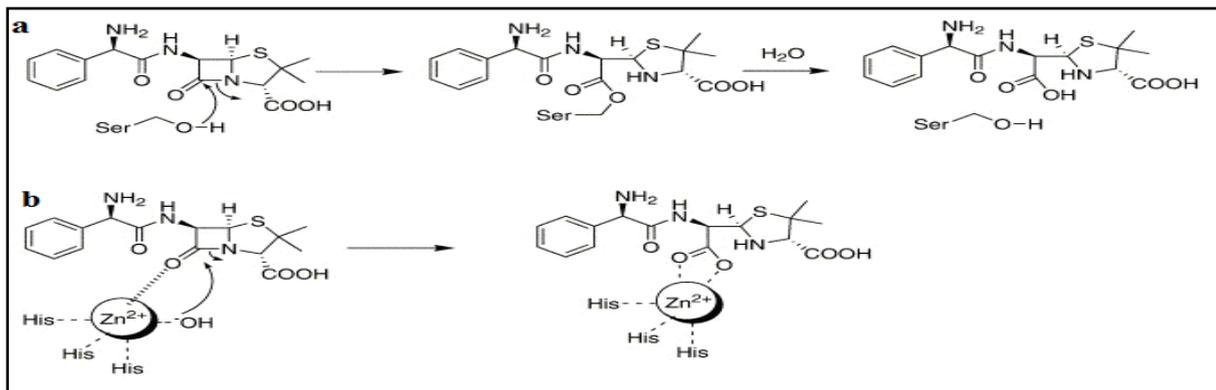


Figure 4 : Mode d'action des bêta-lactamases à sérine (a) et des métallo-bêta-lactamases contre l'amoxicilline (Wright , 2005).

- **Le système d'efflux :**

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Ces pompes peuvent être des transporteurs « drogues spécifiques » et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotique . Telle que les pompes Tet, qui effluent exclusivement les tétracyclines (Markham et Neyfakh, 2001).

- **Modification de la cible :**

L'interaction entre l'antibiotique et la molécule cible est assez spécifique, de faibles altérations de la cible peuvent avoir des effets importants sur la liaison de l'antibiotique. Un exemple de ce mode de résistance est la modification des PLP (protéines liant les pénicillines) qui peut affecter l'affinité de ces molécules (Walsh, 2003).

La mutation de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV confèrent la résistance aux fluoroquinolones, les mutations de l'ARN polymérase confèrent la résistance à la rifampicine. (Rice et *al.*, 2003; Murray et *al.*, 2009).

- **Diminution de la perméabilité membranaire :**

Le caractère hydrophile de la membrane externe des bactéries à Gram négatif est imperméable à la plupart des macromolécules hydrophobes. Cette particularité structurale est en partie, responsable de la résistance intrinsèque des entérobactéries et de *P. aeruginosa* à certains antibiotiques hydrophobes, comme les macrolides (Normak et Normak, 2002).

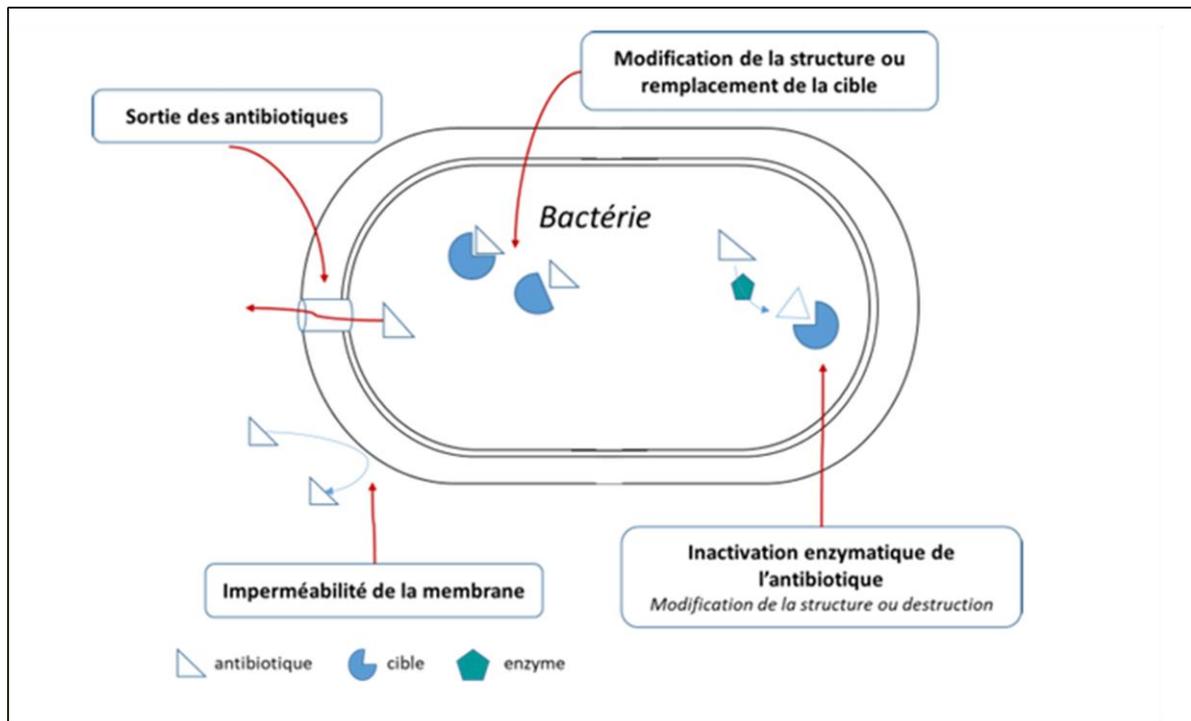


Figure 5 : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Opatowski , 2021)

4-Les bactéries multi-résistantes (BMR) :

Les bactéries sont dites multi-résistantes (BMR) aux antibiotiques lorsque du fait de l'accumulation des résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques (résistance à plus de 3 familles différentes). Elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. Les (BMR) les plus souvent détectées en microbiologie par ordre de fréquence sont les entérobactéries productrices des bêta-lactamases à spectre étendu ou élargi (BLSE), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ou SARM et l'entérocoque (*Enterococcus faecium*) résistant à la vancomycine ou VRE (Veysiere, 2020).

4.1. Les Bactéries Multi-Résistantes d'intérêt clinique :

Les bactéries d'intérêt clinique sont les bactéries fréquemment rencontrées en milieu hospitalier présentant une pathogénicité et menant dans la plus part des cas à des échecs thérapeutiques, elles sont représentées principalement par :

A-*Staphylococcus aureus* résistant à la métiline (SARM) :

Le genre *Staphylococcus aureus* est l'un des principaux pathogènes impliqué dans les infections nosocomiales. Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui ont tendance à se regrouper en amas. Ce pathogène a pour réservoir naturel l'homme, il peut coloniser la peau et les muqueuses (principalement les fosses nasales) sans causer d'infection. Parfois il réussit à pénétrer la peau par le biais de lésions cutanées et est responsable d'infections cutanées assez banales de type furoncles, abcès et parfois infection des muqueuses. S'il traverse la circulation sanguine, il peut être à l'origine d'infections graves telles que des endocardites, des arthrites septiques (Pourriat et Martin, 2005)

B- Les entérobactéries :

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, retrouvés dans le sol, l'eau et le tube digestif de l'homme et des animaux. Elles comportent un nombre élevé de genres et d'espèces fréquemment impliquées dans les infections humaines. Les entérobactéries sont très hétérogènes pour ce qui est de leur pathogénicité et de leur écologie. (kayser et al., 2008). On peut les classer en deux groupes :

-Les entérobactéries commensales du tube digestif : *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter*, *Serratia*,... Ces espèces ne provoquent pas de pathologies intestinales mais sont responsables d'infections extra-intestinales comme les infections urinaires.

-Les entérobactéries pathogènes de l'intestin : *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, et certaines souches d'*E.coli* entéro-pathogènes. Ces espèces sont responsables d'infections digestives.*Escherichia coli* est l'entérobactérie la plus représentée au sein de la flore intestinale. C'est un germe commensal du tube digestif de l'homme et des animaux. (Gansmandel, 2011).

C- Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (E-BLSE) :

De manière générale, les entérobactéries utilisent différents mécanismes de résistance (impermeabilité, systèmes d'efflux, modification de la cible, inactivation enzymatique, production de la biofilm). Dans la majorité des cas, la bactérie produit des bêta-lactamases détruisant les bêta-lactamines (HCSP, 2010 ;Vora et Auckenthaler, 2009).

Les bêta-lactamases constituent une grande famille hétérogène d'enzymes bactériennes conférant aux bactéries la capacité d'hydrolyser la plupart des pénicillines et des céphalosporines, mais elles restent sensibles aux céphamycines ainsi qu'aux carbapénèmes.

Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bêta-lactamases sont inhibées par l'acide clavulanique. La première bêta-lactamase plasmidique, TEM-1, entraînant une résistance à l'amoxicilline, avec la mise en évidence du gène *bla*. Elle s'est rapidement diffusée à d'autres entérobactéries dans le monde entier grâce aux plasmides (Vora et Auckenthaler, 2009). De nos jours, plus de 200 BLSE sont décrites ; elles ont été classées en 11 familles différentes sur la base de leur séquences d'acides aminés : TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA. Les quatre familles majeures sont représentées par les enzymes de type TEM, SHV, CTX-M et OXA. (Boyer-Chammard, 2013).

D-Pseudomonas aeruginosa multi-résistant :

Considéré longtemps comme opportuniste, *P. aeruginosa*, également appelé bacille pyocyanique, est aujourd'hui reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez des catégories de patients à haut risque comme les immunodéprimés, les grands brûlés, les patients hospitalisés en réanimation ou encore ceux atteints de mucoviscidose. La transmission de ce germe peut se faire à partir de l'environnement (eau du réseau) ou par contact avec une personne infectée. *P.aeruginosa* est responsable souvent d'infections urinaires, respiratoires et cutanées.

La sévérité des infections à *P. aeruginosa* est conditionnée, d'une part, par l'état général du patient et. Les mécanismes de résistances développés par ce dernier sont variés. On retrouve :

- Une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la bactérie par :
- Perte d'une porine (OprD) qui affecte essentiellement l'imipénème.
- Un efflux actif.
- Une inactivation des antibiotiques par production de BLSE conférant une résistance à toutes les bêta-lactamines (sauf les carbapénèmes), et d'aminoglycosidases induisant une résistance aux aminosides.
- Une modification de la cible des antibiotiques par mutation de l'ADN gyrase pour les fluoroquinolones et par méthylation de l'ARN 16S ribosomal cible des aminosides (Barbier et wolff, 2010; Bosseray et al., 1997).

5-Les infections nosocomiales :

Les infections nosocomiales sont des infections acquises en milieux hospitaliers (celles qui apparaissent plus de 48 heures après l'admission). Elles affectent 5 à 7 % des patients hospitalisés. Les localisations les plus fréquentes sont les voies urinaires (sur sonde), les plaies opératoires, l'appareil respiratoire (chez les malades sous ventilation assistée), les cathéters intra-vasculaires. Les bactéries responsables peuvent provenir de la flore du patient lui-même ou bien d'autres patients et sont véhiculées par le personnel (surtout par manuportage). Plus rarement la contamination peut être due au matériel médical, de l'eau ou de l'air (Nauciel et validé .,2005)

6-Situation épidémiologique en Algérie :

Le réseau algérien sur la résistance aux antimicrobiens rapporte pour l'année 2016 des taux de BMR par espèce qui montrent que pratiquement une entérobactérie sur trois, soit 30,39 % (1309/4307) est productrice d'une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE). Et plus d'un *Staphylococcus aureus* sur trois soit 36,10 % (291/806) est résistant à la méticilline (SARM). et plus d'un *Acinetobacter sp* sur deux est résistant à l'imipénème , et *P. aeruginosa* est résistant à l'imipénème dans 16,64 % (148/889). Ce qui est inquiétant c'est l'émergence d'entérobactéries productrices de carbapénémases retrouvées à un taux de 2,14 % (97/4523).

L'étude de l'évolution de ces bactéries multi-résistantes , surveillées depuis l'année 2000 montre par ailleurs, pour le SARM, une ascension du taux de 35 % à 36 % entre 2000 et 2016, une augmentation du taux de résistance chez les entérobactéries de 29% en 2004 à 30.39% en 2016% a également été rapportée .La résistance du *P. aeruginosa* à l'imipénème est passée de 4 % en 2001 à 16,64 % en 2016 avec des fluctuations en fonction des années .Contrairement à *Acinetobacter sp*. Résistant à l'imipénème dont le taux a augmenté de façon exponentielle et dramatique de (3 %) en 2004 à (55,24 %) en 2016 avec un pic en 2015 à 65 % (Amhis, 2018).

De nombreuses études ont rapportées une résistance aux bêta-lactamines chez les entérobactéries dominées par la production de BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-15. Les souches productrices de ces enzymes sont souvent à l'origine d'infections potentiellement sévères en milieu hospitalier. Les céphalosporinases plasmidiques identifiées sont CMY-2, CMY-12 et DHA-1. L'isolement de souches d'entérobactéries et de *P. aeruginosa* productrices de carbapénémases reste néanmoins rare en Algérie. (Tani et Arlet, 2014)

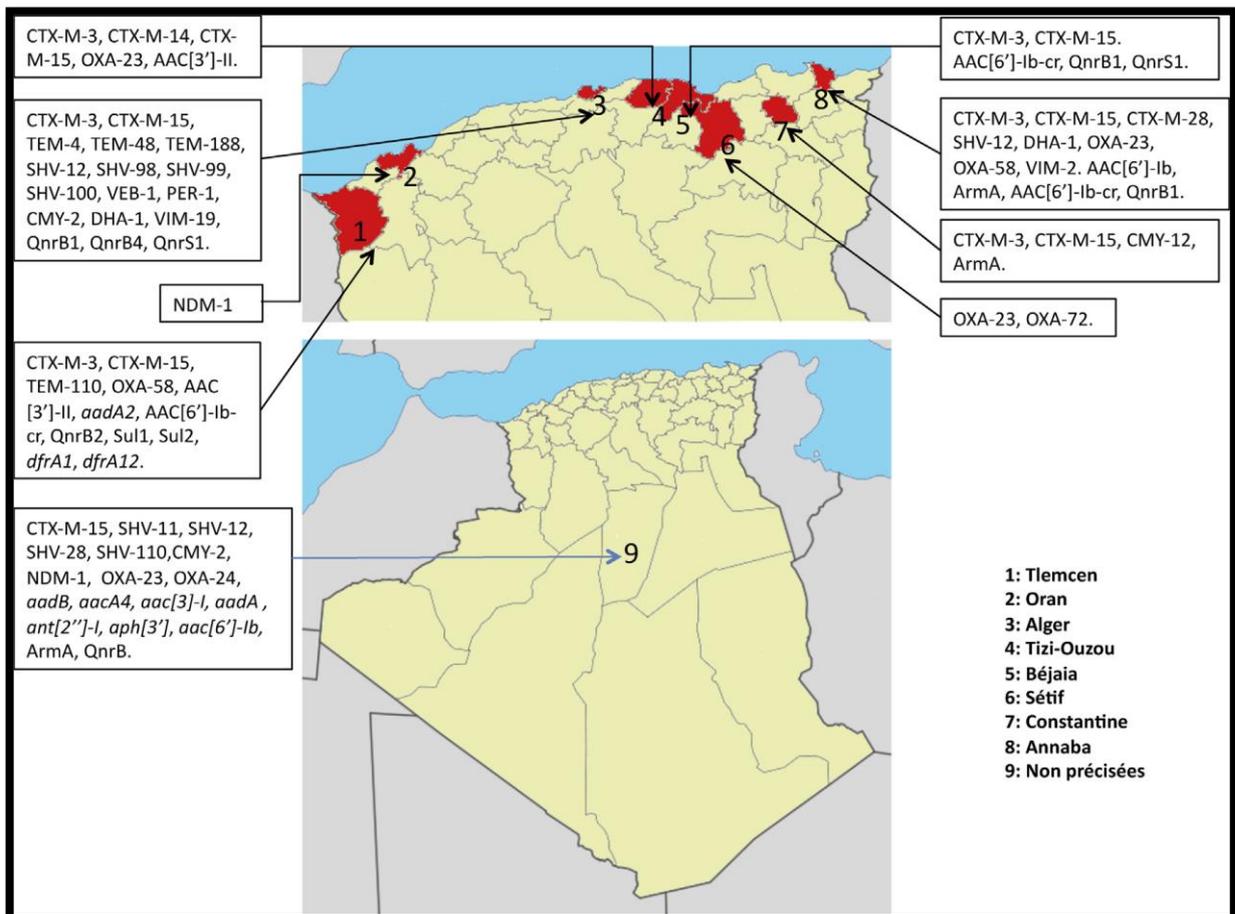


Figure 6: Répartition des différents mécanismes et gènes de résistance aux antibiotiques sur le territoire algérien (Tani et Arlet, 2014)

CHAPITRE II
PLANTES MEDICINALES ET
HUILES ESSENTIELLES

7. Plantes médicinales – aromatiques :

Les plantes ont de tout temps été employées pendant des siècles comme remède pour les maladies humaines car elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires (Cowan, 1999). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (Elqaj et *al.*, 2007).

L'Algérie couvre une surface de 2381741 Km²; elle est dotée d'un patrimoine floristique très diversifié, notamment dans le domaine des plantes aromatiques. Deux chaînes montagneuses importantes, l'Atlas tellien au nord et l'Atlas saharien au sud, séparent le pays en trois types de milieux qui se distinguent par leur relief, leur morphologie et leur climat, donnant lieu à une importante biodiversité écologique (Hammiche, 1990).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à étudier 6 plantes, poussant à l'état spontané dans les régions du nord-est Algérien : *Origanum glandulosum*, *Mentha pulegium*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, et *Salvia officinalis* qui appartiennent à la famille des Lamiaceae et *Pelargonium roseum* qui fait partie de la famille des Geraniaceae. Le choix de ces plantes est basé sur leurs utilisations fréquentes dans nos traditions locales culinaires et médicinales.

7.1. Monographie des plantes étudiées :

7.1.1. Le Thym

Le thym est une plante condimentaire qui appartient à la famille des *Lamiaceae*. Le genre *Thymus L.* se compose d'environ 215 espèces de plantes vivaces herbacées et des sous arbustes.

Il pousse spontanément sur les coteaux arides de la Méditerranée. Il est couramment utilisé dans le domaine thérapeutique, pour ses propriétés pharmacologiques : antispasmodique, antiseptique, antitussif, mais aussi pour son l'activité antimicrobienne. C'est l'une des espèces les plus utilisées dans la médecine populaire (Touhami, 2017).

7.1.2. Description botanique

Le thym est un sous-arbrisseau touffu à tige dressée, ligneuse, rameuse et tortueuse à la base, pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Les rameaux blanchâtres, courtement velus, portent des feuilles persistantes, de petite taille (3 à 12 mm de long sur 0,5 à 3 mm de large), opposées, lancéolées ou linéaires, à limbe entier ; elles sont subsessiles et de couleur vert grisâtre ; leur face inférieure est feutrée et ponctuée de poils sécréteurs, alors que leur face supérieure est glabre et marquée par une nervure centrale déprimée et donne à la feuille une forme générale d'aiguille. (Goetz et Ghedira, 2012).

7.1.3. Position systématique selon (Djedir, 2018)

- Règne : Plantes
- Sous Règne : Plantes vasculaires
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous Classe : Dialypétales
- Ordre : Labiales
- Famille : *Lamiaceae*
- Nom commun : Thym
- Espèce : *Thymus vulgaris*

7.2.1.L'origan

Le genre *Origanum* comprend environ 70 espèces, sous-espèces, variées et hybrides caractérisées par une extrême variabilité dans leurs caractères morphologiques (longueur de la tige, arrangement, nombre et longueur des branches, forme des feuilles...)(Kintzios, 2002)

Communément appelée «zaâter» en Algérie ou «zaâter moulouk» en Tunisie (Mechergui et *al.*, 2010); Les membres du genre sont principalement distribués le long de la région de la Méditerranée, tandis que 75 % d'entre eux sont limités à la Méditerranée orientale (Skoula et *al.*, 1999).

7.2.2 Description botanique

Le genre *Origanum* est constitué de plantes herbacées ou semi-ligneuses à la base. Il mesure de 25 à 85 cm de haut (Carlier , 2005). L'origan a un aspect sec, d'un vert rougeâtre et totalement recouvert d'un duvet (Baba-Aissa ,1991). Les tiges dressées, portent les feuilles ovales opposées et espacées

7.2.3. Position systématique selon (Guignard ,1996 a)

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Gamopétales
- Série : Superovariées tétracycliques
- Super ordre : Tubiflorales
- Ordre : Lamiales
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Origanum*
- Espèce : *Origanum glandulosum*

7.3.1. La Menthe

La Menthe est très répandue dans l'air méditerranéen est connue sous le nom de «Menthe pouliot ». Elle est fréquente dans les milieux humides et elle est parfois cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles très aromatiques. Le nom de « pouliot » vient du latin pulegium, qui dérive de pulex : la puce ; la plante ayant la propriété d'éloigner les puces. (Gamisans et Jeanmonod, 1993) .

7.3.2. Description botanique

Les feuilles, opposées, petites, sont ovale, presque entières (légèrement dentelées) et munies d'un court pétiole. Les fleurs, qui apparaissent l'été, de juillet à fin septembre, sont rose lilas, parfois blanches échelonnées le long de la tige. C'est une espèce spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'Asie, l'Amérique et le nord de l'Afrique, est très commune jusqu'à 1800m d'altitude. (Gamisans et Jeanmonod , 1993).

7.3.3. Position systématique selon (Guignard et Dupont, 2004)

- Sous Règne : Plantes vasculaires
- Ordre : Lamiales
- Famille : *Lamiaceae*
- Division : Magnolipsida
- Classe : Magnolipsida
- Genre : *Menthe*
- Espèce : *Mentha pulegium*



(A)



(B)



(C)

Figure 7 : Photo de A : *Thymus vulgaris* , B: *Mentha pulegium* et C: *Origanum glandulosum*(www.aromatique.fr)

7.4.1. Le Romarin

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est un arbrisseau de la famille des *Lamiaceae* répandu sur toutes les rives de la Méditerranée (Gildemeister et Hoffmann, 1912). Son caractère ensoleillé et son effort de reproduction élevé lui permettent de coloniser les paysages découverts (Sardans et *al.*, 2005). Le romarin tien son nom du latin, rosée, et *marinus* de mer : allusion à son parfum et à son habitat sur les coteaux maritimes.

7.4.2. Description botanique

Le romarin mesure de 50 cm à 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé ; il est caractérisé par ses feuilles persistantes, coriaces, sessiles, linéaires, entières, enroulées par les bords, vertes, blanches-tomenteuses endessous ; fleurs subsessiles, rapprochées en petites grappes axillaires et terminales (Coste, 1973).

7.4.3. Position systématique selon (Cronquist, 1981)

- Règne : plantae
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Lamiales
- Famille: *Lamiaceae*
- Genre : *Rosmarinus*
- Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.
- Noms communs : Romari

7.5.1. La Sauge

La Sauge fait partie des genres les plus importants de la famille des *Lamiacées*, comprenant près de 900 espèces réparties dans le monde entier. L'Algérie compte 23 espèces du genre *Salvia* (Ghorbani et Esmailzadeh, 2017).

Le nom du genre *Salvia* vient du latin *salvare* qui signifie «sauver» et «Guérir» (Pujuguet, 2008). Elle est connue aussi sous le nom *Essalma* chez les Andalous et porte en Algérie le nom de *Souek ennebi* (Meyer, 1881). Cultivée dans le monde entier en particulier dans la région méditerranéenne (Li et *al.*, 2019).

7.5.2. Description botanique

Cette plante vivace a tiges ligneuses à la base forment des rameaux quadrangulaires (Benkherara et *al.*, 2011). De couleur vert-blanchâtre, formant un buisson a une hauteur de 30 à 60 cm, la tige fait de 20 à 30cm de long, émet de nombreux rameaux dressés, présentant des nœuds saillants sur lesquelles sont insérés les feuilles (Teuscher et *al.*, 2004). La forme et la taille des feuilles sont en fonction de leur position sur la tige : Pétiolées, lancéolées et assez grandes, elles sont sessiles, étroites, aiguës. La face supérieure est gris-vert et finement granuleuse, la face inférieure est blanche (Rombi et Robert, 2007)

7.5.3. Position systématique selon (Cronquist 1968 a)

- Règne : Plantae (végétal).
- Sous-règne : Tracheobionta
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous- embranchement : Angiospermes
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Salvia*
- Espèce: *Salvia officinalis*

7.6.1. Le Géranium

Il s'agit d'une plante vivace à écorces brun clair, cultivée en annuelle ou en pérenne. Elle forme des buissons à port érigé pouvant atteindre 1m30 de hauteur (Skaria, 2007). Son nom vient du grec « pelargos » littéralement cigogne puisque son fruit ressemble à un bec de cigogne. Il porte différents noms, dont *Geranium rosat*, *Geranium odorant*, *Pelargonium asperum*, *Pelargonium graveolens* (Lis-Balchin, 2002).

7.6.2. Description botanique

Les feuilles persistantes sont lobées (5 à 7 lobes) et opposées. Elles sont couvertes de poils glanduleux microscopiques qui libèrent un parfum au toucher ou sous l'effet de la chaleur, les tiges sont vertes et tendres. Le système racinaire est pivotant (Demarne, 1986).

7.6.3. Position systématique selon (Prat, 2007)

- Sous-règne : Tracheobionta
- Embranchement : Spermatophyta
- Sous-embranchement : Manoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Sous-classe : Dialypetales
- Ordre: Geraniales
- Famille : *Geraniaceae*
- Espèce : *Pelargonium roseum*



(A)



(B)



(C)

Figure 8: Photo de A: *Pelargonium roseum*, B : *Rosemarinus officinalis* et C : *Salvia officinalis* (www .aromatique .fr)

7.2. Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, qui se caractérisent essentiellement par leurs poids moléculaires faibles, et leurs hydrophobicité (Sell , 2010 ; Kalemba et Kunicha , 2003) .elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs , d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits , mais également à partir de gommages des troncs des arbres, l'hydrodistillation est le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, (Burt, 2004) .

Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison (Gonny et *al.*, 2004).

7 .2.1.Méthode d'extraction :

L'hydrodistillation des HEs est utilisée à ce jour tant que la méthode recommandée par la pharmacopée européenne. Le dispositif d'extraction comprend une source de chauffage surmontée d'un récipient (alambic) dans lequel le matériel végétal est plongé directement dans l'eau et le tout est porté à ébullition. L'installation comprend également un condenseur pour la collecte de l'eau de condensat et un décanteur pour séparer les HE de l'eau (Asbahani et *al.*, 2015).

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes les plus utilisées pour extraire les HEs. Elle est basée sur le même principe de l'hydrodistillation, sauf qu'il n'y a pas de contact direct entre la plante et l'eau. Le système consiste en une grille remplie du matériel végétal, qui se trouve au-dessus de la source de vapeur. La durée d'extraction est raccourcie, réduisant ainsi les altérations chimiques (Masango, 2005).

D'autres techniques sont également appliquées pour l'extraction des HEs telles que l'enflourage (Eltz et *al.*, 2007) . L'extraction par fluide supercritique (Moyler, 1993) et l'extraction aux microondes sans solvant (Lucchesi et *al.*, 2004). Ainsi que l'extraction assistée par ultrasons (Kimbaris et *al.*, 2006).

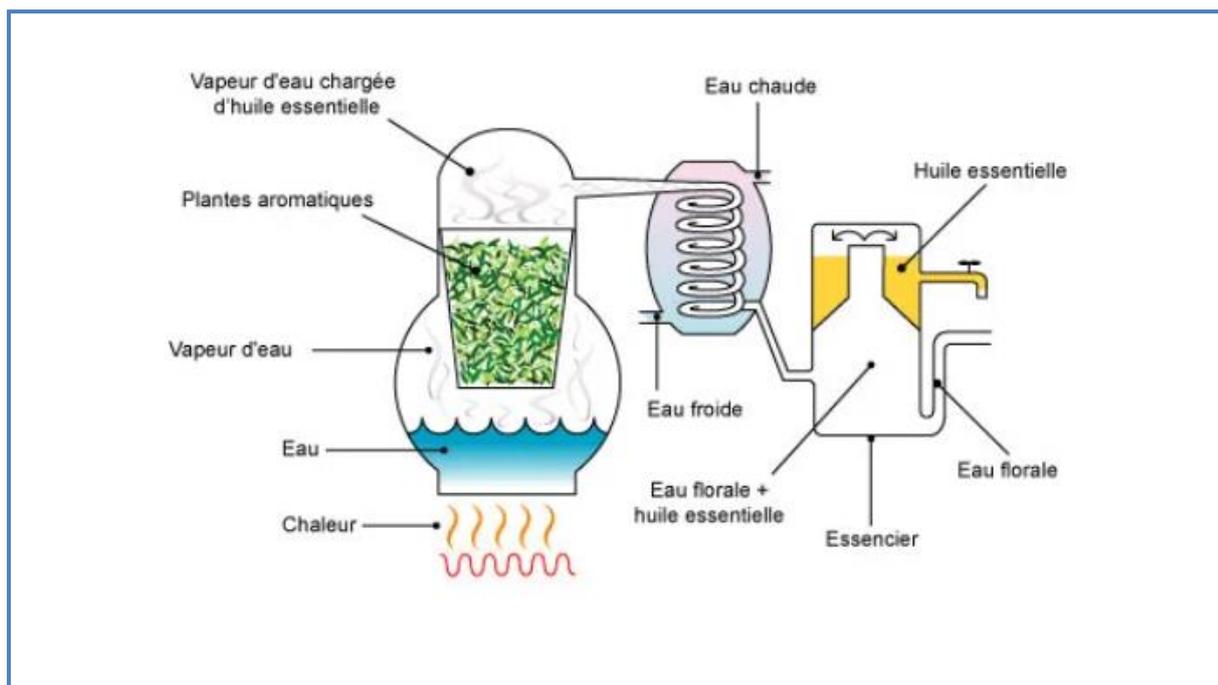


Figure 9: Schéma descriptive du dispositif d'une extraction par hydrodistillation (Jeune,2020)

7.3. Activité biologique des huiles essentielles :

A/Activité antibactérienne :

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif (Burt ,2004). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Oussou *et al.*, 2010). Cette activité biologique est généralement attribuée à certaines molécules communes dans les HEs. Les molécules oxygénées des HEs notamment les composés phénoliques et alcools et en moindre degré, les aldéhydes et les cétones (Kotan *et al.*, 2007).

B/Activité antifongique :

Cette affinité du potentiel antimicrobien contre les champignons est expliquée par le fait que les plantes sont beaucoup plus attaquées par les champignons que par les bactéries (Agrios ,2005). Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (Kalemba et Kunicka, 2003). Il a été démontré que l'activité antifongique augmente selon le type de fonction chimique : Phénols> Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures (Yen et Chang, 2008).

C/Activité antioxydante :

De nombreuses huiles essentielles, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir antioxydant (Mantle *et al.*, 1998 ; Karioti *et al.*, 2006). Les HEs peuvent agir en tant qu'antioxydants par différents mécanismes, tels que le piégeage des radicaux libres et la prévention de l'abstraction continue de l'hydrogène. Elles agissent aussi comme des agents réducteurs et des quenchers de la formation d'oxygène singulet (Yildirim *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2006).

En raison de leur rôle protecteur dans les produits alimentaires contre la détérioration oxydative et dans l'organisme contre les processus pathologiques induits par le stress oxydatif (Zhong et Shahidi, 2015).

D/Activité antibiofilm :

L'intérêt pour l'activité anti-biofilm d'huiles essentielles a augmenté durant les dernières années, en raison des différents composants chimiques pouvant être exploités comme antimicrobiens, non seulement contre les cellules planctoniques mais aussi contre leurs homologues sessile. En effet les HEs peuvent interférer avec les mécanismes impliqués dans la formation de biofilms, permettant ainsi de dégrader et contrôler ce processus. L'effet exercé dépend à la fois des caractéristiques chimiques et du micro-organisme cible. Les deux fractions hydrophiles et hydrophobes des composés d'huiles essentielles peuvent contribuer à l'activité antibiofilm, selon Shahabi et al. (2017), la plupart des composés d'HEs hydrophiles présentent une importante activité antibiofilm, les fractions hydrophiles des huiles pénètrent à travers la matrice EPS (exopolysaccharidique) du biofilm (Desai et al. 2012 ; Kostoglou et al., 2020 ; Wang et al., 2020). Le mécanisme de contrôle potentiel des HEs est principalement due à l'action sur les étapes multiples de formation de biofilm, pendant le cycle de vie de biofilm : (adhésion, formation de microcolonies et maturation) les effets anti-biofilm sont principalement liés à la inhibition de la matrice EPS, suppression de l'adhésion cellulaire et la modification du système quorum sensing QS (Serio et al., 2010; Zhang et al., 2016).

E/Activité insecticide :

Les pesticides à base d'HE ou de leurs constituants ont démontré leur efficacité contre une série de ravageurs (Exp: insectes ravageurs des produits stockés, ravageurs domestiques, ravageurs hématophages). Ils peuvent être appliqués sous forme de fumigants, de formulations granulaires ou de pulvérisations directes avec une gamme d'effets allant de la toxicité létale à la répulsion et/ou à la dissuasion de la ponte chez les insectes (Isman et Machial , 2006). Parmi les HEs bioactives contre les insectes et autres ravageurs figurent l'huile de clou de girofle (eugénol), (Isman et Machial, 2006) .

7.4. Les constituants des huiles essentielles :

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes en particulier des monoterpènes et des sesquiterpènes et des composés non terpéniques (phénylpropanoïdes) générés par la voie des phénylpropanoïdes (Buchanan et al., 2000).

A / Les terpenes :

L'élément principal caractérisant la structure des terpènes est la présence dans leur squelette d'une unité isoprène (2-méthyl-1,3-butadiène). Cette dernière est représentée par la formule structurale générale $(C_5H_8)_n$ dans laquelle, n représente le nombre d'unité isoprène liée. Les terpènes sont classées, ainsi, en fonction du nombre de leurs unités isoprènes en : monoterpènes (avec deux unités d'isoprène), sesquiterpènes (3 unités d'isoprène) (Bruneton, 1999).

a-Les monoterpenes

Ce sont les terpènes les plus simples, ils sont formés de deux unités d'isoprènes et ayant pour formule brute $C_{10}H_{16}$, Ils peuvent être linéaires (acycliques) ou cycliques (mono ou bicyclique) et regroupent de nombreux isomères. Les composés monoterpéniques possèdent différentes fonctions chimiques, comme la fonction alcool (Exp: géranol et linalol) aldéhyde (Bruneton, 1999).

b-Les sesquiterpenes

Il s'agit du groupe le plus diversifié des terpènes. Les sesquiterpènes ont pour formule $C_{15}H_{24}$ (constituée de l'assemblage de trois unités isoprènes) et renferment des composés acycliques ou cycliques (mono, bi, tri ou polycycliques). Comme les autres terpènes, les sesquiterpènes ont aussi divers fonctions, alcool (Exp : bisabol et farnésol), aldéhyde (Exp : sinensals), ester (Exp : acétate de cédryle) et autres (Bruneton, 1999).

B/Les phénylpropanoïdes :

Les phenypropanoïdes ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques, représenté par la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (Bakkali, 2008).

Les phenylpropanoïdes sont moins répondeu dans l'HE que les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles *d'Apiaceae* : (anis, fenouil, persil, cannelles, eugénole, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde) (Bruneton, 1999).

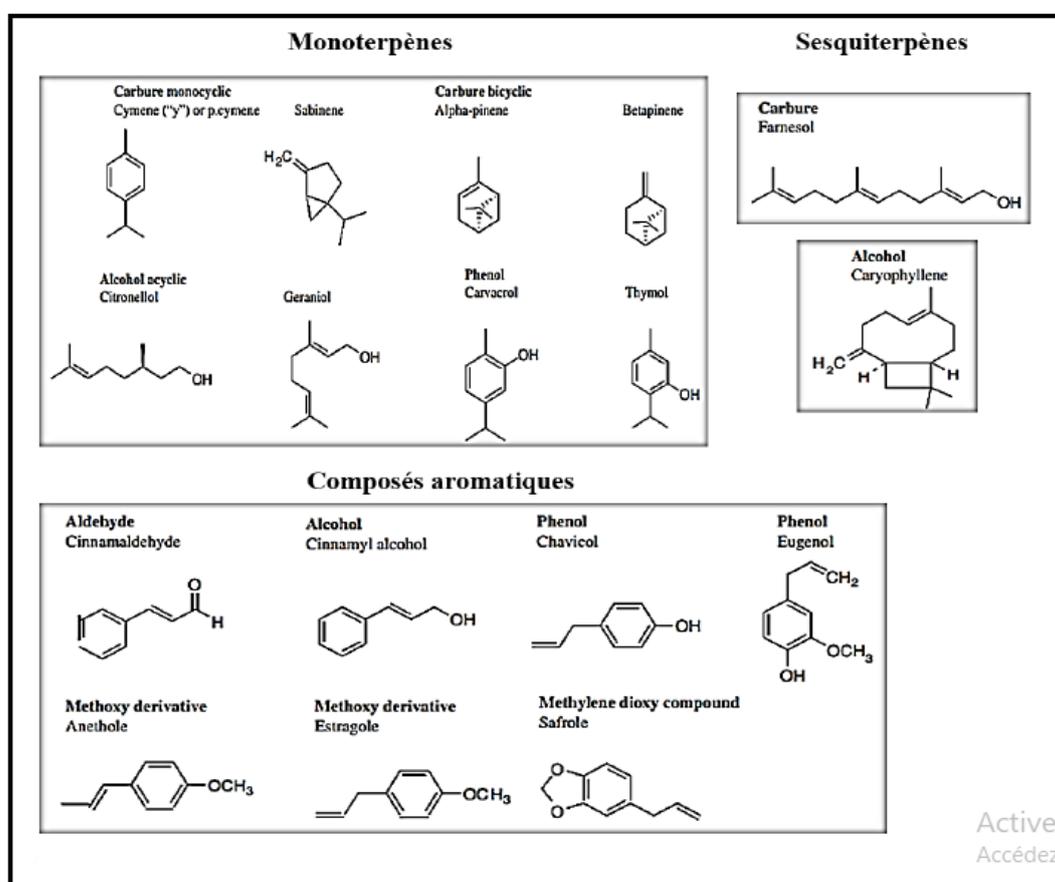


Figure 10 : Structure chimique des principaux composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)

7.5. Mode d'action des huiles essentielles :

Etant donné la complexité de leur composition chimique ; la variabilité des quantités et des profils des composants des HE, l'activité antimicrobienne n'est pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002). Le mode d'action des HE dépend en premier lieu des constituants et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne (Cox *et al.*, 1991; Carson *et al.*, 2002).

Leur action se déroule en trois phases :

1. L'attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
2. L'acidification de l'intérieur de la cellule, en bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
3. Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (Daferera *et al.*, 2003).

Généralement, les HEs possédant de fortes propriétés antibactériennes contiennent un pourcentage élevé de composés phénoliques comme le carvacrol, l'eugénol (2-méthoxy-4-(2-propényl)), Le mode d'action du carvacrol, l'un des principaux composants des huiles d'origan et du thym, attire de plus d'attention de la part des chercheurs. Le thymol est structurellement très similaire au carvacrol, ayant le groupe hydroxyle en un endroit différent sur l'anneau phénolique (Lambert *et al.*, 2001).

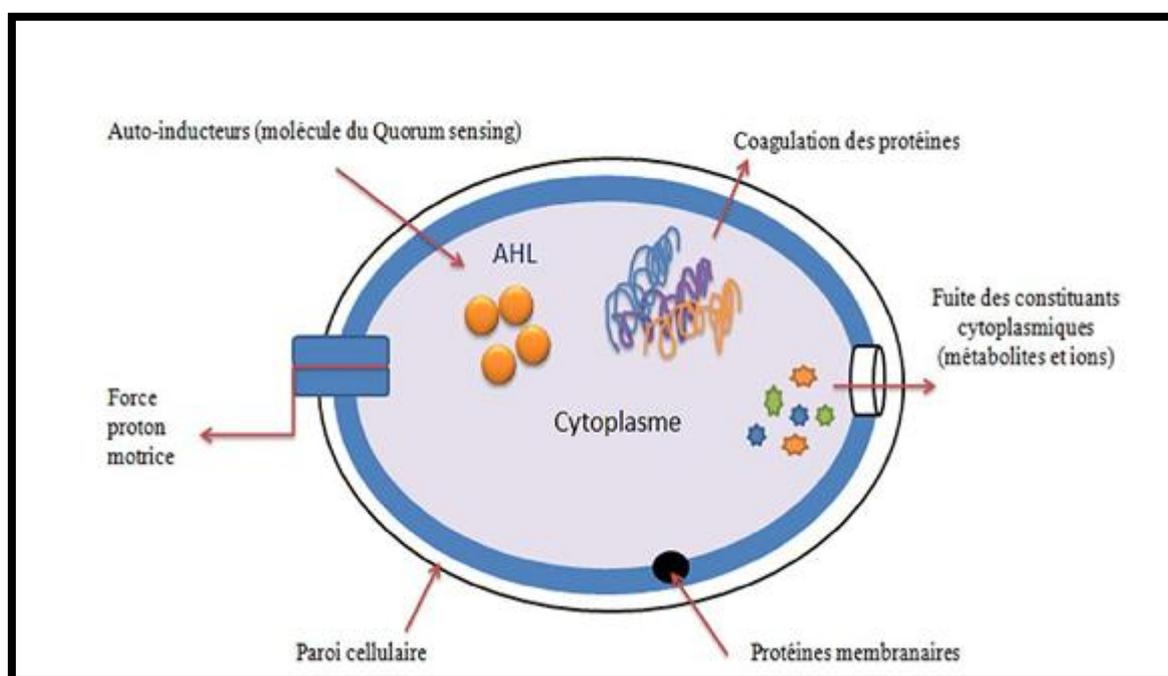


Figure 11 : Actions des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Martin , 2021).

7.6. Techniques d'analyses des huiles essentielles :

7.6.1. Chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de routine utilisée pour l'analyse rapide des fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, fixée sur une plaque de verre les substances migrent, entraînées par la phase mobile composée d'un ou de plusieurs solvants. Ensuite, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode (Caude et Jardy, 1996).

7.6.2. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme (Arpino et al., 1995). Ce type de chromatographie emploie une phase mobile gazeuse inerte et une phase stationnaire liquide. Un chromatographe en phase gazeuse fonctionne en introduisant un échantillon via un port d'injection (également appelé injecteur). Le gaz vecteur (généralement l'hélium), qui est la phase mobile, passe à travers l'entrée et emporte l'échantillon vers la colonne, où se trouve la phase stationnaire. La colonne est enfermée dans un four à température contrôlée.

La séparation chromatographique aura lieu lorsque le mélange (gaz-échantillon) se déplace à travers la colonne. Les composés séparés de l'échantillon sortent de la colonne et pénètrent dans un détecteur, qui fournit un signal électronique proportionnel à la quantité du composé élué (Guinoiseau, 2010.). Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante "indice de Kováts" (Kováts, 1965) ; ou en programmation de température (indices de rétention) (Van Den Dool et Kratz, 1936).

7.6.3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Le principe de cette technique consiste à transférer les composés séparés par CPG dans le spectromètre de masse où chaque molécule sera bombardée à l'aide d'électrons, ce qui conduit à sa fragmentation. Les différents fragments obtenus constituent le spectre de masse de la molécule. L'identification du composé est ensuite effectuée en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres de référence (Sneddon et al., 2007).

7.6.4. Chromatographie liquide a haute performance

La technique (HPLC) est indiquée pour étudier les constituants non volatils des ou pour effectuer des préfractionnements. Elle peut être couplée également à un analyseur de masse (Bruneton, 1999). La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine et une phase mobile liquide circulant sous l'effet d'une haute pression. Après la séparation des différents constituants de l'échantillon, un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (Audigie, 1995).

Tableau 3 : Les principaux constituants des huiles essentielles (HEs) à activité antibactérienne (Burt, 2004)

Nom commun des plantes	Nom latin des plantes	Composées majoritaires des HE	Pourcentage %
Coriandre	<i>Coriandre sativum</i> (feuilles)	linalool (E)-2-décanal	20% 26%
	<i>Coriandre sativum</i> (graines)	linalool	70%
Cannelle	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	trans-cinnamaldéhyde	65%
Origan	<i>Origanum vulgare</i>	carvacrol	Traces à 80%
		Thym γ -terpinène p-cymène	Traces à 52% 2 à 52% 52%
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pinène	2 à 25%
		acétate de bornyle	0 à 17%
		camphre 1,8-cinéole	2 à 14% 3 à 89%
Sauge	<i>Salvia officinalis L</i>	camphre	6 à 15%
		α -pinène	4 à 5%
		β -pinène	2 à 10%
		1,8-cinéole	6 à 14%
		α -thujone	20 à 42%
Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugénol	75 à 85%
		acetate d'eugényle	8 à 15%
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	thymol	10 à 64%
		carvacrol	2 à 11%
		γ -terpinène	2 à 31%
		p-cymène	10 à 56%

8.L'encapsulation

De nos jours, la nanotechnologie est en plein essor et fait l'objet de nombreux travaux au sein de disciplines scientifiques telles que la physique, la chimie et la biologie. En effet en raison de leur hydrophobicité, leur instabilité, l'influence de paramètre physique ou chimique tels que l'oxydation, la volatilisation, la lumière, la chaleur, l'effet des UV ou bien l'hydrolyse peuvent altérer l'huile ou les molécules bioactives présentes dans l'huile, la nano-encapsulation est de plus en plus utilisée. Elle permet le passage de la matière à des dimensions nanométriques et d'améliorer la solubilité de la substance d'intérêt, par conséquent sa capacité d'être absorbé par les cellules vivantes, protège le principe active ou la substance d'intérêt contre la métabolisation et l'élimination au niveau tissulaire ou cellulaire et contre l'action de certains facteurs de dégradation physico-chimiques externes (Marques, 2010 ; Álvarez et al., 2016)

Dans le cas des huiles essentielles, la nano-encapsulation a été développée dans le but principal de la stabilisation de ces dernières dans le temps en limitant leur volatilisation et de les protéger de l'oxydation et de l'exposition aux rayons UV, la surface des nanomatériaux choisis augmente la solubilité des HEs dans l'eau en réduisant leur hydrophobicité, leur permettant de pénétrer dans les cellules en causant une perte d'intégrité de la membrane et détruisant ainsi les cellules et permettant ainsi de réduire la quantité nécessaire à leur utilisation (Sattary et al., 2020; Chaudhari et al., 2021)

8.1.Principe de la nanoencapsulation :

La nanoencapsulation est une méthode qui permet l'obtention de nanoparticules mono-dispersé par l'utilisation de deux phases non miscibles : une phase organique (HE) et une phase aqueuse dans laquelle l'huile est dispersée en petite gouttelettes sphériques grâce à un tensioactif et l'utilisation d'homogénéisation à haute énergie (Bhargava et al., 2015).

8.2.Techniques d'encapsulation et matériaux utilisés :

De nombreuses techniques sont utilisées pour encapsuler les HEs, notamment l'émulsification; séchage par pulvérisation, la lyophilisation, l'enrobage en lit d'air fluidisé, évaporation en phase inverse, hydratation en couche mince. De multiples matériaux sont utilisés pour la nano-encapsulation des huiles essentielles, le choix des matériaux repose aussi sur leurs caractéristiques intrinsèques notamment leur capacité d'encapsulation, leur biocompatibilité, leur biodégradabilité, leur abondance, leur potentielle ainsi que leur rentabilité. Parmi ces matériaux : la silice, le chitosane, la cellulose, la cyclodextrine, les alginate, la gomme arabique sont les plus utilisés (Chakroun, 2020)

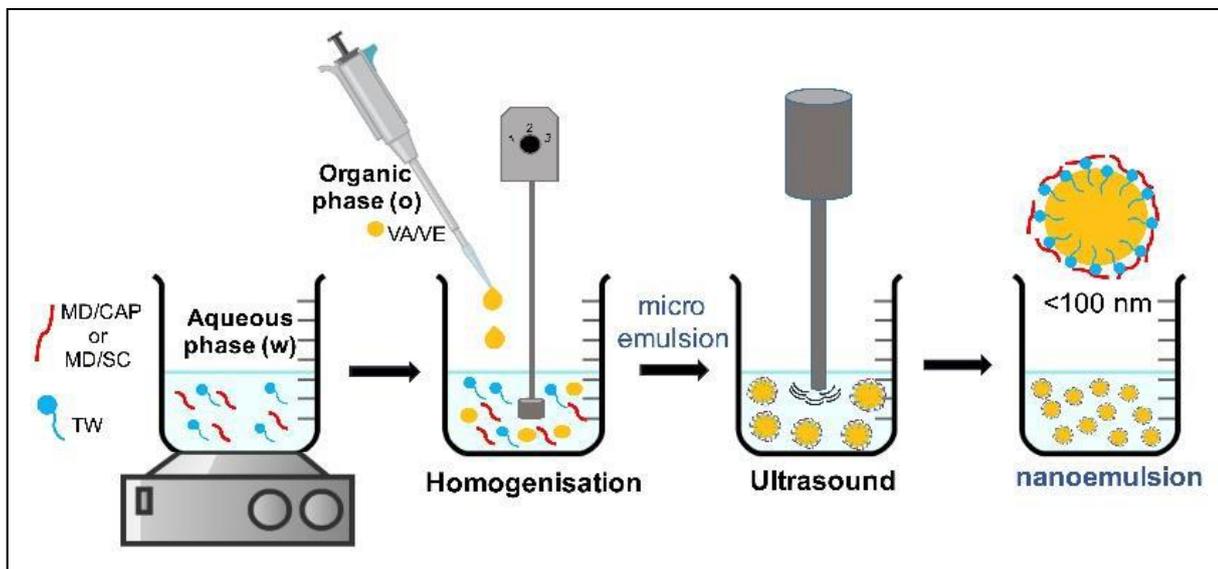


Figure 12 : Les différentes étapes de la préparation de la nanoémulsion (Gill-castel et al., 2022)

CHAPITRE III
LES BACTERIES LACTIQUES
ET EFFET ANTIBACTERIEN

9-Batéries lactiques et effet antibacterien :

L'utilisation des microorganismes non pathogènes ou leurs métabolites améliore d'un point de vue microbiologique et prolonge la durée de conservation des nourritures. Depuis plus de 4000 an les bactéries lactiques (LB) sont utilisées dans la fermentation de nombreux produits et en particulier les produits laitiers (De Martinis *et al.*, 2001).

Elles agissent comme des bio-préservateurs alimentaires, ces derniers forment un groupe de bactéries bénéfiques pour l'homme et colonisent différents biotopes microbiens allant du sol et des plantes au système digestif de l'homme, les BL forment un groupe relativement divers reliées entre elles par un certain nombre de fonctions métaboliques et physiologiques typiques (Yang , 2000) .

9.1. Bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont à Gram positif, peuvent avoir des formes coccoïdes, coccobacillaires, ou bacillaires (Badis, *et al.*, 2005), sont non pigmentées, immobiles et non sporulantes. Les bactéries lactiques tolèrent des pH acides, ne possèdent pas de catalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotoleérant (Hardie et Whiley, 1997)

Pour se développer, elles ont besoin de source de carbone organique (glucides fermentescibles) de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Prescott *et al.*,1999). Le mode de fermentation du glucose présente une caractéristique importante pour la différenciation des genres, il permet de les classer en deux grands groupes :

9.1.1. Bactéries lactiques homofermentaires:

Les espèces des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, et certaines espèces de *Lactobacillus* dans les conditions standard de croissance fermentent les sucres par la voie de Embden-Meyerhof-Parnas en pyruvate, ce dernier est converti en acide lactique par la lactate déshydrogénase (LDH).

Dans certaines conditions de croissance (manque ou excès du carbone, des sucres lentement métabolisés), le métabolisme homolactique peut se transformer en métabolisme mixte caractérisé par la production d'acétate, formiate, éthanol, et /ou du CO₂ en plus de l'acide lactique (Kowalczyk *et al.*, 2015).

9.1.2. Bactéries lactiques hétérofermentaires :

Les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et certaines espèces de *Lactobacillus* fermentent les sucres généralement par la voie de phosphocétolase. Les pentoses sont fermentés conduisant à la production de pyruvate et acétyl-P qui sont convertis ultérieurement en lactate et acétate respectivement. Les hexoses peuvent être convertis en lactate, éthanol et CO₂ (Kowalczyk *et al.*, 2015).

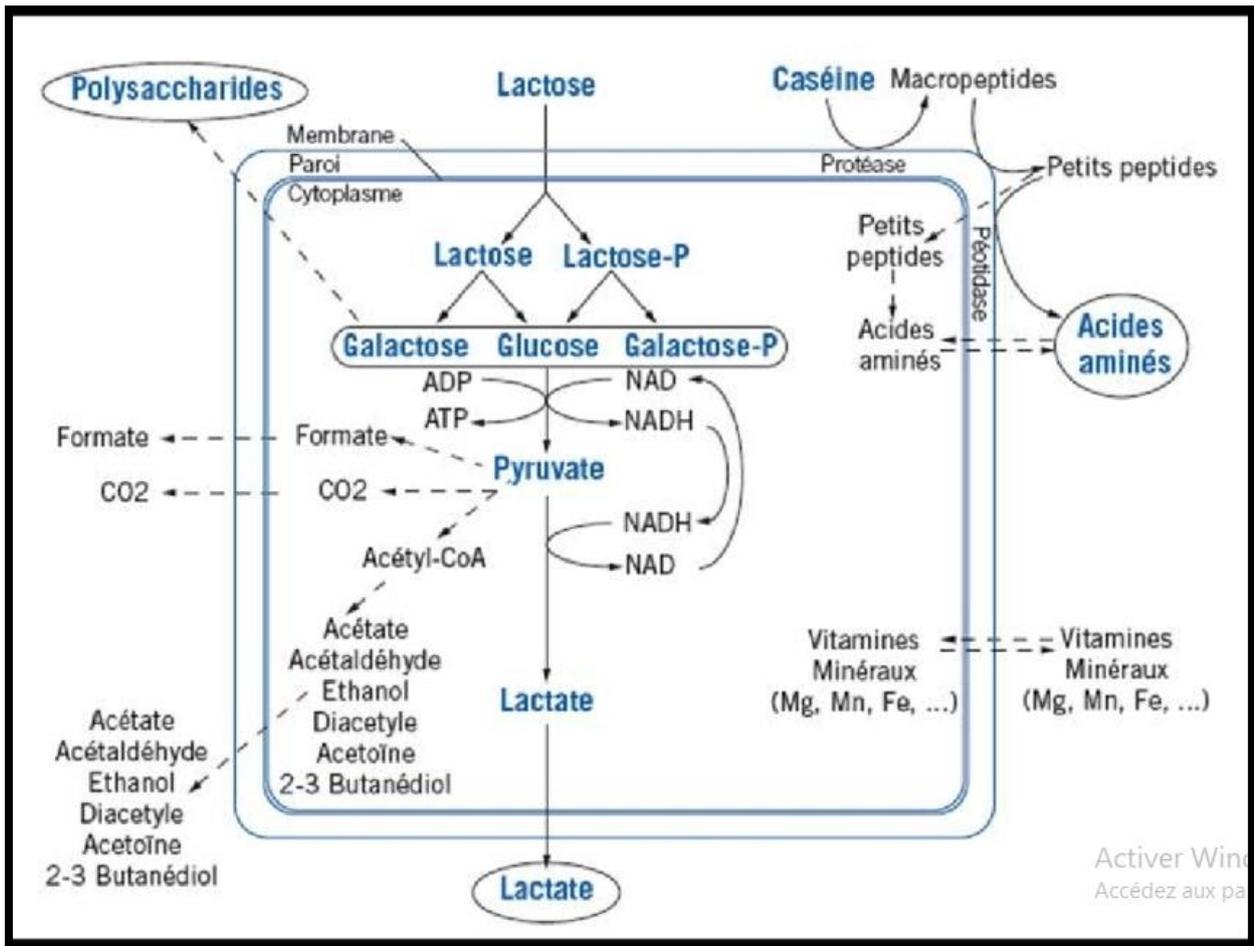


Figure 13 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (Corrieu et luquet , 2008).

9.2. Taxonomie des bactéries lactiques :

Historiquement, le groupe comportait les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*, mais les genres principaux des BL importants en technologie agro-alimentaire incluent également : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* et *Bifidobacterium* (Axelsson , 2004).

Récemment 15 genres lactiques ont été décrits (*Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Ermecoccus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactobacillus*, *Trichococcus*, *Atopobacter*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*. Parmi ces 15 nouveaux genres, seul *Paralactobacillus* est d'origine alimentaire. (Leisner *et al.*, 2000).

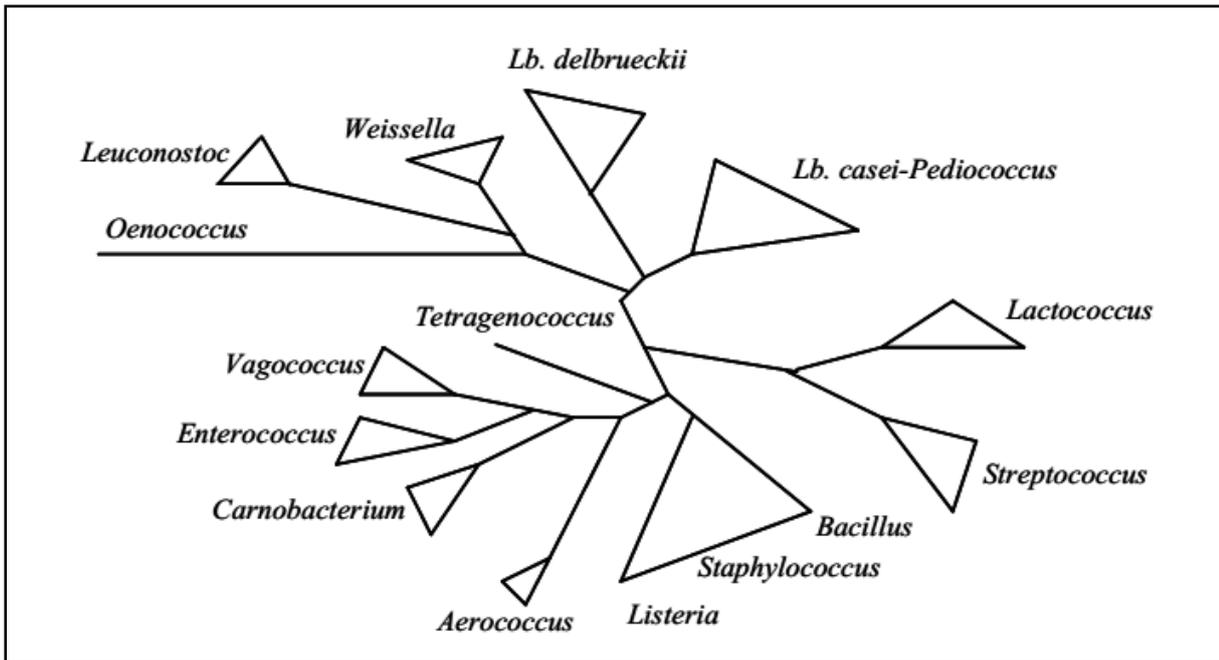


Figure 14: Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004)

9.3. Le genre *Lactobacillus* :

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulés, leur forme peut aller de bâtonnet long et fin, court au coccobacille, ils peuvent être groupés en paires ou en chaînes, immobiles, catalase négatif, ils ont une teneur en guanine-cytosine (G+C) inférieure à 50%. (Hammes et Vogel, 2012)

9.4. Composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les effets antagonistes qu'elles peuvent avoir. Ceux-ci résultent de la production de différents composés organiques et non-organiques capables d'inhiber ou de limiter la croissance de certains germes pathogènes.

- **Acide organique**

la fermentation par les bactéries lactiques est caractérisée par l'accumulation d'acide organique qui s'accompagne d'une réduction du pH (podolak et al., 1996). Les niveaux et les types d'acides organiques produits pendant la fermentation dépendent de l'espèce et de la composition du milieu et les conditions de croissance (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

- **Peroxyde d'oxygène**

La catalase, enzyme nécessaire à la dégradation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est absente chez les bactéries lactiques. Il en résulte une accumulation de ce composé qui peut être inhibiteur de différents microorganismes. En effet, son action peut se manifester aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux indispensables au bon déroulement de la fermentation. L'inhibition se fait par l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et/ou par la destruction des structures protéiques cellulaires (Zalan et al., 2005).

- **Composées aromatiques :**

- a- Diacétyle**

Le diacétyle est produit principalement par les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Grâce au métabolisme du citrate, il possède à la fois des propriétés antimicrobiennes et des propriétés aromatiques qui sont intéressantes dans le domaine des produits laitiers. L'acidification qui a lieu lors de la production de yaourt augmente l'action du diacétyle qui tend alors à inhiber préférentiellement les bactéries à Gram négatif ainsi que les levures (Tahiri, 2007).

- b-Acétaldehyde**

Chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase clive la thréonine en acétaldehyde et en glycine. L'acétaldehyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. coli* dans les produits laitiers (Piard et al., 1990).

- c-La reutéine**

La reutéine produite par *Lactobacillus reuteri*, lors de la phase stationnaire en anaérobiose en présence d'un mélange de glucose et de glycérol (ou de glycéraldehyde) et permet d'inhiber les champignons, certains protozoaires et aussi une large proportion de bactéries à Gram négatif et positif (Ross et al., 2002).

- d- Les bactériocines**

Les bactériocines sont définies comme des petits peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique et produits par des bactéries qui sont immunisées contre leurs propres bactériocines (Cotter et al., 2013). Leur activité peut être restreinte à des souches de la même espèce ou peut s'étendre jusqu'à atteindre de nombreuses espèces et genres différents (Cotter et al., 2005 a).

Les bactériocines sont de nature cationique et sont généralement organisées en une ou plusieurs structures hélicoïdales amphiphiles (Rodriguez et al., 2003; Heng et al., 2007). Leur nature protéique permet leur dégradation par les enzymes protéolytiques en particulier les protéases du tractus gastro-intestinal des mammifères, ce qui les rend sans danger pour la consommation humaine (Zacharof et Lovittb, 2012).

9.5. Classification des bactériocines :

La classification actuelle est fondée sur la taille et le fait que les bactériocines font l'objet ou non de modifications post-traductionnelles (classification proposée par Klaenhammer en 1993, et révisée à la suite du 1er symposium mondial sur les bactériocines de bactéries lactiques, tenu en avril 1995 à Banff, Canada) (Cenatiempo et al., 1996).

A/Classe I: Les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement. Il s'agit de la lanthionine, la β -méthyle lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine; ils peuvent être divisés en deux types :

La classe Ia : Elle comprend des peptides cationiques hydrophobes (nisine) (Dortu et Thonart, 2009).

La classe Ib : Elle comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Mc-Auliffe et Hill., 2001).

B/Classe II: Les bactériocines thermostables non modifiées

Les bactériocines de classe II sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur et ne contenant pas d'acides aminés modifiés (Dortu et Thonart, 2009). Elles sont subdivisées en trois sous classes:

- **La sous-classe IIa** : appelée aussi "pediocin like" les bactériocines de cette sous classe ressemblent structurellement à la pédiocine. Elles possèdent deux particularités, la première est la présence d'une séquence N-terminale conservée (Ennahar et al., 2000). Et la deuxième est la présence d'une activité anti-*Listeria sp.*
- **La sous-classe IIb**: comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité, le type E (Enhancing) et le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires (Dortu et Thonart, 2009).
- **La sous-classe IIc** : les bactériocines circulaires : cette sous classe comprenant les bactériocines activées par la réduction des thiols (thiol activated), comme la lactococcine B (Venema et al., 1996).

C/Classe III : Les protéines à hauts poids moléculaires

Cette classe regroupe des protéines de taille supérieure à 30 kDa et thermosensible. La structure de ces bactériocines diffère complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helvéticine J, l'enterolysine A, la zoocine A et la millericine B (Dortu et Thonart, 2009).

D/Classe IV : Les bactériocines complexes

Les bactériocines de classe IV sont définies comme des protéines associées à une composante non protéique lipidique et/ou oligosaccharidique nécessaire à leur activité biologique (Corrieu et Luquet, 2008).

Tableau 4 : Principales bactériocines et leur cibles bactériennes (Mami et Kihal , 2019)

Dénomination	Espèces productrices	Espèces sensibles
Nisine	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Lactocoques, bacteries Gram positif (dont <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i>)
Lacticine 481	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Lactocoques, Lactobacilles <i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium</i>
Diplococcine	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	Lactocoques
Lactostrepcine (s)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Lactocoques, <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptocoques hemolytiques</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Listeria</i>
Lactocidine	<i>Lactococcus fermentum</i>	Lactobacilles
Lactocine27	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>Acidophilus</i>
PediocineA	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium</i> <i>sporogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i>

CHAPITRE IV

MATERIEL ET METHODES

Matériels et Méthodes

1. Contexte d'étude et lieu de stage :

L'hôpital militaire régional universitaire de Constantine est doté de 380 lits, construit en 2008 réparti en 17 services médicaux et chirurgicaux, il accueille environ 1000 admissions chaque année. La présente étude s'est déroulée au niveau du laboratoire central de microbiologie, comprenant quatre compartiments : la microbiologie, la coprologie, la cytologie et un compartiment dédié à la détection de bacille de koch.

Il s'agit d'une étude prospective, réalisée sur une période de trois mois allant du 23 septembre 2018 au 23 décembre 2018. Ainsi qu'une étude rétrospective à visée descriptive d'une durée d'une année réalisée au niveau du laboratoire centrale de microbiologie de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC) Algérie.

Les prélèvements reçus au laboratoire sont issus de patients hospitalisés dans les différents services de l'hôpital, chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignement qui comporte : le nom et prénom du patient l'âge et le sexe, type de prélèvement ainsi qu'un formulaire (annexe I) permettant de recueillir des renseignements afin d'identifier certains facteurs de risque impliqués dans la colonisation par des souches résistantes.

1.2. Souches de référence :

Escherichia coli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Haemophilus influenzae ATCC 49247

1.3. Souches cliniques :

Ce travail a porté sur 196 souches cliniques recueillies à partir de 323 prélèvements qui ont été issus de malades hospitalisés. Ces souches sont isolées de différents prélèvements et émanant de différents services d'hospitalisation.

1.4. Critères d'inclusion :

Tous les patients adultes quelque soit leurs âge ou sexe et ayant été hospitalisé au moins deux jours au niveau de l'hôpital (HMRUC) ont été inclus dans l'étude :

- Les patients hospitalisés au moins 48h dans l'un des différents services de l'HMRUC.
- L'analyse a porté sur les prélèvements à visée diagnostique émanant des différents services.

1.5. Critères d'exclusions :

Les prélèvements à visé de dépistage et les patients externes et porteurs d'une BMR ou admis depuis moins de 48h ont été exclus, ainsi que les doublons définit comme étant les mêmes bactéries multi-résistantes isolées chez le même patient au niveau d'autres sites infectieux ont été éliminés. Les nouveaux nés et les enfants n'ont pas été inclus dans cette étude.

1.6. Techniques de prélèvement :

A/Prélèvements urinaires

Les urines sont recueillies de préférence le matin après lavage soigneux des organes génitaux externes avec une solution antiseptique ou un savon doux, et rinçage soigneux à l'eau, la première partie de la miction sera rejetée, permettant d'éliminer tout ou une partie de la flore commensale de l'urètre inférieur, et seul le milieu du jet sera recueilli dans un flacon stérile (Bonacorsi, 2007).

B/Patient porteur d'une sonde

L'urine est ponctionnée via l'opercule spécifique de la sonde après désinfection à l'alcool iodé. Il est important d'effectuer le prélèvement juste après un changement de sonde ; et d'éviter de prélever dans le sac collecteur (Bonacorsi, 2016). Afin d'éviter toute prolifération bactérienne, le transport au laboratoire se fera en moins de 2 heures. Au-delà de ce délai, le flacon d'urine sera placé dans un récipient contenant de la glace, les urines pourront être gardées 24 heures à 4C°.

C/Prélèvement du LCR

Le prélèvement doit être effectué dans des conditions rigoureuses d'asepsie dans des tubes stériles, par ponction lombaire. Le prélèvement est immédiatement acheminé au laboratoire (Mariani-Kurkdjian et *al.*, 2016).

D/Prélèvement de pus

La ponction est faite à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue, après préparation soigneuse. Il est nécessaire de chasser l'air pour permettre la survie des bactéries anaérobies (Plainvert et Lavigne., 2016).

E/Prélèvement sanguin (hémoculture)

Toute fièvre inexplicée, survenant particulièrement chez une femme enceinte ou chez un sujet immunodéprimé donne lieu à la prescription d'hémoculture. Le prélèvement doit être réalisé après une asepsie rigoureuse. Toute contamination par des germes cutanés ou ambiants peut compromettre la culture de la bactérie recherchée. La ponction veineuse à l'aide de l'aiguille (type épicroténienne protégée) constitue la méthode de prélèvement habituelle des hémocultures (Hoen et *al.*, 2002).

1.7. Démarche diagnostique :

1.7.1. Examen macroscopique

➤ LCR:

La première étape de l'analyse consiste à noter l'aspect du liquide. Un LCR normal est limpide et classiquement dit eau de roche, différents aspects pathologiques peuvent être observés : eau de riz (ou trouble ; à partir d'environ 200 éléments/mm³), hématiche voir hémorragique. (Mariani -Kurkdjian et *al.*, 2016) .

➤ Urine :

Les urines sont normalement jaune claires et doivent être limpides, l'émission d'urines troubles suggère une infection urinaire, mais n'est cependant pas spécifique ; elle peut être liée à la présence de cristaux, de médicaments. Cet examen permet d'apprécier l'aspect de l'urine, trouble ou claire limpide, la couleur, l'odeur, et la consistance (Frédéric et *al.*, 2008).

➤ Pus :

L'aspect macroscopique de l'échantillon constitue une information importante à noter (hémorragique, purulent, présence de grains, etc.)(Ploy et Denis, 2007).

➤ Hémoculture :

La durée d'observation varie d'une semaine à un mois selon les cas ; la majorité des hémocultures se positivent en 2 à 3 jours jusqu'à 5 jours. La présence d'une production de CO₂, un dépôt flocculeux au-dessus de la couche d'hématie, une hémolyse, une coagulation du bouillon, indique la contamination du prélèvement par une souche bactérienne (Sékou Koné, 2009).

1.7.2. Examen microscopique

a -Etat frais :

Cette méthode consiste à observer entre la lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40. Les renseignements obtenus par cette observation concernent principalement la mobilité et la morphologie des bactéries (Lanotte et *al.* , 2016).

b-Analyse cytologique :

L'énumération est effectuée pour les prélèvements de nature liquide (urine, pus, ponction etc...). Cette analyse cytologique doit répondre à deux objectifs en fonction de la nature de l'échantillon (Bonacorsi et *al.*, 2016), Il s'agit d'une :

➤ Analyse quantitative :

Elle va permettre de répondre en nombre d'éléments cellulaires figurés par unité de volume.

➤ Analyse qualitative :

Afin de connaître avec précision la nature des éléments cellulaires figurés observés lors de l'analyse quantitative.

Technique :

Un volume de 50µl du prélèvement (bien homogénéisé) est prélevé et placé entre la cellule de Nageotte et la lamelle (le remplissage se fait par capillarité). La lecture s'effectue au microscope photonique (G×40).

L'exploration soigneusement de la totalité de la lamelle permet de repérer et quantifier :

- ✓ Les éléments cellulaires : leucocytes, hématies, cellules épithéliales, ou autres.
- ✓ La flore microbienne : bacilles ou coques, éléments mycéliens ou levures.
- ✓ Les cristaux, les cylindres granuleux.

c-Coloration au bleu de méthylène :

Elle permet de mieux visualiser les morphologies bactériennes et de préciser les agencements des bactéries les unes avec les autres.

Technique :

La coloration au bleu de méthylène est réalisée en faisant couler une solution de bleu de méthylène sur un frottis correctement fixé; le temps de contact est de 1 minute, La lame est ensuite rincée à l'eau du robinet, séchée entre deux feuilles de papier buvard puis observée à l'immersion (Lanotte et *al.*, 2016).

d-Coloration de Gram :

La coloration de Gram, est un élément essentiel du diagnostic, elle permet de mettre en évidence et de différencier les bactéries d'après leurs formes, leur dispositions et leur affinité pour les colorants et se fait préférentiellement après centrifugation, la coloration de Gram est positive à partir d'une concentration bactérienne de 10^4 UFC/ml. La méthode de réalisation est résumé au niveau de l'annexe I.

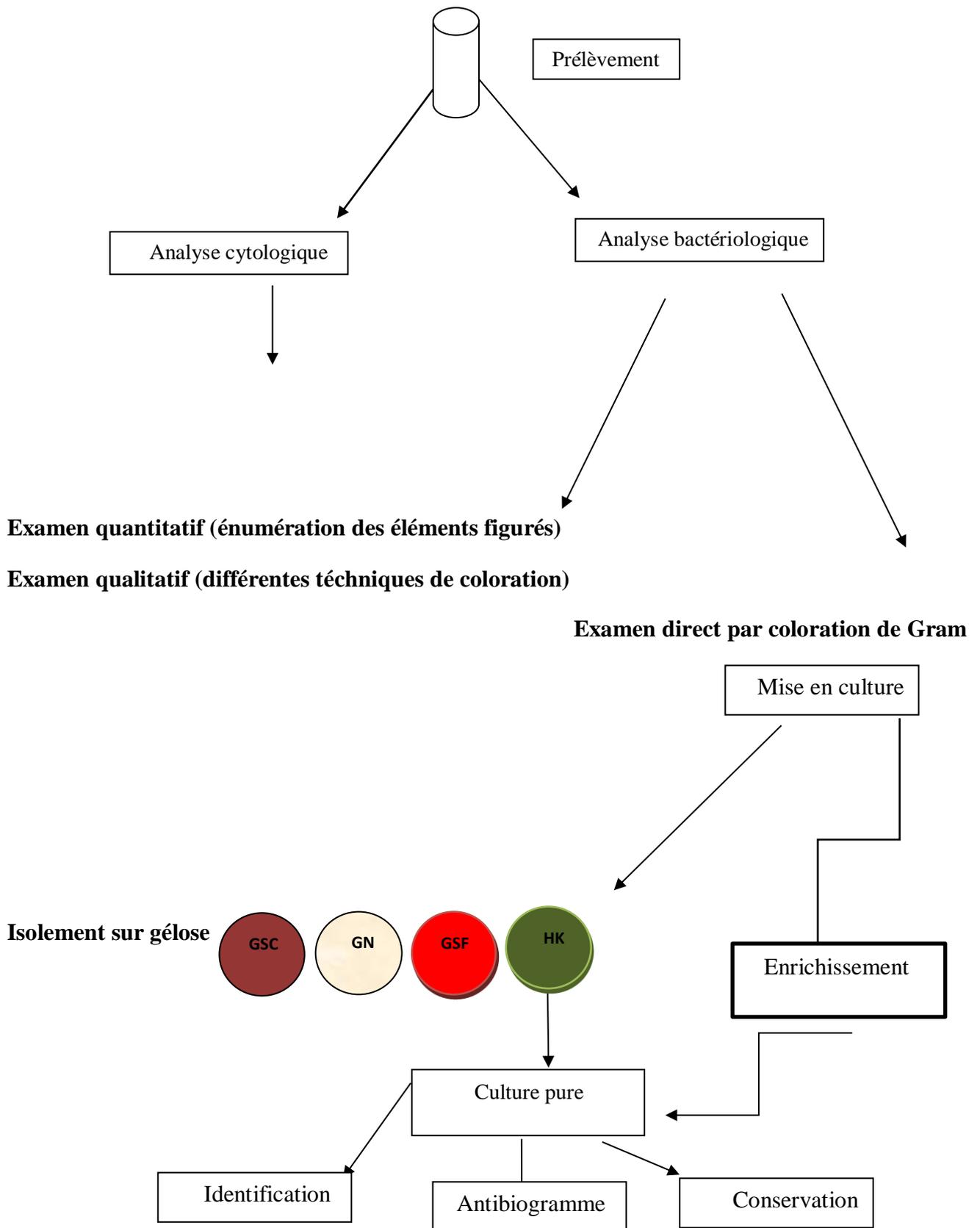


Figure 15 : Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique

1.8. Mise en culture des prélèvements :

➤ Hémoculture :

Après désinfection de l'opercule du flacon d'hémoculture, à l'aide d'une seringue stérile, quelques gouttes sontensemencées sur une gélose au sang cuit (GSC) et une gélose au sang frais (GSF), les boîtes sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO₂ à 35C° pendant 24h à 48h, un isolement sur une gélose hektoen est effectué simultanément pour la détection des bacilles à Gram négatif oxydatif. Des repiquages sont réalisés pour le jour (J2, J8, J30) pour tout les flacons présentent des signes de positivité macroscopique (Granier et Denis, 2007).

➤ Pus :

Quelques gouttes sontensemencées par stries sur une gélose au sang cuit, une gélose au sang frais et une gélose hektoen, ainsi qu'une gélose chapman tout en réalisant un enrichissement dans un bouillon cœur cervelle ; après l'incubation, à partir de bouillon d'enrichissement les mêmes milieux sontensemencés si la culture dans les boîtes d'origine est négative. L'incubation est faite à 35C° pendant 24h à 48h, les boîtes de GSC et GSF sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO₂ (Ploy et Denis, 2007).

➤ LCR :

Un volume de 20 µl est prélevé etensemencé sur une gélose au sang cuit et une gélose au sang frais, les boîtes sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO₂ à 35C° pendant 24h à 48h , un isolement sur hektoen est réalisé pour la mise en évidence des bacilles à gram négatif oxydatif (Mariani et Bingen, 2007a).

➤ Urine :

Un volume de 10µl d'urine est prélevé, après avoir bien homogénéisé le flocon etensemencé en stries parallèles sur une gélose nutritive, ou bien une gélose CLED, Les boîtes sont incubées à 35°C pendant 18 h à 24h. Une culture est dite positive lorsque les numérations sont supérieures ou égales à 10⁵/ ml et d'aspect mono- microbien. (Bonacorsi, 2007) .

1.9. Identification des bactéries :

Dans ce travail réalisé, on s'est intéressé à l'identification des entérobactéries (BLSE) et des bacilles à Gram négatif non fermentaire BGN-NF (*Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* multi-résistant) ainsi que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. La première étape d'identification consiste à réaliser une coloration de Gram, puis la recherche d'une catalase et une oxydase ainsi qu'une coagulase. Une galerie biochimique de type RapID™ ONE system (qualitative micromethod) a été utilisée pour l'identification surtout des bacilles à Gram et à oxydase négative.

1.9.1. Principe des plaquettes RapID™ ONE :

Le système RapID™ ONE de Remel est une micro- méthode qualitative faisant appel à des substrats conventionnels et chromogènes pour l'identification des entérobactéries, ainsi que d'autres bacilles à oxydase négative et à Gram négatif, isolés à partir de prélèvements cliniques d'origine humaine. Elle est constituée de 18 cavités, qui contiennent des réactifs déshydratés, la galerie permet d'accueillir 19 résultats de tests grâce à la présence d'une cavité bi-fonctionnelle ; l'identification de l'isolat du test est obtenus en comparant les résultats à des modèles de réactivité enregistrés dans une base de données, via l'utilisation d'Electronic RapID Compendium (ERIC™) grâce au tableau différentiel RapID, ERIC™ Software (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) .



Figure 16 : Résultat de la galerie rapid one après inoculation par une suspension bactérienne

1.10. Tests biologiques :

IV.10.1.Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion de disque sur gélose de Muller Hinton. La classification des souches bactériennes en catégories « sensibles, (S) », « Intermédiaire, (I) » ou « Résistant, (R) » aux antibiotiques est définie par le (CLSI, 2014). Ce qui a permis de définir les différents phénotypes des souches bactériennes étudiées.

L'épaisseur de la gélose est de 4mm et le diamètre des boîtes est de 90 mm, les boîtes doivent être séchées au préalable afin d'éliminer l'excès d'humidité. La méthode est résumé au niveau de l'annexe I. Après ensemencement par la technique de beurrage utilisant un inoculum de 0.5 McFarland de la souche à tester et incubation pendant 18h à 37°C, les diamètres ou zone d'inhibition sont mesurées avec précision à l'aide d'un pied à coulisse. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations du CLSI. Les entérobactéries présentant des diamètres réduits aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime CTX, céftriaxone CRO, céftazidime CAZ) avec ou sans image de synergie (CTX-AMC), les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* présentant un diamètre réduit à la

Céftazidime avec ou sans image de synergie (CAZ-TCC) ainsi que les staphylocoques présentant un diamètre réduit à l'oxacilline ont été retenues.

Tableau 5 : Antibiotiques testés

Antibiotique	Charge en µg	Abréviation	Famille
Ampicilline	10	AMP	Les pénicillines
Amoxicilline	25	AMX	
Amoxicilline/Acide Clavulanique	20/10	AMC	
Ticarcilline	75	TIC	
Pipéracilline	100	PIP	
Ticarcilline- clavulanate	75-10	TCC	
Pénicilline G	10	P	
Oxacilline	5	OX	
Céfalotine/Céfalexine	30	CF	
Cefoxitine	30	FOX	
Céfotaxime	30	CTX	
Ceftazidime	30	CAZ	
Ceftriaxone	30	CRO	
Aztreonéme	30	ATM	Les monobactames
Imipénème	10	IMP	Les carbapénèmes
Gentamicine	10	GN	Les aminosides
Amikacine	30	AN	
Netilmicine	30	NET	
Acide nalidixique	30	NA	Quinolones /Fluoroquinolones
Ofloxacine	5	OFX	
Ciprofloxacine	5	CIP	
Lévofloxacine	5	LEV	
Erythromycine	15	E	M L S
Spiramycine	100	SP	
Lincomycine	15	L	
Clindamycine	2	DA	
Pristinamycine	15	PT	
Vancomycine	5	VA	Les glycopeptides
Teicoplanine	30	TEC	Les cyclines
Tétracycline	30	TE	
Doxycycline	30	DO	Divers
Colistine	10	CT	
Chloramphénicol	30	C	
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	110	SXT	
Rifampicine	30	RA	Les rifamycines

1.10.2. Test de synergie :

Dans le cas d'une réduction de la sensibilité aux céphalosporines de 3^{ème} génération, la production des BLSE peuvent être mise en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique de l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, ceftazidime et céftriaxone) et l'aztréonam. Cette image dite en "bouchon de champagne" (Jarlier et *al.*, 1988 a).

Technique :

La recherche phénotypique de la production des BLSE se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme ; elle consiste à placer des disques de céftazidime, céfotaxime, ceftriaxone et aztréonam (30 µg) à une distance définie (centre à centre) d'un disque d'AMC (amoxicilline clavulanate) (10 µg) .

Pour les entérobactéries et un disque de TCC (Ticarcilline clavulanate) (75 µg) pour les *Pseudomonas sp* et les *Acinetobacter sp*. La distance est déterminée en fonction de groupe bactérien et le diamètre d'inhibition vis a-vis de la C3G, l'incubation est effectuée pendant 18 heures à 37°C ± 1°C

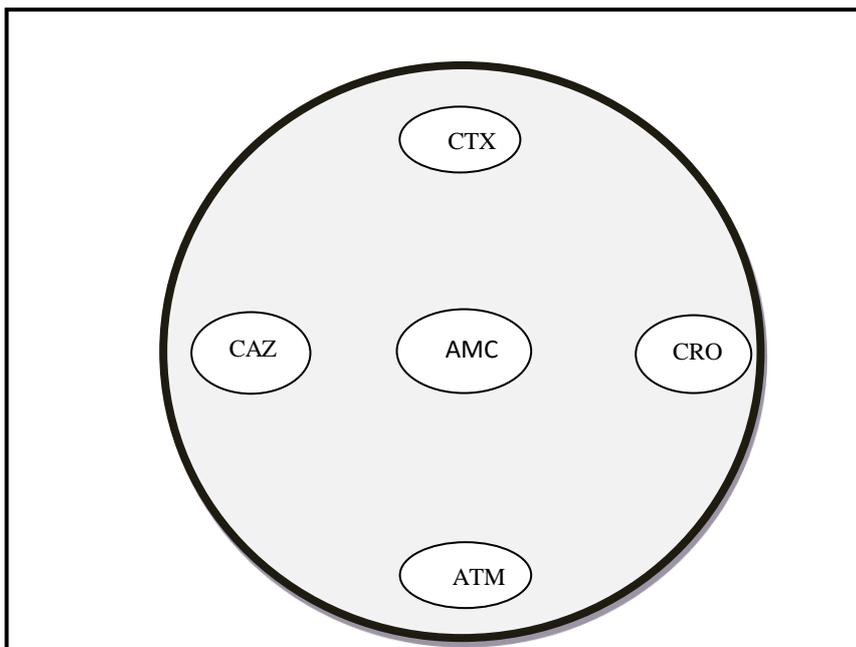


Figure 17 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.

Lecture :

L'apparition d'une image de synergie entre le disque d'AMC ou TCC et les disques ceftazidime, céfotaxime, ceftriaxone, et aztréonam indique la production d'une BLSE. (Naas et *al.*, 2005).

1.10.3. Test du double disque (test espagnol) :

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton (Jonathan, 2005) .

Technique :

Sur une boîte de pétri préalablementensemencée, le disque d'AMC et un disque CTX sont placés à une distance de 25 mm, après un temps de diffusion d'une heure à température ambiante, le disque d'AMC est remplacé par un disque de CTX et les boîte sont incubée a 37C°pendant 18 heures

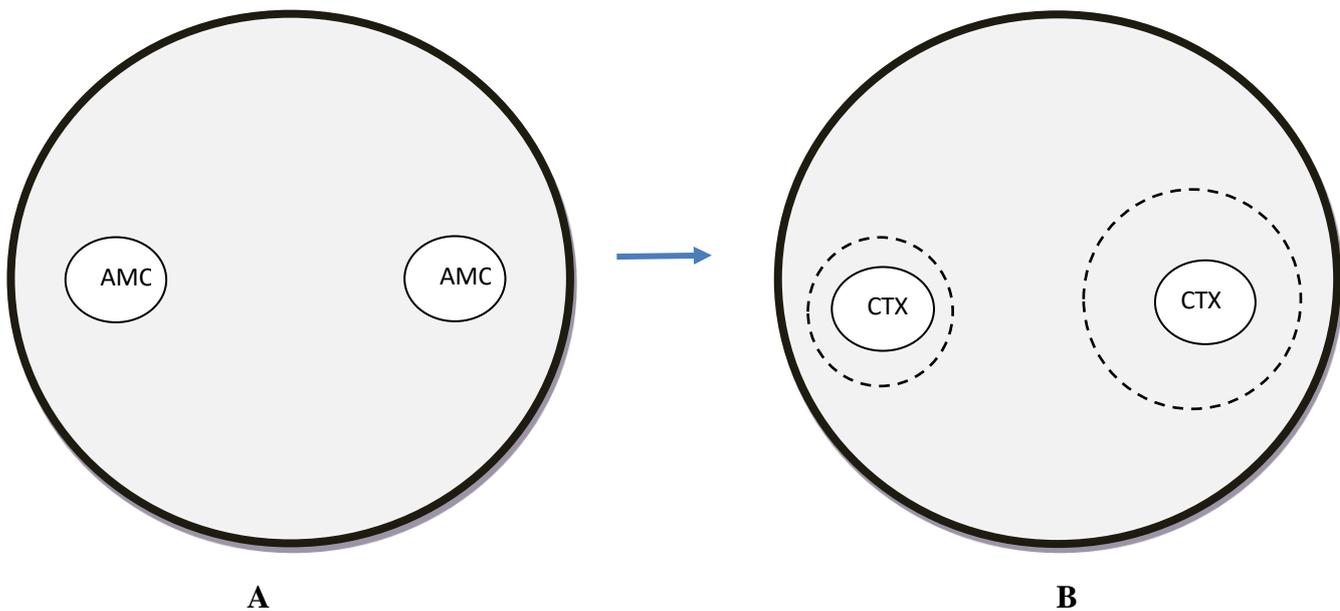


Figure 18 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque. **A :** CTX et AMC, **B :** AMC remplacé par CTX après certain temps de diffusion.

Lecture:

Le test du double disque est considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de troisième génération appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égale de 4 à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de C3G.

1.10.4. Test sur gélose à la cloxacilline :

Pour certaines souches de bacille à Gram négatif il est parfois difficile de distinguer sur un antibiogramme habituel les hypersécrétions des céphalosporinases de haut niveau (CHN) des BLSE ; la cloxacilline ajoutée au milieu pour l'antibiogramme (MH), inhibe *in vitro* les cephalosporinases et reste inefficace sur les pénicillinases des bacilles à Gram négatif ; la concentration de la cloxacilline est déterminée selon le groupe bactérien (CLSI, 2014)

Tableau 6 : Concentration en cloxacilline en fonction du groupe bactérien

	Entérobactéries du groupe 1 et 2	Entérobactérie du groupe 3 <i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter SPP</i>
Concentration en cloxacilline	0,5mg /ml (500 mg /l)	1mg/ml (1000mg /l)
Préparation de la solution de la cloxacilline	50 mg de cloxacilline +10ml d'eau distillée	100 mg de cloxacilline +10ml d'eau distillée
Pour une boîte ronde (90mm)	2ml de solution +18ml de MH	2ml de solution +18ml de MH

Technique :

L'antibiogramme est réalisé sur MH additionné de cloxacilline selon les concentrations représentées dans le (Tab.6) sur la surface gélosée ensemencée par la souche concernée ; les disques antibiotiques (β -lactamines) sont déposées en fonction de la souche étudiée (entérobactéries, *A. baumannii*, *P.aeruginosa*).

Lecture :

Le test à la cloxacilline est interprété en comparant l'antibiogramme réalisé sur MH additionné de la cloxacilline à celui réalisé sur MH sans cloxacilline.

1.11.Conservation des souches :

Les différentes souches concernées sont conservées dans des tubes contenant de la gélose de conservation, pour une conservation de longue durée, les souches sont inoculées dans des tubes contenant le milieu de culture adéquat à chaque souche additionnée à 30% de glycérol et maintenue à -20°C.

1.12. Extraction des huiles essentielles :

L'extraction des HEs a été réalisée par entraînement à la vapeur d'eau à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé avec de l'acétone puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil, une extraction à blanc a été effectuée avant chaque utilisation afin d'éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction.



Figure 19 : Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type clavenge

1.12.1. Matériels végétales :

Les huiles essentielles ont été extraites de la partie aérienne de 6 plantes récoltées de différents régions du nord de l'Algérie (Sétif, Constantine et Bejaia) en période de floraison, ces dernières sont séchées à l'abri de la lumière et à une température ambiante. La masse et la région de chaque plante sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Différents plantes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles

Nom scientifique	Famille	Nom commun	Région	Poids (gr)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lamiaceae</i>	Thym	Sétif	400 ,3
<i>Mentha pulegium</i>		Menthe	Constantine	393
<i>Pelargonium roseum</i>	<i>Geraniaceae</i>	Géranium	Constantine	260 ,3
<i>Salvia officinallis</i>	<i>Lamiaceae</i>	Sauge	Bejaia	372,1
<i>Origanum glandulosum</i>		Origan	Bejaia	708 , 3
<i>Rosmarinus officinalis</i>		Romarin	Bejaia	513

1.12.2. Extraction de l'huile essentielle par entrainement à la vapeur d'eau

L'extraction est effectuée par entrainement à la vapeur d'eau dans la quelle la matière végétale n'est pas en contact direct avec l'eau, la vapeur d'eau se condense dans un réfrigérant permettant la récolte de l'huile essentielle grâce à la différence de densité après décantation l'huile est récolté puis conservé dans des flacons bruns opaques à 5°C . Le rendement en huile essentielle (R) est le rapport entre le poids de l'huile extraite (P') et le poids de la plante traitée (P) (Carré, 1953). Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P'/P) \times 100$$

R% : Rendement de l'huile en (%), P' : Poids de l'huile en (g), P: poids de la plante sèche

1.13. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

1.13.1. Méthode de la ligne radiale (radial streak method) :

Il s'agit d'un test qualitatif préliminaire généralement utilisé pour déterminer les huiles essentielles les plus efficaces, en utilisant des disques de papier stériles (Whatman n°1, diamètre de 6 mm) imprégnés avec 10 µl de solutions mères d'huiles essentielles et placé sur la surface du milieu Muller Hinton (MH) au centre de la boîte. Puis le milieu de culture est inoculé avec une suspension bactérienne (inoculum) ajustée à 0,5 McF ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/ml) par des lignes radiales de la bordure vers le centre de la boîte de pétri. L'activité antimicrobienne a été évaluée en analysant la taille en (mm) de la zone d'inhibition (Bosch et *al.*, 2012).

Tableau 8 : Les souches bactériennes utilisées pour déterminer l'activité antibactérienne des huiles essentielles

Souche	Famille	Origine
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27255	<i>Enterobacteriaceae</i>	Souches de references
<i>E. coli</i> ATCC25953		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700903		
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	<i>Staphylococcaceae</i>	
<i>L. innocua</i> CLIP 74915	<i>Listeriaceae</i>	
<i>E.coli</i> 2793 BLSE	<i>Enterobacteriaceae</i>	Urine (MI)
<i>K. pneumoniae</i> 3486 BLSE		Urine (cardio)
<i>S. marcescens</i> 1392 BLSE		Pus (ortho)
SARM 1392	<i>Staphylococcaceae</i>	Pus(MI)
<i>A .baumannii</i> 2873	<i>Moraxellaceae</i>	Urine (MI)

Les huiles les plus actives sont sélectionnées pour déterminer leur activité antibactérienne en milieu solide par la technique d'aromatogramme et en milieu liquide (CMI) ainsi que leur activité anti-biofilm .

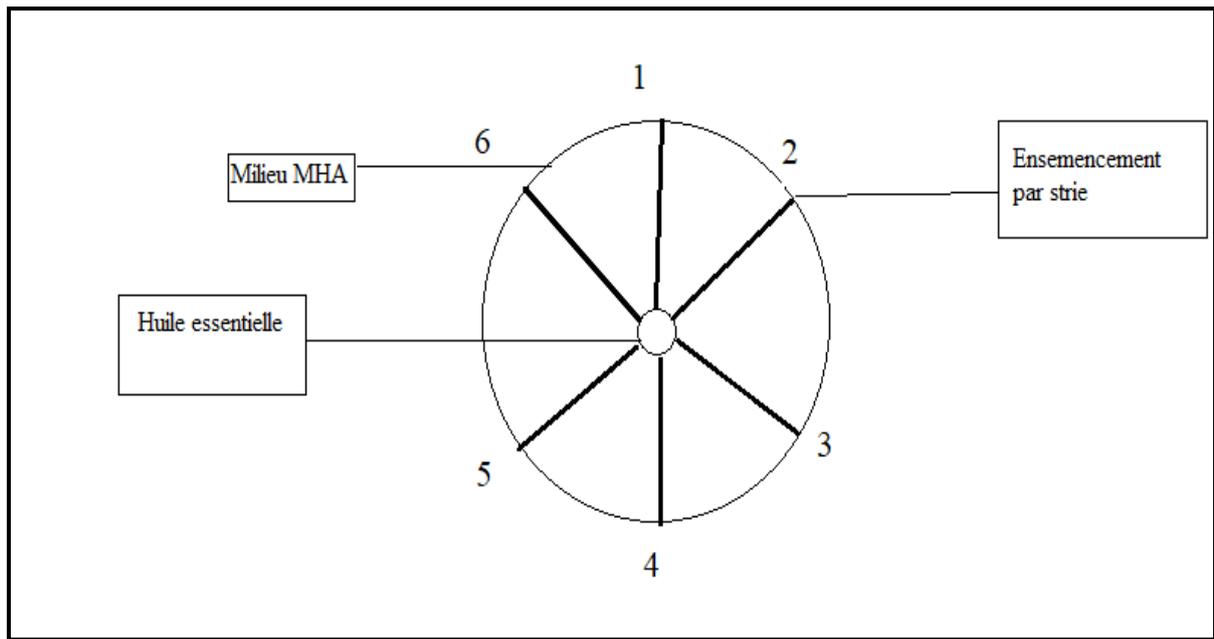


Figure 20 : Test préliminaire (radial streak method) de l'huile essentielle du thym sur une gamme de bactérie résistante . **1:** témoin (BHIB). **2:** *K.pneumoniae* ATCC700903. **3:** *E.coli* ATCC25953. **4:** *P.aeruginosa* ATCC 27255. **5:** SARM 1392. **6:** *L.innocua* clip 74915

1.14. Formulation de la nanoencapsulation et la nanoémulsion de l'huile essentielle de l'origan (*Origanum glandulosum*)

La nanoencapsulation de HE de *L'Origanum glandulosum* a été obtenue par homogénéisation à grande vitesse HSH en utilisant de l'alginate de sodum et du tween 20 ainsi que de l'eau distillée par un homogénéisateur de type Ultra Turrax T25 (IKALabortechnik, Staufen, Allemagne) à 24000 rpm pendant 10 minute.

Alors que la nanoémulsion a été réalisée par la technique d'homogénéisation à haute pression HPH, les émulsions sont effectuées en mélangeant une solution constituée de 1g de l'HE d'origan et 1% du tween 20 dans 100ml d'eau desionisée par une homogénéisation à 18000 tour /min pendant 20 minute avec une température maintenue à 25°C (Duang et *al.*, 2020).

1.14.1. Analyse de la taille et charge des particules des nanoformulations :

Les particules préparées ont été analysées pour leur granulométrie et leur distribution granulométrique, afin de déterminer leurs diamètres volumiques moyens et l'indice de polydispersité par corrélation de photons spectroscopie, en utilisant l'analyseur granulométrique à diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Zetasizer) Nano ZN, Malvern Panalysis Ltd., Grovewood Road, Malvern, UK) à un angle fixe de 173°C à 25°C.

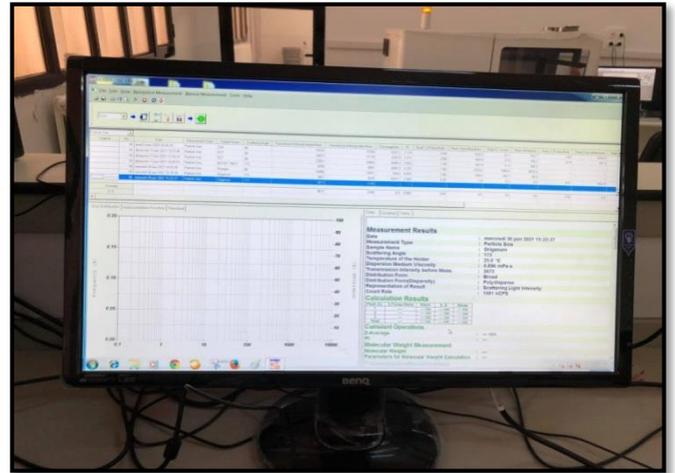


Figure 21: Dispositif du DLS utilisé pour l'analyse de la taille et la charge des particules de la nanoémulsion et nanoencapsulation

Les échantillons ont été analysés en triple exemplaire. Le DLS mesure le mouvement brownien de nano-gouttelettes et relie ce mouvement à un diamètre hydrodynamique équivalent (nm). La taille moyenne des gouttelettes, les courbes de distribution de taille et l'indice de polydispersité ont été utilisés pour caractériser la dispersion de gouttelettes d'huile dans les nanoémulsions. La mobilité électrophorétique des gouttelettes d'huile, dénommé potentiel z ou charge électrique des particules ont également été mesurés par le même appareil (Fraja et *al.*, 2019) .

1.15. Etude de la composition chimique des huiles essentielles hydrodistillées (HD) et des nano-formulations :

1.15.1. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse :

La séparation a été réalisée sur un système Trace GC Ultra Chromatographie (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) équipé d'un spectromètre de masse ISQ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) avec une colonne capillaire TG-5MS de 60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m d'épaisseur (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La séparation des colonnes a été programmée à 50°C avec un temps de maintien de 3 min, puis la température est augmentée à une vitesse de 4°C par min à 140°C avec un temps de retenue de 5 min. Ensuite la température est augmentée de 6 à 260°C par minute pour un temps d'attente isotherme de 5 min. La température de la source d'ions était de 200°C et la ligne de transition la température était de 250°C. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit constant de 1,0 ml/min et l'énergie d'ionisation était réglée à 70 Ev. L'identification des composés s'est faite sur la base de profils concordants avec la SEP bibliothèque informatique (NIST library, version 2005) par comparaison avec des composés bruts et données publiées. Le pourcentage des constituants identifiés a été calculé à partir des aires de pointe du GC. L'indice de Kovat a été calculé pour chaque composé en utilisant les temps de rétention d'une série homologue de n-alcane en C6-C26 et par correspondance avec les valeurs rapportées dans la littérature (Ali et *al.*, 2020) .

1.16 .Détermination de l'activité antibacterienne :

1.16.1.Test de diffusion en milieu solide (Aromatogramme)

Chaque test est répété en triplicata pour limiter le risque d'erreur, dans des boites de pétrie contenant de la gélose MH préalablement préparée, des puits sont découpés dans de la gélose puis chaque puit est rempli avec 20µl d'huile essentielle diluée dans du DMSO ; avec des concentrations décroissantes (1/2 , 1 /4 , 1 /8). Sur le fond de la boite, chacun des puits est identifié avec l'initiale de l'huile essentielle à testé (Daoud et *al.*, 2019). Le même test a été réalisé pour la nano-émulsion et la nano-encapsulation en utilisant des volumes de (20, 25, 30 µl) au niveau des puits en milieu solide.

Préparation de l'inoculum :

En premier lieu une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 McF est préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Cette opacité est équivalente à une densité optique de 0.08 – 0.1 à 625 nm .

Ensemencement et incubation :

Un écouvillon stérile est immergé dans la suspension bactérienne quelques secondes puis le contenu est étalé régulièrement par stries horizontales puis verticales sur la surface de la gélose MH, afin d'obtenir des colonies confluentes. Ensuite, 20 µl de l'huile essentielle à tester sont déposés dans le puit identifié. Une fois tous les puits remplis, les couvercles des boîtes sont refermés et les boites sont laissés 15minutes sur la paillasse afin de permettre une bonne diffusion de l'huile. Les boites sont ensuite incubées couvercle vers le haut, à 37°C pendant 18 à 20 heures.

Lecture et interprétation :

Après incubation, la lecture du diamètre d'inhibition en mm est réalisée à l'aide du pied à coulisse.

1.16.2. Test de diffusion en milieu liquide (evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par la technique de microdilution) :

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées sur des microplaques de 96 puits. La méthode de microdilution est réalisée suivant le protocole préconisé par le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), les huiles essentielles ont été diluées dans le DMSO à 10% puis une série de dilution de raison géométrique 2 est réalisée de façon à avoir une gamme de concentration de (5% - 0.039%). Chaque puit est inoculé avec 50µl de différentes concentrations de l'huile essentielle et 50µl de la suspension bactérienne ajustée à 0.5 MacFarland. Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24 heures, un témoin positif est préparé avec 50µl du BHIB et 50µl de l'inoculum, quant au témoin négatif il est préparé avec 100µl du BHIB, les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24h (Natarajan et *al.*, 2005). La même technique est utilisée pour les nano-formulations (nano-émulsion et nanoencapsulation) avec une gamme de concentrations allant de (250 jusqu'à 7.81 µl/ml).

Lecture et interprétation :

La lecture s'effectue en utilisant un indicateur coloré le 2,3,5-diphényltétrazolium chloride [TTC, le rouge tétrazolium] diluée dans de l'eau distillée stérile à l'ordre de 0,2g/ml, par l'ajout de 40µl de TTC suivi d'une incubation pendant 10 min à 37°C, le TTC révèle la présence de bactéries vivantes par l'apparition d'une coloration rouge. La CMI est égale alors à la plus petite concentration pour la quelle aucune coloration n'est observé (Peskin et Winterbourn, 2000, Sharma *et al.*, 2012).

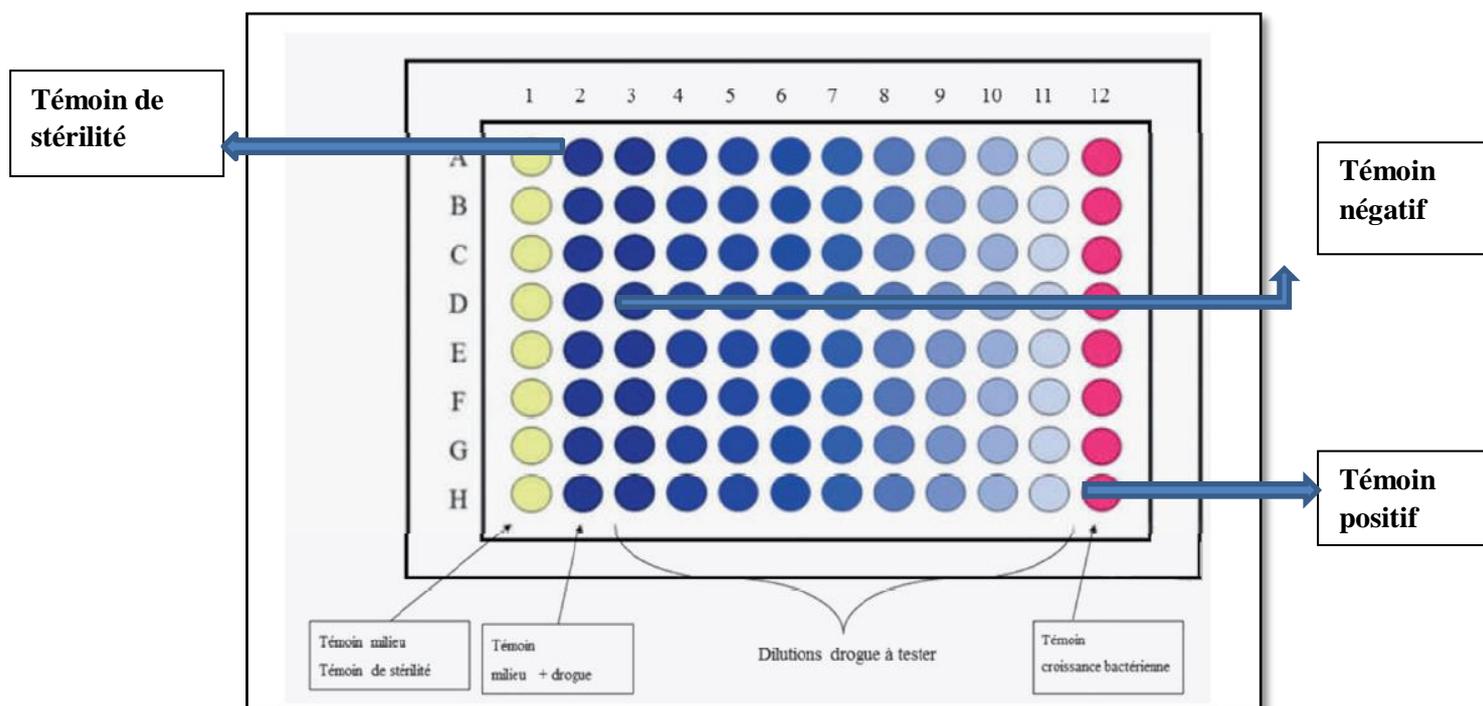


Figure 22 : Plan d'une microplaque pour la réalisation de la CMI en milieu liquide (Fontanay *et al.*, 2015)

1.16.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide :

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle, la même gamme de concentration réalisée par la technique de microdilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'huile essentielle à tester, 10 µl sont prélevés des puits dont aucun changement de couleur n'est observé, ensemencés sous forme de strie sur milieu gélosé MH et incubés à 37°C pendant 24h (Taleb *et al.*, 2018). Le même protocole a été effectué pour la nano-émulsion et la nano-encapsulation

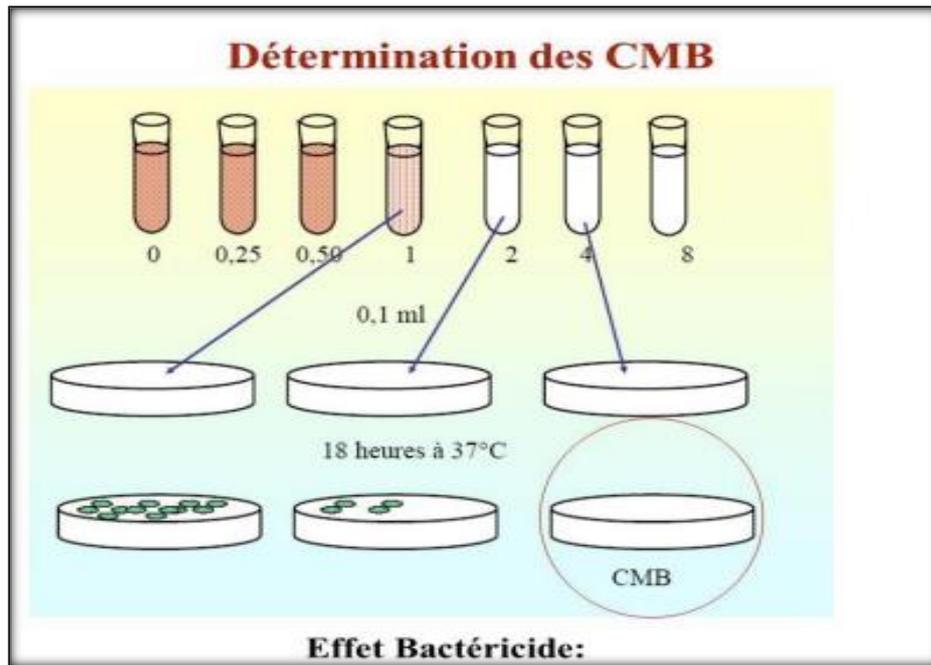


Figure 23 : Détermination de CMB en milieu solide.

1.17. Mise en évidence de la formation de biofilm :

Les souches sélectionnés sont cultivées dans le BHI et incubées à 37°C pendant 24 heures ensuite chaque puits de la micoplaque est rempli par 100µl de BHI stérile et 100 µl de l'inoculum bactérien ajusté à 0.5 McFarland , les puits de la première colonne sont remplis par le BHI stérile afin de servir de témoin , les plaques sont incubées 24h jusqu'a 48h à 37°C, puis les microplaques sont rincées 3 fois avec de l'eau physiologique stérile et séchées 15 minutes à température ambiante , ensuite les plaques sont colorées avec le cristal violet à 0.2% pendant 15min. Le surplus de colorant est versé et rincé à l'eau physiologique stérile et séché pendant 1 heure. 150µl d'acide acétique est rajouté dans chaque puits et les densités optiques sont lus à l'aide d'un lecteur de microplaque à 630 nm (Extremina *et al.*, 2010).

Lecture et interprétation :

La classification des résultats obtenus présente sur la base de la DO témoin. Les souches ont été classées comme suit : $DO \leq DO_t$ (Témoin) $\times 2$: Faiblement formatrice de biofilm, $DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$: Modérée, $DO_t \times 4 \leq DO$: Fortement formatrice de biofilm (Christensen *et al.*, 1985).

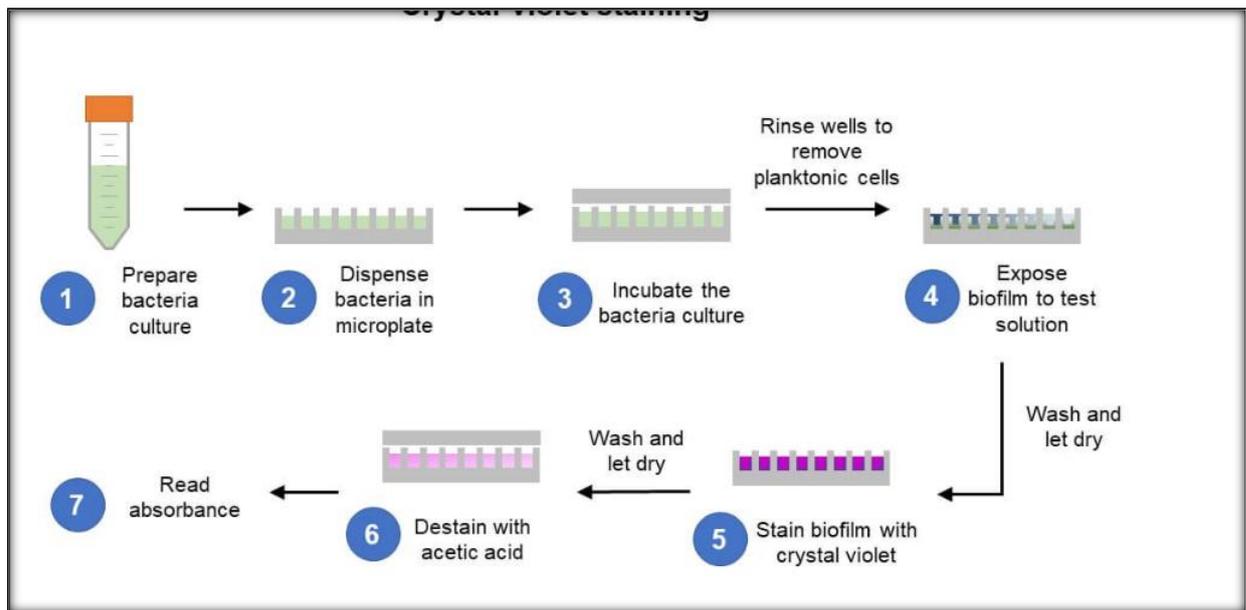


Figure 24 : Mise en évidence de la formation de biofilm chez *A.baumannii* par le cristal violet (CV)(ASTM , 2017)

1.18. Activité antibiofilm de l'huile essentielle(HD) et des nanoformulations de l'origan :

L'inhibition de la formation du biofilm par l'huile essentielle a été effectuée dans les microplaques de 96 puits. Chaque puit est rempli par 100 µl de l'huile essentielle à des concentrations sub-inhibitrices et 100µl de l'inoculum bactérien (10^5 UFC/ml) les puits contenant l'inoculum bactérien sans l'huile essentielle sont considérés comme témoin négatif, les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 48 heures sans agitation après incubation les plaques sont rincées à l'eau physiologique stérile 0.9% afin d'éliminer les bactéries planctoniques. Ensuite les plaques sont séchées à l'étuve à 60°C pendant 45min et chaque puits est rempli par 200µl de cristal violet 0.4% et incubé à température ambiante pendant 15min , afin d'éliminer l'excès de cristal violet les plaques sont rincées 3fois à l'eau physiologique stérile et chaque puits est rempli par 200 µl d'acide acétique à 30% préparé avec de l'eau ultra pure , l'absorbance est mesurée à 595 nm et le pourcentage (%) d'inhibition est calculé en fonction de la formule suivante (Gómez-Sequeda et *al.*, 2020) .

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{\text{DO du contrôle négatif} - \text{DO de l'échantillon} * 100}{\text{DO contrôle négatif}}$$

1.19. Isolement et caractérisation des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été isolés d'un ferment lactique commercial (**Ultrabiotique**) formulé par les laboratoires Nutrisanté , il est composé principalement de *Lb.plantarum* et bifidobacterium, d'acide gras et sels de magnésium , il permet de développer et diversifier la flore intestinale et les défenses immunitaires, les lactobacilles ont étéensemencées en masse à partir des dilutions décimales de la suspension mère, 100µl de chaque dilution est étalée sur le milieu MRS agar précédemment stérilisé et coulé dans des boîtes de pétri stériles, les boites ont été incubées à 30°C pendant 48 H.

1.19.1. Examen macroscopique :

Les colonies obtenues sont observées à l'œil nu afin de déterminer leur caractéristiques culturelles .

1.19.2. Examen microscopique :

Après avoir réalisé une coloration de Gram les colonies sont observées sous microscope optique (grossissement X 100) à fin de déterminer le type de Gram ; la forme de la cellule bactérienne et le mode d'agencement.

1.20. Recherche de la catalase :

L'eau oxygénée est mise en contact avec une colonie bactérienne, un dégagement gazeux indique la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme catalase (Guiraud, 2003).

1.21. Production de CO₂ à partir du glucose :

Ce test permet de différencier le type fermentaire de la souche bactérienne par l'utilisation des cloches de durham, après avoir inoculé la souche bactérienne dans un bouillon contenant la cloche de durham inversé et remplie du bouillon, les tubes sont incubés à 30°C pendant 48h le dégagement d'un gaz au niveau de la cloche indique un type hétérofermentaire tandis que l'absence de CO₂ indique un type homofermentaire (Müller, 1990).

1.22. Évaluation de la cinétique de croissance et de production :

L'évaluation de la croissance des lactobacilles ainsi le pH est effectué dans le milieu MRS liquide à pH 6.8, en effectuant des prélèvements stériles périodiquement afin de déterminer la DO à 560 nm et le pH.

1.23. Mise en évidence de l'activité antibactérienne :

Dans le but de déterminer l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur certaines souches d'intérêt (potentiellement pathogènes et résistantes aux antibiotiques) deux méthodes ont été appliqués (Karmen et Bogovic, 2003) .

1.23.1. Technique direct :

L'activité antibactérienne a été déterminée contre six souches pathogènes SARM, *S.aureus* ATCC6538P, *E.coli* 2793 BLSE, *E.coli* ATCC25953, *L. innocua* CLIP 74915, *A.baumannii* 2873 , le test consiste à ensemencer les lactobacilles en touche sur la surface du milieu MRS solide et à incuber les souches pendant 24H à 30°C , ensuite les boîtes de culture contenant les lactobacilles sont recouvertes avec 8ml du milieu BHI contenant 0.8% d'agar maintenu en surfusion à 45°C inoculé avec 100µl de la souche de culture pathogène , après 24H d'incubation l'apparition de zones claires autour des spots se traduisent par une activité positive (Fleming et al .,1975) .

1.23.2. Technique indirect :

Ce test permet de mettre en contact le surnageant de la bactérie lactique et la souche pathogène, les souches sont cultivées dans du MRS pendant 48h puis centrifugées (8000tr pendant 10min) le surnageant obtenu est filtré à travers des membranes de 0.45µm , des boîtes de pétris MHA dans les quelles des puits de 6mm sont préalablement effectués et ensemencés par les souches pathogènes , les puits sont remplis par le surnageant bactérien , l'activité antibactérienne se traduit par une zone clair autour des puits.

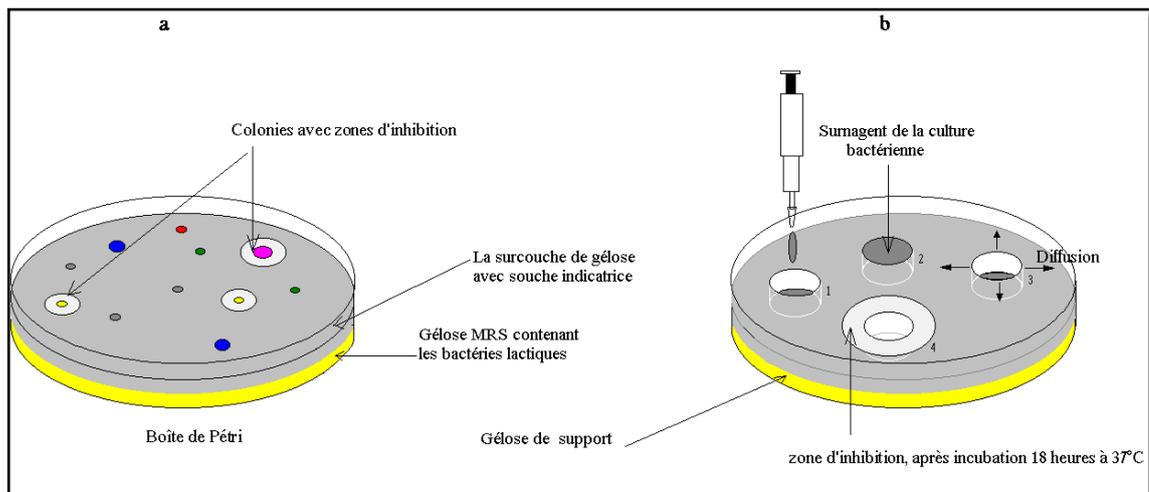


Figure 25 : Méthode de mise en évidence de l'activité antibactérienne en milieu solide **a :** Technique de spot agar et **b:** Technique de puits

1.23.3. Mise en évidence de l'agent inhibiteur :

A/Inhibition due aux acides organiques

Les lactobacilles sont cultivées dans le milieu MRS à 30°C pendant 48H à 72h , la culture bactérienne est ensuite centrifugée, le surnageant récolté est ajusté à un pH neutre par une solution de NaOH à 10M , la neutralisation du pH a pour but d'éliminer l'effet des acides organiques, le surnageant traité est ensuite filtré à travers des membranes de 0.45µm et l'activité antibactérienne est effectuée par la méthode de diffusion des puits en milieu solide (Tagg et Given , 1971a) .

B /Inhibition du au peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est considéré comme un agent inhibiteur de la croissance bactérienne, cet agent est neutralisé par la catalase, afin de limiter l'effet du peroxyde d'hydrogène (Julliard *et al*, 1987), le surnageant est traité avec 2mg/ml de catalase et l'activité antibactérienne est effectuée par la même méthode précédemment mentionnée (methode de diffusion des puits) (Guessas, 2007).

1.24.Analyse statistique :

Le test de khi deux a été réalisé pour analyser les facteurs de risques (sexe, diabète, antibiotherapie préalable.....) les analyses ont été effectuées avec excel ; avec une valeur de $p < 0.05\%$ considérée comme statistiquement significative, les tests de l'activité antibacterienne ont été réalisés en triplicata et les resultats exprimés en moyenne \pm SD , les graphs sont réalisés par excel et graph pad prism 5 .

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSION

V.Résultats et discussion

1.Etude prospective :

1.1 Souches bactériennes

A partir de 323 prélèvements récupérés à partir des patients hospitalisés aux différents services pendant plus de 48h, 196 souches ont été isolées, avec une fréquence d'isolement relativement élevée (64.79%). La prédominance était pour les entérobactéries, avec en tête *E. coli* (25.51%) suivie par *K. pneumoniae* (20.40%). Pour les BGN non fermentaires, la prédominance était pour *P.aeruginosa* (18.36%). Et pour les bactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus* était l'espèce prédominante (15.81%) (**Tab. 9**).

Tableau 9 : Répartition des souches bactériennes par espèce

Espèce	Nombre	Taux
<i>E.coli</i>	50	25.51%
<i>K.pneumoniae</i>	40	20.40%
<i>P.aeruginosa</i>	36	18.36%
<i>S.aureus</i>	31	15.31%
<i>P.mirabilis</i>	11	5.61%
<i>Proteus.spp</i>	7	3.57%
<i>M.morganii</i>	3	1.53%
<i>S.marcescens</i>	5	2.55%
<i>E.cloacae</i>	5	2.55%
<i>E.agglomerans</i>	2	1.02%
<i>P.vulgaris</i>	1	0.51%
<i>P.penneri</i>	1	0.51%
<i>E.aerogenes</i>	1	0.51%
<i>Serratia.spp</i>	1	0.51%
<i>A.baumannii</i>	2	1.02%

1.2.Répartition des souches par service :

Les fréquences d'isolement varient en fonction des services. Le service de médecine interne occupe la première place avec une fréquence de 39.89%, suivi par le service d'orthopédie (**Fig. 26**). Alors que de nombreuses études rapportent le service de chirurgie générale et de réanimation comme département à haut risque de développement d'infection, en effet le CHU de Tlemcen révèle que 35% et 18% des entérobactéries sont principalement isolées du service de réanimation et le service médico-chirurgicale avec une fréquence de 53% et 18% respectivement (Boujamaa, 2015)

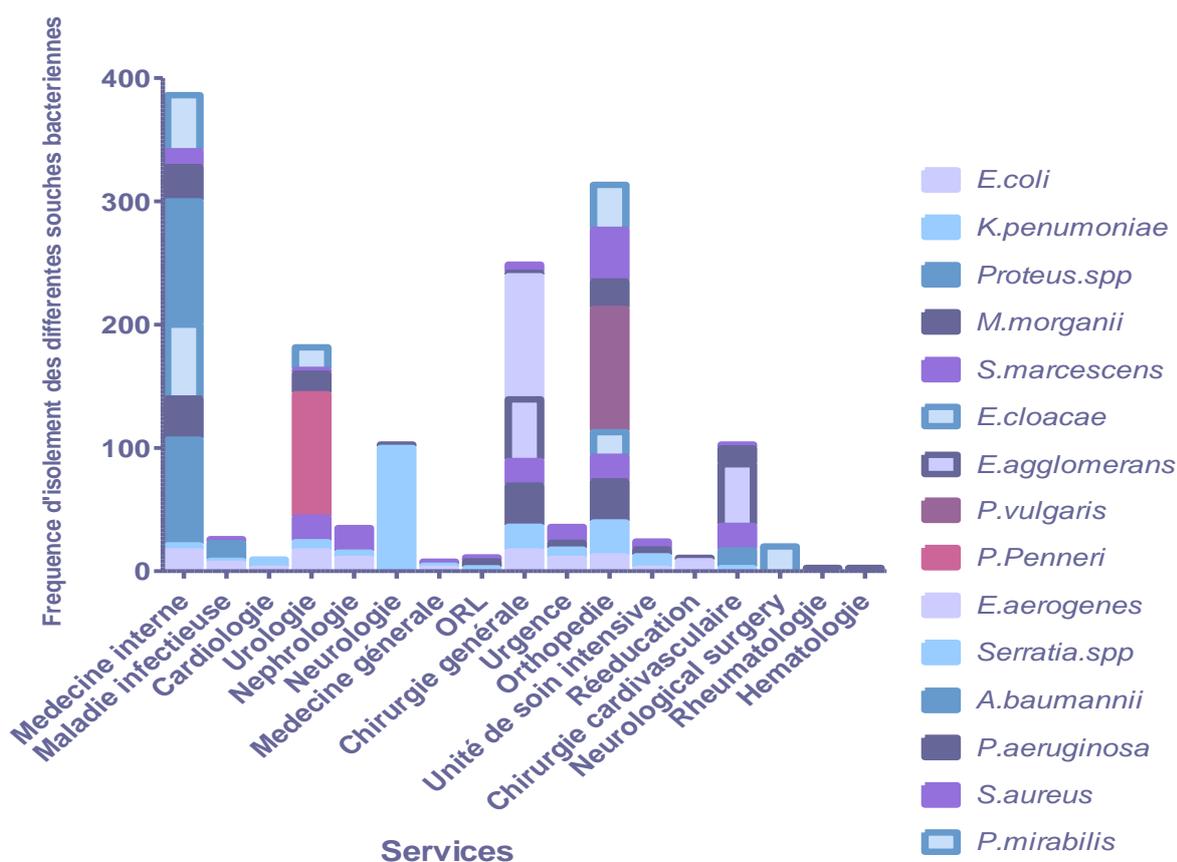


Figure 26 : Fréquence d'isolement des différentes espèces bactériennes en fonction des services

1.3.Répartition des souches en fonction du type de prélèvement :

La répartition des souches bactériennes en fonction du type de prélèvement montre que les souches sont isolées principalement du pus avec un taux de (57.65%), suivies des urines (29.59%) puis des hémocultures et le LCR avec un taux de (3.57%) et (1.02%) respectivement. Une étude au niveau d'un hopital au Malawi rapporte une prédominance des prélèvements issus du pus avec une fréquence de (69.3%) (Kumwenda et *al.*,2021)

1.4.Répartition des souches par sexe :

Les résultats démontrent une prédominance chez les patients de sexe masculin avec un taux de (61.22 %) contre (30.61%) isolés chez les patients du sexe féminin.avec un sexe ratio de 2 , contrairement à notre étude, les resultats obtenus par d'autres travaux rapportent une fréquence superieure chez le sexe féminin (Maiworé et *al* , 2021) .

Tableau 10 : Répartition des souches bactériennes isolées en fonction du sexe

Sexe	Homme	Femme
Taux d'isolement	61.22%	30.61%

2.1.Fréquence et répartition des BMR par famille bactérienne :

La figure 28 montre que le groupe bactérien prédominant est représenté principalement par les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (E-BLSE) avec un taux de (27.47%) ; ce résultat est assez proche des études nationales et internationales publiées jusqu'alors au Nord d'Algérie , où des taux élevés ont été rapportés , soit (39.22%) à Tlemcen (Tani et *al.*, 2014) . Au Camroun une étude avait même rapporté un taux de 76% (Maiworé et *al.* , 2021).

Cette prédominance des E-BLSE peut être expliquée par le fait que les entérobactéries sont les germes les plus fréquemment isolés au laboratoire mais aussi par leur capacité de résistance aux antibiotiques par des mécanismes variables notamment ; production des céphalosporinases chromosomiques et /ou plasmidiques et surtout de bêta-lactamases à spectre élargi. En effet, chez les bactéries à Gram négatif, la production de bêta-lactamases reste le mécanisme le plus fréquent de résistance aux bêta-lactamines. La présence de ce type de mécanisme de résistance au sein de germe hospitalier implique un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et par conséquent d'échec thérapeutique et qui est également un facteur de diffusion (Zahar et *al.*, 2010).

La résistance des souches de SARM n'est pas négligeable, lors de cette étude et pourrait être expliquée par la capacité de résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques mais aussi par un déficit en matière d'hygiène hospitalière facilitant ainsi leur diffusion manu portée de façon endémique dans nos hôpitaux et même dans la communauté (Nguyen Van et *al.*, 2006).

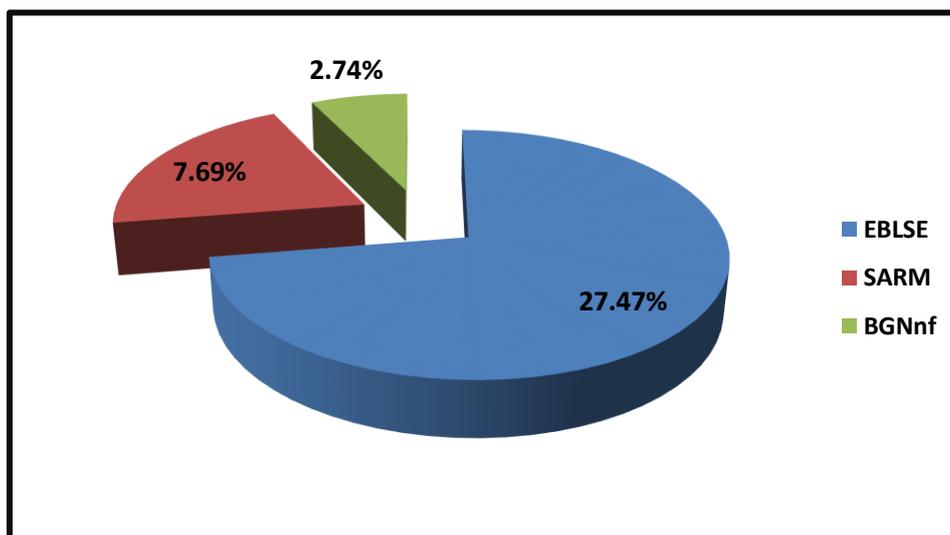


Figure 27: Fréquence d'isolement des BMR en fonction de la famille bactérienne

2. Fréquence d'isolement des bactéries multi-résistantes (BMR) :

Sur l'ensemble des souches isolées, le taux d'isolement des BMR était alarmant. Sur un total de 196, (35.20%) étaient des BMR. Avec une prédominance des souches de *K. pneumoniae* (34%), suivi par *E. coli* (27%), et *S. aureus* (20%) (Fig. 27). Alors qu'une étude réalisée en Tunisie a révélée la prédominance de *P. aeruginosa* (15.7%) suivie de *S. aureus* (15%) et *K. pneumoniae* (12.6%) (Krir et al., 2019)

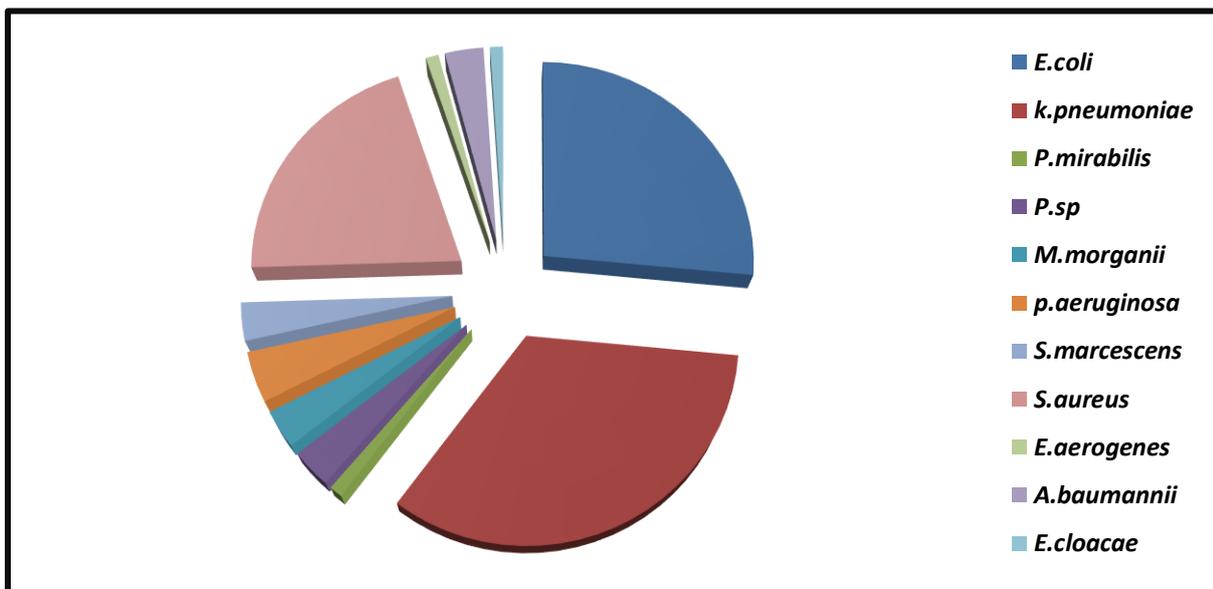


Figure 28 : Répartition globale des BMR selon les espèces bactériennes.

2.2. Caractéristiques de la population :

2.2.1. Facteurs de risques de portage de BMR

L'identification des facteurs de risque de la résistance aux antibiotiques permet de mieux comprendre l'épidémiologie des infections et de mettre en place certaines mesures adéquates dans la lutte contre la résistance et l'imergence de souches résistantes. L'étude des facteurs de risque pouvant être liés au développement d'une BMR est résumé dans le tableau suivant

Tableau 11: Caractéristiques des patients ayant développé une infection nosocomiale

Facteur	Patients porteurs d'une BMR	Patients non porteurs d'une BMR	P -valeur	Odd ratio (95%CI)
Age				
<25	2.64%	4.53%	0.44	1
25-64	45.41%	83.58%		
>64	21.12%	38.87%		
Sexe				
Homme	47.17%	86.82%	0.36	1.34
Femme	21.82%	40.17%		
Dispositif invasif	21.64%	56.32%	0.15	0.55
Diabét	10.56%	58.43%	0.02	2.43
Antibiothérapie préalable	21.82%	41.17%	0.48	1.24
Chirurgie antérieure	28.51%	98.49%	0.58	1.21

a- Antibiothérapie préalable :

Lors de cette étude 21.82% des patients hospitalisés étaient sous antibiothérapie principalement (l'amikacine, gentamycine, vancomycine, augmentin associé ou non au tienam) pendant les 3 derniers mois qui ont précédé leur admission sont porteurs d'une BMR, contre 41.17% qui sont non porteurs de BMR et ayant été sous antibiotiques, l'antibiothérapie n'est pas considérée comme facteur de risque associé à l'acquisition d'une BMR en milieu hospitalier avec (p=0.48 et OR:1.24) .

b- Diabète :

Il a été recensé que 58.43 % des patients porteurs d'une BMR sont diabetiques, l'analyse statistique démontre que le diabète est l'un des facteurs associé à l'aquisition d'une BMR (p=0.02 et OR = 2.43)

c- Sexe :

Concernant le sexe, aucun difference significatif entre l'aquisition d'une BMR et le sexe n'a été observé (p=0.36 (OR: 1.34).

d- Dispositif invasif :

Sur l'ensemble des patients hospitalisés 21.64% sont des porteurs de dispositif invasif et d'une BMR alors que 56.32% sont non porteurs de dispositif invasif et porteurs de BMR, ce qui indique que le dispositif invasif n'est pas lié à l'aquisition de BMR (p=0.15 et OR:0.55).

e- Chirurgie antérieure :

Une grande prévalance 98.49% concernant les patients ayant subi une chirurgie mais sans le développement d'une BMR a été enregistré lors de cette étude, indiquant que la chirurgie n'est pas un facteur associé à l'acquisition d'une BMR ($p=0.5$ (OR: 1.21).

f- Age :

L'analyse statistique du développement d'une BMR en fonction de l'âge n'a pas présenté de différence significative ($P=0.44$).

Le développement d'une infection bactérienne est souvent lié à certains facteurs. Selon de nombreuses études, ces facteurs de risques sont liés d'une part à l'état physiologique du patient comme (l'âge, le sexe, une hospitalisation prolongée, la dépendance physique, les antécédents d'infection urinaire; la sédentarité, l'immobilité, et plaie chronique), mais aussi à l'antibiothérapie, les dispositifs médicaux invasifs, ainsi que les antécédents de portage ou d'infections à BMR, sont considérés comme des facteurs majeurs de risque de colonisation et d'infections aux BMR (Gruber et *al.*, 2013). Cependant, les résultats obtenus par cette étude révèlent l'association d'un seul paramètre (le diabète) comme facteur de risque ; ceci serait probablement dû à la nature de l'échantillon et la taille de l'échantillon pris en considération ainsi que la période d'étude mais aussi à l'hétérogénéité des populations étudiées (âge, type de service, pays), la méthodologie d'étude (Bearman et Wenzel, 2005).

2.4.Répartition des BMR en fonction du service d'hospitalisation :

Certains services hospitaliers sont apparus plus concernés par le problème de la multi-résistance, notamment les services d'orthopédie et la médecine interne d'où provenaient respectivement un taux de (30%) et (20%) de BMR (**Fig. 31**), suivi du service de chirurgie générale avec un taux de (12%) ; Les autres services étaient répartis comme suivant : urologie, réanimation (4%), le service de néphrologie, urgence et maladies infectieuses (6%), la cardiologie (3%) , l'ORL et la rhumatologie , la médecine générale avec un taux de résistance de (1%) ; cependant le CHU de Batna indique que le service de reanimation est le plus concerné par les infection bacterienne multiresistante (Benmehidi, 2014) Concernant notre etude cette prédominance peut être expliquée par le nombre important des infections postopératoires. De plus, le service de médecine interne se démarque par l'accueil d'une grande majorité des patients qui consultent pour divers motifs.

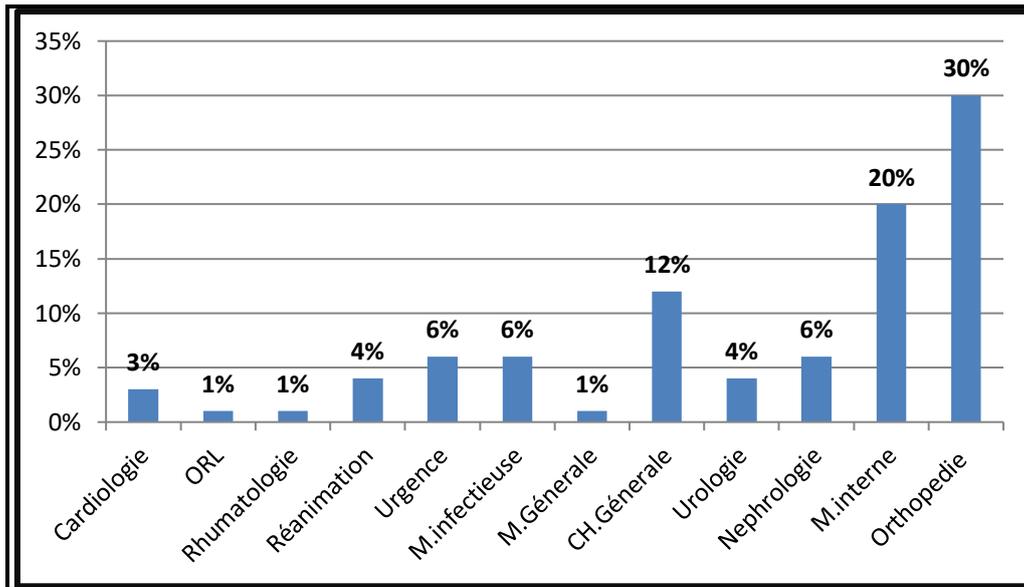


Figure 29 : Répartition des BMR selon les services hospitaliers.

2.5. Répartition des souches résistantes par type de prélèvements :

Les résultats obtenus (**Fig. 32**) montrent que sur l'ensemble des BMR, (67 %) des souches sont isolées du pus, alors que (25 %) sont isolées des urines ; et seulement (4%) sont isolées des hémocultures. Mais aucune bactérie multi- résistante n'a été isolée du LCR; La distribution des sites d'infection était principalement en faveur de l'infection cutanée avec un taux de 67%, en effet Benmehidi revele que 20% des bacteries BMR sont isolées des prelevement cutanées contre 11% au niveau des selles et 19% au niveau des prelevements nasaux (Benmehidi ,2014)

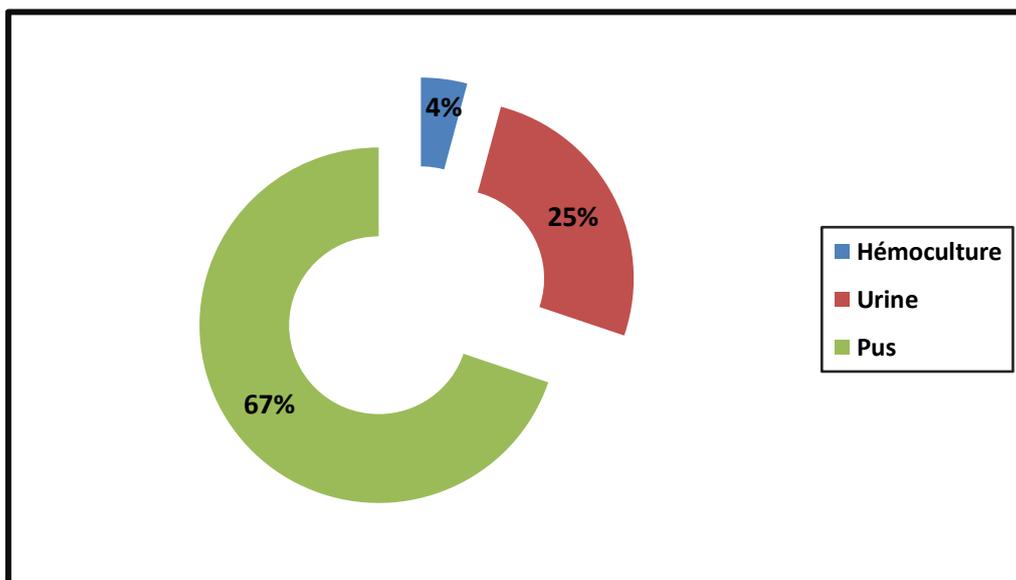


Figure 30 : Répartition des BMR selon la nature des prélèvements

2.6. Répartition des BMR en fonction du sexe :

La répartition des souches multi-résistantes en fonction du sexe démontre une prédominance prononcée chez le sexe masculin avec un taux de (70%) contre un taux de (26%) chez le sexe féminin ; Les fréquences enregistrées pour les deux sexes montrent une dominance pour les sujets masculins (**Fig. 33**). Ceci est en accord avec les résultats de Jovier et *al* qui rapportent une fréquence de 50% chez le sexe masculin (Jovier et *al*, 2019)

Cela est probablement dû au taux élevé d'admission des patients du sexe masculin par rapport au sexe féminin. En effet les militaires actifs sont prédisposés à de nombreux accidents et sont hospitalisés pour de nombreuses affections médico-chirurgicales.

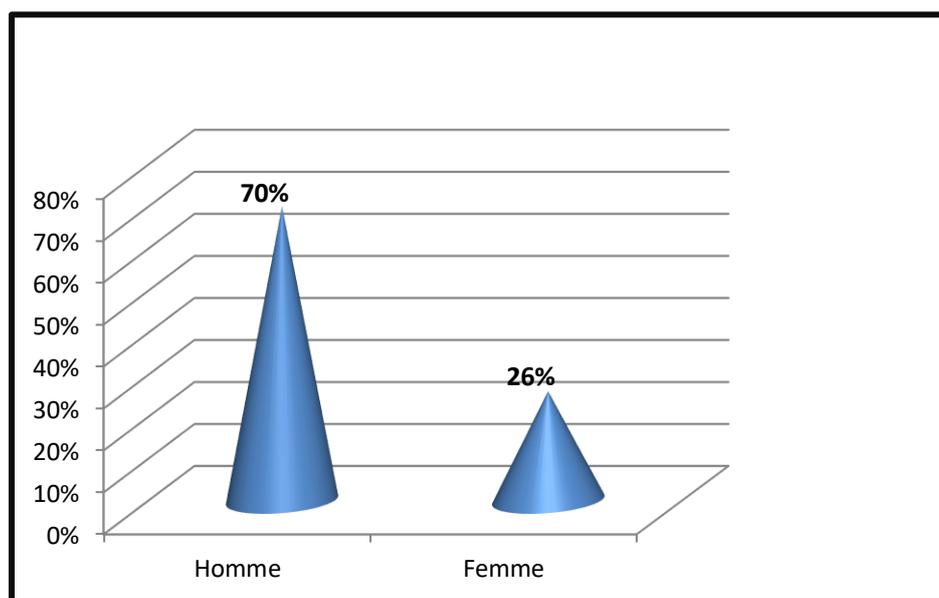


Figure 31 : Répartition des souches des BMR selon le sexe.

2.3. Répartition des BMR isolées par catégorie d'âge :

La répartition des souches isolées par catégorie d'âge des patients montre que le taux le plus élevé est enregistré dans la catégorie supérieur à 60 ans (32%) (**Fig. 30**). En effet l'infection des personnes âgées est fréquente en milieu hospitalier, et peut être expliquée par l'altération des mécanismes de défenses liés au processus de vieillissement (altération du système immunitaire, baisse de la sécrétions des muqueuses, maladies chroniques et fragilité de la peau), la polyopathie et la perte d'autonomie ou l'immobilisation relative des patients induisent des modifications physiologiques qui prédisposent l'individu âgé à l'infection (Xavier, 2010).

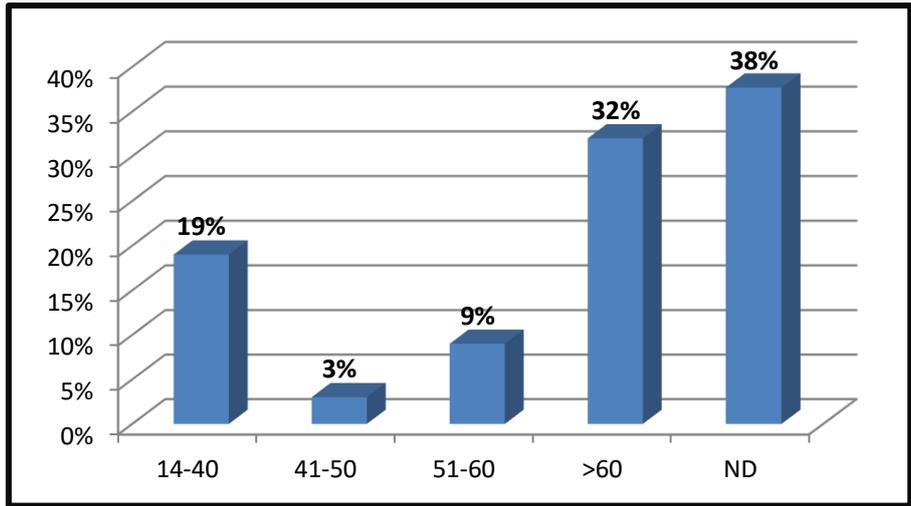


Figure 32 : Répartition des BMR par catégorie d'âge

2.2.2 .Taux de décès chez les patients hospitalisés :

Les résultats de cette étude montrent un taux de décès alarmant (8.69%) chez les patients hospitalisés et ayant contracté une infection à BMR. Une étude menée en Tunisie avait rapporté une mortalité attribuable aux BMR de 25% (Frigui et *al* .2021). Ce taux étant très variable d'une étude à l'autre est probablement lié à l'état physiologique du patient, du type de germe et de sa résistance aux antibiotiques (Bearman et Wenzel, 2005).

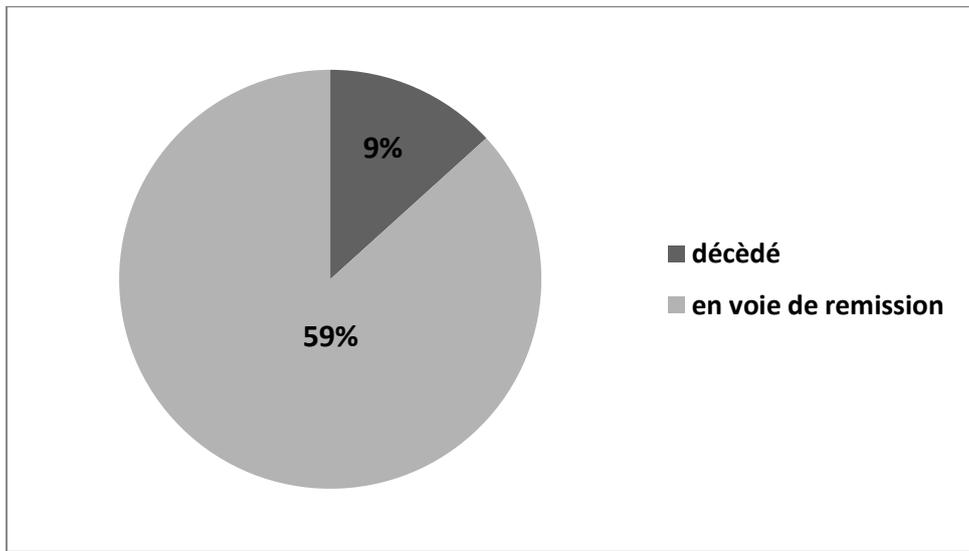


Figure 33: Taux de décès chez les patients admis à HMRUC

3.Profil de résistance aux antibiotiques :

3.1.Résistance des entérobactéries (BLSE)

L'analyse des résultats de sensibilité a montré des taux de résistance élevé et même absolu à certains antibiotiques comme l'ampicilline (AMP), l'amoxicilline (AMX), pipéracilline (PIP) et la ticarcilline (TIC) ont perdu leur efficacité contre presque toutes les souches collectées (**Tab. 12**). Par contre l'imipénème (IMP) a gardé une bonne activité contre toutes les souches testées (0 à 8%), à l'exception de *Proteus mirabilis* (100%). Alors que pour les céphalosporines de troisième génération (CRO, CTX), les fréquences de résistance étaient variables de 50% à 100% pour toutes les souches testées. Pour les aminosides, l'amikacin (AK) a gardé une bonne activité contre tous les isolats testés, sauf pour les *Proteus*. Par contre, la gentamicine (GN) était moins actif sur *E. coli*, *K. pneumoniae*, et *S. marsecens*. Une importante résistance aux quinolones est notifiée notamment vis-à-vis de l'oflaxacine (OFX), en effet Martin avait rapporté une résistance aux pénicillines et aux céphalosporines variable de 71% à 100% (Martin, 2020)

l'agence de santé public du Canada rapporte que les β -lactamines et les fluoroquinolones (FQ) sont les antibiotiques les plus prescrits dans le traitement des infections à BGN, notamment le traitement des pneumonies, des infections urinaires, des infections de la peau et des tissus mous ; ce qui explique le développement et l'augmentation de la résistance des entérobactéries aux FQ ainsi qu'aux β -lactamines ; de nombreuses études rapportent une résistance associée entre les bêta-lactamines, les aminosides, triméthoprime-sulfaméthoxazole, et aux quinolones. Cela est expliqué par la localisation des gènes de résistance à ces classe d'antibiotiques sur le même plasmide (Basu et Mukherjee, 2018; Niero et al., 2018). Les niveaux de résistance obtenus dans cette étude sont inquiétants et alarmants et sont la conséquence de la pression de sélection due à la prescription démesurée et l'usage parfois abusif des antibiotiques à large spectre aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (Lahlou et al., 2009). Ce qui augmente significativement le taux de morbidité et la mortalité

Tableau 12 : Fréquence de résistance des différentes souches d'entérobactéries isolées

Pourcentage de résistance (%)								
ATB	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>M.morganii</i>	<i>Proteus.spp</i>	<i>S.marsescens</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>E.aerogene</i>	<i>P.mirabilis</i>
AMP	100	100	100	100	100	100	100	100
AMX	100	100	100	100	100	100	100	100
AMC	88	91	100	100	100	100	100	100
TIC	94	95	50	100	100	0	100	100
PIP	100	95	50	100	100	0	100	100
CF	100	100	100	100	100	75	100	100
CTX	86	86	50	100	100	100	100	100
CRO	86	86	50	100	100	25	100	100
IMP	8	8	0	0	0	0	0	100
AK	11	0	0	100	0	0	0	100
GN	61	34	0	100	100	0	0	0
NA	61	56	100	0	50	0	0	100
OFX	50	43	100	100	50	0	100	100
CIP	55	39	50	100	50	0	0	100
CT	5	0	100	100	100	0	0	100
STX	77	91	100	100	100	75	100	50

3.2. Résistance des souches de *P. aeruginosa* et *A. baumannii* aux différentes classes d'antibiotiques

Le profil de résistance des souches de *P.aeruginosa* montre des fréquences de résistance élevées notamment aux pénicillines TIC (100%), PIP (100%), ATM (50%), CAZ (100%). On remarque aussi des taux de résistance élevés au carbapénèmes, 66% étaient résistantes à l'IMP et à la levofloxacine. Pour les aminosides, l'amikacine était efficace à 100%, par contre 66% des souches étaient résistantes à la gentamicine. le Réseau National Algérien (AARN) a rapporté des taux élevés de résistance concernant la TIC , PIP et la CAZ avec une fréquence de 94% ,95% et 92% respectivement (AARN ,2022)

Cette souche a développé par ailleurs une résistance acquise très fréquente et en constante évolution liée à sa capacité d'acquérir divers mécanismes de résistance enzymatiques (pénicillinases, hyperproduction de céphalosporinase chromosomique, bêta-lactamases à spectre étendu, carbapénémases de classe B) ou non enzymatiques (impermeabilité par mutation chromosomique de la porine OprD2, surexpression de systèmes d'efflux actif) (Lahlou et *al.*, 2008a).

Concernant les souches d'*Acinetobacter baumannii* une résistance totale (100%) a été observée pour les β -lactamines (CAZ, TIC, PIP , et TZP). Pour les aminosides les résultats ont été similaires à ceux obtenus pour *P. aeruginosa*, et la même chose pour l'imipénème (**Tab. 13**). Ces résultats sont en accord à ceux apportés par plusieurs études (Chahmout, 2011). En effet cette espèce dispose d'un arsenal enzymatique extrêmement vaste et divers pour contrecarrer l'action des antibiotiques et même les désinfectants et les antiseptiques (Mansour et *al.*, 2008). Les souches de *A. baumannii* possède des mécanismes de résistances naturelles aux β -lactamines, correspondant principalement à la production d'une céphalosporinase chromosomique de type Amp C. Ce mécanisme de résistance enzymatique peut être hyperproduit par l'insertion en amont du gène codant cette AmpC naturelle (Poirel et *al.*, 2006). La cause la plus fréquente de la résistance d'*A. baumannii* aux aminosides est la modification de groupes hydroxyle ou amino de l'antibiotique par des enzymes (acétylases, adénylases et phosphotransférases) (Looveren, 2004). La résistance aux fluoroquinolones par ce pathogène étant principalement liée d'une part à la modification de la cible (gyrase et topoisomérase IV), et d'autre part à l'augmentation d'un efflux actif (Varon et *al.*, 2007)

Tableau 13 : Fréquence de résistance des souches de *P.aeruginosa* et *A.baumannii*

ATBs	Pourcentage de résistance	
	<i>P. aeruginosa</i> (N=3)	<i>A. baumannii</i> (N=2)
TIC	100%	100%
PIP	100%	100%
TCC	33%	100%
IMP	66%	50%
ATM	50%	33%
CAZ	100%	100%
AK	0%	0%
GN	100%	50%
CT	33%	0%
STX	100%	50%
LEV	66%	0%
RA	33%	0%
NET	66.66%	0%

3.3.Résistance de *Staphylococcus aureus*

Concernant les souches de *S.aureus* , Le taux de résistance le plus important a été observé pour les β -lactamines (notamment la pénicilline G, l'oxacilline , et la cefoxitine) ; ainsi que les cyclines avec respectivement un taux de résistance de (100%) et (42%), la résistance au aminoside et aux fluoroquinolones n'est pas négligeable avec une fréquence (28%) et (21%) pour la gentamicine et l'oflaxacine respectivement . En revanche le taux de résistance reste assez faible concernant la rifampicine (7%) et aucune souche est résistante à la vancomycine (0%) ; Les souches de *Staphylococcus aureus* se sont révélées très résistante aux β -lactamines (pénicilline G,Oxacilline ,la cefotaxime) ainsi qu'à la tétracycline et la gentamicine , le AARN rapporte une resistance de 97% pour penicilline G et une frequence de 48% a l'OXA se qui concorde avec avec nos resultats (AARN ,2022) , cette résistance s'explique par l'acquisition d'un gène produisant une modification de la protéine liant la pénicilline (PLP2a).

Cette protéine est encodée par le gène *mecA* localisé sur un élément génétique mobile. Elle agit comme transpeptidase, reliant les peptidoglycanes essentiels à la structure membranaire de la cellule bactérienne. Les PLP2a sont différentes des PLP ordinaires par leur très faible affinité pour les antibiotiques possédant un anneau beta-lactame. (aspc , 2009 ; Jetté et al .,2009) .

Aucune souche n'est résistante à la vancomycine ce résultat corrobore avec d'autres études (Arsalane et al ., 2010) . Actuellement la résistance aux glycopeptides demeure rare.

La résistance de SARM à la gentamicine est probablement due à l'inactivation enzymatique des aminosides qui est le mécanisme de résistance le plus souvent observé, il permet d'expliquer la résistance de plus de 95% des souches des bactéries à Gram positif (Jana et Deb , 2006) .

Tableau 14 : Taux de résistance de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de différents antibiotiques

ATB	SARM (N=14)
P	100%
OX	100%
FOX	100%
E	21%
SP	14%
L	14%
DA	14%
PT	7%
VA	0%
AK	28%
GN	24%
OFX	21%
FD	42%
TEC	0%
TE	42%
DO	14%
C	0%
RA	7%

➤ **Test de synergie :**

Le test de synergie a montré que 49 souches donnent une image de synergie entre l'AMC et les C3G indiquant la production des BLSE, le résultat obtenu est confirmé par le test espagnol. Pour les souches co-productrices d'une céphalosporinase, l'image de synergie a été confirmée sur MH contenant de la cloxacilline (inhibiteur des céphalosporinases).

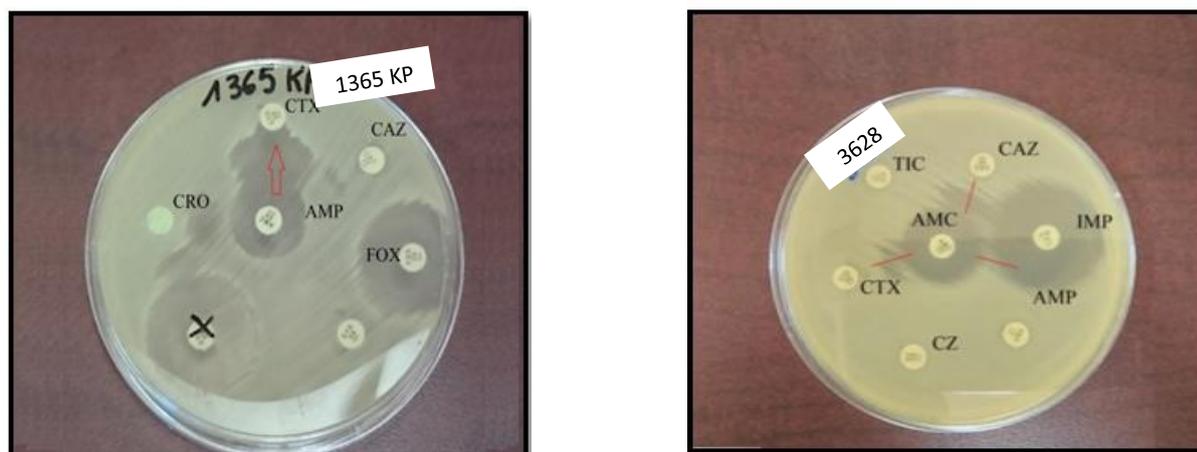


Figure34 : Détection des souches sécrétrices de BLSE par le test de synergie

➤ **Antibiogramme sur gélose Mueller Hinton (MH) additionnée de cloxacilline :**

Les souches résistantes aux C3G et n'ayant pas présenté d'image de synergie, sont testées une deuxième fois par addition de la cloxacilline dans la gélose MH. Les résultats obtenus montrent que sur 6 souches testées, 4 souches ont présentées une augmentation de plus de 8mm autour des disques de ceftriaxone et ceftazidime, ce qui a révélé l'hyperproduction de céphalosporinase chromosomique. Cependant deux souches ont présenté une légère variation des diamètres d'inhibition sur gélose supplémentée par la cloxacilline indiquant l'absence d'une hyperproduction de céphalosporinase chromosomique. Les résultats de ce test ont permis aussi de révéler l'association de deux mécanismes de résistance contre les C3G (BLSE+Céphalosporinase). Cette association est confirmée pour une seule souche par l'apparition d'une image de synergie

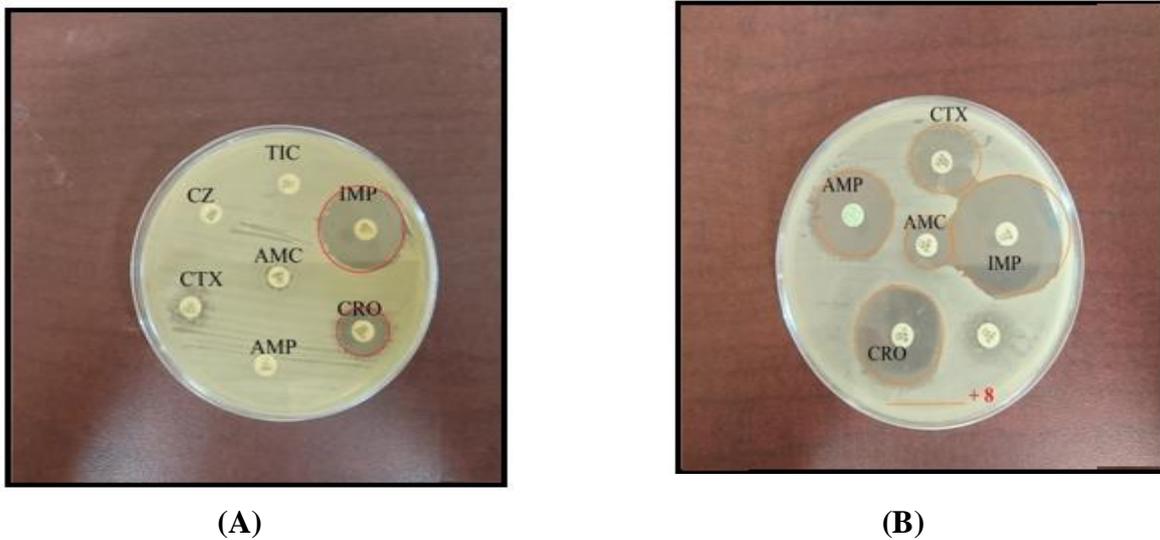


Figure35 : Détection des céphalosporinases en absence de cloxacilline (A) et en présence de la cloxacilline (B) chez une souche de *K. pneumoniae*

4. Phénotypes probables de résistance des entérobactéries aux bêta-actamines :

4.1. Phénotypes du groupe 1

Les phénotypes du groupe 1 (*E. coli* et *P. mirabilis*) ont été répartis en huit phénotypes (Fig. 36), la prédominance était pour le groupe de pénicillinases à bas niveau (33%) suivi par le phénotype sauvage (26%) et les BLSE (20%).

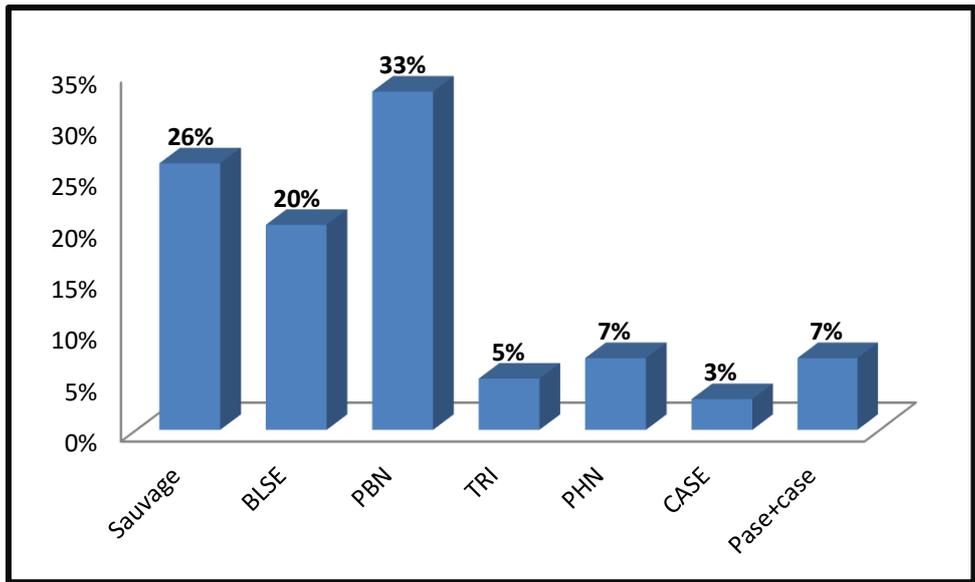


Figure 36: Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines du groupe I: **BLSE:** β -lactamases à spectre étendu, **PBN** :Pénicilline de bas niveau, **TRI**:TEM résistant aux inhibiteurs, **PHN**:pénicilline de haut niveau , **CASE**:Céphalosporinase. **Pase +case**:Association d'une pénicilline et céphalosporinase

4.2.Répartition des phénotypes de résistance du groupe II

Les différents phénotypes de résistance aux bêta-lactamines retrouvés chez les souches de groupe II représenté par *K.pneumoniae* sont répartis en quatre phénotypes (**Fig.37**). La prédominance était pour les BLSE et le phénotype sauvage (35%).

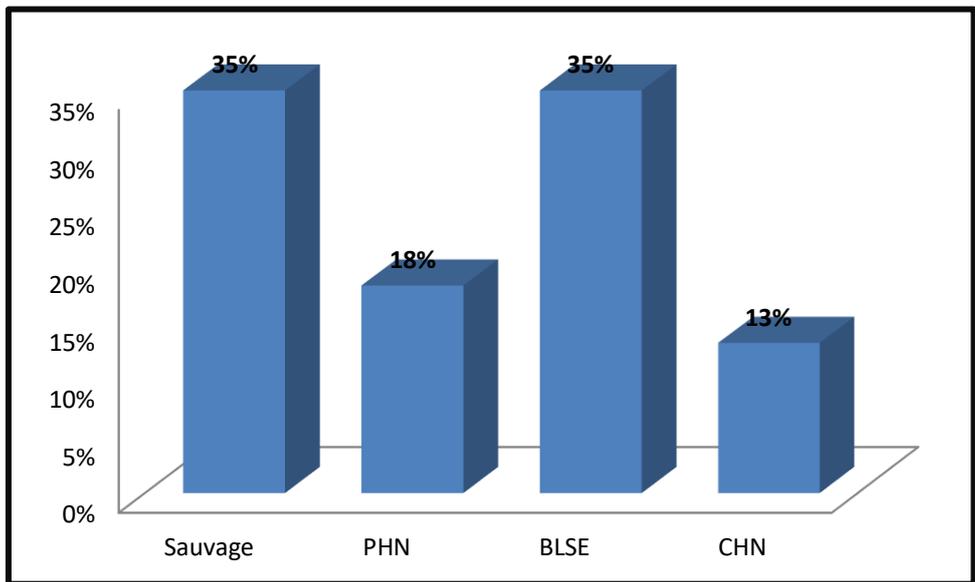


Figure 37 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines du groupeII.

4.3. Répartition des phénotypes de résistance du groupe III

Les phénotypes de résistance du groupe III (*Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Proteus* sp.) sont répartis en quatre groupes, les céphalosporinases à bas niveau étaient le phénotype le plus retrouvé (72%) suivie par les BLSE (20%).

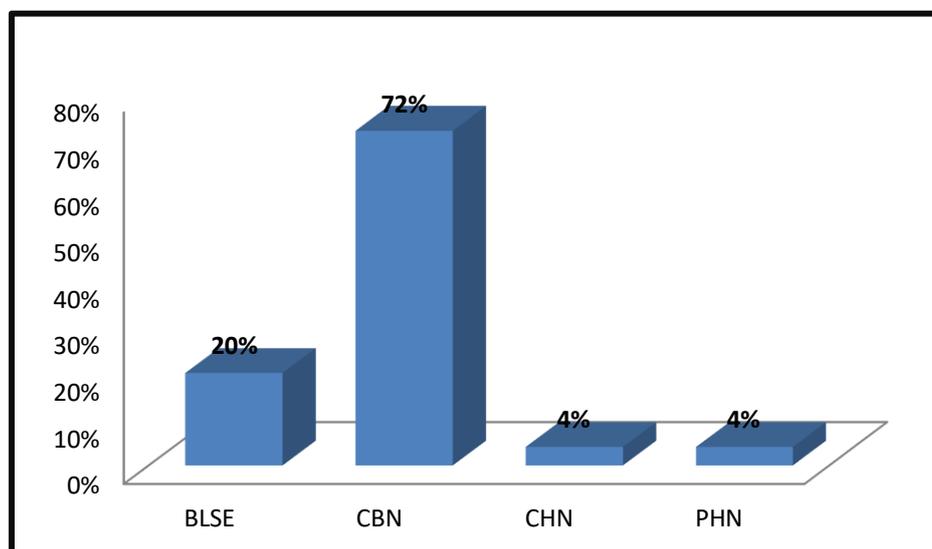


Figure 38: Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines du groupe III

4.4. Répartition des phénotypes de résistance du groupe V

Toutes les souches de ce groupe (*P. vulgaris* et *P. penneri*) font partie du phénotype sauvage (Fig. 39)

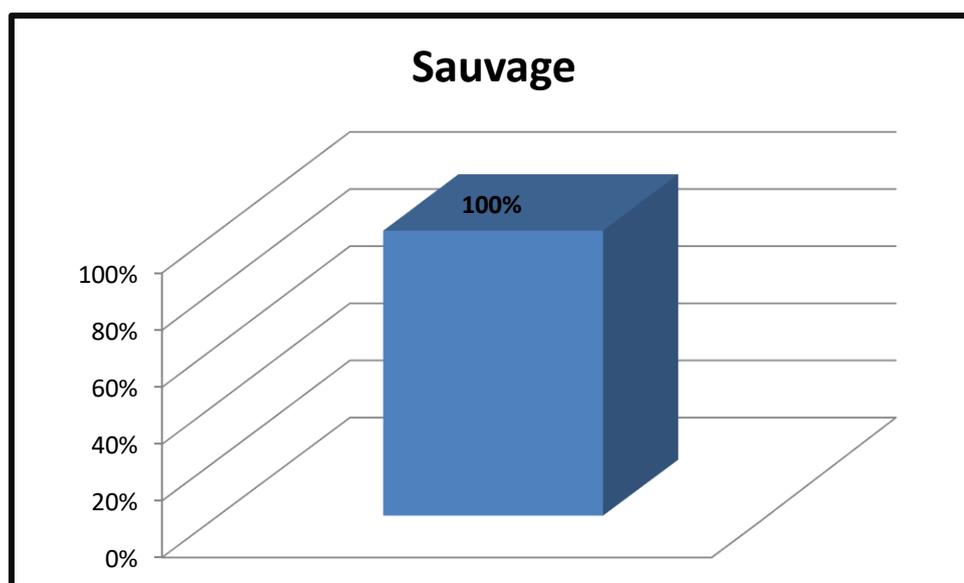


Figure 39 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines du groupe V

5. Etude rétrospective :

L'analyse des données de l'étude rétrospective couvrant une période d'une année (allant du 02/01/2017 au 31/12/2017) a concerné principalement les prélèvements de pus, hémocultures et LCR émanant des services majoritairement incriminé dans les infections nosocomiales telle que le service d'orthopédie, réanimation, médecine interne et le service de chirurgie générale. Durant cette étude 1694 prélèvements ont été effectués et 397 bactéries ont été isolées ce qui correspond à une fréquence d'isolement de (23.43%) du nombre totale des souches isolées durant la période d'étude.

5.1 Fréquence d'isolement et identification des souches par famille bactérienne :

Sur l'ensemble des prélèvements effectués, 397 souches positives ont été isolées et identifiées dont 261/397 (65.74%) sont des entérobactéries, et 54/397 des souches (13.60%) sont des bacilles à Gram négatif non fermentaire représentés par l'espèce (*Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*), et 82/397 (20.65%) sont des *Staphylococcus aureus*. Selon le reseau de surveillance européen revele que 28% des BMR etaient des enterobacteries et 13% sont des *S.aureus* (Opatowski ,2020)

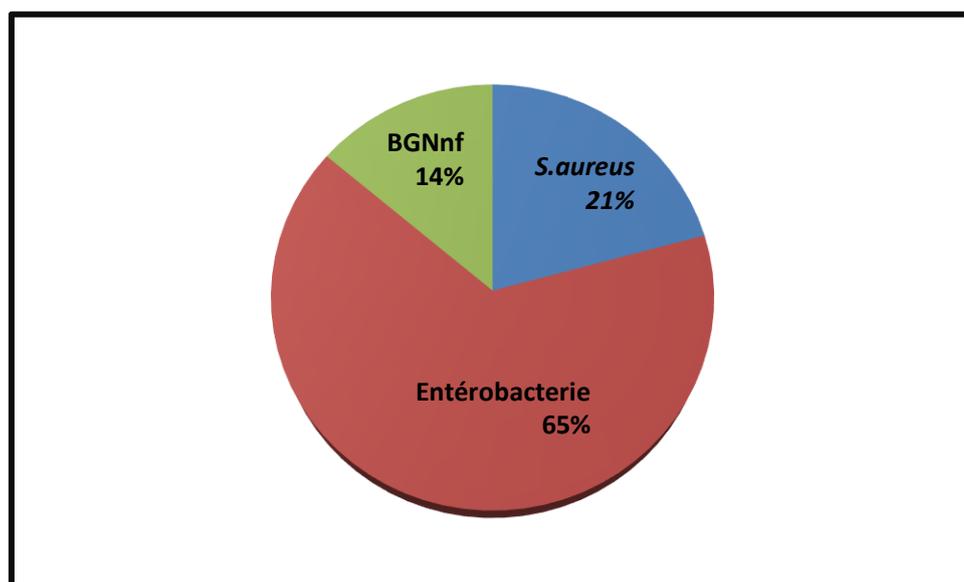


Figure 40 : Fréquence d'isolement par famille bactérienne

5.2 Répartition des souches par espèces :

La répartition des souches isolées par espèces montre que *S.aureus* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 21%, suivie de *E.coli* ainsi que *K.pneumoniae* et *P.aeruginosa* avec respectivement un taux de 15% et 13% (Fig. 41). cependant certaine etude rapportent une prédominance de *E.coli* (62%) suivi de *K.pneumoniae* (38%) et *E.cloacae* (14%) (Jovier et al , 2019)

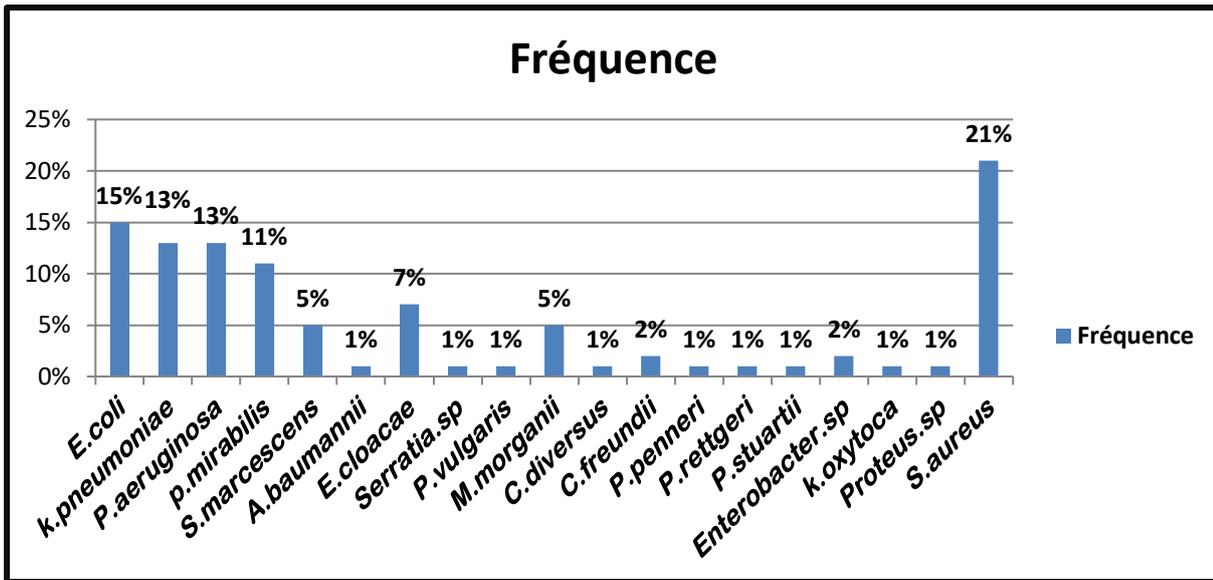


Figure 41: Fréquence d'isolement des souches par espèce

5.3. Répartition des souches isolées par type de service :

La répartition des souches isolées par service (Fig.42) montre que le service d'orthopédie et le service de médecine interne sont les plus concernés avec un taux de 28% et 24% respectivement. En effet c'est au niveau de ces services que les patients sont plus susceptibles de contracter une infection bactérienne suite à une hospitalisation prolongée ou une exposition récente à une antibiothérapie.

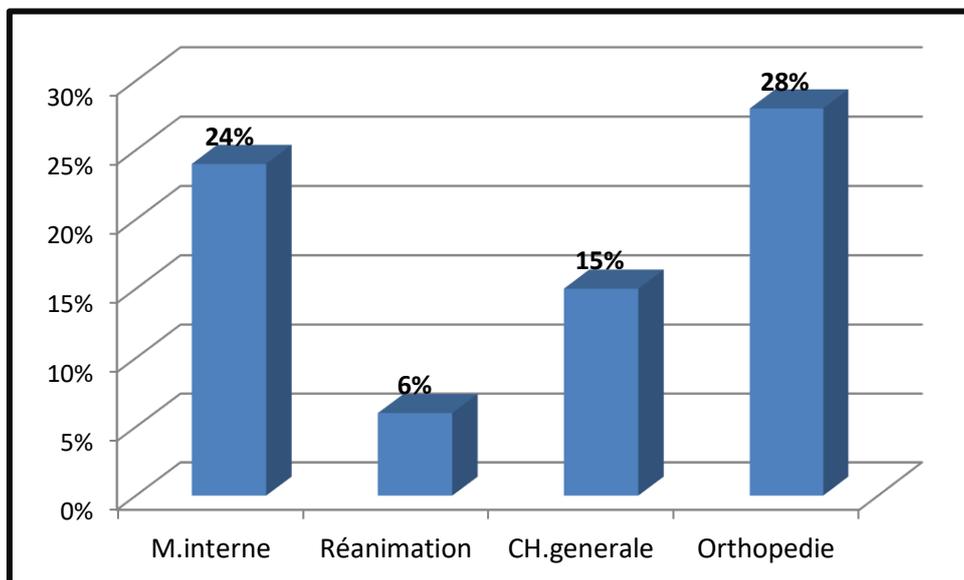


Figure 42 : Fréquence d'isolement des souches en fonction du type de service

5.4.Répartition des souches en fonction du type de prélèvement :

La répartition des souches en fonction du type de prélèvement montre que la majorité des souches sont isolées principalement du pus avec un taux de 96% (Fig. 43). Aucune souche n'a été isolée du LCR, de nombreuses études rapportent la prédominance de l'infection du tissu cutané ; selon une étude réalisée en Tunisie par Kerir et *al.* (2019) au niveau des services des brûlées a rapporté une prédominance de la fréquence des hémocultures (37%) et des infections du site opératoire (26.6%) contre un pourcentage de (7%) concernant les infections urinaires.

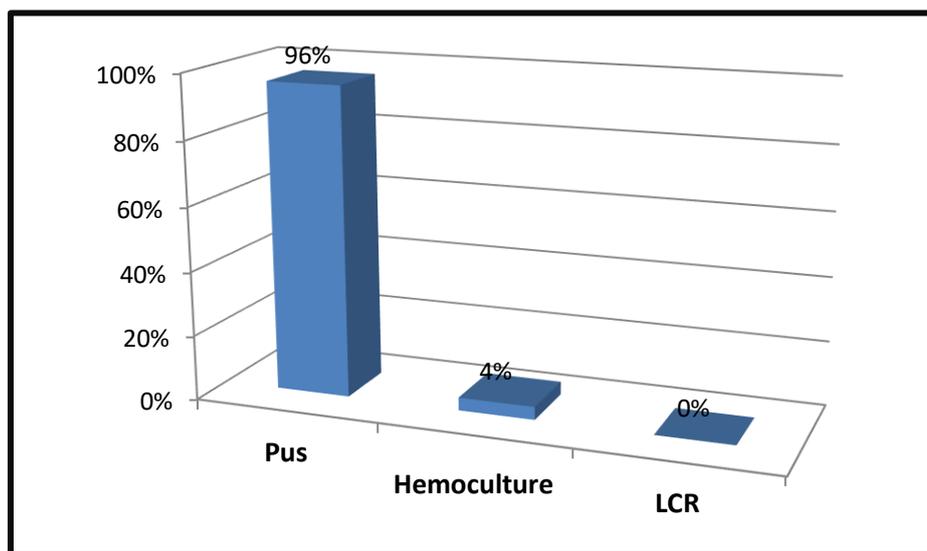


Figure 43 : Fréquence d'isolement des souches par type de prélèvement

5.5.Répartition des souches par sexe :

Le résultat obtenu de la répartition des souches par sexe montre une nette prédominance chez le sexe masculin avec un taux d'isolement de 53% contre un taux de 19% seulement chez le sexe féminin. Cela s'explique probablement par le fait que le recrutement au niveau des hôpitaux militaires s'effectue en faveur des hommes qui sont pour la plus part engagés dans l'armée et exposés à de nombreux accidents (accident de services, maladies professionnelles, amputé.....)

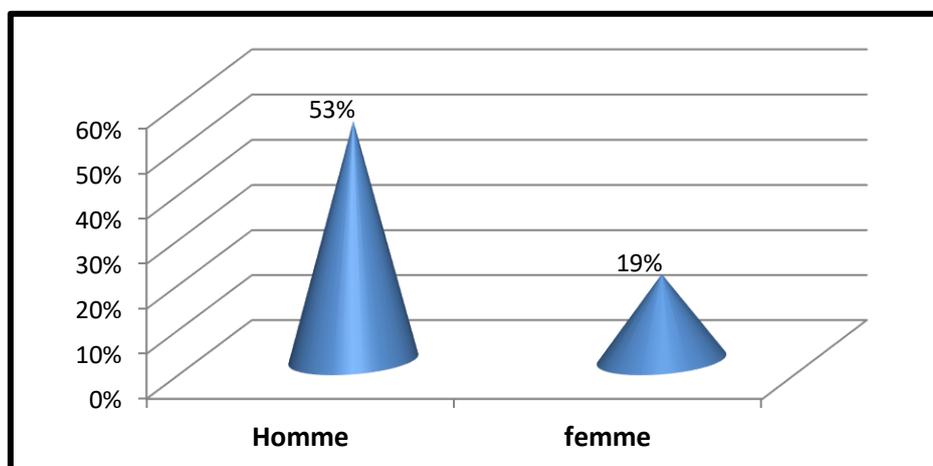


Figure 44 : Fréquence d'isolement par sexe.

5.6. Fréquence d'isolement des souches par mois :

La fréquence d'isolement des souches par mois au cours de l'année 2017, montre une instabilité au cours des premiers mois de l'année (**Fig.45**) suivie par une importante augmentation de 7% au mois d'aout jusqu'à 13% au mois d'octobre puis une phase de déclin durant les mois suivants (mois de novembre et décembre).

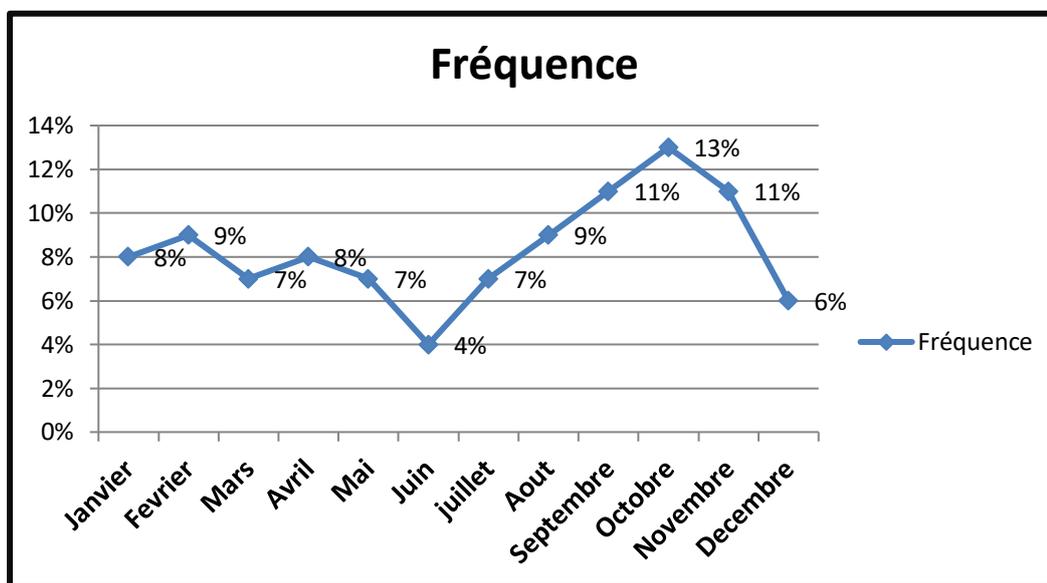


Figure 45 : Fréquence d'isolement des bactéries par mois

6. Résistance aux antibiotiques :

6.1. Résistance des entérobactéries aux différentes familles d'antibiotiques

Le résultat de l'antibiogramme standard des entérobactéries vis-à-vis aux différentes familles d'antibiotiques a permis de déterminer le profil de résistance des entérobactéries (**Tab.15**). L'évaluation des fréquences de résistance montre que les souches d'entérobactéries manifeste une résistance relativement élevée pour les pénicillines (AMX (74 .71%), AMP (72 .41%), AMC (62 .06%)) et les céphalosporines CAZ (55.17%) , CTX (35. 24%) ; cependant la résistance aux aminosides et aux quinolones reste modérée, avec une résistance de 27.96% pour la gentamicine (GN) et de 22.98%, alors que pour la tobramycine (TOB) le taux observé est de 26.81% .

Tableau 15 : Fréquence de résistance aux antibiotiques des entérobactéries

<i>Antibiotique</i>	<i>R</i>	<i>%</i>
AMP	189	72.41%
AMX	195	74.71%
AMC	162	72.41%
TIC	141	54.02%
PIP	135	51.72%
CAZ	144	55.17%
CTX	92	35.24%
CRO	89	34.09%
IMP	4	1.35%
GN	73	27.96%
TOB	60	22.98%
OFX	70	26.81%
CIP	62	27.75%
C	28	10.72%
CS	89	34.09%

Souches d'entérobactéries N =261

6.2. Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus*

La fréquence de résistance des souches *Staphylococcus aureus* montre que les souches sont totalement résistantes à la pénicilline G avec un taux de (95.12%), et à l'oxacilline ainsi que la cefoxitine (36.58%), une résistance moins importante vis-à-vis des aminosides GN, TOB (18,28%) a été observée ; aucune souche n'est résistante à la vancomycine et la pristinamycine. alors qu'une bonne activité de la teicoplanine (12.19%) ; doxycycline (10.97%) et acide fusidique (17.29%) a été observé (**Tab. 16**). La rare utilisation de ces antibiotiques en milieu hospitalier comme en pratique de ville, pourrait expliquer la conservation de leur activité.

Tableau 16 : Fréquence de résistance des souches de *Staphylococcus aureus* aux différents antibiotiques

<i>Antibiotique</i>	<i>R</i>	<i>%</i>
P	78	95.12%
OX	30	36.58%
FOX	30	36.58
E	7	8.5%
SP	1	1.21%
PT	0	0%
DA	3	3.65%
L	1	1.21%
VA	0	0%
TEC	10	12.19%
TE	22	26.82%
DO	9	10.97%
TOB	15	18.29%
GN	15	18.29%
OFX	15	18.29%
AF	14	17.29%
Souche de <i>Staphylococcus aureus</i> N = 82		

6.3. Fréquence de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* :

Les souches de *Acinetobacter baumannii* présentent des taux de résistance relativement élevés vis à vis des carboxypénicillines (TIC (75%)) et aux ureidopénicillines (PIP (75%)) ainsi qu'aux céphalosporines de 3^{ème} génération CAZ (50%), aucune souche n'est résistante à la colistine.

Par contre, les taux de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont relativement faibles ; notamment aux pénicillines TIC et PIP (12%) , ainsi qu'aux C3G (CAZ (10%)), et à l'ATM (8%), les aminosides et les quinolone demeure les molécules les plus actives .

Tableau 17 : Fréquence de résistance des souches de *A. baumannii* et *P. aeruginosa*

<i>Antibiotique</i>	<i>A .baumannii</i> %	<i>P .aeruginosa</i> %
TIC	75%	12%
TCC	75%	18%
PIP	75%	12%
TZP	50%	12%
CAZ	50%	10%
ATM	50%	8%
IMP	25%	8%
GN	25%	14%
TOB	25%	8%
CIP	75%	2%
LEV	50%	2%
STX	25%	60%
RF	-	12%
CT	0%	2%

Souche de *A .baumannii* N = 4 et *P.aeruginosa* N=50

7.Répartition des entérobactéries BLSE par espèce :

Parmi les souches isolées productrices de BLSE, l'espèce *K. pneumoniae* est la plus fréquente avec 37% (**Fig. 46**), suivie par *E .coli* (28%) puis *E. cloacae* (13%), l'enquête nationale de prévalance en France révèle que 27% des bacteries isolées sont des *S .aureus* et 23% sont des enterobacteries (SPF, 2019)

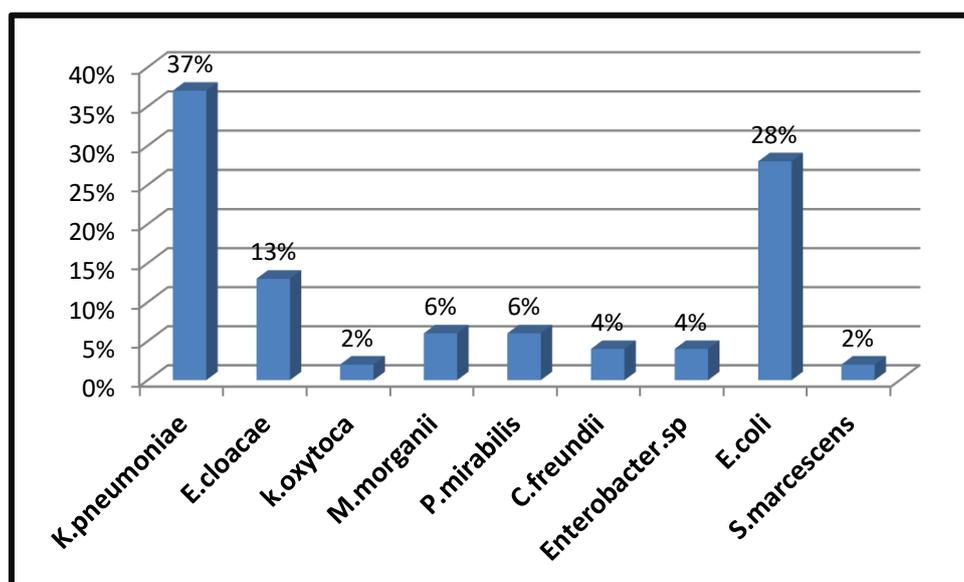


Figure 46 : Fréquence d'isolement des E-BLSE en fonction de l'espèce

7. Rendements des huiles essentielles :

Les extractions par entrainement à la vapeur d'eau des différentes plantes étudiées ont fourni des huiles essentielles ayant des colorations variables allant du jaune clair au jaune relativement foncé avec des odeurs fortes et persistantes, le taux de rendement varie de 0.15% à 2.09 %

Tableau 18: Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles hydro-distillées

Huiles essentielles	Couleur	Odeur	Aspect	Rendement %	Densité
<i>Pelargonium roseum</i>	Jaune claire	Rosée légèrement sucrée	Liquide limpide	0.15%	0.85
<i>Salvia Officinalis</i>	Jaune claire	Acidulé et légèrement camphré	Liquide mobile	0,88%	0.88
<i>Thymus vulgaris</i>	Jaune orangée	Herbacée	Liquide mobile	1,34%	0.89
<i>Origanum glandulosum</i>	Jaune relativement foncé	épicée et phénolée	Légèrement visqueuse	2,09%	0.99
<i>Menthe pouliot</i>	Incolore	Herbacée, menthée	Liquide mobile	0,5%	0.84
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Jaune claire	très Agreste au camphré plus moins	Liquide	0,97%	0.97

D'après le tableau le rendement en huile essentielle est variable d'une espèce à une autre, le meilleur rendement obtenu est celui de *O.glandulosum* 2.09%, néanmoins une étude menée par Nabti (2020) sur des collections d'*O. glandulosum* issues de la région de Sétif, a rapporté un taux de 3.9 %, un taux supérieur au notre ; les rendements obtenus pour *T.vulgaris* est de 1.34% ce qui est supérieur à celui obtenu par Bousbia (2013). Par contre le rendement pour *R. officinalis* est relativement faible (0.97%), un résultat similaire a été obtenu par Touahmi (2017) avec un taux de 0.28%. Aussi le rendement de l'extraction à partir de *M.pouliot* était faible (0.5%), alors qu'une étude menée dans le Nord-Est de l'Algérie par Bouhaddouda (2016) au niveau de la région de Guelma sur la même plante montre un taux supérieur de plus de cinq fois (2.69%). Un rendement de 0.88% a été obtenu de *S. officinalis*, résultat proche (1.2%) à ce obtenu par Ferhat et al. (2013) en Tunisie . L'hydrodistillation du Geranium nous a permis de recueillir un rendement très faible (0.15%), ce rendement est comparable à celui obtenu par Boukhatem et al. (2010) dans la région de Blida (0.2%).

Cette variabilité de rendements en HEs dépend de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques comme la période de récolte, le type d'organes récoltés, le climat le sol et la pluviométrie la période de récolte, la méthode utilisée (Schmidt, 2010)

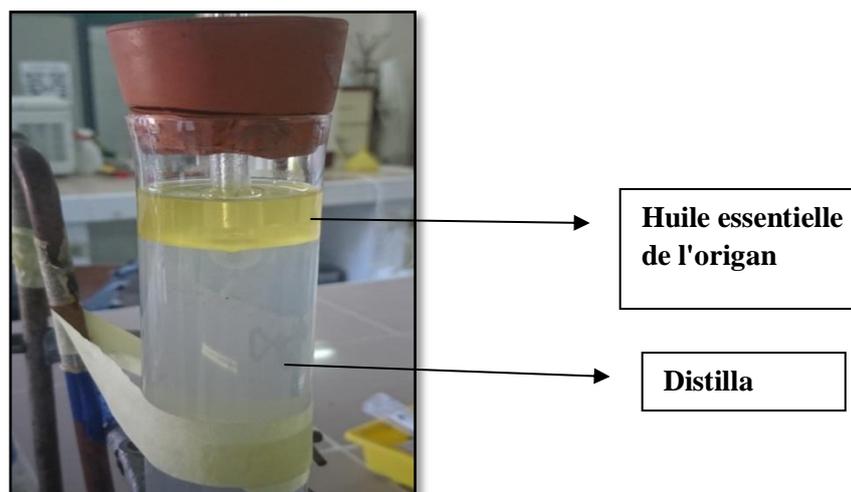


Figure 47 : Aspect et couleur de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

8. Résultats du screening primaire (radial streak line) :

Les résultats du test qualitatif des différentes huiles essentielles (HEs) contre une gamme de souches pathogènes sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Résultat du test préliminaire des six différentes huiles essentielles sur une gamme de souches pathogènes

Souches	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Menthe Pouliot</i>	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Pelargonium roseum</i>
<i>E.coli</i> ATCC25953	+++	+	+	-	-	-
<i>K.pneumoniae</i> ATCC700603	+++	-	+	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC6538P	+++	+++	+	+	++	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC27255	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> 2793 BLSE	+++	++	-	-	+	-
<i>A.baumannii</i> 2873	+++	+++	-	+	-	-
<i>S.marcescens</i> 1393 BLSE	+++	+++	-	+	+	-
SARM 1392	+++	++	-	+	+	-
<i>K.pneumoniae</i> 3466 BLSE	+++	-	-	-	-	-

Avec : - : Absence d'inhibition, + $\leq 2\text{cm}$; ++ $2 < d \leq 3$; +++ $3 < d \leq 4$

L'analyse des résultats obtenus montre que l'HE d'*O.glandulosum* était le plus actif contre l'ensemble des souches testées à l'exception de *P.aeruginosa* ATCC 27255, suivie de celle de *T.vulgaris* dont l'activité a couvert un large spectre, elle a été active contre toute les souches pathogènes sauf *P.aruginosa* ATCC 27255 et *K.pneumoniae* ATCC700603. L'activité antibactérienne de *S.officinalis* n'est pas négligeable, en effet l'huile essentielles de la sauge était active contre quatre souches, alors que l'huile essentielles de *R.officinalis* et *M.pouliot* ont présenté une activité modérée,

finalement l'huile essentielle de *Pelargonium roseum* était inactive contre toutes les souches testées. Les résultats de ce test ont permis de sélectionner les huiles essentielles d'*O.glandulosom*, *T.vulagris* et *S.officinalis*.

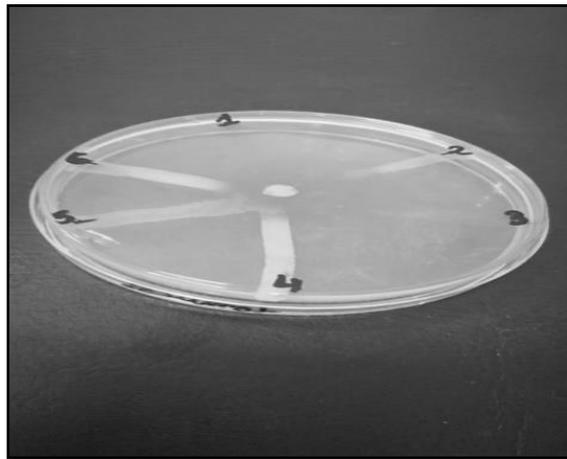


Figure 48: Screening primaire (radial streak line) de l'huile essentielle du thym (*Thymus vulgaris*) sur gélose de MH. **1:** BHIB . **2:** *E.coli* 2793BLSE **3:** *S.aureus* ATCC 6538P .**4:** *K.pneumoniae* 3466 BLSE.**5:** *E.coli* ATCC 25953. **6:** *K.pneumoniae* ATCC 700603

9. Taille et charge des particules

L'analyse de la taille des particules a révélé que la taille de la nanocapsule est de 120 nm, selon la littérature la taille des nanocapsule mono-dispersées est limitée à une gamme comprise entre (20 et 200 nm); alors que la taille de la nanoémulsion est de 54nm , soit <100nm (taille ultra fine) ce qui indique la nanoémulsion formée est relativement stable(Mc-clements et Rao ,2011) . La charge des particules de surface est négatif pour la nanoémulsion (-26.2) ainsi que pour l'encapsulation (-15.5) .

Tableau 20 : Taille et charges de particules obtenues des nano-émulsion et nano-encapsulation

Type des particules	Taille (nm)	Charge	PDI
Nanocapsule	120±18.37	-15.5±0.32	0.244±0.05
Nanoémulsion	54.24±1.29	-26.2±2.6	0.296±0.09

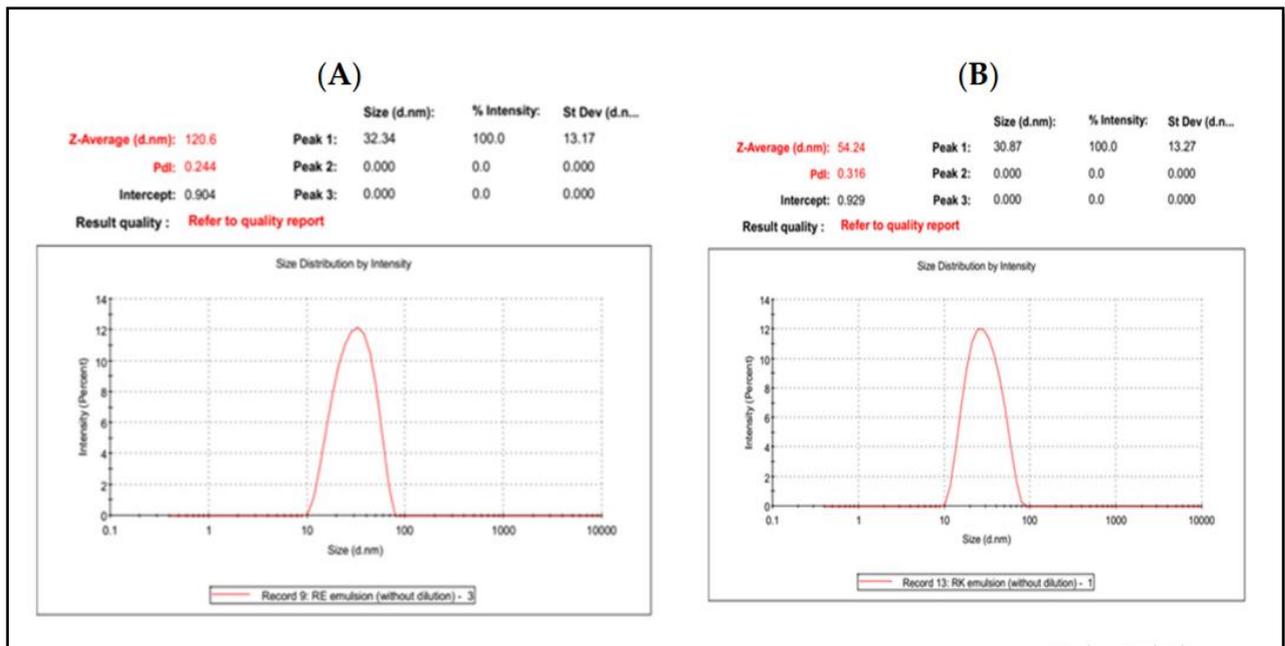


Figure 49 : Distribution de la charge et la taille des particules de l'huile essentielle de l'origan **(A)** : nanocapsule et **(B)** : nanoemulsion

10. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles :

L'analyse de la composition chimique par CPG/SM (GC/MS) de trois huiles essentielles des trois plantes médicinales (*T. vulgaris*, *O. glandulosum* et *S. officinalis*) sélectionnées en se basant sur leur pouvoir antimicrobien a permis d'identifier les molécules bioactives (**Tab. 21**).

Tableau 21: Composition chimique des huiles essentielles d'*O.glandulosum*, *T.vulgaris* et *S.officinalis*

Composé	Type	Huiles essentielles HD%		
		<i>O. glandulosum</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>S. officinalis</i>
-α pinene	MH	0,21	0.14	0.18
Camphene	MH	-	0.53	0.52
1,8 Cineole	MH	-	-	13.20
	MH	-	-	34.91
Thujonone				
β-Pinene	MH	-	0.51	0.22
Isoborneol	MH	-	-	0.32
Camphor	OM	-	0.21	39.62
Borneol	OM	-	76.42	0.87
Thymol , methyl ether	OM	-	0.38	-
Thymol	OM	49.52	17.69	-
β-Caryophyllene	SH	0.53	1.09	1.09
A- Humulene	SH	0.12	-	1.40
δ -Cardinene	SH	-	-	0.50
Caryophyllene Oxide	SH		0.86	0.17
Viridoflorol	OM	-	-	5.84
Humulene oxide	MH		-	0.72
β-Myrcene	MH	0.15	-	-
P -Cymene	OM	27.56	-	-
Carvacrol	OM	16.13		
δ -Terpinen	MH	5.59	-	-
β -Bisabolene	SH	0.18	-	-
Totale		99.99%	97.83%	99.56%

SH:Sesquiterpènes hydrocarbonées/ **OM:** Monoterpènes oxygénés / **MH:** Monoterpènes hydrocarbonées

L'huile essentielle de l'origan contient 9 molécules (**Tab. 21**) ; La prédominance était pour les monoterpènes oxygénés (92%), où le Thymol était le composé majoritaire (49.52%), suivi par le P-Cymene (27.56 %), le carvacrol (16.13%) et le δ -Terpinen (5.59). ce qui indique que cette plante présente un chémotype Thymol /P-cymene /Carvacrol . Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par de nombreuses études en Algérie (Constantine, Sétif) et d'autres pays (Khalfi et al., 2008 ; Berrehal et al., 2010 ; Wijesundara et Rupasinghe, 2018 ; Nabti et al., 2020) . Tous rapportent une prédominance des monoterpènes oxygénés et monoterpènes hydrocarbonés.

De même pour l'huile essentielle de *T. vulgaris*, 9 composés ont été identifiés correspondant à 97.93% du contenu total de l'huile, les monoterpènes oxygénés étaient prédominants avec un taux de (95%), pour cette huile le Bornol était le composé majoritaire (76.42%) et en deuxième position le Thymol (17.69). Alors que de nombreuses études ont rapporté la prédominance du Thymol (Martins, 2020).

L'huile essentielle de *S. officinalis* contient 14 composés, caractérisés par la prédominance de quatre constituants chimiques, où le Camphor était le constituant majoritaire (39.62%), suivi par l' α -thujanone (34.91%), le 1,8-cineole (13.20%) et le viridiflorol (5.84%). Ces fréquences et chémotype sont similaires à ceux rapportées par Zerkani et al., (2022).

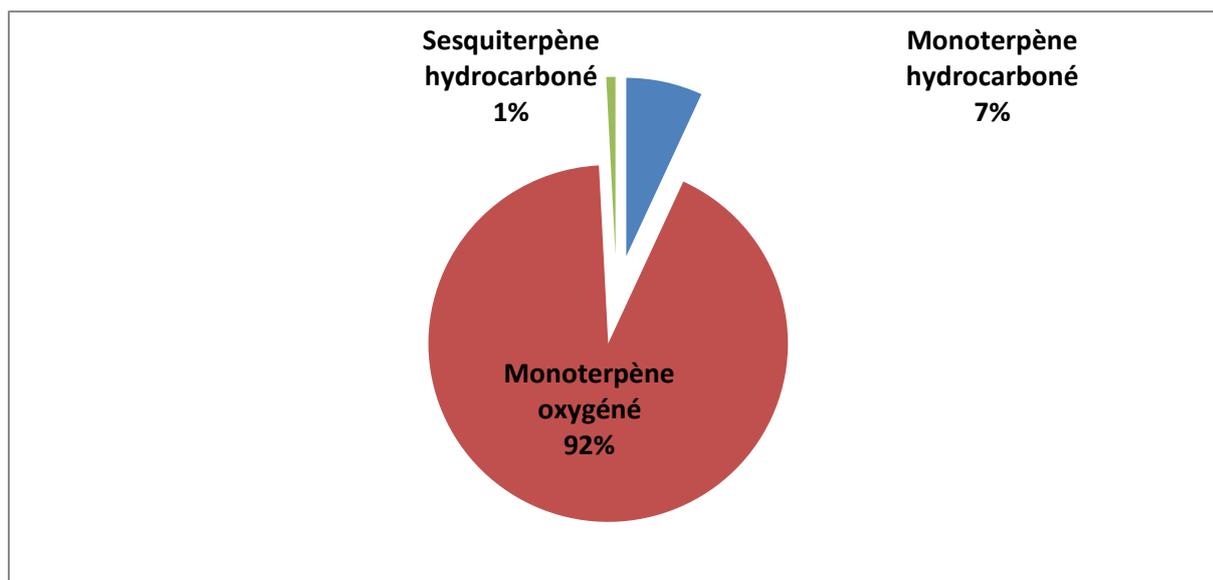


Figure 50 : Pourcentage des principales familles chimiques de l'HE d'*Origanum glandulosum*.

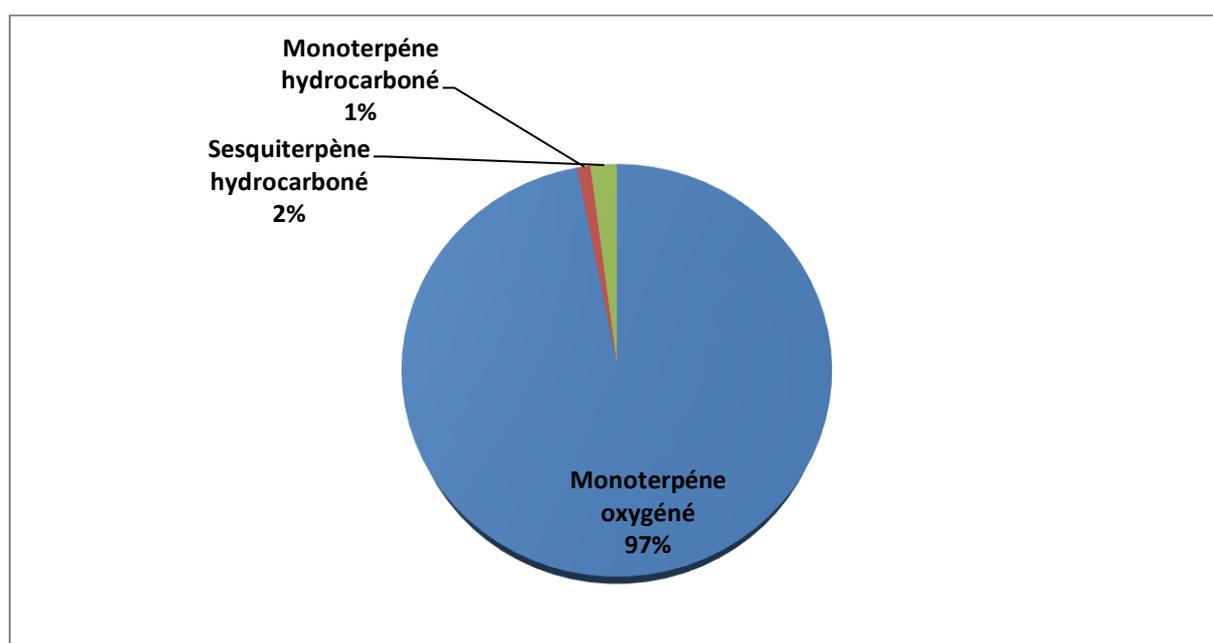


Figure 51: Pourcentage des principales familles chimiques de l'HE de *Thymus vulgaris*

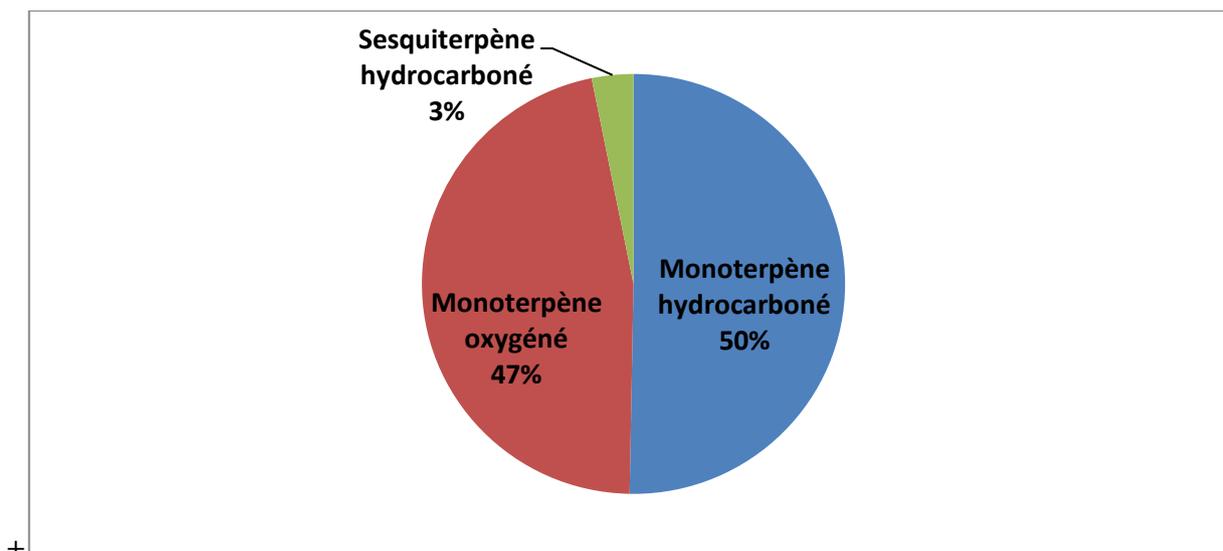


Figure 52: Pourcentage des principales familles chimiques de l'HE de *Salvia officinalis*

11. Composition chimique des nanoformulations (nanoémulsion et nanoencapsulation) :

Les résultats de l'analyse de la composition chimique par CPG/SM des nanoformulations (nanoémulsions et nanoencapsulations) de l'huile essentielle de *O. glandulosum* sont différents à ceux de l'huile essentielle (**Tab. 22**).

Tableau 22 : Composition chimique des nanoémulsions et les nanoencapsulations de l'*O. glandulosum*

Composé	Type	Nanoformulations	
		Nanoemulsion	Nanoencapsulation
- α -Thujene	MH	Nd	1.08±0.05
- α -Pinene	MH	0.68±0.02	1.73±0.07
3 Camphene	MH	Nd	0.39±0.01
-1 Octen-3-ol	OM	1.29±0.13	1.64±0.03
-3-Octanone	MH	0.38±0.05	0.58±0.04
- β -Myrcene	MH	0.79±0.05	1.66±0.08
- α -Terpinene	MH	0.73±0.08	2.39±0.1
-p-Cymene	OM	19.78±0.16	18.58±0.30
-Limonene	MH	0.64±0.07	1.09±0.06
-Eucalyptol	OM	Nd	0.35±0.07
- δ -Terpinen	MH	0.77±0.09	4.52±0.12
-Linalool	OM	2.98±0.10	2.97±0.25
-Borneol	OM	1.13±0.09	2.43±0.17
-Terpinene-4-ol	OM	2.73±0.16	2.95±0.09
- α -Terpineol	OM	1.35±0.02	1.30±0.12
-Thymol methyl ether	OM	0.73±0.05	0.74±0.05
-Thymol	OM	51.42±0.46	39.47±0.45
-Carvacrol	OM	9.96±0.26	7.07±0.10
- β –Caryophyllene	SH	0.78±0.10	1.34±0.12
- α -Humulene	MH	Nd	-
- β –Bisabolene	SH	0.89±0.11	1.57±0.11
- β –Sesquiph ellandrene	SH	Nd	0.65±0.09
-Caryophyllene Oxide	SH	1.37±0.09	1.54±0.14
Total		99.58	96.04

18 composés ont été identifiés dans les nanoémulsions représentant 99.58% de l'huile totale (Tab. 22). Les composés majoritaires sont principalement le Thymol (51.42%), suivi par le P-cymene (19.78%) et le carvacrol (9.96%). Aussi l'analyse des nano-capsules a cependant révélé certain changement dans sa composition chimique dans la quelle 22 composés ont été identifiés avec une prédominance en Thymol (39.47%) suivi par le P-cymene (18.58%), le Carvacrol (7.07%) et le δ -terpinene (4.52%), on note aussi la présence des isomères non oxygénées tel que α -terpinene (2.39%) et certains alcools comme le linalool (2.97%), le boneol (2.43%) et le terpinene-4-ol (2.95%). Ces molécules sont formées grâce à l'effet de l'homogénéisation. En comparaison avec le profil chromatographique de l'HE obtenu par hydrodistillation, de nombreux composés en terme de quantité et de qualité ont été modifiés ; ces différences sont du au mécanisme d'homogénéisation et la quantité d'énergie appliquée, selon Donsi et *al.*, (2011) et Chang et *al.*, (2012) l'application des techniques intensives tel que HSH (High speed homogenization) et HPH (High pressure homogenization) conduit

à la floculation et la coalescence et certains changements physiques ainsi qu' une modification biologique de son activité. Donsi et *al.*, (2011) rapporte aussi que l'application de HSH et HPH était responsable de la décomposition des molécules et composés préalablement actifs présents dans l'huile essentielle tel que (le carvacol, le thymol, le terpinen).

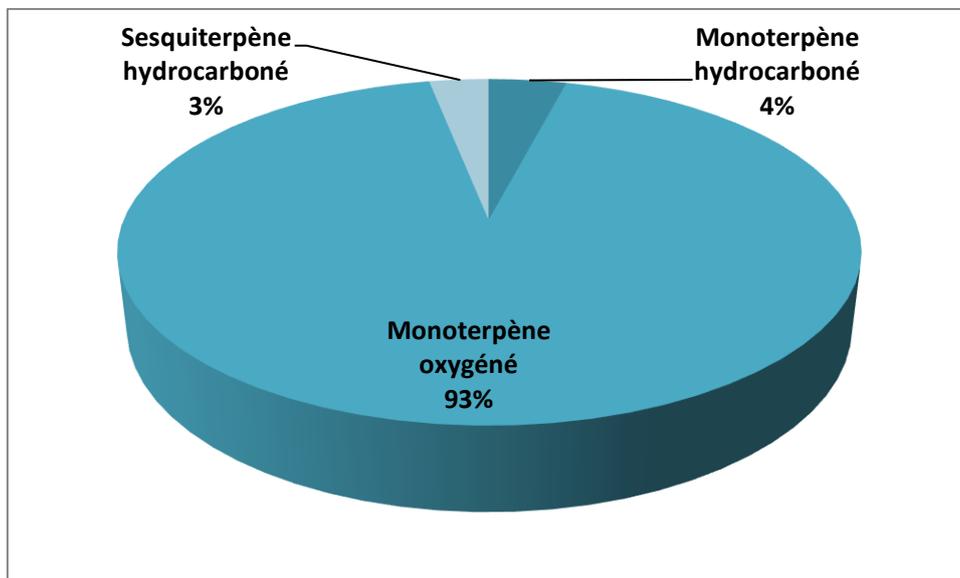


Figure 53 : Détection des principales familles chimique dans les nanoémulsions

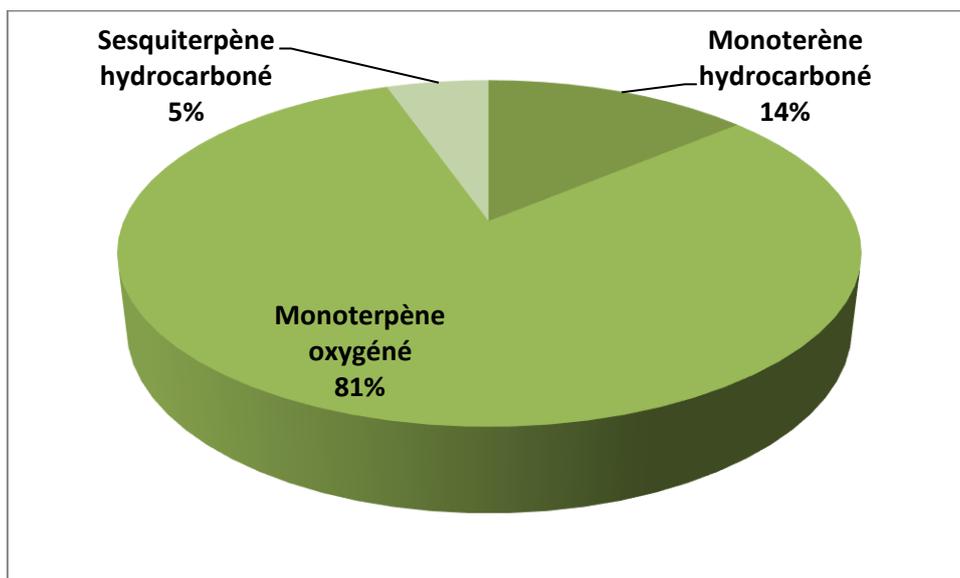


Figure 54 : Détection des principales familles chimique dans les nanocapsules.

12. Activité antibactérienne :

12.1. Résultats de l'activité antibactérienne des trois huiles essentielles (*Salvia officinalis*, *Origanum glandulosum* et *Thymus vulgaris*) testé en milieu solide (Aromatogramme) :

Les résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion de disque ou aromatogramme a montré que l'HE d'*O.glandulosum* a présenté une très bonne activité vis-à-vis des souches cliniques et des souches de références à l'exception de *P.aeruginosa* ATCC 27255. Le diamètre le plus important a été enregistré avec *A.baumannii* 2873(40mm) et SARM 1392 (35mm) ainsi qu'avec les souches de références : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (22mm) et *E.coli* ATCC25953 (20mm), ces résultats corroborent avec ceux de Bjaoui et *al.*, (2013) en Tunisie sur la même espèce, avec des diamètres variables entre 16-36 mm sur l'ensemble des souches testées.

Tableau 23 : Activité antibactérienne des huiles essentielles de *T.vulgaris*, *O.glandulosum* et *S.officinalis* sur milieu solide exprimé en zone d'inhibition.

Souche /(HE)	Dilution	<i>O.glandulosum</i> ,	<i>T .vulgaris</i>	<i>S.officinalis</i>
<i>P .aeruginosa</i> ATCC 27255	1/2	NA	NA	NA
	1/4	NA	NA	NA
	1 /8	NA	NA	NA
SARM 1392	1/2	35 ±0	17 ±0.5	NA
	1/4	22 ±0.5	20 ±0	NA
	1/8	11 ±0.5	19 ±0	NA
<i>K . pneumoniae</i> 3466 BLSE	1/2	15 ±0	12 ±0	8 ±0
	1/4	13 ±0	11 ±0	8 ±0
	1/8	12 ±0.5	10 ±0	9 ±0
<i>S . marcescens</i> 1393 BLSE	1/2	16 ±0.5	17 ±0	8 ±0.5
	1 /4	16 ±2	ND	8 ±0.5
	1 /8	13 ±0.5	6 ±0	8 ±0.5
<i>A. baumannii</i> 2873	1/2	40 ±0	22 ±0.5	NA
	1/4	33 ±2	22 ±0	NA
	1/8	14 ±0.5	20 ±0	NA
<i>E .coli</i> 2793 ATCC	1 /2	13 ±0	15 ±0.5	8 ±0.5
	1/4	11 ±1.5	15 ±0	8 ±0.5
	1/8	10 ±0	10 ±0	7 ±0.5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	1 /2	22±0.2	26±0	12
	1/4	17±0.1	15±0	NA
	1/8	14±0	21±0.2	NA
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	1 /2	17±0	11±0.2	NA
	1/4	16±0.2	12±0.1	NA
	1/8	12±0.4	10±0.1	NA
<i>E.coli</i> ATCC259539	1/2	20±0.2	14±1	NA
	1/4	13±0.1	12±0.4	NA
	1/8	12±0.5	10±0.4	NA

Les résultats de l'aromatogramme pour l'HE de *T.vulgaris* montrent une bonne activité avec des zones d'inhibition qui varient de 10 à 26 mm, à l'exception de *P.aeruginosa*. Ces résultats sont comparables à ceux rapportées par Bouhdid et *al.* (2009a) sur les souches de *S.aureus*, *P.aeruginosa* et *E.coli* avec des zones d'inhibition qui varient entre 8 et 24mm.

Cependant l'activité antibactérienne de *S.officinalis* était moins importante en comparaison avec ceux d'*O. glandulosum* et *T.vulgaris*, avec une zone d'inhibition variable entre 7 et 12mm. L'HE de *S.officinalis* était inactive vis-à-vis la majorité des souches testées (*S.aureus* ATCC 6538P et *K.pneumoniae* ATCC 700603, *E.coli* ATCC 8739, SARM 1392 et *P.aeruginosa* ATCC 27255). Ces résultats sont différents de ceux rapportés dans la littérature, en effet Moumni et *al.* (2020) avaient rapportés des activités meilleures sur les souches de *E.coli* (11.3mm) et *P.aeruginosa* (7mm) .

L'inactivité de ces trois huiles sur *P.aeruginosa* est attribuée surtout à sa membrane externe et les mécanismes de résistance de cette bactérie (Mann et *al.*, 2000).

La différence de l'activité biologique étudiée des 3 huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes testées est due d'une part à la différence structurale de chaque germe bactérien et d'autre part à la variation de la composition chimique de chaque huile essentielle.



Figure 55 : Diamètre d'inhibition obtenu avec l'huile essentielle de *T. vulgaris* vis à vis de la souche *A. baumannii*



Figure 56 : Diamètre d'inhibition obtenu avec l'huile essentielle de *T. vulgaris* vis à vis des souches de *P.aeruginosa*

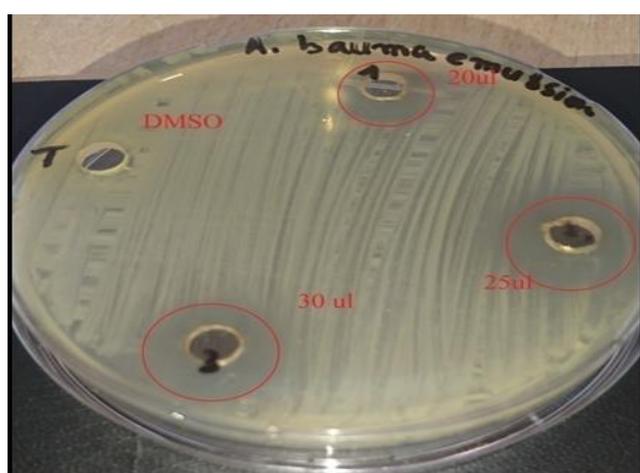
12.2. Résultats de l'activité antibactérienne des nano-formulations en milieu solide (Aromatogramme) :

L'analyse des résultats de l'aromatogramme des nanoformulations a montré que les diamètres d'inhibition sont compris entre 7 et 23 mm pour les deux formulations (**Tab. 24**).

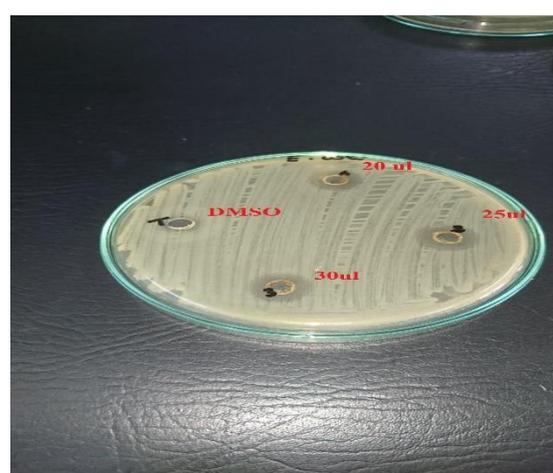
Tableau 24 : Activité antibactérienne de la nanoémulsion et nano-encapsulation en milieu solide vis-à-vis des souches pathogènes exprimé en zone d'inhibition

Souches	Zone d'inhibition en mm					
	Nanoemulsion			Nanoencapsulation		
	20 µl	25 µl	30 µl	20 µl	25 µl	30µl
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27255	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SARM 1392	12	12	12	13	13	15
<i>E.coli</i> 2793	NA	NA	NA	11	12	12
<i>S. marcescens</i> 1393	NA	NA	NA	11	11	12
<i>K.pneumoniae</i> 3466 BLSE	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>A.baumannii</i> 2793	20	20	23	11	12	12
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	15	15	16	14	14	12
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	8	11	11	15	15	13
<i>E.coli</i> ATCC 25935	7	7	7	12	15	17

La nanocapsulation a gardé une activité antibactérienne meilleure que la nanoémulsion. La suspension des nanoémulsions était inactive contre quatre souches (*K.pneumoniae* 3466BLSE, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* 25935 BLSE et *S.marcescens* 1393 BLSE), cependant la suspension de la nanoencapsulation était non active seulement contre *P. aeruginosa* et *K.pneumoniae*. La diminution des diamètres des zones d'inhibition est due à la dilution et le changement des concentrations des molécules bioactives lors de l'homogénéisation.



(A)



(B)

Figure 57 : Diamètre d'inhibition de la nanoémulsion vis-à-vis des souches de (A) : *A.baumannii*, (B) : *E. coli*

12.3. Résultats de l'activité antibactériennes des huiles essentielles en milieu liquide et solide (CMI et CMB) :

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *O.glandulosum* et *T.vulgaris* ainsi que *S.officinalis* par la méthode de concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) contre les souches pathogènes sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*O.glandulosum*, *T.vulgaris* et *S.officinalis* vis-à-vis des souches pathogènes en milieu liquide et solide.

Souches	<i>O. glandulosum</i>		<i>T. vulgaris</i>		<i>S. officinalis</i>	
	CMI (%)	CMB (%)	CMI (%)	CMB (%)	CMI (%)	CMB (%)
<i>E.coli</i> ATCC25953	0.15	0.15	1.25	2.5	NA	NA
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	0.15	0.15	1.25	2.5	NA	NA
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	0.15	0.15	0.62	2.5	1.25	5
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27255	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>E.coli</i> 2793BLSE	0.62	0.62	0.15	0.15	2.5	5
<i>A.baumannii</i> 2873	0.07	0.15	0.31	0.62	2.5	>5
<i>S.marcescens</i> 1393 BLSE	0.31	0.31	0.62	1.25	2.5	2.5
SARM 1392	0.15	0.15	0.15	0.15	2.5	>5
<i>K.pneumoniae</i> 3466BLSE	0.62	1.25	0.07	0.07	2.5	5

Les valeurs des CMI sont comprises entre 0.07% et 2.5 % pour l'ensemble des HEs; la meilleure activité est celle de l'huile de l'origan avec en faible concentration (0.07%) pour *A.baumannii* et 0.15% pour *S.aureus* ATCC 27255 et *K.pneumoniae* ATCC 700603, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'aromatogramme. De même pour l'HE du thym la concentration de 0.07% est suffisante pour inhiber la croissance des souches de *K.pneumoniae* 3466 BLSE et de 0.15% pour SARM 1392 et *E.coli* 2793 BLSE. Une activité modérée a été observé pour l'HE de *S.officinalis* avec des CMI comprises entre 1.25% et 2.5%, l'activité la plus intéressante est celle obtenue avec la souche de *S.aureus* ATCC 6538P avec une CMI de 1.25% .

La concentration minimale bactéricide (CMB) la plus importante est manifesté par l'*O.glandulosum* et *T.vulgaris* pour les souches de *E.coli* ATCC 25953 et *K.pneumoniae* ATCC 700603 et *S.aureus* ATCC 6538P ainsi que SARM 1392 et *E.coli* 2793 BLSE avec une CMB de 0.15% .Alors que l'huile la moins active est celle de *S.officinalis* avec des CMB >5 pour *A.baumannii* 2873 et SARM 1392.

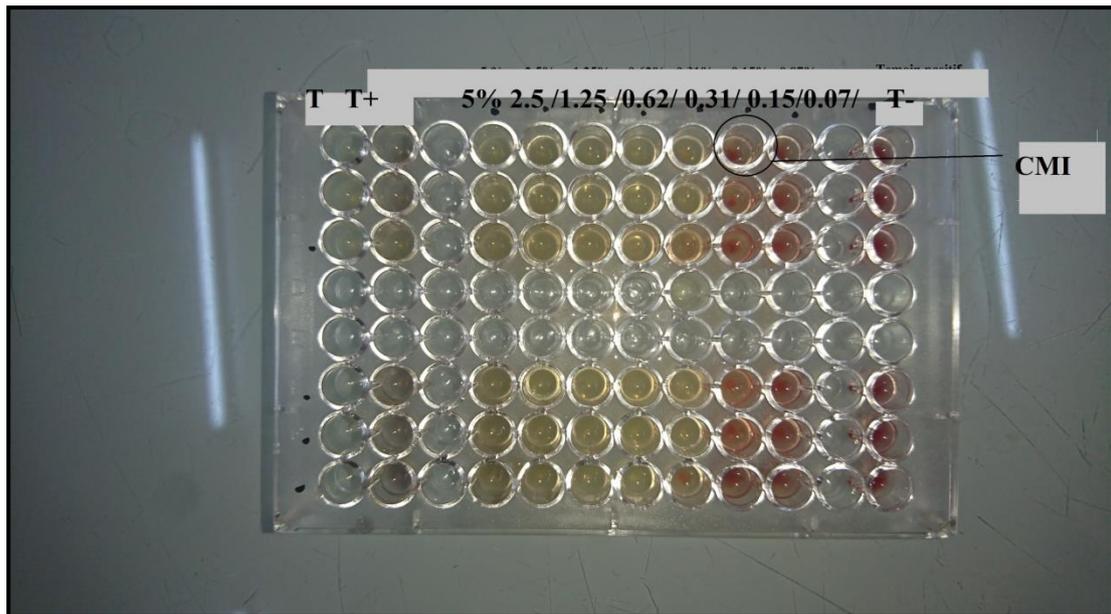


Figure 58 : Microplaque de 96 puits inoculé par une souche de *E.coli* et l'huile essentielle de l'origan

Etant donné que les huiles essentielles d'*O.glandulosum* et *T.vulgaris* sont riches en monoterpènes oxygénés (carvacrol et borneol), et que ces derniers sont largement connus pour leur activité antibactérienne ; ils peuvent agir à des niveaux morphologiques jusqu'à des niveaux de régulation en passant par des cibles structurales grâce à leur caractère hydrophobe, ils affectent la membrane externe de la cellule et le cytoplasme et vont induire une perturbation des structures bactériennes entraînant une augmentation de la perméabilité. Elles agissent aussi sur le maintien du statut énergétique en agissant sur la membrane cellulaire, en perturbant le processus de transduction d'énergie couplé à la membrane et le transport de soluté, et la régulation métabolique. (Bouhdid *et al.*, 2010) nous suggérerons que cette activité antibactérienne est probablement liée à la présence et la richesse de ses composés bioactifs (carvacrol, thymol, et borneol) .

S.officinalis avait présenté un effet modéré et limité, ces résultats sont en accord avec Alzihad et Shaabani (2012), dont les résultats démontrent une activité antibactérienne de l'HE de *S.officinalis* contre seulement les souches de *S.aureus* et *Candida albicans* , une étude réalisée par Marino *et al.* (2001) . a révélée que l'HE de *S.officinalis* possède une activité bactériostatique mais aucun effet bactéricide, cette activité est attribuable aux composés majoritaires de l'espèce de *S.officinalis* tel que le 1,8 cineole, le camphre mais aussi l'effet synergique des constituants mineurs présents dans l'huile essentielle (Burt, 2004).



Figure 59 : Détermination de la concentration minimale bactericide (CMB) chez une souche de *E .coli*

12.4. Résultats de l'activité antibactérienne de la nanoemulsion et nanoencapsulation en milieu liquide :

Tableau 26 : Résultats de l'activité antibactérienne des nano-formulations en milieu liquide (methode de la microdilution)

Souches	Nanoemulsion (µl/ml)		Nanoencapsulation(µl/ml)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E.coli</i> ATCC25953	62.5	125	31.25	250
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	31.25	125	31.25	250
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	31.25	62.5	31.25	125
<i>P.aeruginosa</i> ATCC27255	NA	NA	NA	NA
<i>E.coli</i> 2793BLSE	NA	NA	31.25	31.25
<i>A.baumannii</i> 2873	62.5	125	31.25	31.25
<i>S.marcescens</i> 1393 BLSE	NA	NA	31.25	125
SARM 1392	62.5	62.5	31.25	62.5
<i>K.pneumoniae</i> 3466BLSE	NA	NA	NA	NA

L'activité antibactérienne par microdilution a permis de confirmer les résultats obtenus par l'aromatogramme, la concentration minimale inhibitrice est 31.25µl/ml pour la nanoémulsion contre l'ensemble des souches pathogènes, alors la CMI de la nanocapsule est comprise entre 31.25 et 62.5 µl/ml, les résultats de cette activité antibactérienne en milieu liquide sont dus à leur richesse en monoterpène non-oxygéné.

13. Mise en évidence des souches formatrices de biofilm :

Les résultats de la formation de biofilm *in vitro* par les cinq souches sélectionnées sont résumés dans le tableau ci-dessous

Tableau 27 : Evaluation de la formation de biofilm *in vitro*

Biofilm	Non formatrice	Faible	Modéré	Fort
Souches			<i>SARM</i> <i>S.aureus</i> ATCC 6538P	<i>A.baumannii</i> 2873 <i>K.pneumoniae</i> 3466BLSE <i>E.coli</i> 2793BLSE

Les biofilms permettent aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte, de plus, les bactéries productrices d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants, les bactéries présentes dans un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (Ceri et al., 2010). 80% des résistances aux antimicrobiens sont attribuées à la formation des biofilms, d'où l'intérêt de rechercher des substances naturelles comme les huiles essentielles pour inhiber ou éradiquer ces structures de résistance.

La méthode de fixation par Cristal violet (CV) a pour but de quantifier la formation de biofilm par spectrophotométrie. Le CV est un marqueur basique qui diffuse à travers la membrane bactérienne à l'intérieur de la bactérie pour se lier aux molécules chargées négativement. Cette méthode a permis de mettre en évidence la capacité d'adhésion des souches microbiennes au niveau des microplaques, sur les cinq souches testées *A.baumannii* 2873 *K.pneumoniae* 3466 BLSE et *E.coli*2793BLSE, étaient fortement formatrices de biofilm $DO_t \times 4 \leq DO$, alors que l'espèce de *S.aureus* ATCC 6538P était modérément formatrice de biofilm, de nombreuses études rapportent la formation de biofilm par des pathogènes tels que *S.aureus*, *S.enteritidis* et *L.monocytogenes*

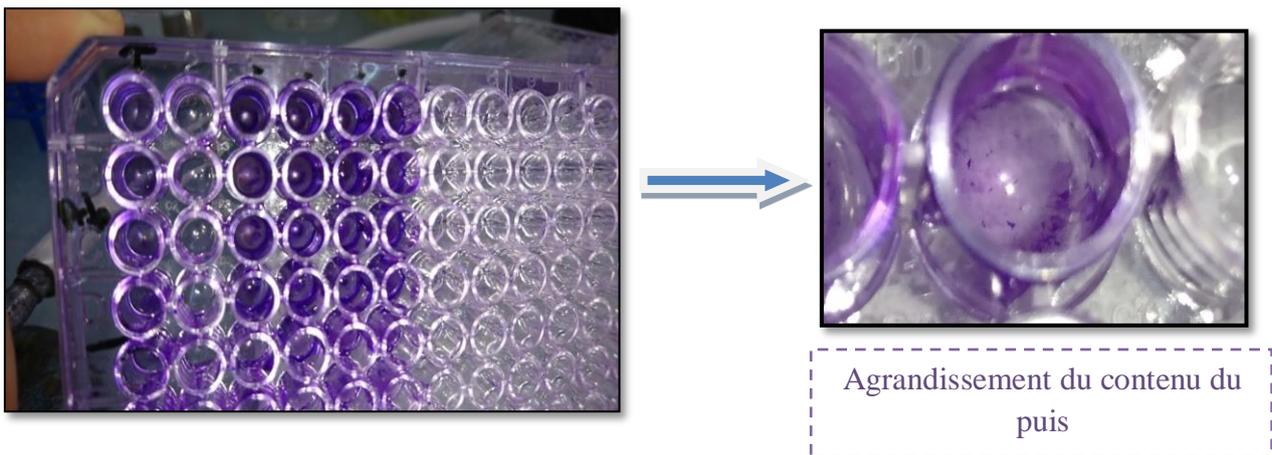


Figure 60 : Mise en évidence de la formation de biofilm par la méthode de coloration au CV chez la souche de *A.baumannii*

14. Activité antibiofilm de l'huile essentielle de l'origan et ces nanoformulations sur les souches cliniques et de références :

Les résultats de l'activité antibiofilm par la méthode du cristal violet en microplaque de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* et de ses nanoformulations (nanoémulsion et nanoencapsulation) sur des souches susceptibles de former le biofilm (SARM, *S.aureus* ATCC 6538P et *A.baumannii*) montrent que l'effet inhibiteur de la formation de biofilm par l'huile essentielle et ces nanoformulations a été observé même à des concentrations sub-inhibitrices (CMI/4 ,CMI/2; CMI ,CMI*2 ,CMI*4,CMI *8), (Fig. 61, 62, 63) .

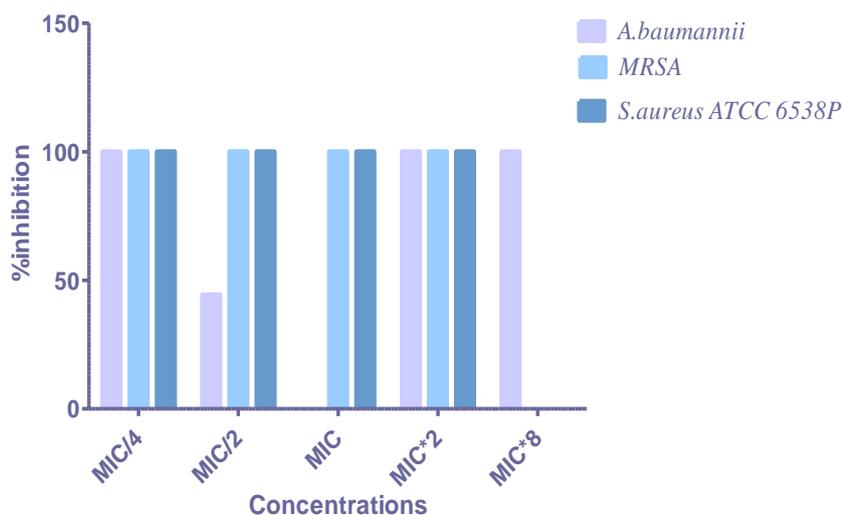


Figure 61 : Effet inhibiteur de la formation de biofilm de la nanoemulsion sur les souches sélectionnées

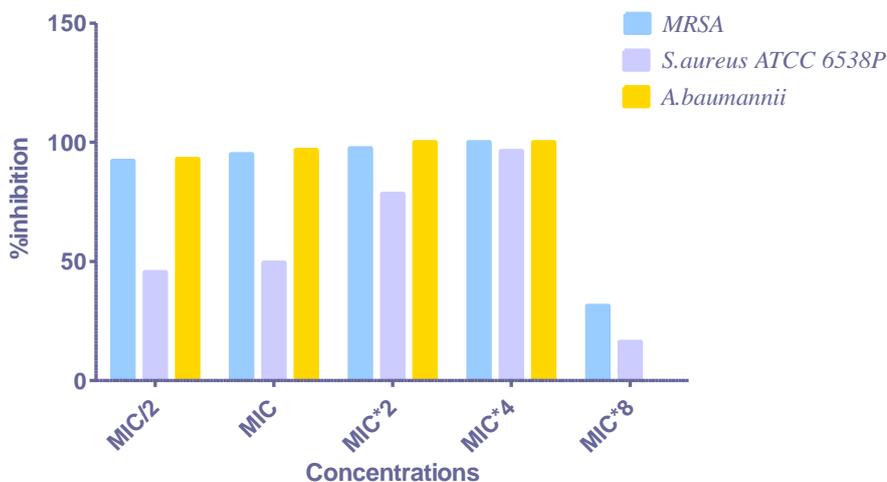


Figure 62 : Effet inhibiteur de la formation de biofilm de l'huile essentielle de l'*O.glandulosum* sur les souches sélectionnées

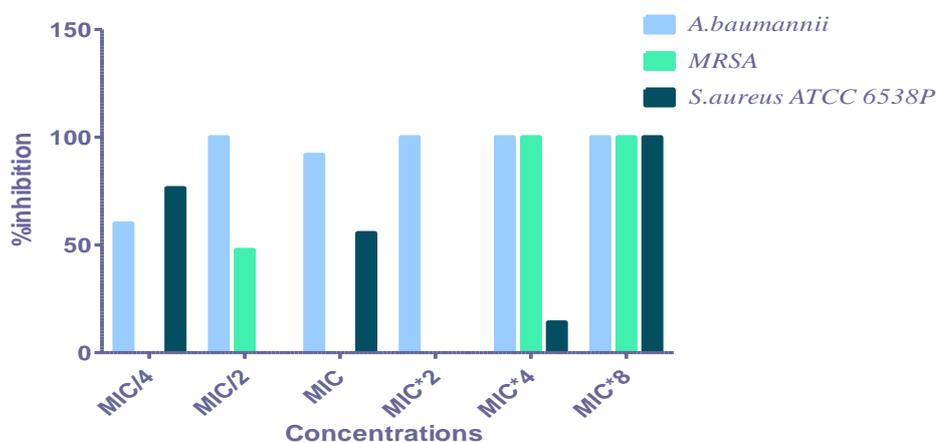


Figure 63 : Effet inhibiteur de la formation de biofilm de la nanoencapsulation sur les souches sélectionnées

L'effet de l'huile essentielle sur les souches pathogènes démontre que la CMI*2 et la CMI*4 correspondant respectivement à une concentration de 0.31% et 0.62% , concernant les souches de *S.aureus* ATCC 6538P et SARM et de 0.15% et 0.31% pour les souches de *A. baumannii* étaient responsables d'une meilleure activité. Alors que la CMI*8 était responsable d'une faible activité antibiofilm, ce résultat est en accord avec celui obtenu par Nastro et *al.* (2017) qui a démontré que les souches de *S.aureus* traitées avec des fortes concentrations supérieures à la CMI de carvacrol pouvaient induire un taux faible de mutation induisant une augmentation de la formation et production de biofilm (Nastro et *al.*, 2017). Une diminution de la sensibilité a été observée chez *B. cereus* après croissance en présence de concentrations non létal de carvacrol et suggèrent que *B. cereus* s'adapte au carvacrol en abaissant sa fluidité membranaire par modification de la composition en acides gras (Dubois-Brissonnet et *al.* 2011; Luz et *al.* 2014).

L'activité antibiofilm de la nanoémulsion sur l'ensemble des souches testées était meilleure avec un taux d'inhibition de 100% à l'exception de *A. baumannii*, ceci corrobore avec les résultats rapportés par Silva et *al.* (2022) qui ont rapporté une meilleure activité du thymol, géraniol et eugénol formulé sous forme de nanoémulsion, en effet la petite taille des particules permet d'augmenter la surface de contact avec le germe concerné et un meilleur passage à travers les membranes bactériennes (Huang et *al.*,2010) .

Cependant concernant la nanocapsule de forte concentration CMI*8 était responsable d'une meilleure activité alors que de faible concentration stimule la formation de biofilm avec un taux d'inhibition de 0% pour les souches de SARM et *S.aureus* ATCC 6538P, en effet Nastro et son équipe ont démontré que la stimulation de la formation de biofilm de *S.aureus* traité avec de faible concentration de carvacrol était due à une réponse adaptative.

15. Caractérisation macroscopique des bactéries lactiques :

La caractérisation macroscopique permet de déterminer les caractères relatifs aux colonies des bactéries lactiques obtenues sur le milieu MRS solide après 72h d'incubation à 30 C°, les colonies obtenues ont été caractérisées par une couleur blanchâtre, lisse, uniforme avec un contour régulier et une taille de 0.5mm à 1mm.

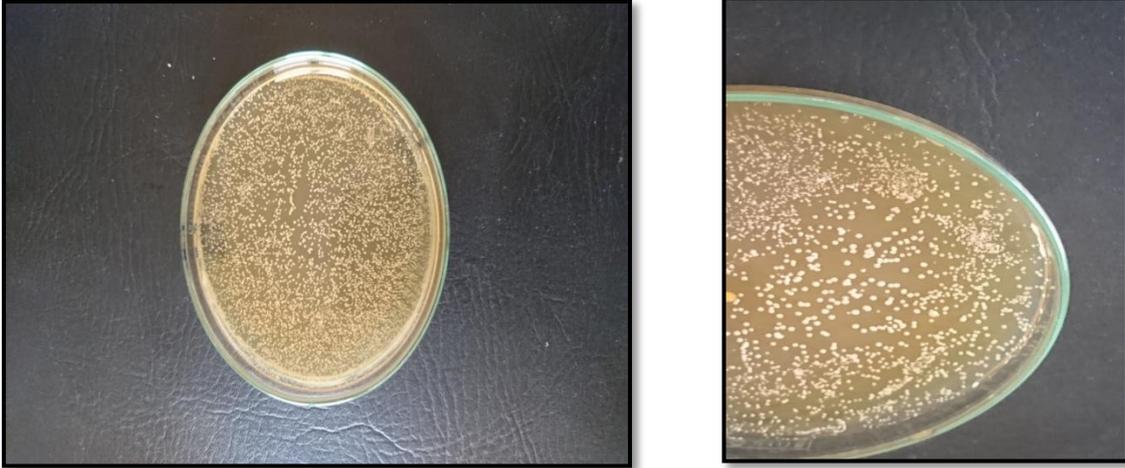


Figure 64 : Aspect des colonies de *Lb. plantarum* obtenues sur milieu MRS solide

16. Caractérisation microscopique des bactéries lactiques :

Suite à une coloration de Gram, l'examen microscopique des souches montre qu'il s'agit de bacille à gram positif

17. Test biochimique :

17.1. Recherche de catalase :

L'absence de dégagement gazeux affirme que les souches sont catalases négatives, ce qui caractérise les lactobacilles .

17.2. Production de CO₂ à partir de glucose :

Le test du type fermentaire effectué en milieu MRS liquide en présence de la cloche de Durham, montre que les souches se développent sans production de gaz ce qui indique que les souches possèdent un métabolisme homofermentaire.



Figure 65 : Absence de la production de gaz dans la cloche à partir du glucose en milieu MRS liquide

18. Cinétique de l'acidité et mesure de la croissance :

L'évaluation de la cinétique de croissance par prélèvement stéril effectué chaque 2h d'incubation à 37C° par lecture de la densité optique à 600 nm, montre que la phase exponentielle est atteinte après (6 – 8 et 10h) d'incubation respectivement, cependant la phase stationnaires s'est manifesté après (12h et 16h jusqu'à 18h) d'incubation respectivement. La détermination de l'acidité produite par les bactéries lactiques évaluées par mesure de pH a été effectuée périodiquement chaque 2h jusqu'a 24h d'incubation à 37C° et sans agitation. Les résultats obtenus montrent que la valeur de pH diminue progressivement pour atteindre une valeur de pH = 4; après 10 heures d'incubation, cette étape d'acidification est cruciale pour les LB afin d'inhiber la croissance d'une microflore indésirable.

Les bactéries lactiques utilisent la fermentation lactique pour la dégradation des glucides et la synthèse de d'ATP grâce à deux voies principales de fermentation lactique. L'homofémentation (la glycolyse), suivie de la conversion de deux molécules de pyruvate en deux molécules de lactate, utilisée par les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* et à certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lactobacillus bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*), *Lactobacillus casei*) et *Lb. Plantarum*.

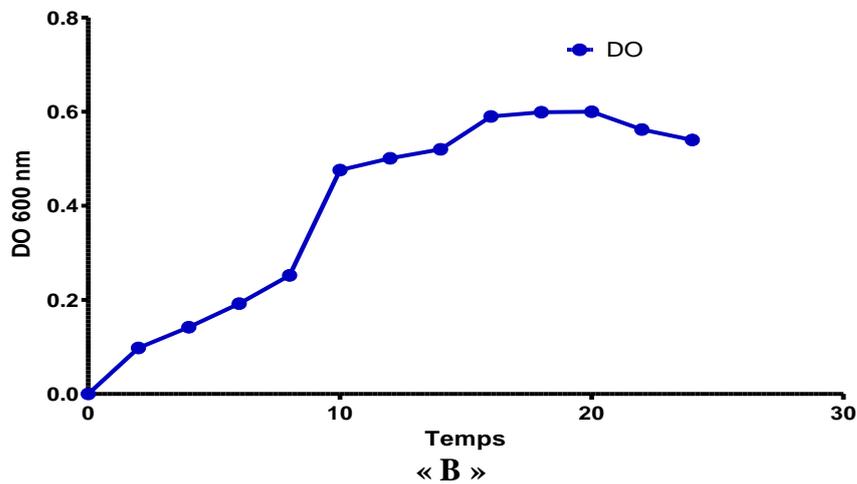
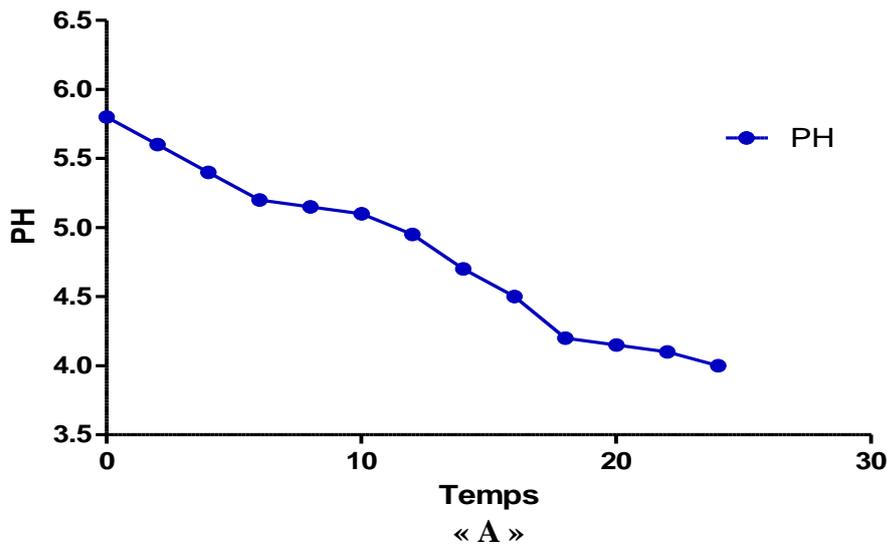


Figure 66 : Evaluation des paramaitres « A » : pH et « B » : DO d'une culture de la souche *Lb.plantarum*

19.Activité antibactérienne :

L'effet antagoniste des bactéries lactiques (LB) a été évalué par des tests directs et indirects; Le test direct a été utilisé pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de la souche de *Lb. plantarum* en milieu solide par la méthode des spots contre six souches pathogènes.

19.1. Technique direct :

La méthode de spot sur agar a été effectuée dans un premier temps afin de déterminer si la souche possédait une activité contre les souches pathogènes, les résultats obtenus montrent que la souche de *Lb. Plantarum* possède une activité contre les souches indicatrices avec des diamètres qui varient entre 10 mm et 20mm, les souches de SARM 1392 et *L. innocua* CLIP74915 se sont montrés plus sensible à l'activité de *Lb.plantarum* avec des diamètres de 20 et 19 mm respectivement (**Tab. 28**).

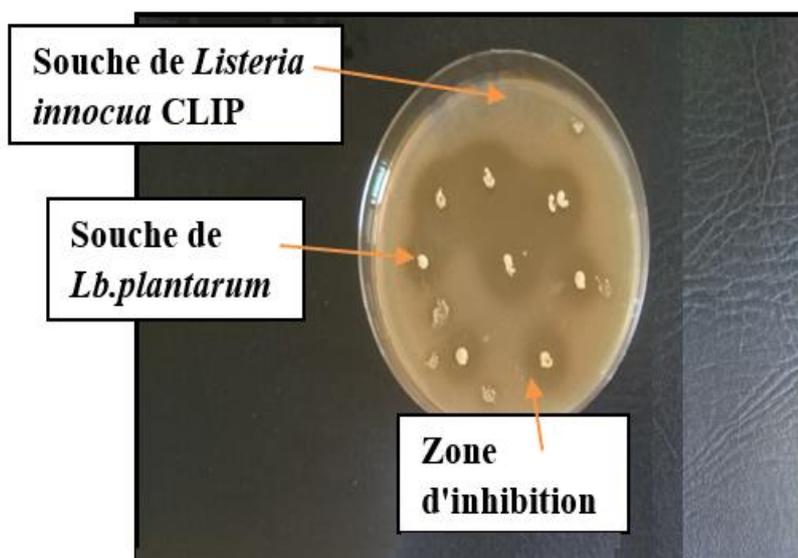


Figure 67 : Activité antibactérienne de *Lb. plantarum* par méthode de spot contre *L. innocua* CLIP 74915

De nombreux travaux rapportent l'efficacité des bactéries lactiques contre les bactéries pathogène à Gram – et à Gram +. Une étude menée par Belhamra (2017) rapporte que les souches de *Lb. Plantarum* étaient responsables d'une très bonne activité avec des diamètres qui varient de 15mm jusqu'a 48mm contre un ensemble de six souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* ; *Salmonella typhimurium* ; *Citrobacter freundii* ; *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*) avec une sensibilité accrue de *S.aureus* (43.5mm), ainsi que *Salmonella typhimurium* et *Citrobacter freundii* qui ont présenté une sensibilité similaire dont les diamètres d'inhibition varient de 27 à 48mm et de 29,5 à 40mm, divers facteurs peuvent être impliqués dans l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques parmi ces facteurs : la concurrence pour les nutriments, la diminution du pH suite à la production d'acides organiques notamment l'acide lactique et acétique, en plus de la production de divers composés tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) connu comme l'agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques particulièrement celle des lactobacilles ainsi que le diacétyle (2,3-butanedione) dont l'activité atteint son maximum lorsque le pH du milieu est inférieur à 7 (Salminen *et al.*, 2004)

Tableau 28 : Diamètres d'inhibition obtenus par la méthode de spot sur milieu MRS solide

Souches	SARM 1392	<i>S.aureus</i> ATCC6538P	<i>E.coli</i> 2793 BLSE	<i>E.coli</i> ATCC 25953	<i>L. innocua</i> CLIP74915	<i>A.baumannii</i> 2873
Diamètre (mm)	20	12	15	10	19	12

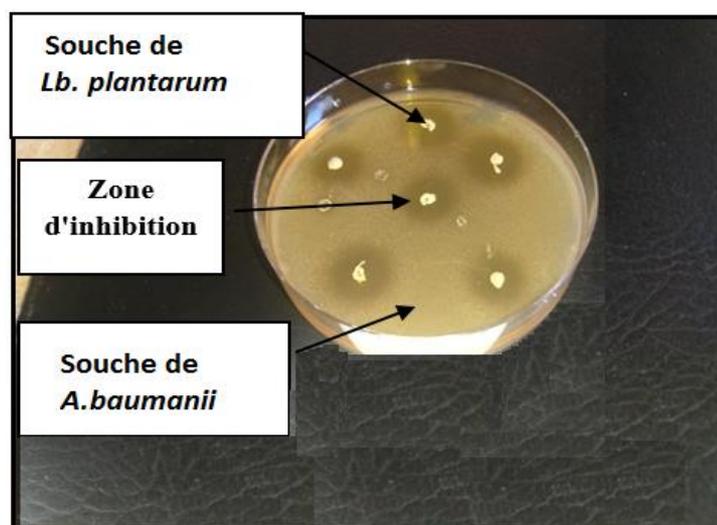


Figure 68 : Activité antibactérienne de *Lb.plantarum* par la méthode de spot contre *A.baumannii*

19.2. Technique indirecte (Surnageant brute) :

La technique des puits a été effectuée contre les mêmes souches indicatrices en utilisant le surnageant brute, les diamètres calculés sont compris entre 8mm et 12 mm. *Listeria innocua* CLIP74915 était la souche la plus sensible (12mm) suivi par la souche *A.baumannii* 2873 avec un diamètre (10 mm) (**Tab.29**), l'activité antagoniste des bactéries lactiques selon la technique indirecte décrite par barefoot et *al.* (1983) montre que les lactobacilles ont présenté une activité modérée. Alors que Mekri (2016) a rapporté une excellente activité des BL vis-à-vis de *S.aureus* ATCC 25932 (22mm) et *B.cereus* (23mm). L'effet inhibiteur des lactobacilles est principalement lié à deux origines : la première est la production d'acide lactique ou l'acide acétique et la deuxième est la production de bactériocines (Wilson et *al.*, 2005 ; torodov et dicks, 2004) ; Afin de s'assurer de la nature de l'agent inhibiteur d'autres tests complémentaires sont nécessaires, pour cela nous avons refait le même test après avoir traité le surnageant afin de neutraliser l'action du peroxyde d'hydrogène et les acides organiques.

Tableau 29 : Diamètres d'inhibition obtenu par la technique indirecte (cas du surnageant brute) sur milieu MRS solide

Souches	SARM 1392	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>E.coli</i> 2793 BLSE	<i>E.coli</i> ATCC 25953	<i>L.innocua</i> C LIP 74915	<i>A.baumannii</i> 2873
Diamètre (mm)	8	NA	8	11	12	10

19.3. Test indirect (Surnageant traité) :

Après traitement aucune activité n'a été décelé vis-à-vis des différentes souches testées (**Tab. 30**) ce qui suggère que l'activité antibactérienne est probablement due à des substances autres que les bactériocines, Niku-Paavola *et al.* (1999) ont rapporté la production de composés antimicrobiens à faible poids moléculaire autres que les acides organiques par *Lactobacillus plantarum*. La fraction active contenant, l'acide benzoïque, méthylhydantoïne, mévalonolactone et cyclo- (glycyl-L-leucyl) agissant en synergie avec l'acide lactique, ce qui laisse à penser que l'effet exercé par nos souches serait probablement du à un effet synergique entre les différents composés sécrétés par les bactéries lactiques, Selon Kalenhammer. (1988) les bactériocines possèdent un spectre d'activité limitée aux espèces taxonomiquement proches et occupent la même niche écologique et ils ont un mode d'action bactéricide. Yang et Ray (1992), ont montré que la production des bactériocines chez les bactéries lactiques sélectionnées selon leur pouvoir antagoniste dépend fortement de plusieurs facteurs tels que la performance des souches, la composition du milieu de culture, le pH du milieu de culture, le temps d'incubation et la température optimale de croissance.

Tableau 30 : Diamètres d'inhibition obtenu par la méthode indirecte (cas du surnageant traité)

Souches	SARM 1392	<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	<i>E.coli</i> 2793 BLSE	<i>E.coli</i> ATCC 25953	<i>L.innocua</i> CLIP 74915	<i>A.baumannii</i> 2873
Diameters (mm)	-	-	-	-	-	-

- : aucune activité

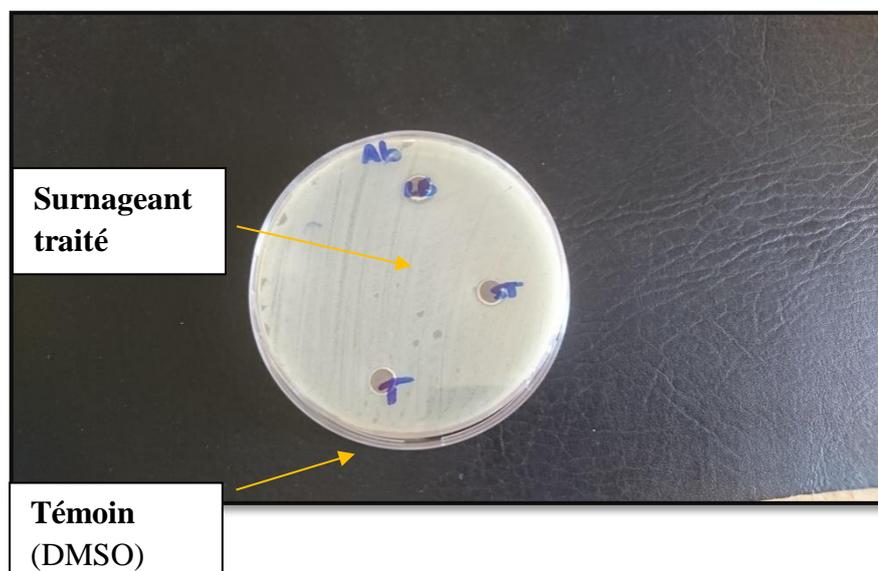


Figure 69 : Activité antibactérienne du surnageant traité vis a-vis de *A.baumannii*

CONCLUSION

Conclusion

Les infections dues aux bactéries multi-résistantes sont responsables de mortalité et morbidité à travers le monde, à l'heure actuelle certaines espèces bactériennes sont tellement résistantes qu'aucun traitement n'est efficace contre ces souches, la recherche d'alternatives issues de molécules biologiques est primordiale et d'une grande nécessité dans la lutte contre l'émergence et la dissémination de souche multi-résistante .

La présente étude a mis en évidence les taux de résistance inquiétants et alarmants de ces souches en milieu hospitalier , en effet une fréquence de (35.20 %) a été observée avec une prédominance des souches de *K. pneumoniae* (34%) et *E.coli* (27%) , marquée par une résistance aux β -lactamines , quinolones , aminosides et au le triméthoprime-sulfaméthoxazole ; de nombreux services hospitaliers sont apparus concernés par le problème de résistance, notamment les services d'orthopédie et la médecine interne d'où provenaient respectivement un taux de (30%) et (20%) de BMR ; l'étude phénotypique a permis de révéler différents phénotypes dont : les céphalosporinases , les pénicillinases , BLSE , SARM .

L'analyse chimique par CPG/SM a permis l'identification de 9 composés pour l'HE de l'origan le thym et 14 composés pour la sauge. Chaque HE était caractérisée par un chemotype ou un composé majeur , le thymol (49.52%) pour l'origan , le borneol (76.42 %) pour le thym , et le camphor (39.91%) pour l'HE de la sauge . Les tests d'activité antibactérienne ont montré que les HEs de l'origan et du thym avaient une bonne activité antibactérienne sur l'ensemble des souches de référence et les souches multi-résistantes. Contrairement à l'HE de la sauge qui a présenté une activité modérée ; à la dilution $\frac{1}{2}$, les HEs du thym et l'origan ont généré des zones d'inhibition d'un diamètre compris entre 11 et 40 mm.

Dans le but de protéger et maintenir les propriétés physio-chimiques, biologiques et fonctionnelles de l'HE nous avons procédé à la micro-encapsulation de l'huile la plus active(*O.galndulasum*) par émulsification , en utilisant la technique HSP et HPH , afin d'obtenir une huile formulée sous forme d'émulsion et de nanoencapsulation.

Les résultats de l'analyse par CPG/SM ont permis d'identifier 18 composés pour la nanoémulsion et 22 composés pour la nanoencapsulation tous deux caractérisés par une prédominance en thymol l'activité antibactérienne en milieu solide a généré des diamètres d'inhibitions compris entre 7 et 23 mm avec une concentration de 30 μ l.

La recherche d'antagonisme entre les BL (*Lb.plantarum*) et une gamme de souche indicatrice(*E.coli* 2793 BLSE, SARM 1392; *S.aureus* ATCC 6538P.*E.coli* ATCC 25953 , *Listeria innocua* CLIP 74915 et *A.baumannii* 2873) a été réalisée en milieu solide par la méthode de double couche et la méthode de diffusion des puits ;l'application du surnageant traité n'avait généré aucune zone d'inhibition démontrant ainsi l'absence de production de bactériocines .

Origanum glandulosum a présenté une bonne activité antibactérienne et anitibiofilm ; générée sous forme d'une huile HD ou bien de microencapsulation et pourrait servir comme alternative dans la lutte contre les infections dues aux bactéries multi-résistantes cependant d'autres études sont nécessaires notamment in vivo pour s'assurer de son utilisation clinique.

En perspective à cette étude :

- Il serait intéressant d'élargir l'étude à de nombreuses structures hospitalières afin de déterminer les fréquences et les niveaux de résistance actuelle et caractériser les gènes et les mécanismes de résistance des BMR.
- Mettre en évidence les facteurs de virulence contribuant à la multiresistantes.
- Evaluer la cyctotoxicité des HEs .
- Evaluer l'activité antibiofilm au niveau structurale par l'HE grace une étude à l'echelle microscopique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Arsalane, L.Y., Qamouss, A., Chafik, M., Boughalem, L., Louzi. (2010). Epidémiologie des bactéries multirésistantes dans un réanimation polyvalente d'un hôpital universitaire de Marrakech entre octobre 2006 et septembre 2009. *Les Technologies de Laboratoire*, **5** (21)18

Agence de la santé publique du Canada. Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales : Surveillance de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez les patients hospitalisés dans des hôpitaux canadiens de soins de courte durée. http://www.phac-aspc.gc.ca/nois-sinp/reports-rapport/mrsa-sarm_result-fra.php

Agence de sante publique du Canada. Lignes directrices pour l'évaluation de la sensibilité des *Enterobacteriaceae* résistants aux antibiotiques à cause des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et le signalement des cas Disponible sur <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ceqa-pceeq/esbl98-fra.php>

ASTM E2799-17 .(2017). Standard Test Method for Testing Disinfectant Efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm using the MBEC Assay, ASTM International, West Conshohocken, PA,

AARN.(2022).Réseau Algerian de Surveillance de la Resistance aux Antibiotiques .Données de l'antibioresistance .nombre et pourcentage de la resistance de *S.aureus*

Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. San Diego, cinquième édition (5^{ème}) .Academic Press

Ali, H., Al-Khalifa, A.R., Aouf, A., Boukhebti, H., Farouk, A.(2020). The effect of nanoencapsulation and nanoemulsion on the chemical structure and biological activity of Algerian *Origanum glandulosum*. *Science Report* , **10**: 28-12.

Alizadah ,A ., Shaabani ,M .(2012) .Essential oil composition , phenolic content antioxidant and antimicrobial activity in *salvia officinalis* L cultivated in Iran . *Advances in Environmental biology* .**6** (1)221-226

Álvarez, S.P., López, N.E.L., Lozano, J.M., Negrete, E.A.R., Cervantes, M.E.S., (2016). Plant Fungal Disease Management Using Nanobiotechnology as a Tool, in: Prasad, R. (Ed.), *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 169–192

Amhis,W .(2018). Programme de Prévention et de Contrôle des Infections à Bactéries Multi-Résistantes en milieu de soins. Disponible sur <http://resistancecontrol.info> >consulté le 16 /12 /22

Amri,J.E. ,Elbadaoui,K., Zair,T.,Bouharb, H.,Chakir,S., et Alaoui,T.I.(2014). Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silene vulgaris* sur différentes souches testées , *Research Gate*,**82**(1): 7481

Aouni,M.,Pelen,F.,Soulimani,R. (2013).Etude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application , *Phytotherapie*,**11**(4):225-236.

Arpino , P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant ,J., Vergnol ,A., Witier ,P. (1995).Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris,

Asbahani, A., El Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. ,El Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., et Elaissari, A. (2015). Essential Oils: From Extraction to Encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*

Association des Enseignants-chercheurs de Microbiologie Immunologie des Facultés de Pharmacie.(AEMIP) **consulté le 21/05/2023**

Audigie, C.L., Dupon, G. et Zongain, F. (1995).*Principes des méthodes d'analyse biochimique*. T1, 2ème ED. Doin, Paris, p. 44

Avril , J.L., Tardivel , R. (1996).[Bacterial complications of blood transfusions]. *Transfusion Clinique et Biologique* ,**3**: 43-9.

- Axelsson, L. (1998a).** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In: Lactic acid bacteria*. Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Deccer. p. 1-72
- Barefoot ,S.T. & Klaenhammer T.R., (1983).** Detection and activity of lactacin B. a bacteriocin produced by *Lactococcus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*,**45**: 1808-1815
- Bouhaddouda ,N.(2016) .** *Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : Origanum vulgare et Mentha pulegium*.Thèse de doctorat en biochimie .Université de Badji Mokhtar Annaba . Algérie
- Benmehidi ,M.(2014) .**Situation épidémiologique des bactéries multi résistantes (BMR) aux antibiotiques en Reanimation médicale au CHU de Batna.Thèse de doctorat en science médicale .Université de Hadj Lakhdar de Batna
- Branger, B.(2009).** Présentation et communication des données. Réseau « Sécurité Naissance – Naître ensemble » des Pays de la Loire.disponible sur www.reseau-naissance.com
- Benkherara , S. Bordjiba,O . Boutlelis Djahra.A.(2011) .** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Sauge officinale : *Salvia officinalis* L. sur quelques entérobactéries pathogènes . *Revue Synthèse* ,**23** :74-75
- Bouyahya ,A., Bakri ,Y. A.,Touys,A.,Talbaoui,A., Khouchlaa,A., Charfi ,S.,Abrini ,J., Dakka,N.(2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie* :DOI 10.1007/s10298-017-1118-z
- Boudjemaa , D. (2015).**Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez Enterobacter cloaceae .Thèse de Doctorat : Microbiologie. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid, 161P.
- Badis, A. ,Laouabdia-Sellami,N .Guetarni,D. Kihal,M and Ouzrout,R.(2005).** "Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle»." *Science and Technology* , **23** : 30-37
- Barbier,F., Wolff ,M.(2010) .** Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. Vers l'impasse thérapeutique ? *Médecine Science (Paris)*, **26**(11) : 960-968.
- Bearman, G., Wenzel ,R.(2005).**Bacteremias: a leading cause of death.*42 Archives of Medical Research*,**36**: 646-59
- Belhamra ,Z .(2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires.Thèse de doctorat en microbiologie .Université de Ferhat abbas Setif 1
- Bosch, M., Nart, J.,Audivert, S., Bonachera, M.A., Alemany, A.S.,Fuentes, M.C., Cuné,J.(2012).**Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Archives of Oral Biology*, **57**: 539–549.
- Berrehal ,D., Boudiar ,T., Hichem, L., Khalfallah, A., Kabouche ,A., Al-Freihat, A.,Ghannadi ,A., Sajjadi ,E., Mehrabani, M., Safaei-Ghomi, J. & Kabouche, Z.(2010).**Comparative composition of four essential oils of Oregano used in Algerian and Jordanian folk medicine. *Natural Product Communcations*, **5**: 957 – 960
- Bhargava ,K., Conti, D.S.,Da Rocha, S.R.P., Zhang, Y.F. (2015).** Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology*,**47**:69-73.
- Bonacorsi, S.(2007a).** Examen cyto bactériologique des urines. In: Denis F., Ploy M.C.,MartiC., Bingen E. et Quentin R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier.Masson.Paris. P :135-143.
- Bonacorsi, S(2016).**Bactériologie medicale.Technique usuelles .Ed Elsevier.Masson .Paris . 3eme édition

Bosseray, A., Brut, A., Mallaret .M.R., et al. (1997). Epidémiologie des infections nosocomiales chez la personne âgée. *Hygiènes*, **6**:316-318.

Boukhatem, M.N., Hamaidi, M.S., Saidi, F., Hakim, H. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du *Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.)* cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technologie*, **3**:37-45

Bousbia, N. (2013). *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaire.* Thèse de doctorat en chimie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique

Boyer -Chammrad, T. (2013). Lutte contre les Bactéries Multirésistantes en ville : état des lieux et moyens mis en œuvre après une hospitalisation. Thèse de doctorat en médecine. Paris . Université de Paris Diderot .p90

Boyle, W. (1955). Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review*, **66**: 25-28

Branger, B. (2005 a) . Comité technique des infections nosocomiales (CTIN) et le Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin) avec les centres de coordination des comités de lutte contre les infections nosocomiales (Clin). Enquête de prévalence nationale 2001 des infections nosocomiales chez les nouveau-nés et des enfants et adolescents de moins de 18 ans. *Archives de Pédiatrie*, **12**: 1085-93.

Briand, Y.M. (2009). Une histoire de la résistance aux antibiotiques, L'Harmatta. ed.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales*, Éditions médicales internationales, Editions Technique & Documentation, 1120p.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.*, 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris

Bryskier, A. (2005). Vancomycine, Teicoplanine, in: Domart Y., Veyssier, P. (Eds.), *Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals.* *American Society for Microbiology* Washington, pp 930-945

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists: Rockville, MA, p 1367

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**:223-253

Butaye, P., Cloeckert, A., Schwarz, S. (2003). Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **22**: 205-210

Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*, **16**(12): 1115–1120

Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M. et al. (2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, **109**:1139–49

Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A. and Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **15**: 143–182. doi: 10.1111/1541-4337.12179.

Basu, S., & Mukherjee, M. (2018). Incidence and risk of co-transmission of plasmid-mediated quinolone resistance and extended-spectrum β -lactamase genes in fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli*: a first study from Kolkata, *Indian Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **14**: 217–223.

Coyle, M.B. (2005). Antimicrobial Susceptibility Testing Manual, *American Society of Microbiology*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.asm.org/index.php/34-international/asm-meetings-andconferences/274-antimicrobial-susceptibility-testing-manual>. Consulté le 12/03/2023

Clinical and Laboratory Standards Institute .(2014) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI Document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

Comité de l'antibiogramme - Société Française de Microbiologie, communiqué 2000-2001 [en ligne], consulté le 13 novembre 2021. adresse URL : <http://www.sfm.asso.fr>

Carson, C.F., Riley ,T.V., Bosque ,F.(2002). Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, **78**: 264-269.

Cox, S.D., Gustafson, J.F., Warmington, J.R.,Wyllie ,S.G.(1991). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Malaleuca alternifolia* essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**:170-175

Carré, P., (1953). Précis de Technologie et de chimie industrielle. T3. Ed Ballière JB. et fils

Cowan ,M.M.(1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 564-582

Caude, M. et Jardy A.(1996). Méthodes chromatographiques. Base documentaire : *Techniques d'analyse*.1445p.

Carlier, V.(2005).« Herbière médicinale. 35 plantes de santé à herboriser »,Edition Aubanel, Genève, 203p

Coste ,H. (1937) .Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Second Tirage . Paris - Librairie des Sciences et des Arts. 807 p.

Chaudhari, A.K., Singh, V.K., Das, S., Dubey, N.K.(2021). Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system. *Food and Chemical Toxicology*, **149(11)**:20-19. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112019>

Cenatiempo ,Y ., Berjeaud JM ., Biet F et al. (1996). Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques, Elsevier/INRA, *Lait* , **76**,169-177.

Corrieu ,G ., Luquet F.M. (2008). Bactéries lactiques et probiotiques, édition Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris France, p9, 10, 25, 51.

Chakroun,Y.(2022).*Activité antifongique et antimycotoxines d'huiles essentielles tunisiennes sur des souches de Fusarium productrices d'enniatines et évaluation de leur potentialisation par nanoencapsulation* .Thèse de doctorat en microbiologie et immunologie .Université de bordeaux .France

Cronquist,A. (1968 a) . The Evaluation and Classification of Flowering Plants. 396

Cronquist, A., (1981) : An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York.1262 P.

- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.A., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M. (1985).** Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, **22**:996–1006
- Cotter, P., P. Ross, et C. Hill. (2013).** «Bacteriocin - a viable alternative to antibiotics ?» *Nature Reviews Microbiology*, **11** : 95-105.
- Cotter, P.D, C Hill, et P Ross.(2005 a).** «Bacteriocin: developing innate immunity for food.» *Nature Reviews Microbiology*, **3** : 777-788.
- Cavallo, J.D., De Mouy, D., Fabre, R., Garrabe, E., Armengaud, M.(1998).** *Pseudomonas aeruginosa* en pratique de ville : étude AFORCOPIBIO 1995-1996. *Médecine et maladies infectieuses*, **28**: 258-259.
- Ceri, H., Olson, M.E., Turner, R.J. (2010).** Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, **11**:1233–1237
- Chahmout, S. (2011).** *Pneumopathies nosocomiales à Acinetobacter baumannii en réanimation à propos de 155 prélèvements distaux protégés à l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V de Rabat.* Thèse de Doctorat. Université Mohamed V, Maroc. 106p
- Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D.J. (2012).** Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: Influence of ripening inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**:12056–12063. [CrossRef] [PubMed]
- Corrieu, G., Luquet, F. M., 2008.** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Lavoisier, Paris.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2003).** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, **22** :39–44
- Dortu, C., Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires (2009). Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Interest For Food Products Biopreservation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **13**(1), 143-154.
- Demarne, F.E. (1986).** « La sélection des Pelargonium à parfum ». J.I.H.E, Digne
- Desai, M. A., Soni, K.A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., and Silva, J.L.(2012).** Reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surfaces by essential oils. *Journal of Food Protection*, **75** (7):1332–7. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-517.
- De martinis, E.C.P., Publio, M.R.P., Santarosa, P.R., Freitas, F.Z.(2001).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32** :32-37
- Duong, V.-A. Nguyen, T.-T.-L.; Maeng, H.-J.(2020).** Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules*, **25**:47-81. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafigui, K., Kadri, A., Gharsallah, N. (2019).** Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of date palm pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arabian Journal of Chemistry*, 3075–3086. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
- Dubois-Brissonnet, F., Naitali, M., Mafu, A.A., Briandet, R.(2011).** Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by plant-derived terpenes. *Applied Environmental Microbiology*, **77**:906–910. doi: 10.1128/AEM.01480-10

Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT Food Science and Technology*, **44**: 1908–1914.

Dellaglio, F, H. de Roissart, S., Torriani, M.K, Curk et D ,Janssens. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In Bactéries Lactiques*. Édité par H Roissart, & F.M Luquet. Paris: Lavoisier

Djedir, G. (2018). *Etude comparative entre deux espèces du Thym: Thymus coloratus et Thymus capitatus dans la région de Tlemcen : Aspect écologique, cartographique et morphométrique*. Master, Université Aboubakr Belkaid, Tlemcen. Algérie

Davies, J., Davies, D.(2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Review*, **74**:417–33. doi:10.1128/MMBR.00016-

Eltz ,T., Zimmermann, Y., Haftmann, J., Twele, R., Francke ,W., Quezada–Euan ,J.J.G. et Lunau,K. (2007). "Enfleurage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees." *Proceeding of the Royal Society of London B, Biological Science* , **274(1627)**: 2843–2848.

Elqaj, M., Ahami, A., Belghyti, D. (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". *Maroc.science and education*

Ennahar ,S ,Sachihara ,T.,S onomoto,K et Ishizaki ,A. (2000). Classe IIa bacteriocins biosynthesis structure and activity .*FEMS Microbial review*, **24** (1) :85-106

Elouennass, M., Bajou ,T., Lemnouer ,A et al.(2003). *Acinetobacter baumannii* : étude de la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed, Rabat, Maroc. *Médecine et maladies infectieuses* , **33** :361–364.

Extremina, C. I., Da Fonseca, A. F., Granja, P. L., Fonseca, A. P. (2010). Anti-adhesion and antiproliferative cellulose triacetate membrane for prevention of biomaterial-centred infections associated with *Staphylococcus epidermidis*. *International journal of antimicrobial agents*, **35**(2):164-168

Frédéric, J, Elvire M-K, Audrey M, Jean DC. (2008). les difficultés d'interprétation de l'examen cyto bactériologique des urines. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2008 : (406)51-59

Fraja, A., Jaafara, F., Martib, M., Coderchb, L.,Ladharria, N. A.(2019). comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Industrial Crops Product*, **140**:1–18.

Fleming, H., P., Erchells, J.L. et Casilow, R.N., (1975). Microbiol inhibition on isola *Pediococcus* from cucumber bunc. *Applied Environmental Microbiology* , **30**: 1040-1042

Fontanay,S., Mougnot, M.E., Duval.E.R.(2015). Évaluation des -activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel* , **5** (2).

Farhat, M.B., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J.(2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, **49**:904–914.

Frigui, S , Bourbiaa.Y., Mokline.A., Naija .H., Messadi, A.A.,et . Thabet .L .(2021) . Bactériémies Nosocomiales: Épidémiologie Clinique Et Bactériologique Chez Les Brûlés . *Annales of Burns Fire Disasters*, **31**; **34**(1): 10–17.

Guinoiseau, E. (2010). *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action.* Thèse de doctorat en biochimie et biologie moléculaire Université de Corse. France

Gansmandel, T. (2011). *Etude épidémiologique des résistances d'Escherichia Coli BLSE au centre hospitalier de Valenciennes en 2006.* Mémoire pour le DES de biologie médicale. Lille : Université de Lille 2, 145 p.

Gazengel, J.M. (2007). *Le préparateur en pharmacie.* Edition Office Des Publications Universitaires Tee & Doc, Paris, 24- 25p

Goetz, P et Ghedira, K. (2012). *Collection Phytothérapie pratique .phytotérapie anti-infectieuse . springer .paris 4:357-365p.*

Gamisans, J. et Jeanmonod, D. (1993). *Catalogue des plantes vasculaire de la corse, seconde édition, Edition des conservation et jardin botanique de la ville de Genève, Chambésy. Cité in(Sylvain S., 2010)*

Gildemeister, E et Hoffmann, F.R. (1912). *Les huiles essentielles. 2ème Edition. Edition Schimmel & Cie, Miltitz près leipzig.*

Ghorbani, A., & Esmailzadeh, M. (2017). *Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. Journal of traditional and complementary medicine, 7(4): 433-440*

Guignard, J.L. Dupont, F. (2004). *Botanique : Systématique moléculaire, 13 ème éd. Ed. Masson, Paris. 237 p.*

Guignard, J.L., (1996 a). *Abrégés en botanique. 10 ème éd. Ed. Masson. Paris. 278 p.*

Gómez-Sequeda, N., Cáceres, M., Stashenko, E.E., Hidalgo, W., Ortiz, C. (2020). *Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against Escherichia coli O157:H7 and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Antibiotics, 9:730.*

Guessas, B. (2007). *Les particularités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de Staphylococcus aureus.* Thèse de doctorat. Université d'Oran Es-Senia .Algérie

Granier, F., et Denis, F. (2007). *Hemoculture. In : Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. Paris. P :107-115.*

Gruber, I., Heudorf, U., Werner, G., Pfeifer, Y., Imirzalioglu, C., Ackerman, H., Brandt, C., Besier, S., Wicheilhaus, T. (2013). *Multidrug-resistant bacteria in geriatric clinics nursing homes and ambulant care –Prevalence and risk factors .International journal of Medical Microbiology , 303: 405 – 409*

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

Giraud-Morin C, Fosse, T. (2008). *Évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005–2007). Pathologie biologie, 56 :417–423.*

Gil –Caster, O., Barra, P., Greus, A.R., Bustos, R. (2020). *Encapsulation of vitamin A and E as spray dried additives for the feed industry .Molecule, 25 :13-20*

Hoën, B., Alla, F., Selton, C., et al. (2002). *Association pour l'Etude et la prévention de l'Endocardite infectieuse (AEPEI) Study Group . Changing profile of infective endocarditis : results of a 1-year survey in France . Journal of American Medical Association , 288:75-81.*

Hsu, S.T., Breukink, E., Bierbaum, G., Sahl, H.G., de Kruijff, B., Kaptein, R., van Nuland, N.A., et Bonvin, A.M. (2003). *NMR study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles .Conformational changes are a key to antimicrobial activity . journal of biomolecular and Chemistry , 278(15) :13110-7*

Holzappel, W. H., Geisen, R et Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food and Microbiology*,. **24**: 343-362

Heng, N.C.K, P.A, Wescombe, J.P ,Burton, R.W, Jack , J.R ,Tagg. (2007).*The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria.* Édité par M.A Riley, & M.A Chavan. Berlin: *Springer Verlag*

Hammiche, V. (1990). Usages traditionnels des plantes spontanées d'El Goléa. Actes du colloque de l'Association Française pour la conservation des espèces végétales. Mulhouse.

Huang, Q., Yu, H., Ru, Q. (2010). Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal of Food Science*, **75**:R50–R57.

Hyldgaard, M., Mygind ,T., Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*,**3**: 1-24

Hardie, J.M ., R.A Whiley.(1997). «Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus* .» *Journal of Applied Microbiology* .Symposium Supplement. (83): 1-11

Isman, M. B., Machial, C. M. (2006). Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. eds., *Naturally Occurring Bioactive Compounds.* Elsevier.**3**: 29–44

Jeune, J.L .2020. Technique d'extraction des huiles essentielles disponible sur le site <https://nidoessentialoil.com/extraction-des-huiles-essentielles>. Consulté le 02 /04 / 24

Juillard, V., Spinnler, M., Desmazeaud, M.J., et Bouquien ,C.Y. (1987). Phénomène de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait* ,**67**: 149-172.

Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and Philippon, A. (1988 a) . Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infectious Disease*, **10**: 867–878

Jetté, L ., Lefebvre, J. Ismail J. Institut national de santé publique du Québec. Laboratoire de santé publique du Québec. Programme de surveillance passive de *Staphylococcus aureus* (SARM). Disponiblesur:http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/039_staphylococcus_aureus_2000.pdf

Jarlier ,V.,Arnaud, I.,Carbonnr, A. (2012).Surveillance des bactéries multirésistantes dans des établissements de santé en France –Réseau BMR Raisin –Résultats 2010 Saint Maurice :Institut de veille sanitaire .84p

Jana, S.,Deb ,J.K. (2006).Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* ,**70**(2):1

Jonathan, N.(2005). Screening for extended-spectrum beta-lactamase-producing pathogenic enterobacteria in district general hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 1488–1490.

Jovier ,S.(2019).*BLSE hospitalier en France comprendre e pour controler.*Thèse de doctorat .Université de Paris .France

Khalfi ,O., Sahraoui, N., Bentahar ,F. & Boutekedjiret ,C.(2008). Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil from Algeria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , **88**: 1562–1566

Krir, A., Dhraief ,S.,Messadi ,A.A.,Thabet ,L. (2019).Profil bactériologique et résistance aux antibiotiques isolées dans un service de réanimation des brûlés durant sept ans. *Annals of Burns and Fire Disasters* . vol. XXXII - n. 3

Kazi Tani,B. Z., Decré, D., Genel, N., Boucherit-Otmani, Z., Arlet, G., and Drissi, M. (2013). Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microbial Drug Resistance*,**19** (3): 185-190.

Karmen ,G. T. et Bogovic .B. M .(2003). Partial characterization of bacteriocins produced by *Bacillus cereus* isolate from milk and milk products .*Food Technology and Biotechnology*,**41**(2):121,129

Kowalczyk, M. Mayo, B. Fernández, M. Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2015).Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of —Omic Technologies. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Mozzi F,Raya R R, Vignolo G M.

Kintzios ,S.E.(2002). Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios S.E. *Oregano— The Genera Origanum and Lippia*. Ed. Taylor & Francis. London. pp: 3–8.

Kováts ,E. (1965).Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in *Advances in Chromatography*. **7**: 229-247.

Kostoglou, D., Protopappas,I .,and Giaouris,E. (2020). Common plant derived terpenoids present increased anti-biofilm potential against *Staphylococcus* bacteria compared to a quaternary ammonium biocide. *Foods* ,**9** (6):697. doi: 10.3390/foods9060697

Karioti, A., Vrahi-Hadjilouca, T., Droushiotis ,D., Rancic, A., Hadjipavlou-Litina, D., Skaltsa, H.(2006). Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Medica*,**72**: 1330-1334

Kumwenda, P.; Adukwu, E.C.; Tabe, E.S.; Ujor, V.C.; Kamudumuli, S.P.; Ngwira1, M.; Wu, J.T.S.; Chisale, M.R.O.(2021). Prevalence, distribution and antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates from a tertiary Hospital in Malawi. *BMC Infectious Diseases*. , 21, 34.

Kalembe ,D., Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medical Chemistry* , **10** : 813-829

Kotan ,R., Kordali ,S. ,et Cakir, A. (2007). "Screening of antibacterial activities of twenty–one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift Naturforschung C*, **62**(7–8): 507–513

Kimbaris, A.C., Siatis, N.G., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., Pappas, C.S., Polissiou ,M.G. (2006).Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem*, **13**: 54-60

Kayser ,F., Boottger, E., Zinkernagel , R., Haller , O., Eckert , J., Deplazes ,P.(2008).*Manuel de poche de microbiologie médicale* . 11ème édition Flammarion Ed. Paris. p800

Lang ,G. and Buchbauer ,G. (2011). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal* ,**27**:13-39

- Leclerc, H., Gaillard, J.P., Simonet, M. (1995).** Microbiologie générale : *la bactérie et le monde bactérien*. Edition Doin, Paris. 535p.
- Lozniewski, A., Rabaud, J. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Nancy: CCLINSud-Est
- Laub, G.R. (1986).** Discovery of the sulfa drugs. *South Medical Journal*, **79**: 782
- Levy, S.B., Marshall, B. (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, **10**: 122-129
- Lucchesi, M.E., Chemat, F., et Smadja, J. (2004).** "Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, **1043(2)**: 323-327.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 453-462.
- Lis-Balchin, M. (2002 a), Lis-Balchin M. (1996).** Geranium oil. *International Journal of Aromatherapy*, **7**: 10-11
- Lindgren, S.E et Dobrogosz, W.J. (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria on food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**: 149-164
- Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Goris, G., Christensen, H., Rusul, G. (2000).** Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chilli, a Malaysian food ingredient. *International Journal of System Environmental Microbiology*, **50**: 19-24
- Lanotte, P., Isnard C., Mereghetti L. (2016).** Du prélèvement à la caractérisation des souches. Bactériologie médicale. Technique usuelles. Ed Elsevier Masson. Paris. P : 15-43.
- Lucet J.C. (1998).** Lutte contre les bactéries multi résistantes. *La revue du praticien*, **48** : 1541-1546
- Looveren Van, M., Goossens H. (2004).** Antimicrobial resistance of *Acinetobacter spp* in *European Clinical Microbiology and Infection*, **10(8)**: 684-704.
- Les plantes aromatiques utilisées et leur images disponible sur : www.aromatique.fr. Consulté le 20/02/2022
- Lahlou, A., Chegri, H., L'Kassmi, M. (2009).** Epidemiology and antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* isolated in urinary tract infections at the Moulay Ismail Military Hospital of Meknes. *Antibiotiques*, **11**: 90-96
- Lahlou, A.I., Salord H., Gille Y., Roure C., Tigaud S., Bajou T., Ratbi N., Kassmi H.L. (2008 a).** *Pseudomonas aeruginosa* et résistance isolée à l'imipénème: clone émergent en milieu hospitalier. *Les techniques de laboratoire*, **11**: 4-9.
- Luz, I.D.S., De Melo, A.N., Bezerra, T.K., Madruga, M.S., Magnani, M., De Souza, E.L. (2014).** Sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella Typhimurium* cultivated in a meat broth. *Foodborne Pathogenes and Disease*, **11**: 357-361. doi:10.1089/fpd.2013.1695
- Li, L., Wei, S., Zhu, T., Xue, G., Xu, D., Wang, W., & Kong, L. (2019).** Anti-inflammatory norabietane diterpenoids from the leaves of *Salvia officinalis* L. *Journal of Functional Foods*, **54**: 154-163

Moumni ,S ., Elaissi ,A ., Trabelsi ,A., Merghni, A.,Chraief,I., Jelassi, B.,Chemli,R., and Ferchiche. S.(2020).Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some *Lamiaceae* spicies oils fom Tunisia. *BMC. Complementary Medicine and Therapies*, 3;20(1):103. doi: 10.1186/s12906-020-02888-6

McClements ,D. J., Rao ,J.(2011). Food-grade nanoemulsions:formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , **51**(4): 285-330. doi:10.1080/10408398.2011.559558

Marino, M .,Bersani, C.,et Comi ,G.(2001).Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oil from *lamiacea* and *compositae*. *International Journal of Food Microbiologyl* , **67**:187- 195

Mann ,C.M .,Cox , S.D et Markham, J.L. (2000).The Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 Contributes to Its Tolerance to the Essential Oil *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) .*Letters in applied Microbiologyl* , **30**:294 – 279

March ,A., Aschbacher , R.,Dhanji,H.,livermore ,D.M., Bottcher , A., sleghel , F., Maggis S., Noalem ,M., Larcher , C., Woodford, N. (2010).Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clinical Microbiology and infection*,**16** (7) 934-944

Mekri, M.(2016). *Effet de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et pseudolactiques et des huiles essentielles d’Inula viscosa contre les germes pathogènes.*Thèse de doctorat en science biologique .Université de sidi bel abbas .Algérie

Marais ,O. (2008).Les infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* augmentent leurs résistances. *Option Biotechnologie* .N°408.

Mansour ,W., Bouallegue O., Dahmen S ., Boujaafar N . (2008). Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux β -lactamines chez des souches de *Acinetobacter baumannii* isolées à l’hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). *Pathologie Biologie*,**56** (3) : 116-120.

Mainardi ,J.L., Goldstein, F.W., et Gutmann ,J.(1996). Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. Encyclopedie Médicale de Chirurgie .*Maladies infectieuses* . 8-006N-10

Martin ,A . (2020) .Les huiles essentielles antibactériennes: exemple du thym (thymus) .These de doctorat en Pharmacie .Université de Picardie Jules Verne. France

Metintas ,S., Akgun, Y., Durmaz, G., Kalyoncu, C . (2004).Prévalence and characteristics of nosocomial infections in Turkish university hospital. *American Journal of Infection control*, **32**: 409-13

Mariani-Kurkdjian , P .,et Bingen, E. (2007a). Analyse bactériologique des selles. In : Denis Ploy,F .M.C., Martin, C., Bingen, E. et Quentin R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson.Paris. P : 145-154.

Mariani –Kurkdjian ,P.,Bonacorsi, S., Bingen, E. (2016).Diagnostique bacteriologique et suivi biologique des meningitis bacteriennes .Bacteriologie médicale :Technique usuelles . Ed ElsevierMasson.Paris. P : 141-146.

Müller ,T. (1990). Comparison of methods for differentiation between homofermentative and hétérofermentative lactic acid bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, **145** (5) : 363-366

Mami ,A ., kehal ,M .(2019).Activité anti-bactérienne de *lactobacillus plantarum*: Le bio-contrôle des bactéries d’altération alimentaire par les bactéries lactiques du genre *lactobacillus*.Edition universitaire européenne.

Marques, H.M.C.(2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal* **25**:313–326. <https://doi.org/10.1002/ffj.2019>

Mechergui, K., Coelho, J. A., Serra, M. C., Lamine, S. B., Boukhchina, S., & Khouja, M. L. (2010). Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**(10), 1745–1749.

Meyer, A. (1881). Don précieux aux amis, traitant des qualités des végétaux et des simples. P. Fontana. History of medicine and natural science

Mao, L.C., Pan, X., Que, F., Fang, X.H. (2006). Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, **222**(3): 236–241.

Mantle ,D.,Anderton, J.G., Falkous ,G. ,Barnes, M. ,Jones ,P.,Perry ,E.K .(1998).Comparison of methods for determination of total antioxydant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comparative. Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molcular Biology* , **121**: 385-391

Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, **13**:833–839

Moyler ,D.A. (1993). "Extraction of essential oils with carbon dioxide." *Flavour and Fragrance. Journal* , **8**(5):235–247.

Matthew, M.(1979). Plasmid-mediated P-lactamases of Gram-negative bacteria : properties and distribution. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **5**:349

Murray ,P.R., Rosenthal, K.S. Pfaller, M.A.(2009).Medical Microbiology Elsevier edn., Philadelphia, pp. 960

Markham ,P.N., Neyfakh ,A.A.(2001).Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria, *Current Opinion Microbiology*, **5**:509-514.

Mc -Auliffe ,O, Hill,C. LANTIBIOTICS: STRUCTURE, BIOSYNTHESIS AND MODE OF ACTION. *FEMS Microbiology Review*,**25**: 285-308.

Maurin ,M.(2018).Antibiotiques,antibiorésistance et environnement.*Encyclopedie de l'environement* , onulté le 2 octobre 2024 [en ligne ISSN 2555-0950] url : <https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/antibiotique-antibioresistance-environnement/>.

Maiïworé ,J., Baane M-P., Youssouf D., Bole J. & Nango F.Y.N. (2021). Portage Digestif des Bêta-Lactamases à Spectre Élargi Chez Quelques Patients de l'hôpital de la Caisse Nationale de Prévoyance Sociale de Maroua (Cameroun). *European Scientific Journal*, ESJ, **17**(10), 107. <https://doi.org/10.19044/esj.2021.v17n10p107>

Nauciel ,C., vildé ,J.L.(2005). Bacteriologie medicale ; 2eme edition MASSON Éditeur 21, rue Camille-Desmoulins 92789 Issy-les-Moulineaux Cedex 9

Normak, H.B., Normak ,S.(2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*,**252**: 91-106

Natarajan, D., Britto, S.J., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., Perumal, G. (2005). Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis* a rare medicinal herb. *Journal of Ethnopharmacology*, **102**: 123–126.

Naas, T., Lezzar, A., Bentchouala, C., Smati, F., Scheftel, J.M., Monteil, H., and Nordmann, P. (2005). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *Senftenberg* isolates producing CTX-M beta-lactamases from Constantine, Algeria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**: 439-440.

Niero, G., Bortolaia, V., Vanni, M., Intorre, L., Guardabassi, L., & Piccirillo, A. (2018). High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. *Veterinary Microbiology*, **216**: 93–98.

Nguyen Van, J.C., Kitzis, M.D. et al. (2006). Détection de la colonisation nasale de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : étude prospective comparant l'amplification génique temps réel vs les milieux chromogènes sélectifs. *Pathologie Biologie*, **285**: 285-292

Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., and Timinouni, M. (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **42**: 20-29.

Nseir, S., Blazejewski, C., Lubret, R., Wallet, F., Courcol, R., Durocher, A. (2011). Risk of acquiring multidrug-resistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. *Clinical Microbiology and Infection* **17**(8):1201–8.

Nabti, L.Z. (2020). Sensibilité aux antibiotiques et aux huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* Desf. des souches d'*Escherichia coli* isolées d'infection urinaire au CHU de Sétif. Thèse de doctorat en biologie végétale. Algérie. Université de Ferhat Abbas Setif 1

Nostro, A., Marino, A., Ginestra, G., Cellini, L., Di Giulio, M., Bisignano, G. (2017). Effects of adaptation to carvacrol on *Staphylococcus aureus* in the planktonic and biofilm phases. *Biofouling*, **33**: 470–48

Niku-Paavola, M. L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, **86** (1):29-35

Oussou, K.R., Youlou, S., Kanko, C., Tue Bi, B., Kanko, C., Boti, J.B., Ahibo, C. & Casanova, J. (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Research*, **1**: 50-59.

Opatowski, M. (2020). Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du système national des données de santé. Thèse de doctorat en santé public et épidémiologie. Université Paris-Saclay. France

Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Review*, **18**: 657-86.

Piard, J.C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J., et Desmazeaud, M.J., (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **44**: 143- 1

Pujuguet, P. (2008). Entre capitelles et lavognes découvrez la flore de la garrigue, Sentier Botanique Vignerons, Bourg-Saint-Andéol Ardèche

Prat, R. (2007). Expérimentation en biologie et physiologie végétale. 300 manipulations; édition QUAE. Herman éditeurs, Paris. 56p

Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (1999). Microbiology. 4th ed. New York:WCB/McGraw-Hill

Podolak ,P.K.,Zayas ,J.F.,Kastner, C.L et fung, D.Y.C.(1996).Inhibition of *Listeria Monocytogenese* and *Escherichia coli* O175:H7 on beef by application of organic acid.*journal of food protection* ,**59**:370-373

Peskin, A.V., Winterbourn CC., (2000). A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinical and Chemical Activity*,**293** :157–166.

Ploy, M.C., Denis, F.(2007). Analyse cyto-bactériologique des pus. In : Denis F,Ploy MC, Martin C, et al., editors. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson . p. 165–70.

Ploy ,M.C., et Denis, F. (2007). Analyse cyto-bactériologique des pus. In : Denis F., PloyMartin, M.C.C., Bingen ,E. et Quentin, R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed ElsevierMasson.Paris. P : 165-169.

Plainvert , C. , lavigne, J.P . (2016).infection cutanées .Bactériologie médicale .Technique usuelles . Ed ElsevierMasson.Paris. P : 183-191.

Poirel , L. (2006). Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelles perspectives. XVIIe Congrès nationale de la SFHH-Nantes. P 25.

Pourriat , J.L., Martin ,C.(2005).Principes de réanimation chirurgicale.- 2ème édition. Arnette groupe liaisons Ed. Rueil-Malmaison, 1437p

Rice, L.D., Sahn, D. Bonomo, R.A.(2003). Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In:Murray, P.R. (Ed.), Manual of Clinical Microbiology, 1, eighth ed. ASM Press, Washington, p. 1074

Rhayour,K. (2002).*Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Esherichia coli, Bacillus subtilis et sur Mycobacterium phleiet , Mycobacterium fortuitum* . Thèse de doctorat, University de Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 170p. <http://toubkal.imist.ma/handle/123456789/999>

Rombi , M., Robert ,D.(2007) « 120 plantes médicinales ». Ed., Alpe 09, avenue Albert II Mc- 98000 MONACO.225-227

Rodriguez, K. E, Martinez,M.I, Horn,N. and Dodd.H.M.(2003). "Heterologous production of bacteriocins by Lactic Acid Bacteria." *International Journal of Food Microbiology* ,**80**:101-116

Ross, R.P., Morgan, S et Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* .**79**: 3-16

Singh, S.B., Barrett. J.F .(2006).Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochemistry and Pharmacology* , **71**: 1006-1015

Saga, T., Yamaguchi, K. (2009). History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Medical Association Journal*,**52**: 103–108.

Shahabi ,N .,Moradi ,M,Forogh .M, Tajik .H.(2017). Physical, antimicrobial and antibiofilm properties of Zataria multiflora Boiss essential oil nanoemulsion. *International journal of food and technology* ,**52** (7)1645-1652

Sell, C.(2010). Chemistry of Essential Oils. Handbook of Essential Oils: *Science, Technology, and Applications*. Hüsnü C. B. K. et Gerhard B. New york: USA, Taylor& Francis: 121–150

Serio, A., Chiarini, M., Tettamanti,E., and Paparella,A.(2010). Electronic paramagnetic resonance investigation of the activity of *Origanum vulgare* L. essential oil on the *Listeria monocytogenes* membrane. *Letters in Applied Microbiology*,**51**(2):149–57. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02877.x

Sharma, A., Gupta S., Sarethy IP., Dang S., Gabrani R., (2012). Green tea extract: Possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food chemistry*, 135: 672–675.

Sneddon, J., Masuram, S., & Richert, J. C. (2007). Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Basic Principles, Instrumentation and Selected Applications for Detection of Organic Compounds. *Analytical Letters*,**40**(6):1003–1012.

Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G. Johnson, C.B.(1999). A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (*Labiatae*).*Phytochemistry*,**52**: 649–657.

Sylvain ,S. (2010). *Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats*. Thèse de doctorat. France.Université de Corse. p222

Sardans , J., Roda, F. et Penuelas , J. (2005) . Effects of water and a nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. *Environmental Experimental Botany*,**53**:1 -11

Skaria, B.P. (2007).« Aromatic plants ». *New India publishing*.New Delhi . 88-95.

Sattary, M., Amini, J., Hallaj, R., (2020). Antifungal activity of the lemongrass and clove oil encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against wheat's take-all disease. *Pesticide Biochemistry and Physiology* .170:104-696. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104696>

Sékou Koné ,M. (2009). *Bilan de sept (7) ans d'hémoculture en milieu hospitalier pédiatrique de Bamako*. Thèse doctorat en médecine . Université de Bamako. Mali .2-19-20-21-23-26-62-74-75-Santé Publique France. Enquête nationale de prevalence (ENP) des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017. 2019.

Srinivasan,S., Sheela.,D et al.(2006). Risk factors and associate problems in the management of infections with Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Medical Microbiology*. **24** (3):182-185. www.ijmm.org

Schmidt, E. (2010). Production of essential oils. Handbook of Essential Oils: *Science, Technology, and Applications*. Can Başer K. H. et Buchbauer G. Florida, CRC Press: 83–119.

Silva, G.C., Filho, J.G.O.,Ribeiro, M.M.M., De Souza, C.W.O., Ferreira, M.D. (2022).Antibacterial Activity of Nanoemulsions Based on Essential Oils Compounds Against Species of *Xanthomonas* that Cause Citrus Canker. *Biointerface Research in Applied Chemistry*,**12**:1835–1846

Salminen, S., Wright ,A. V., Ouwehand ,A. (2004). Lactic acid bacteria microbiological and functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., U.S.A.

Torodov ,S.D., et Dick ,L.M.(2005).Optimization of bacteriocins ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD isolated from spoiled black olives . *journal of Microbiology*,**43** (4):370-4

Toubes ,E., Singh K., Yin, D., Lyu, R., Glick , N., Rissel ,L.,Mohapatra , S., Saghain.,Weistein,A., Trenholme, G. (2003).Risk factors for antibiotic-resistant infection and treatment outcomes among hospitalized patients transferred from long-term care facilities: does antimicrobial choice make a difference? *Clinical Infectious Diseases*,**36**: 724-730

Taleb, M.H.,Abdeltawab, N.F.,Shamma, R.N., Abdelgayed, S.S.,Mohamed, S.S.,Farag, M.A.,Ramadan, M.A. (2018).*Origanum vulgare* L. Essential Oil as a Potential Anti-Acne Topical Nanoemulsion—In Vitro and In Vivo Study. *Molecules* ,**23**: 21-64.

Tahiri, I. (2007). *Isolement, caractérisation et étude de la divergicine M35, pour la bioconservation des produits marins prêts à consommer*, Thèse doctorat en sciences etTechnologie des aliments.Université Laval

Touhami ,A.(2017). *Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres Thymus récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement* . Thèse de doctorat en chimie organique .Universite Badji Mokhtar Annaba. 173p.Algerie.

Tajkarimi , M.M., Ibrahim ,S.A., Cliver , D.O.(2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*,**21**: 1199-1218

Tagg, J. R., and A. R. McGiven. (1971a). Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* 21(5): 943

Tani, Z. B. A. K. et Arlet, G .(2014).Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, **62**(3): 169-178.

Velasco ,J., Dobarganes ,C., Marquez-Ruiz, G. (2003). Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Grasas Aceites* ,**54**:304–14

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P. Kersters, K et Swings, J .(1996). Polyphasic taxonom, a concensus approach to bacterial systematics. *Microbiology Review*, **60**: 407-438.

Van Den Dool, H.,Kratz ,P.D.(1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of .Chromatography*,**11**:463-471

Varon ,E, Janoir .C, Gutmann.L .(2007) .CNRP .Rapport d'activité 2008 .Centre national de référence des pneumocoques .laboratoire de microbiologie .Paris

Vora, S.,Auckenthaler , R. (2009).Que signifie « bêta-lactamases à spectre élargi » en pratique ? *Revu Médical Suisse*, **5**: 1991-1994

Veyssiere,A.(2020).*La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019* .Thèse de doctorat en pharmacie .Université de Bordeaux.France

Venema, K., M.H.R. Dost, P.A.H. Beun, A.J. Haandrikman, G. Venema, et J. Kok. (1996). The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of *Lactococcus Zactis* IL1403. *Applied Environmental Microbiology*, **62**: 1689-1692

Walsh, C. (2003).Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, D.C., ASM Press

Wang , Y., Hong , X., Liu,J., Zhu,J., and Chen,J .(2020). Interactions between fish isolates *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* in dual-species biofilms and sensitivity to carvacrol. *Food Microbiology*. **91**:103-506. doi: 10.1016/j.fm.2020.103506

- Wilson ,A.R.,Sigeo ,D., et Hepton ,H.A.S.(2005).** Anti-abcterial activity of *lactobacillus pantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenesis* due to lactic acid production .*journal of Applied Microbiology* ,**99**:1516 -1522
- Willey, J.M, and Van Der Donk.W.A.(2007).** "Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function." *Annual Review of Microbiology*, **61** : 477–
- Wijesundara, N.M., Rupasinghe, H.P.V. (2018).**Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Pathogenesis* ,**117**:118–127.
- Xavier,B.(2010).**Infections nosocomiales en gériatrie. CHU Besançon, France. Disponible sur :<http://www.chu-besancon.fr/geriatrie/courspdf/infnosogeriatriexb.pdf>
- Yang, R., M. C. Johnson and B. Ray (1992),** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*,**58**, 10, 3355-9.
- Yen ,T.B., Chang ,S.T.(2008).** Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol agaist wood decay fungi. *Bioresource of Technology*, **99**: 232-236
- Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, O. F., Bilaloglu, V. 2000.** Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* l.), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48(10)**, 5030–5034.
- Yamashita ,S.K., Louie ,M., Simor ,A.E., Rachlis,A.(2000).** Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. *Canadian Journal of Infectious Diseases* ,**11**:107-11
- Yang ,Z.,Staff, M.,Huttunen ,E., Widmalm ,G.,(2000).**Structure of viscous exopolysaccharide produced by *lactobacillus helveticus* K12.*Carbohydrate Research*,**329**:465-469
- Zahar,R et al.(2010).** “Duration of Colonisation by *Enterobacteriaceae* Producing Extended-spectrum B-lactamase and Risk Factors for Persistent Faecal Carriage,” *Journal of Hospital Infection* ,**75(1)**:76–78
- Zacharof, M.P, and R.W, Lovittb. (2012).**"Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria." *Review Article APCBEE Procedia*, **2**: 50-56
- Zalan, Z, A Barath, and A Halasz.(2005).** "Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains." *Food Technology and Biotechnology* ,**43** :219-225
- Zhong, Y., Shahidi, F. (2015).** Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Journal of Functional Foods*. ed., Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing, pp. 287–333.
- Zerkani,H.,Kharchoufa,H., Tagnaout,I., Fakchich,J.,Bouhrim,, Amalich,S.,Addi,M .,Hano,C .,Cruz-Martins,N .,Bouharrouad ,R.,Zair,T.(2022).** Chemical Composition and Bioinsecticidal Effects of *Thymus zygis* L., *Salvia officinalis* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. Essential Oils on Medfly *Ceratitis capitata* and Tomato Leaf Miner *Tuta absoluta*. *Plants*, **11(22)**: 3084.<https://doi.org/10.3390/plants11223084>
- Zohoun , A.,Bajjou ,T., Sekhsokh,. Y et al. (2010).**Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des bactéries Multirésistantes isolées d’infections urinaires à l’Hôpital Militaire d’Instruction Mohammed V de Rabat. **270** : 412-413 .

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., and Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* ,**59**:282–9. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.05.