

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة أبي بكر بلقايد- تلمسان

Université Aboubakr Belkaïd- Tlemcen –
Faculté de SNV-STU



MEMOIRE

En vue del'obtention du diplôme de MASTER

En : Sciences biologiques

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Par : **CHERIGUI Samira**

BENDAHMANE Amina

Sujet

Sensibilité des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolé à partir des infections hospitalières aux huiles essentielles extraites de quelques plantes de l'Ouest algérien.

Soutenu publiquement, le 17 / 10 / 20 , devant le jury composé de :

Président	Mr. SENOUCI BEREKSI Mohamed	Maitre de conférences B	U. de Tlemcen.
Examinatrice	Mm. BELLIFA Samia	Maitre de conférences B	U. de Tlemcen.
Encadreur	Mr. KHADIR Abdelmounaim	Maitre de conférences A	U. d'Oran.

Dédicace

*Je tiens à dédier ce modeste travail à : **Mon cher papa « Nousserdine »** école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des travaux et à mis à ma disposition tous les moyens nécessaire pour que je réussisse, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

Ma chère maman « Zahra »

Qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Soyez fière de moi aujourd'hui et voyez à travers ce travail mon amour sincère et ma Gratitude profonde que dieu vous gardes et protèges pour moi inchalah
À ma grande mère pour l'affection et le soutien tout au long de mes travaux, toujours présente. Que dieu la garde pour moi.

A mes chers frères « Hocine, Lahcen, Toufik, Hamza et Younes »

*À mes chère sœurs ; **Ahlem** et son mari **Rafik, Chaima** et ma petite nièce **Rania** pour leur amour, soutien et appui inestimable.*

*A toute ma famille **CHERIGUI et BENMEZROUA** : oncles, tantes, cousins et cousines, petits et grands*

*A mes chères copines intimes « **Fatiha, Nihel, Ammara, Chahrazed, Fatima, Meriem, Kheira, Yousra, Sabrina** ». Pour les moments de joie partagés en leur compagnie, leur gentillesse et tous les sentiments qu'ils me témoignent et leur présence.*

*A mes collègues **Amine et Abdesslam**.*

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*A mon binôme « **Amina Bendahmane** » qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail*

A tous ceux qui m'aiment, a tous ceux que j'aime.

Samira

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents :

Pour vos mains qui ont tant travaillé

Pour votre sourire qui m'a tant motiver

Pour votre cœur qui m'a tant donner

Pour vos sacrifices et vos encouragements

Pour vous qui m'avait tant aimé

Mon marie Ibrahim :

Pour ton amour, ton encouragement, ton aide pour que ce travail ce soit...

Mon petit-fils : Bilal qui ma donner plus d'espoir dans la vie

*Mes adorables sœurs : Djamila, khadra, Malika, Aicha, soumia et leurs enfants :
Imade, Zeyneb, Romaissa, Younes, Inès, Manel, Imane,Alaa, Sara, Younes et Tasnime
et enfin Rodina.*

Pour leurs supports et leurs motivations

Pour leurs sourires pleins d'espoirs

Mes chers frères : Lachen et Hocine, Mohammed, Omar

Pour leurs aides et encouragements

Ma belle-mère : Aicha et toute la famille ...

*Mon binôme : **CHERIGUI Samira** et toute sa famille*

Pour votre aide et votre travail

Pour votre coopération et votre patience

Mes copines : Bouziane Karima, Merabetsoumia et Asma

Pour les souvenir inoubliables avec vous

*Tous mes amies, mes collègues et tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce
mémoire de près ou de loin...*

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à monsieur **KhadirAbdelmounaim**, maitre- de conférences à l'université Oran 1 Ahmed Ben Bella pour m'avoir fait confiance et accepté de m'encadrer, de m'avoir encouragé, orienté et conseillé, Je le remercie sa disponibilité et sa patience. Je le remercie vivement pour le choix du sujet, Pour son soutien et sa grande générosité, tout le long de mon travail, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.*

*J'adresse mes sincères remerciements à monsieur **SENOUCI BEREKSI Mohamad**, Maitre de conférences Bâl'université AboubekrBelkaïd (MCB) de Tlemcen (laboratoire des produits naturels) d'avoir accepté de présider le jury.*

*J'exprime vifs remerciements à madame **Bellifa Samia** à l'université AboubekrBelkaïd pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.*

*Nos respects et Nos sincères remerciements à monsieur **Azzi Rachid**, madame **BekhechiChahrazed**, madame **Malek Fadila**, monsieur **Baba Ali**, monsieur **Benaouda**, monsieurs : **Cherif Abdessamed**, **Bensaim Azzedine** et monsieur **Hocine**.*

*Nous remercions chaleureusement tout le personnel du laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement « LAMAABE » pour leur aide et surtout les doctorants **Benzyane Yassine**, **Asma**, **Karima** et **Nes Fatima**.*

À tous mes amis.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Samira et Amina.

Liste des Figures :

Figure.1 : Aspect des colonies de <i>K. pneumoniae</i> sur milieu gélosé.	6
Figure.2 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>K.pneumoniae</i>	8
Figure.3 : Mécanisme d'action des antibiotiques	10
Figure.4 : Observation en microscopie électronique à balayage de Biofilm	12
Figure.5 : Biofilm de 4h à <i>Klebsiellapneumoniae</i> (souche clinique) formé sur lamelle de Thermanox, en condition statique.	13
Figure.6 : Développement et structure d'un biofilm bactérie.	14
Figure 7 : images de la plante <i>Ammoidesverticillata</i> (Flora.biologiasur.org 2020 17h.30)	19
Figure 08 : Image <i>Ammoides verticillata</i> (myrtea.formation.com2020/17h.30)	20
Figure 09 : l'arbre d'eucalyptus (www.biolib.de 2020 /7h :17min)	
Figure10 : :feuillesd'<i>Eucalyptusglobulus</i>(myrtea.formation.com 2020/7h.30min)	
Figure 11 : Structure de l'unité isoprénique(Creté, 1965)	16
Figure 12 : Schéma explicatif de l'hydrodistillation	17
Figure 13 : châssis d'enfleurage(passionprovence.org 2020/20h.30)	35
Figure 14 : Enfleurage des pétales des roses(passionprovence.org 2020/20h.30)	35
Figure 16 : la partie aérienne d'Ajowan. (flora.biologiasur.org)	42
Figure 17 : L'appareil d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation « Clevenger »	44
Figure.18 : Aspect microscopique de coloration de gram : <i>K.pneumoniae</i> (Photo ORIGINALE)	46
Figure.19 : Standardisation des suspensions bactériennes (DO = 0.1-0.08)	47
Figure.20 : le dépôt des disques d'antibiotiques	48
Figure 21 : Antibiogramme de <i>K.pneumoniae</i>	49
Figure.22 : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de pétri (Boukhatemet <i>al.</i>, 2014)	49

Figure 23 : Résultats d'antibiogramme d'une souche <i>Klebsiellapneumonia</i>	51
Figure.24 : Le test TSI (milieu triple sucres).	65
Figure.25 : Test citrate de Simmons.	65
Figure.26 : test Mannitol mobilité	65
Figure.27.28.29.30 : Dilution de la suspension inoculum au 1 /100 ($\approx 10^6$ UFC/ ml) dans de l'eau physiologique	66
Figure. 31.32.33 : matériels utilisés pour l'aromatogramme	67
Figure. 34.35.36 : Procédure de l'aromatogramme	68

Liste des Tableaux :

Tableau.1 : classification de <i>K. pneumoniae</i> selon Bergy.	4
Tableau.2 : Caractères biochimiques de <i>K. pneumoniae</i>	7
Tableau.3 : la classification d'<i>Ammoidesverticillata</i> selon Quezelet, 1963	18
Tableau.4 : la classification d'<i>Ammoidesverticillata</i> selon Dobignard-Chatelain	18
Tableau.7 : Classification botanique d'<i>eucalyptus</i> selon Guinard, 2001	38
Tableau.8 : Critères microscopiques de <i>K. pneumoniae</i>	52
Tableau.9 : Taux de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux ATB	52
Tableau.10 : Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions d'<i>A. verticillata</i>.	53
Tableau.11 : Test d'ONPG	65

Liste des abréviations :

ADH	Arginine dihydrolase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATB	Antibiotique
ATCC	AmericanTypeCulture Collection
BHIB	brain-heartinfusionbroth
BLSE	Bêta- lactamase à spectre Elargi ou Etendu
C3G	Céphalosporinede 3èmegeneration
CA-SFM	Comitéd'antibiogramme- société française de microbiologie
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CIP	Ciprofloxacine
CIT	Citrate
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DHA	Dharhanhospital
DO	Densité optique
EDTA	Ethylenediamintetraaceticacid
H₂S	sulfure d'hydrogène
I	Intermédiaire
IMP	Imipénème
IND	Indole
INO	Inositol
<i>Kp.</i>	Klebsiellapneumoniae
LDC	Lysine décarboxylase
LPS	lipo-polysaccharide
M H	Mueller –Hinton
ODC	Ornithine
OnpG	Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside
R	Résistance naturelle

S	Sensible
Subsp	Sous espèce
TDA	Tryptophane désaminase
TSI	Triple Sugar Ion
UFC	Unité Formant colonie

Résumé :

Notre travail porte sur l'étude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoidesverticillata*(NOUNKHA) de la famille des ombellifères très utilisée dans l'ouest Algérien pour des fins culinaires et thérapeutiques.

Pour répondre à cet objectif, une extraction de l'huile essentielle des fleurs et feuilles d'*Ammoidesverticillata* a été réalisée par la méthode d'hydrodistillation de type Clevenger. L'activité antibactérienne a été déterminée sur une souche bactérienne de référence (*klebsiellapneumoniae*ATCC) et une souche d'origine clinique selon la technique de l'aromatogramme par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Les résultats obtenus indiquent que l'HE d'*A.verticillata* a une moyenne activité antibactérienne. Il induit des diamètres d'inhibition allant de 10 et 11 mm pour le test sur les souches bactérienne de *K.pneumoniae*. L'*Ammoidesverticillata* est considérée comme étant une alternative de traitement aux antibiotiques et peuvent être utilisées comme un bon traitement pour lutter contre les bactéries multi-résistantes.

Mots clé : *Klebsiellapneumoniae*- *Ammoidesverticillata*- huiles essentielles - activité antibactérienne- résistance.

هذا العمل يهدف الى تقييم تاثير الزيوت الأساسية لاوراق و ازهار نبات النونخة على السلالات المرجعية و السلالات من اصل السريري لبكتيريا الكلابسيلا اظهر تاثير الزيوت الأساسية لنبات النونخة النشاط المثبط للبكتيريا كلابسيلا بنومونيا السالبة الغرام و الظاهر في نتائج اختبار بطريقة النشر على الاجار. من خلال النتائج المحصل عليها نستنتج ان مستخلصات الزيوت الأساسية لنبات النونخة لها تاثير مثبت ملحوظ و مهم على بكتيريا كلابسيلا بنومونيا .

الكلمات المفتاحية

كلابسيلا بنومونيا _ الزيوت الأساسية _ نبات النونخة

Abstract :

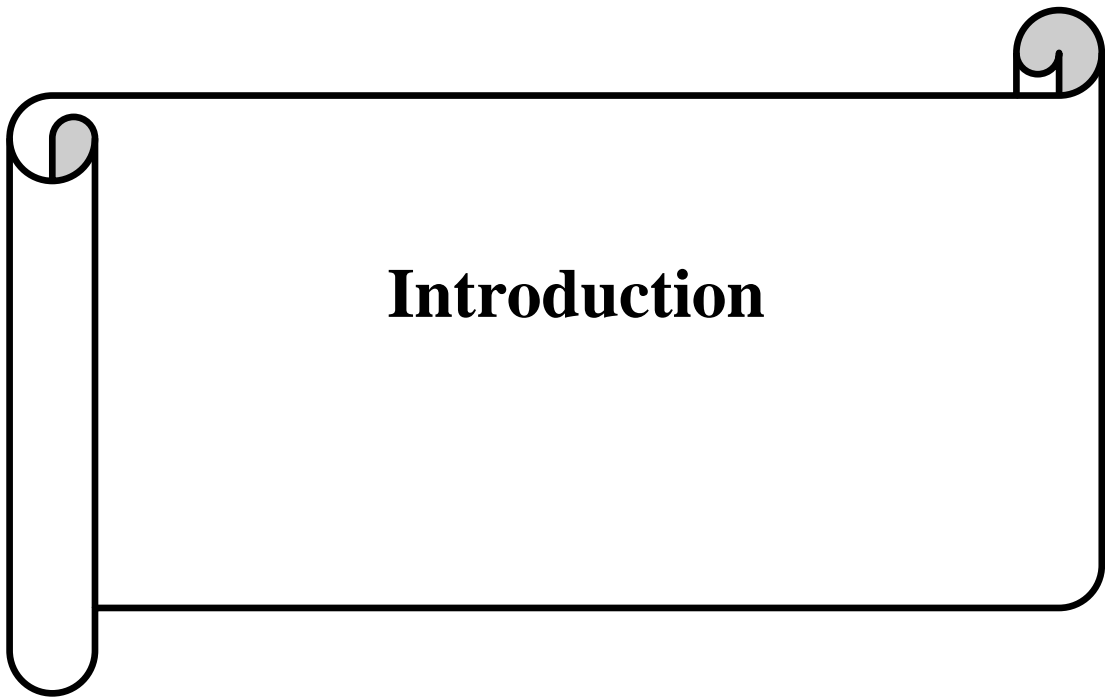
Our work focuses on the antimicrobial effect of *Ammoides verticillata* Essential Oil (NOUNKHA) of the family of the Obelliferae, widely used in western Algeria for culinary and therapeutic purposes.

To meet this objective, an extraction of essential oil from flowers and leaves of *Ammoides verticillata* was carried out by the Clevenger hydrodistillation method.

Antibacterial activity was determined on a reference bacterial strain (*klebsiella pneumoniae ATCC*) and a clinical strain based on the aromatogram technique by the diffusion method on agar medium.

The results indicate that *A. verticillata* HE has medium antibacterial activity. It induces inhibition diameters ranging from 10 to 11 mm for the *K. pneumoniae* bacterial strain tested. *Ammoides verticillata* is considered an alternative treatment to antibiotics and can be used as a good treatment to fight against multi-resistant bacteria.

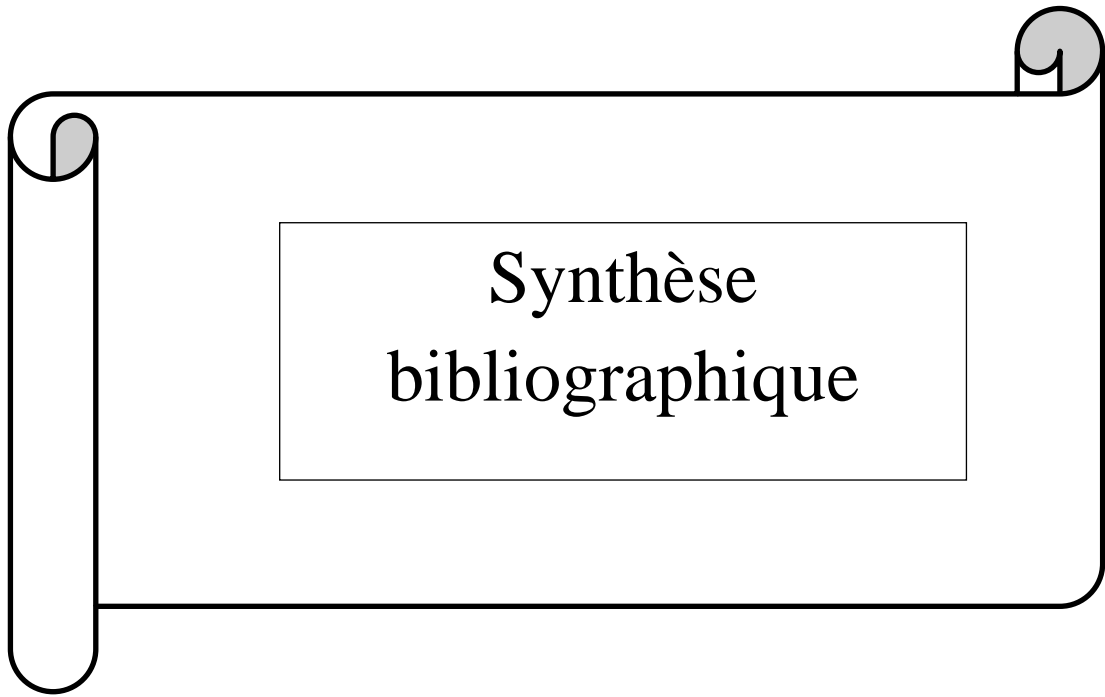
Key words: *Klebsiella pneumoniae* - *Ammoides verticillata* - essential oils — antibacterial activity



Introduction

L'adaptation des bactéries à l'environnement est un phénomène qui caractérise ces êtres vivants et qui les protège contre la disparition malgré qu'elle soit entourée d'agents antibactérien de différentes natures, cette adaptation est due principalement à la plasticité du génome et ça capacité à acquérir de nouveau gènes par plusieurs moyens à savoir la conjugaison, les intégrons, les transposons, les bactériophages etc... de ce fait les bactéries sont toujours présente de dépits des traitements utilisés pour les faire disparaître et causant ainsi différent infections au être humais. Les infections respiratoires sont parmi les infections considérées comme dangereuse du faite que la rapidité de transmissions et les dégâts causés sur les malades, telle que les infections nécrosante fatale. Parmi les bactéries responsable de ces infections, l'espèce *Klebsiellapneumoniae* qui ne cesse de causer des infections graves dans les structures de soin et dans la communauté tel que les pneumonies nécrosante mortelle, ces infections affecte souvent le système respiratoire et autres, et sont accompagnée par des résistances accrues aux antibiotiques les plus actifs. La recherche de nouveaux remèdes à ces infections semble indispensable et urgente. Le traitement avec les plantes médicinale naturelle semble un modèle de traitement connue depuis l'antiquité et ne présente pas de danger si il est bien maitrisé en connaissant les extrais utilisé, leurs composition chimiques et leurs activité biologique. Les plantes médicinale en l'occurrence les plantes aromatique et médicinales PAM sont considéré comme une source prometteuse en molécules antibactérienne du faite de la diversité chimique présente dans le monde végétale et aussi puisque une grande partie de ces molécules sont méconnue et reste à découvrir.

Plusieurs plantes sont connues depuis très longtemps pour leur aptitude à traiter les infections du système respiratoire. Dans ce travail nous allons tester l'effet des huiles essentielles issues *d'Ammodendron verticillata* sur des souches de *Klebsiellapneumoniae* d'origine hospitalière et le comparer avec l'effet des antibiotiques utilisé pour traiter les infections causé par ce germe.



Synthèse
bibliographique

I- Généralités sur *K. pneumoniae* :

I-1- Découverte :

Le genre *Klebsiella* été nommé par Trévisan en 1887 pour honorer le microbiologiste Allemand du 19^{ème} siècle Klebs Edwin (**Brisse et al., 2006**). Cet espèce type est dénommé pneumobacille de Friendlander qui avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient qui a décédé d'une pneumonie donc Friendlander l'a décrit comme agent de pneumonies mortelles pendant la période 1882-1884 (**Duca et al., 1979**).

I-2- Classification :

Selon la classification de la 2^{ème} édition de Bergy's manuel *K.pneumoniae*(**George et al.,2004**), elle appartient au :

Domaine : *Bacteria*

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma Proteabacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Klebsiella*

Espèce : *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella* (Klebsielles) comporte cinq espèces dont l'espèce type est *Klebsiella pneumoniae* (**Bergogne et al.,1995**).

L'espèce *K.pneumoniae* est subdivisée en 3 sous espèces :

- *K. pneumoniae subsp pneumoniae*, - *K. pneumoniae subsp zaenae* et - *K. pneumoniae subsp Rhinoscleromatis*(**Avril et al.,2000**).

I-3- Habitat :

K. pneumoniae est une entérobactérie, responsable des infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies), des infections intestinales et urinaires. Elle a un effet cytotoxique sur les épithéliums des voies aériennes et peut être responsable de pneumonies nosocomiales (**Bachiri et al., 2017**).

Les *K. pneumoniae* sont des bactéries très répandues dans la nature (l'eau, le sol, les végétaux, la flore fécale des animaux) (**Baerwolf et al., 2002**). Elle est également retrouvée dans la flore fécale d'environ 30% de l'homme et des animaux, elle existe à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment des voies respiratoires (**Babley et al., 1978 ; Dong et al., 2003; El-Fertas-Aissani et al., 2012**).

I-4- Caractères bactériologiques :

I-4-1- Caractères morphologiques :

Les bactéries appartenant à l'espèce *K. pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif, de 0.3 à 1.0 µm de diamètre et de 0.6 à 6 µm de longueur (**Abbot., 2010 ; Srinivasan et al., 2012; Kumar et al., 2013**) Immobiles, diplobacilles généralement capsulées, non sporulées, anaérobies facultatifs (**El-FertasAissani et al., 2012**).

I-4-2- Caractères culturels :

Sur les milieux classiques d'isolement pour les entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac'Conkey), les colonies de *K. pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont lactose positive, bombées, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (**Freney et Bollet., 2000**).

Après 24 heures d'incubation à 37°C sur des milieux non sélectifs et des milieux sélectifs lactosés pour *K. pneumoniae* et après 48 heures pour *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* les colonies sont rondes, grandes de 3 à 4 mm de diamètres et d'aspect muqueuse (Figure.1) à cause de la présence de capsule (**Joly et Reynaud., 2002**).

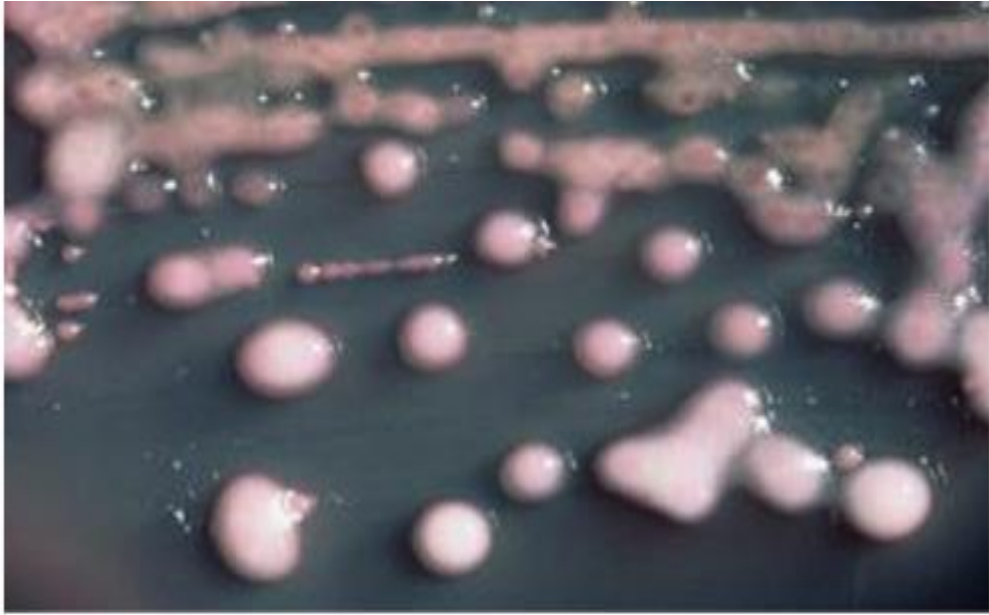


Figure.1 : Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu gélosé (Gueye O., 2007).

I-4-3- Caractères biochimiques :

K. pneumoniae est une bactérie aéro-anaérobie facultative, elle présente les caractères généraux des entérobactéries, en fermentant le glucose avec production de gaz, elle est caractérisée comme suite;oxydase négative, catalase positive et possède une nitrate-réductase.

- Les caractères biochimiques sont illustrés dans le **Tableau.1**:

Tableau.1 : Caractères biochimiques de *K.pneumoniae* (Joly et Reynaud., 2002).

Caractères biochimiques :	<i>Klebsiellapneumoniae</i> :
Fermentation des sucres : glucose	+
Métabolisme du tryptophane en indole : Indole	-
ONPG. KCN	+
H ₂ S	-
VP	+
RM	-
TDA	-
Citrate de Simmons	+
LDC	+
ODC	-
ADH	-
Mobilité	-
Production de gaz	+
Lipase, Dnase	-

I-5- Pathogénicité de *K. pneumoniae* :

On peut dire facteur de pathogénicité ou facteur de virulence, mais certains auteurs ont considéré que le terme pathogénicité est la capacité de la bactérie à causer une maladie alors que le terme de la virulence signifie la mesure ou le degré de pathogénicité (Podschn and Ullmann., 1998).

K. pneumoniae est à la fois une bactérie commensale de l'organisme et un pathogène responsable d'infections variées. Elle caractérise naturellement le tube digestif, les voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux. *K. pneumoniae* se trouve dans l'eau, les sols, et la poussière.(Podschn and Ullmann., 1998).

Parmi les infections dues aux *K. pneumoniae*, on peut citer l'infection respiratoires communautaires survenant surtout chez les sujets fragilisés celles des personnes âgées, diabétiques, les alcooliques et même pour les malades hospitalières qui portent des infections opportunistes. **(Boukadida et al., 2002)**.

K. pneumoniae est un agent classique et majeur d'infections nosocomiales en général et néonatales particulièrement **(Boukadida et al., 2002)**.

Elle est l'une des principales espèces bactériennes impliquées dans les infections urinaires (IU) **(Ben Haj Khalifa et al., 2010 ; Struve et al., 2012)**.

Elle fait partie du groupe KES (Klebsiella, Enterobacter, Serratia) qui est d'une grande importance en clinique hospitalière **(Nedjai., 2011)**.

II- Les antibiotiques :

II-1- Définition :

Le terme « Antibiotique » est créé en 1942 par Waksman pour faire référence à tous les dérivés produits par le métabolisme des micro-organismes qui possèdent une activité antimicrobienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte (**Bryskier., 2015**).

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

- Les ATB extraits de la fermentation des moisissures ou bien d'autres genres bactériens.
- Les agents antibactériens de synthèse.

Aujourd'hui, les ATB synthétiques sont une minorité, ils sont classés principalement selon (**Singh and Barrett., 2006**) en 03 classes lesquels sont : les sulfamides, les quinolones (ou bien fluoroquinolones) et les oxazolidinones.

Au cours de ces dix dernières années, seuls quelques ATB ont pu être mis sur le marché (**Guinoiseau., 2011**).

II-4- Résistance naturelle et acquise aux ATB :

L'efficacité de l'antibiotique dépend d'au moins trois facteurs : la quantité d'antibiotique au contact de la cible, l'affinité de l'antibiotique pour la cible et la production d'enzymes inactivant l'antibiotique. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle, et donc présents chez toutes les souches de l'espèce, soit d'une résistance acquise par certaines souches, suite à l'apparition de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de matériel génétique tels que des plasmides, des transposons ou des intégrons. (**CASFM., 1997**).

On peut distinguer deux types de résistances aux antibiotiques soit une résistance naturelle ou bien acquise.

II-5- Résistance de *K. pneumoniae* aux ATBs :

L'émergence de *K. pneumoniae* multirésistante a posé des problèmes importants dans la gestion et le traitement de l'infection par ces bactéries.

D'après (**Piperakia et al, 2017**) ; la *K. pneumoniae* est naturellement multirésistante à certaines ATB celle des ampicillines à la carbénicilline et à la ticarcilline.

Elle est connue par sa propriété à collecter des plasmides de résistance en raison de la production d'une pénicillinase chromosomique.

Depuis 1980 ; *K. pneumoniae* est devenue l'espèce de référence pour les plasmides codant pour les B-lactamase à spectre étendu conférant la résistance aux céphalosporines à spectre étendu. (**Piperakia et al., 2017**).

III- Le biofilm bactérien :

III-1- Historique et définition :

Le terme biofilm a été utilisé pour la première fois par C.E. Zobell en 1943. L'existence des biofilms était connue, notamment dans les écosystèmes naturels puis par ses applications, comme par exemple dans l'épuration des effluents.

Un biofilm désigne le développement des micro-organismes au contact d'une surface dans un environnement donnée. Il y'a 03 éléments sont nécessaires à la formation d'un biofilm qui sont : la surface, le micro-organisme et l'environnement : une communauté microbienne fixée à un support et enveloppée dans une matrice organique « un état physiologique »(Alain et al.,2007).

D'une part les microbiologistes (Alain et al., 2007), ont décrit le biofilm par l'ensemble des micro-organismes, soit de la même espèce, soit d'espèces différentes qui vivent en symbiose et forment une communauté. C'est l'ensemble des cellules isolées et de micro-organismes de cellules filles associées entre elles et/ou aux surfaces. Cet ensemble est contenue dans une matrice constituée d'exopolysaccharides bactériens de matière organique et non organiques ; ainsi que des macromolécules piégées du milieu environnant. La figure suivante représente une observation microscopique d'un biofilm.

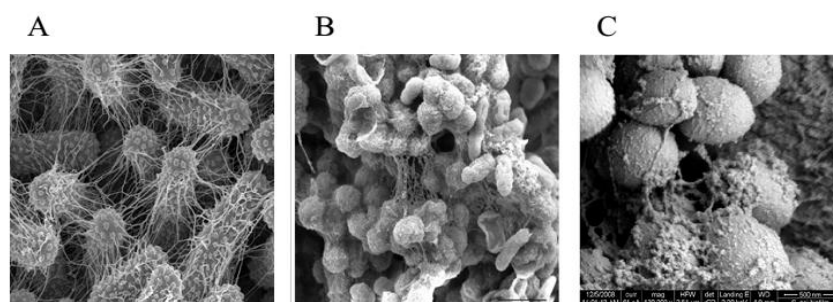


Figure.2 : Observation en microscopie électronique à balayage de Biofilm.

A : Biofilm de 48h à *K. Pneumoniae* formé sur lamelle de Thermanox, en microfermenteur.

D'après (Belestrino et al., 2008). B : Biofilm de 72h a *Salmonella entéritidis*formé a l'interface air-liquide. D'après (Lasa.,2006). C : Biofilm de 48h a *Staphylococcus epidermidis*formé dans un système CDC biofilm reactor. D'après (Williams et Bloebaum., 2010).

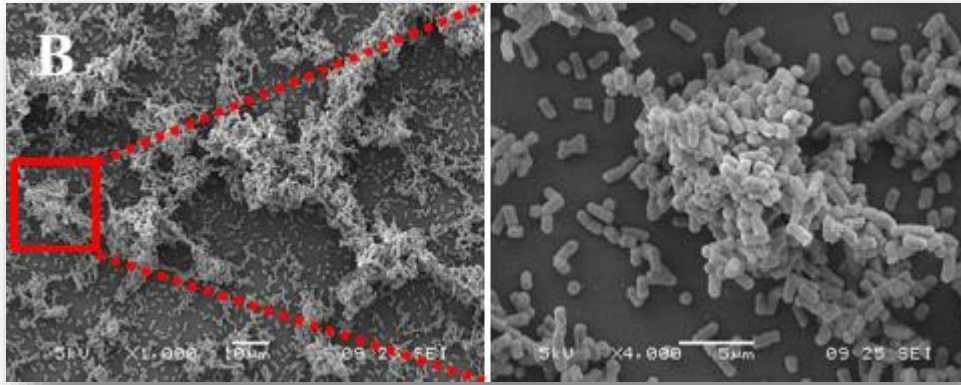


Figure.3 : Biofilm de 4h à *K. pneumoniae*(souche clinique) formé sur lamelle de Thermanox, en condition statique. Données non publiés. D’après (Jones et III-2-

III-2- Localisation :

Un biofilm est présent dans un milieu aqueux ou exposé à l’humidité, il peut se développer sur tous les supports exposés, même occasionnellement, a de l’eau et des nutritifs.

Un biofilm peut se développer sur n’importe quel type de surface soit **naturelle** ou **artificielle**, **minérale** celle (des roches, interface air-liquide). **Organique** : (racines, feuilles des plantes et le tube digestif des animaux). (Chalvet de Rochemonteix., 2009).

III-3- Les étapes de formation d’un biofilm :

Après les phases d’adhérence réversible puis irréversible, la bactérie forme une microcolonie qui produit une matrice extracellulaire (en jaune) et qui peut accueillir d’autres espèces microbiennes par accréation. Le biofilm mature est le site de gradients inverses en nutriments (flèche bleue) et en déchets (flèche rouge) définissant des niches physiques et chimiques. Il peut se disperser et libérer des bactéries mobiles (dispersion active) ou des agrégats bactériens entourés de matrice (dispersion passive). Une photographie de microscopie électronique d’un biofilm d’E. Coli développé in vivo sur cathéter est présentée en insert.(Lebeaux et Ghigo.,2012)

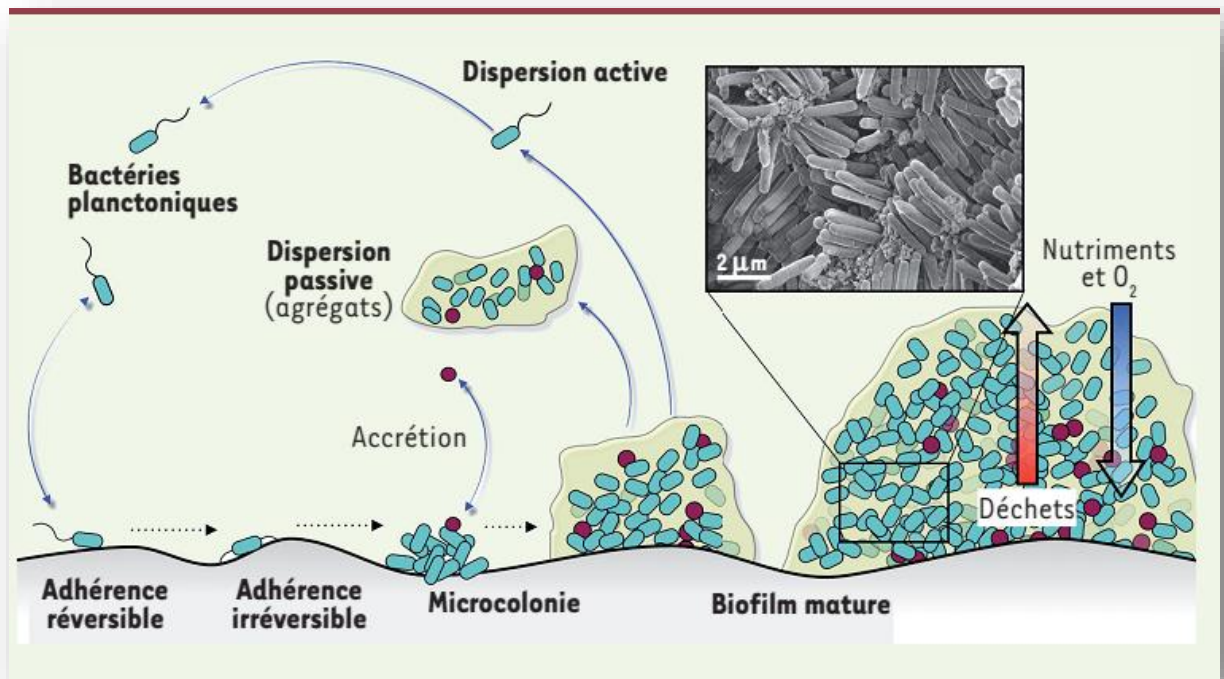


Figure.4 : Développement et structure d'un biofilm bactérie. (Lebeaux et Ghigo., 2012)

III-4- La lutte contre les biofilms :

L'un des facteurs qui facilitent la survie des bactéries pathogènes soit sur une surface (environnement) ou bien chez leurs hôtes, est la formation de biofilm. C'est à cause des caractéristiques des bactéries formant le biofilm et quelles diffèrent à celle des bactéries planctoniques, de nouveaux outils et de nouvelles démarches pour la prévention, le traitement et le diagnostic de ces bactéries pathogènes sont requis (Ceri., 2010).

L'effet des biofilms en santé animale et en santé publique est indiscutable.

Le développement de la prochaine génération d'agents antimicrobiens devra tenir compte de la synergie possible entre deux antibiotiques, ou entre un antibiotique et une autre molécule (ex. biocide, ion métallique, enzyme, agent tensioactif ou un inhibiteur du *quorum sensing*) afin d'accroître leur efficacité envers les biofilms (Ceri., 2010). Pour ce faire, il faudra également développer des essais standardisés permettant

d'évaluer ces synergies potentielles. De même, l'efficacité des biocides/désinfectants devra être évaluée contre des bactéries d'un biofilm et non plus uniquement contre des cellules planctoniques. Considérant son impact sur la santé animale et la santé publique, la persistance de gènes de résistance aux antibiotiques à l'intérieur des biofilms est un autre aspect important qui ne peut être négligé. De plus, les bactéries ne forment que très rarement des biofilms composés d'une seule espèce bactérienne. Certaines bactéries peuvent aussi s'incorporer à des biofilms existants. **(Yannik et al.,2014).**

En résumé, il nous faut effectuer des recherches en vue de développer des stratégies pour la prévention et le traitement des infections chez l'homme et l'animal en tenant compte des caractéristiques du biofilm. Des recherches sont également requises afin de développer des procédures de désinfection permettant d'éliminer les biofilms à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation, car ces biofilms représentent des réservoirs potentiels d'agents infectieux. **(Yannik et al.,2014).**

I-Généralités sur les plantes aromatiques médicinales :

Les plantes médicinales –aromatiques (PAM) sont connues sous le nom des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, **(Fransworth et al.,1986)**.

Un grand nombre de plantes (environ 35000 espèces) sont utilisées dans le monde pour des objectifs médicaux, ce qui montre qu'il y'a une large biodiversité utilisée par l'être humain.

I-1-L'aromathérapie :

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE extraites des plantes au but de traiter certaines maladies.

En 1928, un pharmacien français René Maurice a créé le nom aromathérapie il a défini ce terme par l'utilisation des aromates des plantes aromatiques dont ont extrait les huiles essentielles .ces huiles essentielles sont des essences volatiles utilisées pour le traitement de certaines maladies , **(Verbek.,2006)**.

Actuellement , de nos jours , beaucoup de publications scientifiques utilisent les huiles essentielles et leurs composés pour tester leurs effets in vitro .**(Lima et al., 1993 ; violon et al.,1993 , violon et chaumont.,1994)**

Utilisés surtout en médecine dentaire qui utilise la listerine : une solution constituée de l'huile essentielle des plantes (thymol et eucalyptol) utilisée pour le lavage de la cavité orale des dents car elle possède une activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et la plaque dentaire**(violon et chaumont.,1994)**.

I-2-La phytothérapie anti-infectieuse :

I-2-1-phytothérapie :

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement «soigner avec les plantes». La phytothérapie ou bien «la thérapie par les plantes» est demandée de façon incroyable, les gens font confiance aveugle à cette médecine sans prise compte de danger de ces plantes et herbes sur leur santé (*Gahbich., 2009 ; Sebai et Boudali., 2012*).

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales (*A. Chevallier., 2001*). Beaucoup de remèdes phytothérapeutiques sont nés des observations, de l'inspiration et de l'expérience des guérisseurs, devenus des personnages révéérés dans toutes les tribus et chez tous les peuples (*Bermness, Larousse 2005*).

De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques. C'est pour cela on voit que la phytothérapie qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle offre aussi de multiples avantages malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne. L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend des plantes leurs effets en fonction de leurs principes actifs (*Chevallier., 2001*).

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants naturellement présents dans cette plante ; ils lui confèrent son activité thérapeutique. Il se peut que des principes actifs se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais de manière inégale. Et tous les principes actifs d'une même plante n'ont pas les mêmes propriétés (ex :l'oranger : ses fleurs sont sédatives et son écorce est apéritive) (*Sebai et Boudali., 2012*).

I-2-2- La médecine conventionnelle et phytothérapie :

Ainsi que l'initiative de l'OMS, les médecines conventionnelles et traditionnelles pouvaient fonctionner parallèlement en revenant expériences que se précèdent, malgré que leurs rapports sont relativement complexes.

La médecine moderne prenne conscience qu'il existe un complément ou une alternative aux antibiotiques pour une antibiothérapie de masse plus en plus défailante.

Actuellement beaucoup de médecins généralistes boudent ces traitements alternatifs quoique ce soit plus le rôle des aromathérapeutes de les prescrire.

Des études sérieuses qui ont été trouvé des résultats suffisamment évocateurs pour combattre certaines bactéries pathogènes et aussi virulentes. Aussi si on parle de facteur économique on dit que les huiles essentielles ne sont pas prises en charge par la sécurité sociale. C'est un débat qui doit être évolué mais le travail sera long. Néanmoins, il y'a certains unités hospitalières qui font appelle à la diffusion des huiles essentielles riches en alcool et en oxydes terpéniques pour des problèmes instrumentales. Donc, l'ouverture d'esprit semble se profile, et ça sera beaucoup trop longue à se mettre en place. Mais l'espoir viendra grâce aux chercheurs et des médecins passionnés pour cette discipline (Nathali., 2006).

I-2-3- Les plantes médicinales utilisées pour traiter les infections respiratoires en Algérie :

L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires (Dobignard et Chatelain., 2010-2013). Cependant, la flore médicinale algérienne reste méconnue jusqu'à nos jours, car sur les quelques milliers d'espèces végétales, seules 146 sont dénombrées comme médicinales (Baba Aissa., 1999). L'étude de la médecine traditionnelle et du traitement par les plantes est donc particulièrement

intéressante car peu de travaux de recherche ont concerné cet aspect, et plus particulièrement l'utilisation des espèces spontanées en médecine traditionnelle.

II- Présentation de la plante *Ammoidesverticillata* :

II-1-description de la plante :

L'Ammoidesverticillata est une plante qui appartient à la famille des apiacae (apiacées) qui est très abondante et comprend 300 espèces et 55 genres en Algérie. Parmi cette large diversification on a *l'Ammoidesverticillata*.

En Algérie, elle est connue sous le nom **Nunkha** issu de la déformation du nom perse (**Nankhah**) d'origine d'utilisation en **Iran** comme un aromate dans le pain (**Baytopet et situlpinar.,1986**)

L'Ammoidesverticillata a une saveur aromatique forte et piquante avec une odeur agréable très diffusible et intense, elle est persistante même après la dessiccation. À cause de leur odeur forte, les graines de cette plante sont utilisées dans les préparations culinaires.



Figure 5: images de la plante *Ammoidesverticillata* (**Flora.biologiasur.org**)

II-2- Description botanique :

II-2-a- Caractères botaniques :

Ammoides verticillata appartient à la famille des ombellifères caractérisé par un cycle dynamique tardif , et se présente généralement au début du mois de Mai et s' étale jusqu'au mois de juillet .C'est une plante spontanée ,annuelle, a souches filiformes et à tiges ramifiées de(10-40cm)de long ,avec des feuilles basales à nombreux segments multiples verticillés et les feuilles supérieurs sont pénatifides à segments linéaires **(quezel et santa.,1961) .**

L'inflorescence de cette plante est ombelliforme à fleurs blanches. Les fruits sont scarbres papilleux, ovides qui renforme six bandelettes par méricarpe (généralement 1mm de long). **(quezel et santa.,1961)**



Figure 6: Image *Ammoides verticillata*(DocPlayer.fr)

II-3-Systématique :

En **1963**, **Quezeletsanta** ont mis la clé de détermination botanique de la plante *Ammoidesverticillata* selon la classification dans le Tableau suivant :

Tableau 2 : la classification d'*Ammoidesverticillata*(**Quezelet santa.,1963**)

Embranchement	Phanérogames ou spermaphytes
Sous embranchement	Angiospèrmes
Classe	Edicots
Sous classe	Astéridés
Ordre	Apiales
Famille	Apiacée
Genre	<i>Ammoides Adanson</i> ou (<i>ptychotis koch</i>)
Espèce	<i>Ammoidesverticillata</i>

Cette systématique a été modifiée au niveau de l'espèce par **DobignardChatelain., 2011** comme elle est représenté dans ce Tableau suivant :

Tableau 3 : la classification d'*Ammoidesverticillata* (**DobignardChatelain.,2011**)

Embranchement	Trachéophytes
Sous embranchements	Spèrmatophytes
Classe	Magnoliopside
Sous classe	Astèridées
Ordre	Apiales
Famille	ApiaceaesLindl
Genre	<i>AmmoidesAdans</i>
Espèce	<i>Ammoidespusilla (Brot) Breister</i>

II-4- Moment de la récolte :

Le choix de la période de la cueillette dépend du rythme naturel de la vie végétale et varie selon les espèces et aussi selon la partie de la plante à récolter. Il est toujours préférable de procéder à la récolte par un temps sec et chaud. Ainsi le matin est le moment le plus favorable mais on peut faire la cueillette le soir avant la fraîcheur. (Valnet., 2001)

II-5-Le séchage :

L'idéale est de faire sécher les plantes dans un endroit sec, vaste et bien ventilé .L'étape de séchage a pour but d'enlever l'eau (=déshydrater) des plantes pour assurer une bonne conservation et pour favoriser l'inhibition de toutes activités enzymatiques afin d'éviter la dégradation de certains bactéries.Les plantes cueillies entières, comme les branches de laurier ou de lavande, (les branches d'arbustes), peuvent être suspendues au plafond en bouquets. Les racines doivent être bien lavées de leur terre et séchées dans un four chauffé à 50 °C ou sur un radiateur bien chaud. (Anonyme., 2018) .

II-6-Conservation et stockage :

Toutes plantes médicinales ont des propriétés pharmacologiques qui dépend de la région de leurs production, la période ou moment de la récolte ,les techniques de cueillette et les modalités de conservation .Afin de garantir la qualité des produits il faut connaitre et respecter ces conditions et alors protéger la source de production .Généralement les plantes médicinales sont conservées dans un endroit chaud et sec pour éviter la détérioration et la dégradation enzymatique des composés organiques .

Les racines, rhizomes, tubercules et bulbes se récoltent à l'automne pour les plantes annuelles ou au printemps pour les autres. (Anonyme., 2018).

II-7-Enquete thérapeutique et utilisations médicinales de l'*Ammoidesverticillata* :

D'après (**Sijelmassi., 1991**), l'*Ammoidesverticillata* possède des qualités précieuses et jouit d'une grande faveur populaire locale .Cette espèce est connue par ces qualités thérapeutiques depuis les plus anciens dans la médecine populaire locale.

Elle est utilisée comme une plante rafraichissante,antispasmodique pour les spasmogastro-intestinaux,et aussi comme antiseptique. D'autres chercheurs comme avancent que la plante *Ammoidesverticillata* est conseillé contre la grippe et l'hypertension ainsi que le diabète.

IV- L'eucalyptus Globulus :

IV-1- Définition :

Les eucalyptus sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur. Ce sont originaires d'Australie .L'eucalyptus fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen.Ils ont une capacité exceptionnelle d'absorption d'eau (**Rabiai., 2014**)

L'eucalyptus élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria à partir de ce point vient le nom « d'arbre à la fièvre » ou « Australien Fever tree»(**Bergamini.,1964**)



Figure 7: l'arbre d'eucalyptus (www.biolib.de 2020 /7h :17min)



Figure.8 :feuilles d'*Eucalyptus globulus*(myrtea.formation.com 2020/7h.30min)

IV-2-Description botanique de la plante :

L'eucalyptus globulusest une espèce de la famille des Myrtaceae . C'est une famille de plantes dicotylédones (Deux cotylédons sur l'embryon). Ils sont réparties en environ trois milles espèces devisées en 134 genres.

L'eucalyptus globulus possède des feuilles persistantes ouvertes de glandes à huile qui représentent une des principales caractéristiques de ce genre.

Sur les jeunes arbres, les feuilles bleutées ont une curieuse caractéristique, ils sont opposées, sessiles, ovales et glauques, et sur l'arbre grandissent elles deviennent alternes et très allongées.

Les fleurs sont variées avec de nombreuses étamines de plusieurs couleurs : Blanches, crème, jaunes, roses ou bien rouges. Chez l'eucalyptus les fruits prennent la forme d'un cône de couleur brune à l'état de maturité. (Serventy., 1968), (Quezel et santa., 1963)

IV-3-Classification dans la systématique botanique :

selon la classification scientifique faite par Angiospèresphylogénygroupe (APG) l'eucalyptus est classé comme suit : (Rabiai., 2014)

Tableau 04 : Classification botanique d'eucalyptus(Rabiai., 2014)

Règne	Végétale
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotes
Sous classe	Rosidés
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	Eucalyptus
Espèce	<i>Eucalyptus globulus</i>

Ainsi l'eucalyptus globulus a plusieurs synonymes comme : le gommier bleu, *Eucalyptus globulus*, Arbre fièvre, Eucalyptus officinal. En Algérie il est connu

sous le nom de Calitous ou Kafour c'est le nom vernaculaire le plus populaire dans plusieurs regions.(**guinard.,2001**)

IV-4-Les propriétés thérapeutiques médicinales de l'eucalyptus :

-C'est un fébrifuge à cause de son effet rafraichissant indésirable sur la température du corps.

-C'est un anti-infectieux vis-à-vis des bactéries et virus et facilite la dissolution et l'élimination des glaires bronchiques (plasmiques, fluidifiants, expectorant).

-C'est un antiseptique liée à la présence du cineole(**Baba Aissa.,1999**)

L'eucalyptus est utilisé comme un antiseptique pour les voies urinaires et comme un antirhumatisme dans certaines cas .on peut dire que cette plante est excellent et un très précieux antibiotique naturel, bien qu'il est utilisé dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques pour ces propriétés bénéfiques pour la voie respiratoire. (**Candy.,1997**)

IV-5- L'huile essentielle de la plante *Eucalyptus globulus* ;

Les huiles essentielles ont des effets très importantes sur la santé humaine,comme tous les essences , l'HE de l'*eucalyptus* à garder sa position dans le domaine médicinale ,pour son efficacité contre les affections respiratoires et les préparations pharmaceutiques .(**Bigendako.,2004**)

IV-6-usages thérapeutiques de l'huile essentielle de l'eucalyptus ;

Il existe deux voies pour l'usage de l'HE d'*Eucalyptus* :interne et externe.

III- 6 –a- La voie interne :

Principalement dans les cas des inflammations et infections respiratoires (Bronchites, sinusite, rhum.... etc.) pour réaliser le traitement il y'a deux méthodes :

➤ Inhalation ;

Cette méthode consiste à respirer la vapeur d'eau plus quelques gouttes de l'HE d'*Eucalyptus* dans un bol pendant 15 min.

- Infusion ; on prenant 150ml d'eau bouillante et en ajoute 2à3 feuilles de l'*eucalyptus*, puis boire deux fois par jour.(**Bey-Ould-Si-Said., 2014**).

IV -6-b-La voie externe :

Dans ce qui concerne la friction et massage de la peau car elle pénètre à l'intérieur des tissus et irriguent le sang .aussi pour l'hygiène buccale rince bouche ou bain de bouche comme la listérine

Cette HE est utilisée pour combattre les douleurs rhumatismales les mal de tête et la mal de gorge.

IV-7-Composition chimique :

Se compose de différents composés chimiques comme les oxydes terpéniques : cinéolesmonoterpenes, limonènes, gamma terpineneparacymeneetc. Les composés majoritaires sont le 1,8 cineole, camphène, a-pinène, globulol, b-pinène, p-cymene, myrcene, g-terpinene, a-terpineol et le limonène (**Pereira et al., 2004 ; Song et al., 2009**). Un travail portugaise a révélé la présence de 33 composés dans les huiles essentielles du fruit ; dont les monoterpenes (50,4%), les sesquiterpènes (49,6%).

(**Pereira et al., 2004**).

IV-Les huiles essentielles :

IV-1-Historique :

Les produits aromatiques font partie de la médecine et de la pharmacie depuis l'antiquité et via le monde arabe puis ont été introduits en Europe. Les huiles essentielles sont décrits depuis un siècle environ.

Sur le plan chimique : les HE sont très complexes et souvent coûteuses et sujettes à diverses falsifications, très actives mais potentiellement toxiques (**Agenot.,2014**).

IV-2-Définition des huiles essentielles :

Une huile essentielle est un liquide odoriférant caractérisé par un aspect fluide à épais de couleur variable selon les plantes dont elle est extraite. Cette huile essentielle est sécrétée par des cellules spécialisées qui se trouvent au moins dans une partie de la plante (fleurs : la lavande, le bois : cèdre Atlas, les racines : gingembre et les graines : carotte).

Les HE sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques qui se trouvent dans différentes parties des plantes. Les HE sont volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur. (**Hammoudi.,2008**).

Une huile essentielle ne renferme pas du tout de gras, malgré ce que l'on pourrait croire.

Selon les études faites par (**Geyser et al.,2008**) la répartition des huiles essentielles peuvent être réparties dans divers organes fleurs (origan), feuilles, écorces, le bois (bois des roses), fruits ou graines.

Selon la monographie de la Pharmacopée européenne, la matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, à l'exception des fruits du genre Citrus qui sont toujours traités à l'état frais. Les huiles essentielles peuvent subir un traitement ultérieur approprié. Elles peuvent être commercialement dénommées comme étant déterpénée, désesquiterpénée, rectifiée ou privée de « x ». - Une huile essentielle

déterpénée est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures monoterpéniques.

- Une huile essentielle déterpénée et désesquiterpénée est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques.

- Une huile essentielle rectifiée est une huile essentielle qui a subi une distillation fractionnée dans le but de supprimer certains constituants ou d'en modifier la teneur.

- Une huile essentielle privée de « x » est une huile essentielle qui a subi une séparation partielle ou complète d'un ou plusieurs constituants. Pour être de qualité optimale, une huile essentielle doit être 100% naturelle (c'est-à-dire non dénaturée par des molécules de synthèse chimique), 100% pure (c'est-à-dire non mélangée avec d'autres huiles essentielles ayant des caractéristiques proches) et 100% intégrale (c'est-à-dire que le distillateur aura recueilli la totalité des molécules contenues dans la matière végétale distillée).**(Dgeyser et al.,2008)**

IV-3-Variabilité des huiles essentielles :

Le mode d'obtention (distillation ,expression ,et extraction)n'est pas le seul responsable de la variabilité de la composition d'une essence .Il y'a aussi l'influence du cycle végétatif tant au long du développement et les facteurs environnementaux (biotope ,les pratiques agricoles).Le climat (humidité ,durée d'ensoleillement ,le vent ...) ,l'altitude , la composition du sol ,et peut être aussi l'heur de récolte .

L'influence est plus marquée lorsque l'HE est stocké en surface (c.à.d. les poils sécréteurs des lamiacées).

Lorsque les variations sont constantes au sein d'une même espèce on spécifie :

-soit le chémotype (chimiotype =CT)

- Soit l'origine géographique **(Agenot ,2014)**

IV-4-Activités pharmacologiques :

Les huiles essentielles sont des extraits naturels des plantes possédant avec une efficacité extraordinaire utilisées dans plusieurs domaines : la santé par exemple le renforcement des défenses du système immunitaire le soulagement des douleurs articulaires...etc(**Abegaz et al,1993**). Ainsi les essences ont des activités anti-inflammatoires et anti-analgésiques importantes et très remarquables (**Abegaz et al.,1993**).

IV-5-Toxicité des huiles essentielles :

Comme tous les produits naturels : " ce n'est pas parce que c'est naturel c'est sans danger pour l'organisme " avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie, l'aspect toxique des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation. Ainsi, à cause de leur pouvoir irritant, allergène ou phototoxique (présence de furocoumarine), (**naganuma et al.,1985**) et il y a certaines qui ont un effet neurotoxique à cause des cétones (alpha-tujone)

IV-6-Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants appartenant, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : - Le groupe des terpénoïdes (les plus fréquents) ; - Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (moins fréquents).

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences et des dérivés du phénylpropane, retrouvés en tant que composé majoritaire dans quelques-unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc.... Divers autres constituants minoritaires leur sont associés. Les composés terpéniques sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonées (C₅) ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (isoprène) (**Ganou., 1993**)

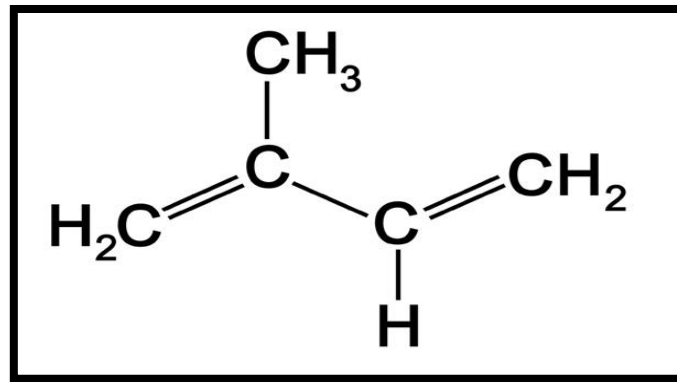


Figure.9 : Structure de l'unité isoprénique (Creté., 1965)

VI-7-Contrôle de qualité des huiles essentielles :

Le respect de l'ensemble de critères de qualités garantira l'authenticité des huiles essentielles ,leur efficacité, thérapeutique et réduira le risque de toxicité .Une stratégie applicable à toutes les huiles essentielles par la pharmacopie Européenne des HE permettant de bien définir l'HE et de vérifier son identification et sa pureté :L'analyse chromatographique ,densité ,pouvoir rotatoire, indice de réfraction ,et les recherches de diluants ou de classification(Agenot.,2014).

V-Techniques d'extraction des huiles essentielles :

Au bous du 3eme siecle,dans le sud du France, au royaume des parfums, l'exploration des méthodes d'extraction des huiles essentielles volatiles a commencée et ils sont développées par plusieurs procédés visant à améliorer la qualité des extraits et pour mieux connaitre leurs constituants et leurs rendement. (France-Ida.,1996)

V-1-La distillation :

En 2004,Bendjilali a définit la distillation comme étant la séparation des constituants qui se composent au moins de deux ou plusieurs constituants par le passage vers l'état gazeux soit par ou sans recyclage. L'extraction se fait en deux étapes :

-La diffusion de l'HE à l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal.

-L'évaporation et entraînement à la vapeur d'eau.

Le principe de la distillation repose sur la volatilisation des HE qui seront entrainés à la vapeur d'eau, puis en passe à la condensation et à la fin l'HE se sépare du distillat par décantation. **(Bendjilali.,2004)**

V-1-1-Entraînement à la vapeur d'eau :

La deuxième méthode à base de distillation c'est l'entraînement des constituants volatiles du matériel végétal à la vapeur d'eau par le même principe mais qui diffère par le degré de contacts entre l'eau et le matériel végétal **(Bendjilali.,2004)**. cette méthode apporte une amélioration à la qualité des HE en minimisant les altérations hydrolytiques **(Hadjji et al., 1985)**.

V-1-2-L'hydrodistillation :

L'hydrodistillation c'est le contact direct avec de l'eau, cette méthode consiste à immerger le matériel végétal directement dans un alambic et remplir par l'eau, puis porté à ébullition. La séparation de l'HE se fait par différence de densité des vapeurs hétérogènes qui seront condensées sur la surface froide **(Bruneton.,1999)**.

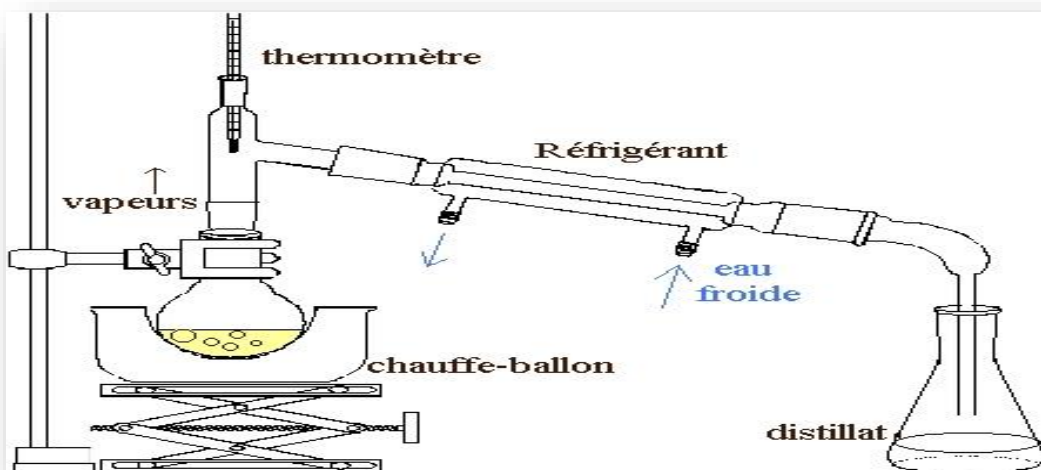


Figure 10: schéma explicatif de l'hydrodistillation.

V-1-3-Distillation par solvants organiques :

Le principe de cette méthode consiste à faire une macération de la plante dans un solvant pour faire passer les substances odorantes dans le solvant et elle est utilisée pour les huiles essentielles qui ont une densité voisine ou proche à l'eau.(**Beliveau et al.,1985**)

V-2-Distillation assisté par microondes ou ultrasons :

Consiste utiliser un volume moindre de solvant et un temps de chauffage réduit pour éviter la dégradation des composés volatiles thermosensibles .L'avantage de cette méthode par rapport aux techniques classiques c'est le rendement élevé.(**Kimbaris et al.,2006**)

V-3-L'enfleurage :

C'est une technique basée sur une forte affinité des molécules odorantes pour les références comme par exemple les oranges, les fleurs(violettes ,tubéreuses,Jmasine...etc).

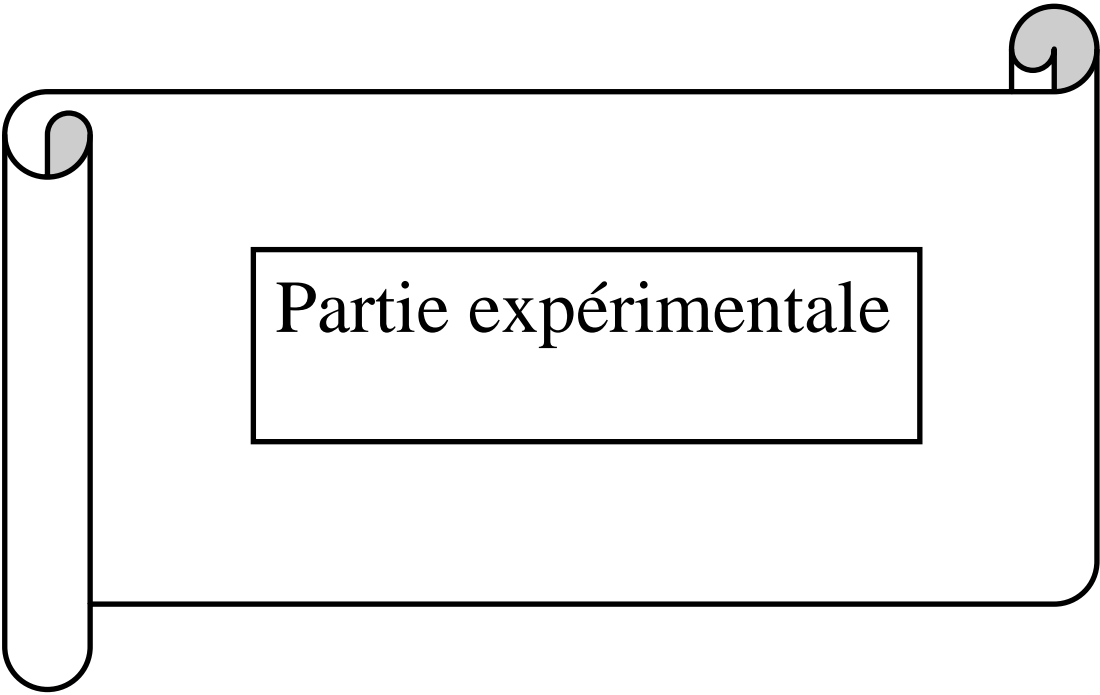
Les fleurs sont étalées d'une façon délicate sur les plaques en verre enduites d'une couche mince de graisse et l'on superpose sur des châssis en bois. Les substances volatiles seront diffusées et absorbée par la couche de graisse(**Paré.,1992**).

V-4-Expression ou pression à froid :

Spécifique pour les HE des agrumes comme le citron, l'orange ...etc, et elle consiste à briser mécaniquement, les poches à essence au niveau de l'écorce ou péricarpe du fruit pour obtenir le contenue (**willem.,2004**).

V-5-Incision :

se fait en fondre l'écorce des arbres pour recueillir le suc. Ex : caoutchouc de l'arbre de l'hévéa.(**Finar.,1994**)



Partie expérimentale

Notre travail expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire : Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement-LAMAABE- de l'Université Abou-Bekr-Bekaid-Tlemcen entre février et mars 2020.

1. Matériels :

1.1. Matériels végétal :

Dans notre travail nous avons utilisé les parties aériennes d'*Ammoidesverticillata* qui ont subi des extractions pour l'obtention de l'huile essentielle. La récolte de la plante a été faite en Juin 2014. L'identification botanique a été faite en constituant un herbier et le déposant dans notre laboratoire et en consultant des botanistes du laboratoire Écologie de Gestion des Écosystèmes Naturels.



Figure 11: la partie aérienne d'Ajowan. (flora.biologiasur.org)

1.2. Matériels biologiques :

1.2.1. Souches :

Dans le présent travail nous avons étudié deux souches de *K. pneumoniae*, nous avons pu isoler une seule souche de *K. pneumoniae* à partir du service de Microbiologie du CHU de Tlemcen alors que la deuxième est une souche de référence ATCC 70603.

2. Méthodes :

2.1. Mode Obtention des huiles essentielles :

Une quantité de plante (fleurs et tige) sèche est introduite dans un ballon de 2 litres contenant une quantité suffisante d'eau placé au-dessus d'une source de chaleur pendant 3h. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Ce procédé utilise l'appareil de type « Clevenger » qui est la technique la plus couramment utilisée à l'échelle des laboratoires d'extraction d'huiles essentielles. La conservation de l'HE s'est faite à 4 °C (Khadiret *al.*, 2013).



Figure 12: L'appareil d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation
« Clevenger »

2.2. Préparation de la suspension microbienne (l'inoculum), Repiquage et Conservation des souches :

▪ Revivification des souches :

La revivification des souches a été faite par l'ensemencement de 5 ml de bouillon nutritif à partir des souches bactériennes conservées.

Ces souches sont incubées à une température de 37°C pendant 24h, cette étape contribue à l'enrichissement et la revivification des souches.

▪ Repiquage :

Les souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries sur gélose Mac'Conkey pour l'isolement des bactéries à gram négatif grâce à l'action de deux inhibiteurs présents dans le milieu. Le cristal violet pour l'inhibition de la flore gram positif, et les sels biliaires pour la sélection des Entérobactéries. Ce milieu ensemencé est incubé à 37°C pendant 24 heures.

▪ Conservation des souches

La conservation des souches a été faite par la méthode suivante :

- A partir des jeunes cultures (18-24h) sur bouillon nutritif, on a ensemencé des tubes inclinés (5-6ml) à l'aide de pipette pasteur puis incubé 24h à 37°C. Après l'incubation, on ajoute 3 ml de BHIB contenant 15% de glycérol (est un cryoprotecteur qui empêche l'éclatement des cellules pendant la conservation) dans chaque tube après une agitation au vortex, on la déposé 2 ml dans un tube eppendorf dans le congélateur à une température de (-4°C).

2.3. Tests de confirmation des souches

Les souches bactériennes utilisées : *K. pneumoniae* sont des souches déjà identifiées et référencées. Nous avons vérifié leur pureté par quelques test incluant :

2.3.1. Examen macroscopique

Il permet d'observer la taille, la forme, la couleur et l'aspect des colonies.

2.3.2. Examen microscopique

➤ Etat frais

Cette technique permet d'observer les bactéries à l'état vivant pour examiner leur morphologie et leur mobilité.

➤ Coloration de gram :

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes :

➤ Technique :

- Déposer une goutte de l'eau distillée sur une lame puis pris une colonie de Kp et la mettre sur la lame.
- Ensuite, appliquer la coloration par l'ordre suivant :
- Mettre quelques gouttes de Violet de gentiane sur la lame pour 30 secs puis rincer.
- Alcool : 15 secs suivis d'un rinçage.
- Fushine : 30 secs suivis d'un rinçage et d'un séchage (**Denis et al., 2011**).

2.3.3. Identification biochimique :

✓ Test mannitol mobilité :

Utilisé pour tester la mobilité des bactéries. **Figure 15**

✓ Teste citrate de Simmons :

Utilisé pour voire si la bactérie peut dégrader le Carbone .**Figure 16**

✓ Teste TSI :

C'est un teste d'identification pour les entérobactéries qui permet de voire si la bactérie est capable de réduire le sulfate.**Figure 17**

✚ L'antibiogramme

L'antibiogramme est l'interprétation de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique en terme d'efficacité clinique. Il permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi -quantitatives (sensible, intermédiaire ou résistante).La technique utilisée est la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton (BioRad) et interprété après mesure des diamètres d'inhibition en accord

avec les recommandations du comité d'antibiogramme de la Société française de microbiologie CA-SFM 2012.

➤ **Technique:**

✓ **Préparation de l'inoculum :**

Ensemencer 5 ml de bouillon BHIB avec 2 à 3 colonies de la souche à tester et incuber 3 à 5 H sous agitations à 37 ± 1 ° C. La culture doit être de 108 UFC/ ml soit de densité optique-la densité doit être entre 0.08 et 0.1.



Figures 13: Standardisation des suspensions bactériennes (DO = 0.1-0.08)

➤ **Ensemencement :**

- Diluer la suspension inoculum au 1/100 ($\approx 10^6$ UFC/ ml) dans de l'eau physiologique ;
- Homogénéiser au vortex;
- Ensemencer la suspension inoculum
- Par inondation les boîtes de Pétri coulées par 20ml de gélose Muller -Hinton;
- 45
- Rejeter l'excès puis sécher les boîtes de Pétri 20 à 30mn à l'étuve.
- Application des disques :
- Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile;

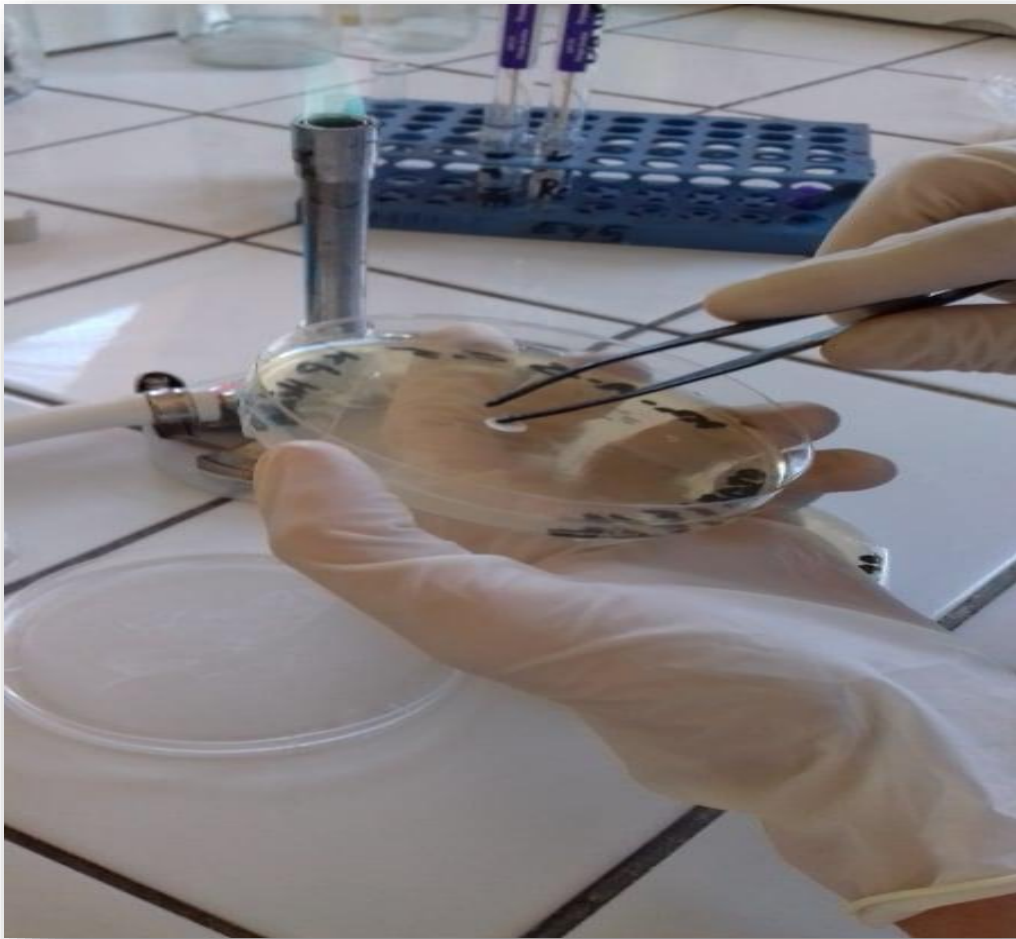


Figure14: le dépôt des disques d'antibiotiques

➤ **Lecture :**

Après 18 à 24 heures d'incubation, mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition, et comparer ces résultats aux valeurs critiques Figure dans l'annexe; Classifier les bactéries dans l'une des catégories :Sensible, Intermédiaire ou Résistance ;

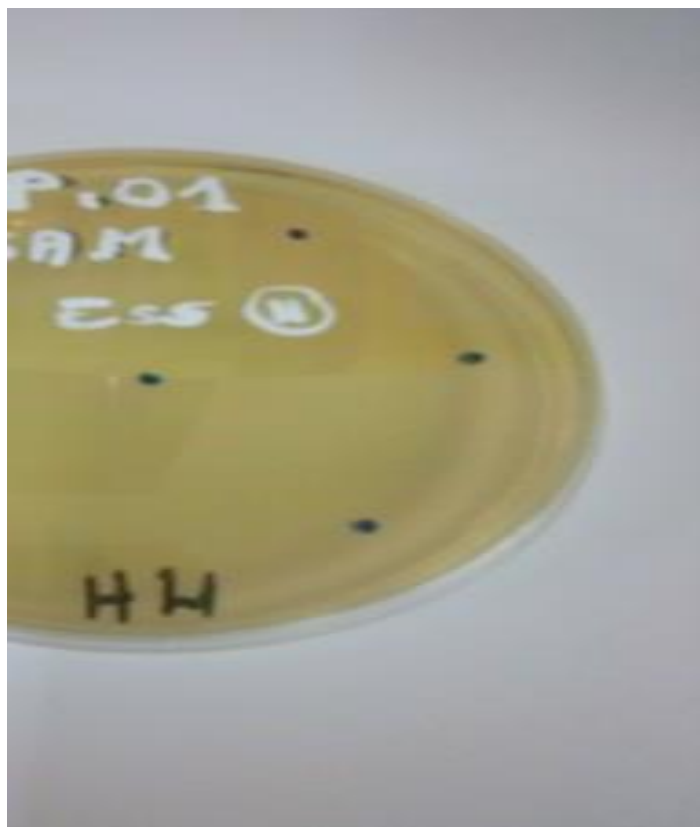


Figure15: Antibiogramme de *Klebsiellapneumoniae*.

- Amoxicilline acide clavulanique (AMC).
 - Imipenèmes (IPM).
 - Gentamicine (GN).
 - Oxacilline (OX).

• **2.4. Tests d'activité antimicrobienne :**

2.4.1 Criblage des huiles essentielles par la technique de l'aromatogramme :

Un disque de papier filtre stérile (Wattman) de 6 mm de diamètre imprégné de 5 μ l de l'HE brute a été déposé sur milieu Mueller-Hinton (MH) préalablement ensemencé à partir d'une suspension bactérienne de concentration équivalente \approx 108UFC (DO = 0,1- 0,08 à 590nm) et diluée au 1/100.

Après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures, les résultats sont lus par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm).

La même méthode est utilisée pour tester l'huile seulement que le disque a été imbibé avec 4 μ l, 10 μ l de l'huile utilisée. L'expérience a été réalisée en trois exemplaires (**Khadiretal., 2016**)

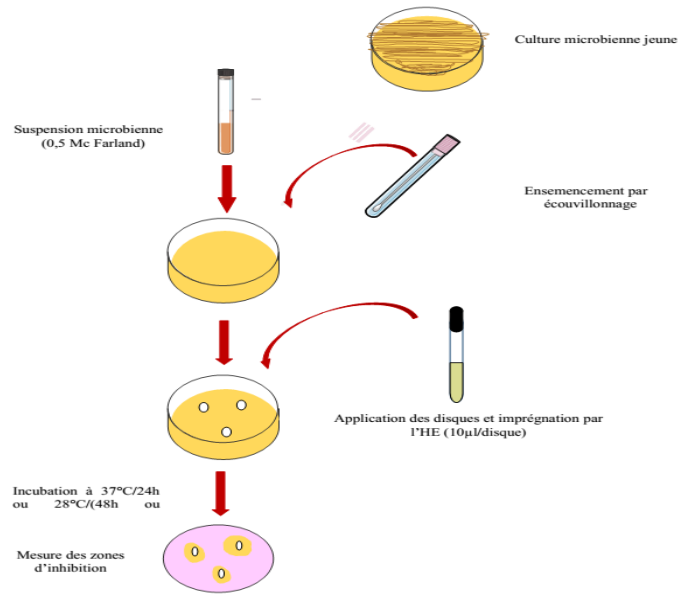


Figure 22: Technique de diffusion sur gélose par disques.

Figure16 : Illustration de la méthode de l'aromatogramme sur boîte de pétri
(Boukhatemet *al.*, 2014).

- Les huiles essentielles seront ainsi classées selon l'échelle de Ponce et *al.* 2003 en :
 - **Non Sensible(-)** pour des diamètres inférieurs à **8mm**.
 - **Sensible (+)** Pour diamètres **9-14mm**.
 - **Très sensible (++)** pour Diamètres **15-19mm**.
 - **Extrêmement sensible (+++)** Pour des diamètres supérieurs à **20mm**.

2.4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI):

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées à l'aide des plaques de microtitration à 96 puits. Une série de dilution d'huile essentielle à 1/2 a été préparée dans le bouillon Müller-Hinton en ajoutant le Tween 80 pour une concentration de 10 % (v/v) dans le but d'avoir une miscibilité totale de l'huile dans le bouillon. Une deuxième solution dite blanche a été préparée avec le bouillon Müller-Hinton et le Tween 80 avec une concentration de 10 %. Cette solution a été utilisée pour compléter les dilutions successives de la première solution qui contient l'huile essentielle et afin que la concentration de Tween 80 reste la même à 1 % dans les différentes concentrations préparées.

L'inoculum à 108UFC/ml a été dilué à 1/1000 pour avoir la concentration de 108 UFC/ml ensuite, 180µl de la suspension bactérienne à 105 UFC/ml a été déposé à l'intérieur des puits de la microplaque et on ajoute 20µl d'HE pour chaque concentration. On laisse deux rangées verticales représentent les témoins :

Les puits de la première rangée verticale sont remplis par 200 µl de bouillon Müller-Hinton comme premier témoin négatif. Les puits de la deuxième rangée verticale sont remplis par 200 µl de la suspension microbienne standardisée à 105 UFC/ml comme témoin positif.

Après incubation des plaques à 37 °C pendant 18- 24 h les CMI sont déterminées comme la plus faible concentration pour laquelle la croissance microbienne n'est pas observée à l'œil nu (**Khadiret *al.*, 2013**).



Résultats et discussion

Résultats et discussion :

1. Résultats :

1.1. L'huile essentielle d'*Ammoidesverticillata* :

L'huile essentielle d'*Ammoidesverticillata* est très aromatique, liquide de couleur jaune foncée et de saveur forte et piquante avec un rendement d'extraction de 2,7%.

1.2. Observation microscopique :

L'observation microscopique des souches (d'hémoculture/ Référence) de *Klebsiella pneumoniae* est représenté dans le tableau au-dessous :

Tableau 05 : Critères microscopiques de *K. pneumoniae*.

La coloration de Gram .

Souches :	Mobilité	Forme :	Gram :
<i>K. pneumoniae</i> d'hémoculture / <i>K. pneumoniae</i> de référence	Immobile	bacille	Négatif

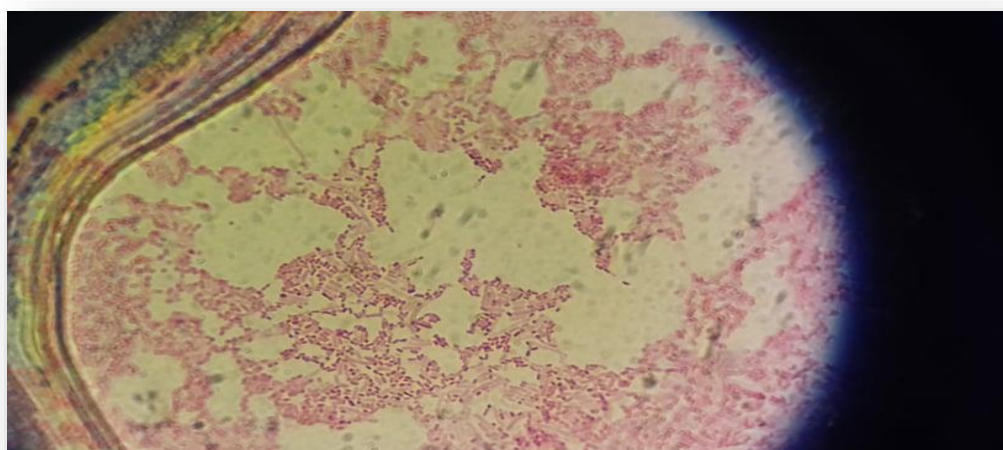


Figure 17: Aspect microscopique de coloration de gram : *K.pneumoniae*

(Photo originale).



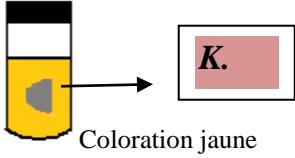

Figure17: Le test TSI (milieu triple sucres). Figure18 : Test citrate de Simmonse.



Formation des bulles d'air dans le trajet de pipette pasteur : cela signifie que la bactérie est immobile

Figure 19 : test Mannitol mobilé.

Tableau 6: Test d'ONPG.

Coloration	Interprétation	Conclusion
 <p>Coloration jaune</p>	<p>La bactérie <i>K. pneumoniae</i> a hydrolysé l'ONPG En ONP (produit coloré jaune)</p>	<p>La bactérie <i>K. pneumoniae</i> possède la B-galactosidase. Elle dite ONPG +.</p>
 <p>En cas général (Incolore)</p>	<p>IL n'y a pas d'ONP dans le milieu, la bactérie n'a pas hydrolysé l'ONPG</p>	<p>La bactérie ne possède pas la B-galactosidase. Elle dite ONPG -.</p>

1.3. Résultats de l'antibiogramme :

Les résultats d'antibiogramme sont déterminées en terme du diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques(voire **Figure 20**).



Figure20 :Résultat d'antibiogramme sur boite pétride la souche *Klebsiellapneumoniae* d'hémoculture (Photo original).

Les résultats du test d'antibiogramme sont résumés dans le tableau suivant :

Antibiotiques testées :	OX	AMC	IPM	CN
Résistance de <i>Kp</i> d'hémoculture et de référence	R	R	S	R

Tableau.07 :Taux de résistance de *Klebsiellapneumoniae*aux antibiotiques.

L'antibiogramme a révélé des résultats variables. En effet, la souche *Kp* a exprimé un phénotype de résistance contre l'Oxacilline, l'Amoxicilline-acide clavulanique, et la Gentamicin. Par contre, pour l'Imipineme la souche *Kp* est est sensible.

Les résultats obtenu pour le test de ces ATB ont été comparé avec le travail de(HASSAINE,2012) qui a testé la sensibilité de *Klebsiellapneumoniae*sur un ensemble des antibiotiques et ils ont trouvé que les résultats ont montré une résistance à de nombreuses β -lactamines. Les taux de résistances étaient les suivants: amoxicilline (100%), amoxicilline/acide clavulanique (71.42%), céfotaxime (71.42%), ceftazidime (71.42%), aztréonam (57.14%), Imipénème 14.28 et Ertapénème 14.28%.Contrairement aux autres β - lactamines la céfoxitine présente une bonne activité sur toutes la collection des souches de *Klebsiellapneumoniae* étudiée avec (100%) de souches sensibles,

L'activité antimicrobienne par la méthode de Vincent est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (voir figure 21).



Figure 21 : Résultats d'antibiogramme d'une souche d'hémoculture *K.pneumoniae* (photo original).

1.4. Résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne d'huile essentielle d'*Ammoidesverticillata*:

. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose :

L'activité antibactérienne de l'HE d'A.V. a été réalisée, in vitro, sur des souches bactériennes d'hémoculture et de référence. Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions sont présentés dans le **Tableau (08)** :

Tableau08 : Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions d'*A.verticillata*.

Quantité d'huile essentielle :5µl	
Les souches :	Diamètre :
<i>K. pneumoniae</i> hospitalière	10 mm
<i>K. pneumoniae</i> de référence	11 mm

D'après les résultats ci-dessus des zones d'inhibition on a remarqué que les souches *K. pneumoniae* sont sensibles à l'huile essentielle d'*A.verticillata*. (Résistance intermédiaire).

2- Discussion :

Dans ce travail nous avons évalué l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*A.verticillata* et leur effet sur des souches *K.pneumoniae*.

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*A.verticillata* sur des souches *K.pneumoniae*. En comparant nos résultats avec ceux trouvés par **Hachemi et Hamzi., 2018**, on constate que ils ont trouvé que les bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) sont les plus sensibles à l'huile essentielle d'*A.verticillata* avec des diamètres qui varient entre 22-40)(mm) par rapport aux bactéries à Gram positif (*Enterococcus fecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenese*) dont les diamètres de ces dernières varient entre (8-30) mm.

Selon plusieurs auteurs, les HE sont considérés actifs s'ils produisent une zone d'inhibition avec des diamètres égaux ou supérieur à 20 mm. En conséquence, l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a une forte action antibactérienne contre les bactéries Gram négatif: germes d'origine cliniques: *E.coli* (ESBL), *E.Coli* et *Klebsiellapneumoniae* qui sont très sensibles aux actions inhibiteur de l'huile

essentielle d'*A.verticillata* avec une inhibition des diamètres respectifs : 37 ; 39.5 ; 36.5 (Caillet et Lacroix.,2007)

En outre, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est liée aux métabolites monoterpéniques, qui peuvent inhiber la transmission des ions aux bactéries. De plus, les composants sesquiterpéniques jouent un rôle défensif dans la plante (Deba et al., 2008).

Dans un travail fait par (Bekhechi et Abdelouahed.,2004), ils n'ont constaté que les huiles essentielles d'*A.verticillata* récoltées des différentes stations de Tlemcen ont un effet inhibiteur remarquable (résistance intermédiaire) et avec des zones claires dépassant 30mm et allant jusqu'à 36,7 mm qui sont identiques à nos résultats dont les diamètres d'inhibition de *K. pneumoniae* sont dans l'intervalle obtenu par leur travail.

Les tests effectués par Bekhechi et Abdelouahied., 2004 sur les HE d'*A.verticillata* montrent que la majorité des souches 77,7%, sont sensibles, avec une zone d'inhibition supérieure ou égale à 25 mm ; les souches de *Pseudomonas*, *Klebsiella* et *E. coli* (E5) ont une **résistance intermédiaire**.

Une autre étude faite par Toubal et al., 2012, ils ont trouvés que les souches *Klebsiella pneumoniae* ont une résistance moyenne à l'HE d'*A. verticillata*.

En comparant nos résultats avec ceux trouvés par Attou., 2017, on constate qu'il a trouvé que l'HE d'*Ammoides verticillata* a représenté une activité antibactérienne et anti-levure remarquable. L'HE d'*A. verticillata* a l'activité la plus élevée à une concentration de 10µl/ disque, elle est extrêmement active contre cinq souches bactériennes avec des diamètres d'inhibition dépassant les 23mm, tandis qu'une faible activité est remarquée contre *Klebsiella pneumoniae* avec un diamètre de 9.5mm, cette HE est alors plus active contre les Gram (+) que les Gram (-).

Ainsi, les résultats microbiologiques montrent que *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* ont les plus résistants, avec une CMI comprise entre (1999 et 2208 g /ml), les souches

de *Listeria monocytogenese*, E.coli sont inhibées à partir d'un même seuil de concentration de l'huile essentielle, soit 1046 g/ml.

Les résultats indiquent que l'HE d'*Ammoides verticillata* possède une activité remarquable contre *K. pneumoniae* et donc elle peut être utilisée pour le développement de nouveaux agents antibactériens afin de traiter les infections causées par cette espèce virulente (**Rebaya et al.,2016**).



Conclusion et
perspective

Conclusion :

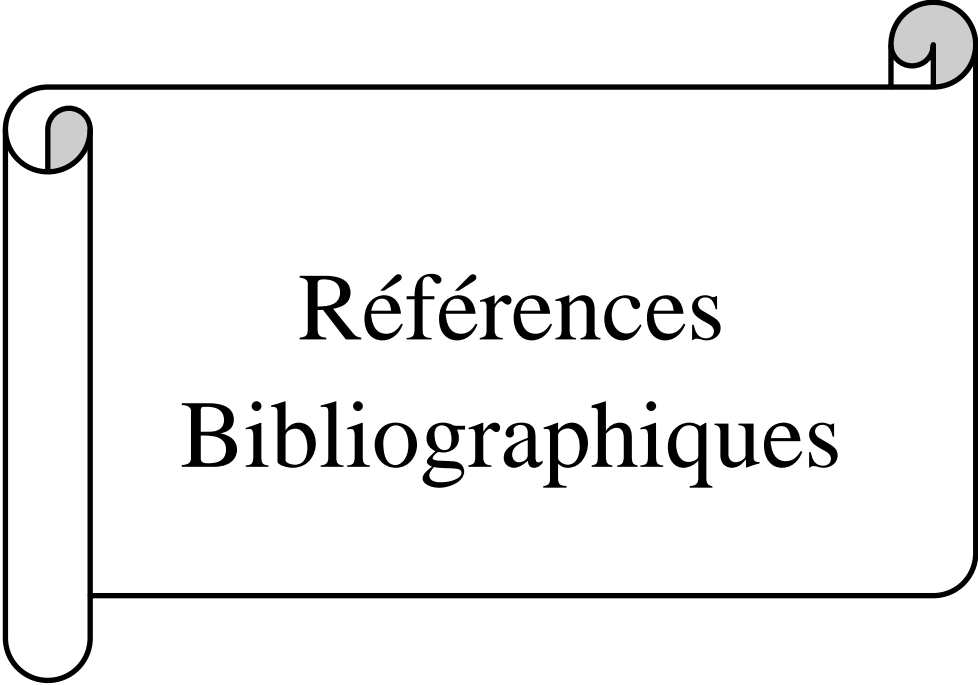
Depuis des années, les antibiotiques ont été utiles dans la **lutte contre plusieurs maladies comme la pneumonie**. Mais, au fil des décennies, les bactéries se sont modifiées pour résister à ces traitements et devenir des bactéries multi -résistantes (BMR).

Notre travail a pour objectif de rechercher une autre voie antimicrobienne pour éviter ou diminuer la multi -résistance des bactéries pathogènes, en étudiant l'effet des huiles essentielles sur *klebsiella pneumoniae* issue des infections hospitalières. la médecine conventionnelle cherche à engager la phytothérapie dans les traitements des maladies microbiennes comme alternative contre ces derniers en faisant des travaux sur leur mode d'obtention qui est connue par le procédé d'extraction.

Le présent travail portant sur l'étude des plantes médicinales et leurs huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, nous a permis de tirer un certain nombre de conclusions :

- D'après les résultats obtenus, le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Ammoides varticillata* est très important pour la souche étudiée et montre qu'elle a un pouvoir antimicrobien très efficace .contre la souche étudiée.

Enfin, Nous souhaitons que nos travaux ont fourni des informations importantes et utiles qui aideront à mener à bien des travaux scientifiques sur le thème des plantes médicinales et des remèdes naturels.



Références
Bibliographiques

Références bibliographiques :

- **Abbott, S. L. (2011).** Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition (pp.639-657). American Society of Microbiology
- **Alain. B et al, 2007.** Microbiochimie et alimentation
- **Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H.(2000).** Bactériologie clinique, Ellipses, Paris. 2^{ème} édition : 171-211
- **Anonyme, (2018),** Récolter, sécher et conserver les plantes aromatiques (PAM)[En ligne] consulté le 10 Avril 2018. - <https://www.bio-enligne.com/phytotherapie/349-secher.html>..
- - **ABEGAZ, B. ; YOHANNES, P.G. and DIETER, R.K. (1993).** J. Nat. Products, 46 (3), 424.
- **Baerwolf S, Geffers C, Behnke M. 2002.** Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. SHEA 216
- **Bagley, S. T., Seidler, R. J., Talbot, H. W., & Morrow, J. E. (1978).** Isolation of Klebsiellae from within living wood. Applied and environmental microbiology, 36(1), 178-185.
- **Belestrino, D., Ghigo, J.-M., Charbonnel, N., Haagensen, J. A. J et Forestier, C. (2008).** The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *K. pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharide. *Environ Microbiol* **10**, 685-701.
- **Bergogne-Berézin E, Dellamonica P. 1995.** *Antibiothérapie en pratique clinique*. Masson, Paris. P 486
- **Brisse, S., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006).** *The Genus Klebsiella. Prokaryotes*, 6, 159–196
- **Baba Aïssa F. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles: *Flore d'Algérie et du Maghreb*. Ed. Librairie Moderne-Rouiba, 231 pages

- **Baytop T. & Siltlipinar N. (1986).** *Characteristics of « Nankhan» cultivated in Anatolia and its volatile oil.* *J Fac. Pharm. Istanbul*, **22**: 73 - 76.
- Bremness, L. 1996. **L'oeil nature: Les plantes aromatiques et médicinales.** Bordas Nature Paris. 303
- **Benjilali B. (2004)** – *Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation.* 17-59
- **Bruneton J., 1999.** - « *Pharmacognosie* » *Plantes médicinales*, Éd. Lavoisier, Techniques et documentation, Paris, 405
- **Béliveau, R.; Gingras, D. 2005.** *Les aliments contre le cancer.* Édition du Trécarré. Outremont. 213 p
- **BRUNETON J.** *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales* - (5^e Edition). Lavoisier; 2016.
- **Bigendako. J.(2004).** Identification et zonage des Eucalyptus globulus aurwanda. chemonics international inc. projet adar. P10
- **Ceri H, Olson ME, Turner RJ.** Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother.* **2010**; 11:1233–1237.
- **Crété, P. (1965).** *Precis de botanique. v. 2: Systematique des angiospermes*
- **-Bigendako. J.(2004).** Identification et zonage des Eucalyptus globulus aurwanda. chemonics international inc. projet adar. P10
- **BeyOuld Si Said, Z. (2014).** Activités biologiques des huiles essentielles des feuilles et du fruit d'une plante médicinale Eucalyptus globulus. Mémoire de magister, département des sciences alimentaires, Université Abderrahmane Mira Bergamini, D. 1964. *The land and wildlife of Australia.* Life Natural Library, New York (États-Unis). Bejaïa : 109 p
- **Chevallier A., Larousse 2001.** *Encyclopedia of Medicinal Plants* (2nd Edition).
- **Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. 1997.**
- **Dong, Y., Chelius, M. K., Brisse, S., Kozyrovska, N., Kovtunovych, G., Podschun, R. A., & Triplett, E. W. (2003).** Comparisons between two

- Klebsiella*: The plant endophyte *K. pneumoniae* 342 and a clinical isolate, *K. pneumoniae*
- **Duca E., duca M., Furtunescu G.**, Microbiologie médicale, 2^e Ed. Didactique et pédagogique, Bucarest, **1979**, 436p
 - **Dobignard A. & Chatelain C. (2011)**. Index synonymique de la flore d'Afrique du nord. Volume 2 :
Dicotyledoneae : Acanthaceae - Asteraceae. *Editions des conservatoires et jardins botaniques - Genève*.
428ges.
 - **Degryse A., Delpla I., Voinier M. (2008)** : Risque et bénéfices possibles des huiles essentielles.
Dubois, J., Mitterand, H., Dautat, A. 2006. *Dictionnaire étymologique et historique du français*, Éditions Larousse huiles essentielles. Ingénieure du Génie Sanitaire, Atelier santé environnement
 - **El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., & Bakour, R. (2013)**. Virulence Profiles and antibiotic susceptibility patterns of *K. pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 61(5), 209-216.
 - **El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., & Bakour, R. (2013)**. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *K. pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 61(5), 209-216.
 - **El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. 2012**. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *K. pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *PATBIO-3048*; No. of Pages 8.....**P: 05**
 - **Fleming, A., 1929**. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. *British journal of experimental pathology*.
 - **France-Ida J. (1996)** - Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence*. 3 : 5-6.
 - **Serventy, V.** *Wildlife of Australia*. Thomas Nelson Ltd, Canada. 1968.p28

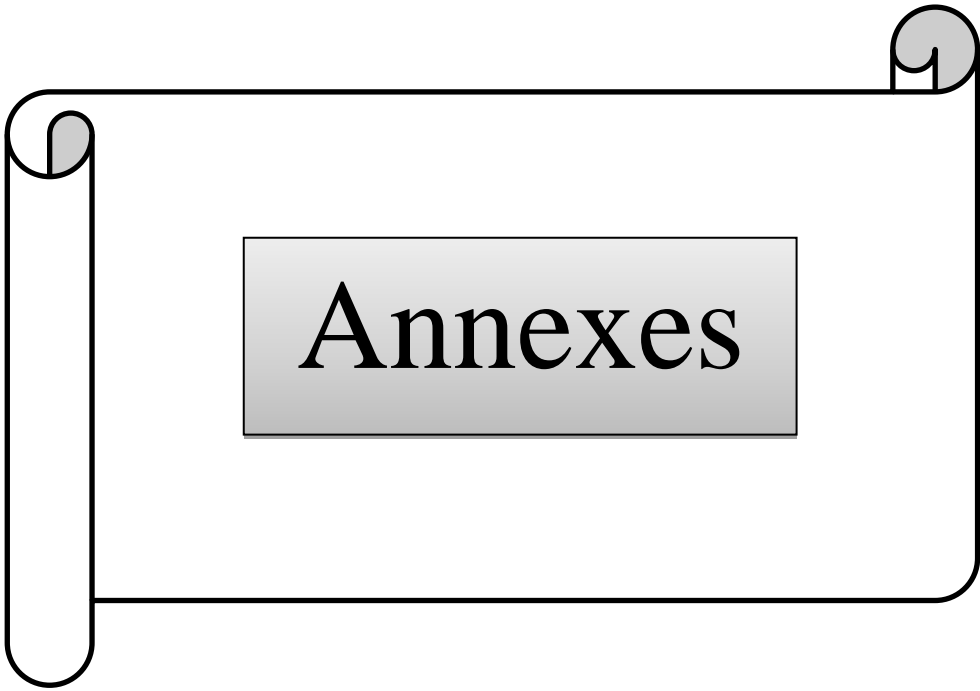
- Finar, IL "Organic chemistry". Ed Longman Scientific and Technical Vol II, 354.
- **Fleming, A., 1929.** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. Influenzae. British journal of experimental pathology.
- **Gueye O. 2007.** Utilisation des méthodes biométrique dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. P 22, 24-28
- **Guinoiseau, E., Lorenzi, V., Luciani, A., Tomi, F., Casanova, J., Liliane, B. 2011.** susceptibility of the multi-drug resistant strain of *Enterobacter aerogenes* EA 289 to the terpene alcohols from *Cistus ladaniferus* essential oil. Natural Product Communications, 6, 1-4.
- **Gahbich S., 2009.** La Phytothérapie, Ecole Supérieure des Sciences et Techniques de la Santé de Sousse.
- **Ganou, L. (1993).** Contribution à l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles. Thèse de l'INP Toulouse, France
- **Geser, N., Stephan, R., Hächler, H. (2012).** Occurrence and characteristics of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC veterinary research*, 8(1), 1.
-
- **Jones, H. C., Roth, I. L. Sanders, W. M. (1969).** Electron Microscopic Study of a Slime Layer. *J Bacteriol* 99, 316-325
- **Kumar, D., Shrutikirti., Kumari, K. (2013).** Klebsilla: In Drinking Water. International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 2 (12), 38-42.
- **Lamia Bachiri., Mohamed Bammou., Ghizlane Echchegadda., Jamal Ibjibijen., Lhoussaine El Rhaffari., Zoubida Haloui., Laila Nassiri. 2007.** Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles De Deux Espèces De Lavande : *Lavandula dentata* Spp. *dentata* Et *Lavandula pedunculata* Spp. *pedunculata*. MGH78578. *Symbiosis*, 35(1), 247-259.

- **Lasa, I.2006.** Towards the identifications of common features of bacterial Biofilm developement.*IntMicrobiol Off J Span SocMicrobiol* 9,21-28.
- **Le Minor L and Véron M. 1989.**Bactériologie médicale, 2éme édition , Flammarion Médecine-Sciences, Paris.2:428-432.
- **Lima, E.O., Gompertz O.F., Giesbrecht, A.M.Paulo, M.O. (1993).** In vitro antifungal activity of essential oils obtained from plants against dermatophytes . *Mycoses*. 36: 333-336.
- **Nathaliverbek**preparatrice en pharmacie janvier 2006 :L’aromathérapie comme alternative credible a l’antibiothérapie
- **Paul H. Roy. 1997.** Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l’œuvre chez les bactéries. *Médecine/ sciences* n° 8-9, vol. 13.
- **Piperakia et al,2017)**
- **Podschun, R. and U. Ullmann. 1998.** Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity f
- **Pereira S.,Freire S.R.C.; Neto P., SilvestreJ. D., and SilvaM.S.A.(2004).** Chemical composition of the essential oil distilled fromthe fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal .*Flavour and fragrance journal flavourfragr. J.* 2005; 20: 407–409
- **Quézel P. & Santa S., 1962.** Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques
- **Quezel P. et Santa S., 1963.** - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridoniales. Tome II. Ed. CNRS, Paris, 671p.
- actors. *Clin.Microbiol.Rev.* 11:589-603.
- **Singh SB, Barrett JF. 2006.** Empirical antibacterial drug discovery □ foundation in natural products. *Biochem.Pharmacol.* 71, 1006-1015
- **Srinivasan, V. B., Vaidyanathan, V., Mondal, A., & Rajamohan, G. (2012).**

- Role of the two component signal transduction system CpxAR in conferring cefepime and chloramphenicol resistance in *K. pneumoniae* NTUH-K2044. *PLoS One*, 7(4), e33777.
- **Sebai M., Boudali M., 2012.** La Phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel, infirmier de la sante publique. Institut de formation paramédical CHETTIA. 56p.
 - **Song A., Wang Y., Liu Y.(2009).** Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* Labill from China. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 4 (4)PP
 - **Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014).** Les biofilms bactériens :leur importance en santé animale et en santé publique [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Canadian journal of veterinaryresearch = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 78(2), 110–116.
 - **Viollon, C., Chaumont ,J.P. (1994)** Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 128: 151-153
 - **Viollon, C., Leger, D., Chaumont, J.P. (1993).** Activités antagonistes in vitro de certains composés volatils naturels vis-à-vis de germes de la flore vaginale. *Plant. Med. Phytother.* 26: 17-22.
 - **Valnet J., (2001),** la phytothérapie-traitement des maladies par les plantes –Se soigner par les plantes. Ed. Vigot . ISBN :2-253-03790-7.In : **Haddouchi F., (2007):**Contribution à l'étude des huiles essentielles de *Thymus Fontanesii* (Zaâteur) de la région de Mostaganem et de *laurusnobilis*(Rend) de la région de Tlemcen (Nedroma).Activités antibactériennes et antifongiques en fonction de leur de leur conservation .Thèse magister, Université Abou BakrBelkaid Tlemcen
 - **Williams, D. L etBloebaum, R. D. (2010).** Observing the biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 grown using the CDC biofilm

reactor. *MicroscMicroanalOff J MicroscSoc Am Microbeam Anal Soc Can*
16,143-152

- **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D et OuarKorich M.N. 2001.**
Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.



Annexes

Annexes

✚ Préparations des milieux

- Préparation des géloses :

❖ Gélose Mac'Conkey (marque Fluk) :

- Peptone20g/l
- Lactose..... 10g/l
- Bile salts5g/l
- Sodium chloride..... 5g/l
- Neutral red0.075 g/l
- Agar12g/l
- pH final7.4 ± 0.2 (AT 37°C)

Pour la préparation de 1l, on prend 52g/l de Mac'Conkey poudre.

❖ Gélose nutritive :

- Extrait de viande : 1g.
- Extrait de levure : 2g.
- Peptone :5g.
- Chlorure de sodium : 5g.
- Agar-agar : 15g.
- Eau distillée :
1000ml.
- pH :7.4

Suspendez 28g dans 1l d'eau distillée, chauffer jusqu'à la dissolution totale.

Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

❖ Préparation du milieu de culture Sabouraud :

- Peptone :
.....5g.
- Glucose :
.....20g.

Annexes

- Hydrolysate de caséine :
5g.
- Agar-agar :
18g.
- Eau distillée :
.....1000ml.
- pH : 6.

❖ **BHIB :**

• **Composition :**

- Gélatin Peptone..... 10g/l
- BeefHeart infusion10g/l

• **Calf Brain**

- Infusion..... 7.5 g/l
- Sodium chloride..... 5.0g/l
- Disodium Phosphate..... 2.5 g/l
- Dextrose..... 2g/l
- pH final7.4 ± 0 .2
- at25°C

• **Préparation de BHIB :**

Mettre en suspension 37g du milieu dans un litre d'eau distillée. Chauffer légèrement si nécessaire jusqu'à complète dissolution. Répartir et stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 min. Pour obtenir meilleurs résultats le milieu devrait être utilisé le même jour de sa préparation, ou chauffé dans un bain d'eau bouillante pendant quelques minutes pour expulser l'oxygène dissous, laissé refroidir avant l'utilisation.

❖ **Préparation de l'eau physiologique :**

- 9 grammes dans un l.

Annexes

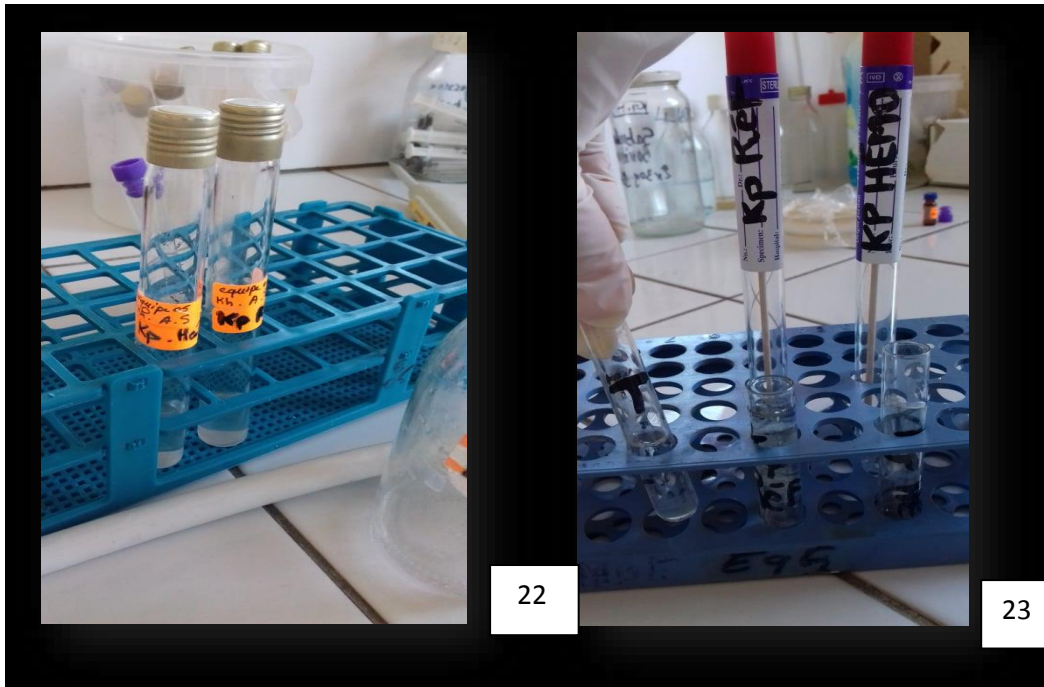


Figure 22; 23;24 : Dilution de la suspension inoculum au 1/100 ($\approx 10^6$ UFC/ml) dans de l'eau physiologique.

Annexes

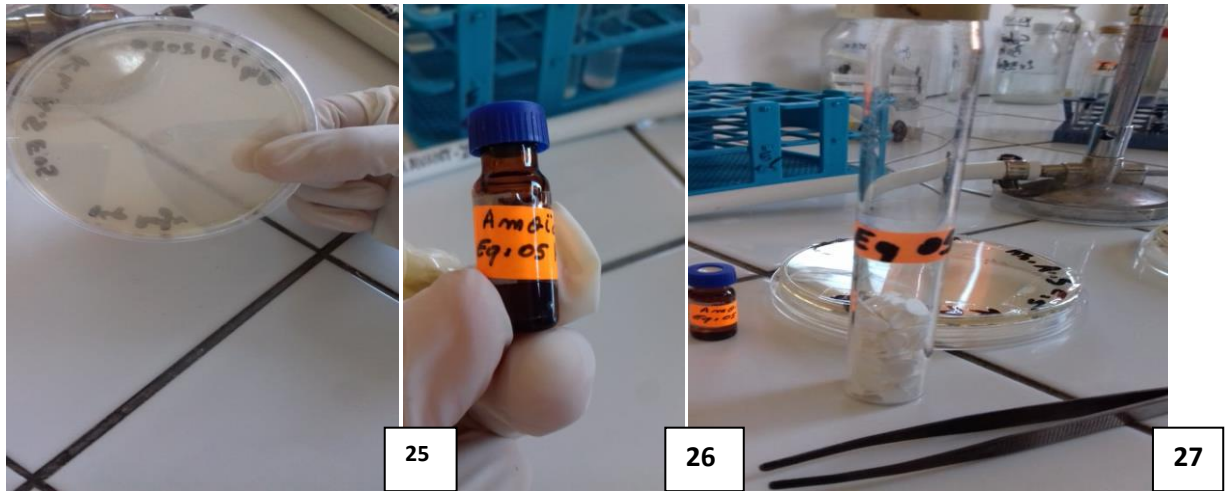


Figure 25;26;27: matériels utilisés pour l'aromatogramme.

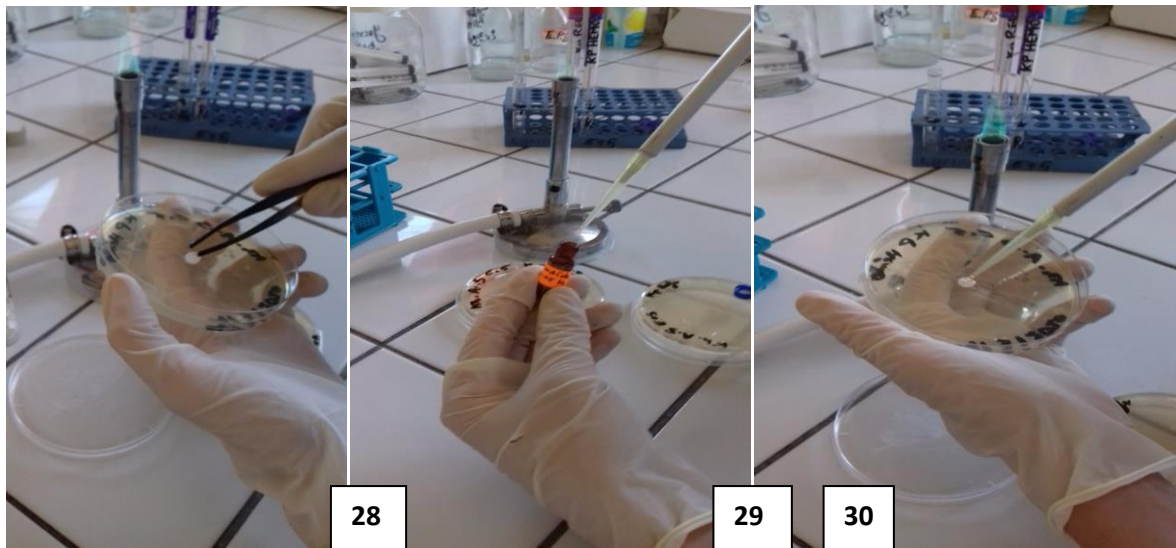


Figure 28; 29; 30;31: Procédure de l'aromatogramme.

