

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-
Mostaganem
Faculté des Sciences de la



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

TOUMI Bakhta & SIAGHI Meriem

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie appliquée

THÈME

L'étude de L'activité Antimicrobienne de L'huile Essentielle de Clou de Girofle (*Syzygium Aromaticum*) Vis-A-Vis *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus*.

DEVANT LES MEMBRES DE JURY

Président :	Mr. DJIBAOUI Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur :	Mr. BEKKADA Ahmed Ali	Professeur	Centre U Tissemsilt
Examineur :	Mr. AIT SAADA Djamel	MCA	U. Mostaganem

Travail réalisé au niveau de laboratoire de la faculté SNV-Université de Mostaganem.

Année universitaire 2020-2021.

Remerciement

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

Nous tenons à remercier profondément tous ceux qui ont participé de près ou de Loin à la réalisation de ce travail et particulièrement :

*Notre encadreur, Mr. **BEKKADA Ahmed Ali**, professeur au Centre Universitaire de Tissemsilet, On lui remercie pour la bienveillance, l'aide, le soutien, les précieux conseils, la patience et la disponibilité permanente qu'il nous a témoignés dans ce travail.*

Nos remerciements aux membres de jury :

- ***Mr. DJIBAOUI Rachid** ; Professeur à l'Université de Mostaganem qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.*
- ***Mr. AIT SAADA Djamel** ; Maitre de Conférence A à l'Université de Mostaganem, d'avoir accepté d'être l'examineur de notre travail.*

*Nous exprimons, notre profonde gratitude à nos enseignants, sans oublier de remercier toute l'équipe du laboratoire de notre université en particulier M^{me} **Amir.F**, M^{me} **Hafida**, pour leurs aides et tout le personnel du Laboratoire de l'Hôpital d'Ain-Tedeles, en particulier Mr. **NEKAA Hamou**. et Mr. **REZIGA Charef**.*

On tient à remercier nos très chers parents du plus profond de notre cœur, pour leurs innombrables sacrifices et de nous avoir tant aidé, soutenu, réconforté, cru en nous et encouragé dans les moments de doute. Tous les mots ne suffiraient pas à vous dire combien on vous aime et combien vous comptez pour nous.

En fin nous remercions toutes les personnes qui ont contribué à Différent degrés à la réalisation de cet humble mémoire de fin d'études.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents pour leurs endurance, leur Amours, leurs sacrifices et leurs encouragements. Que ce Travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse.

*A ma sœur que j'adore **Tinhinnane.***

*A mes frères **Aissa et Massinnissa.***

*A tous mes chers amis et tous mes proches que j'aime
Surtout **M'heni, Rima, Narimen, Bakhta, Nadjette, Louis.***

*Je tiens également à dédier cette œuvre à tous mes collègues de **Microbiologie Appliqué promotion 2021** que j'ai eu le plaisir de Côtoyer pendant cette période de formation.*

SIAGHI Meriem



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon père

L'école de mon enfance et berceau de ma culture. Ta sagesse et ton courage ont toujours été sécurisants pour moi. Tu es aussi un travailleur exemplaire et infatigable, avec tes modestes moyens, tu as toujours subvenu à nos besoins, tu as rempli pleinement ton rôle de père. Que Dieu fasse que je bénéficié longtemps encore de tes conseils

A ma chère mère

Le plus beau cadeau que le Bon Dieu m'a offert, Aucune dédicace ne serait été assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Elle a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. Qui est toujours un exemple pour moi, et qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les bonnes. Que dieu la garde et la protège.

*A mes cher **Frères** et A mes très chères **Sœurs***

*A ma binôme **Siaghi Meriem***

*A tous mes **collègues***

*Et a tous mes **meilleures amies***

*A tous ce que j'aurais **oublié** de citer mais Ils sont toujours présents **dans mon cœur.***

Toumi Bakhta

Résumé

L'utilisation abusive des antibiotiques est le facteur majeur qui contribue à l'apparition de différents types des bactéries antibiorésistantes. L'émergence et la diffusion croissante de ces dernières remettent en question l'efficacité de ces traitements tant chez l'homme que chez l'animal, en conséquence, nous proposons dans cette étude d'autres alternatives thérapeutiques.

Un certain nombre de bactéries multirésistantes fournies par le laboratoire des analyses médicales de l'hôpital d'Ain Tedeles (Mostaganem) a fait l'objet d'études morphologiques, physiologiques et biochimiques et a conduit à la confirmation de leurs identités, il s'agit des espèces *E. coli*, *Proteus mirabilis*, et *Staphylococcus aureus*.

L'extraction de l'huile essentielle de 500g de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) par la méthode d'hydrodistillation, a fourni un rendement de 5.516%. La détermination de l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles est réalisée par un aromatoigramme en suivant la méthode de diffusion sur gélose. Des résultats satisfaisants vis-à-vis des agents pathogènes cliniques expérimentés ont été obtenus, les diamètres des zones d'inhibition ont été de l'ordre de 15, 16.20 et 18 mm pour respectivement *Proteus mirabilis*, *E. coli*, et *Staphylococcus aureus*. L'effet inhibiteur de ces huiles essentielles est proportionnel aux concentrations testées, les bactéries à Gram positif semblent être plus sensibles que les bactéries à Gram négatif.

Ainsi, cette étude permet de conclure que l'huile de girofle possède une importante activité antibactérienne.

Mots clés : multirésistance, *Syzygium aromaticum*, huile essentielle, activité antimicrobienne, aromatoigramme.

Abstract

The overuse of antibiotics is the major factor contributing to the appearance of different types of antibiotic-resistant bacteria. The emergence and increasing diffusion of these bacteria call into question the efficiency of these treatments in both humans and animals. Consequently, in this study we propose other therapeutic alternatives.

A number of multi-resistant bacteria provided by the laboratory of medical analysis of the hospital of Ain Tedeles (Mostaganem) was the subject of morphological, physiological and biochemical studies and led to the confirmation of their identities, it is about *E. coli* species, *Proteus mirabilis*, and *Staphylococcus aureus*.

The extraction of the essential oil from 500g of clove (*Syzygium aromaticum*) by the hydrodistillation method, provided a yield of 5.516%. The determination of the antimicrobial activity in vitro of the essential oils is performed by an aromatogram following the agar diffusion method. Satisfactory results with respect to the clinical pathogens tested were obtained, the diameters of the inhibition zones were of the order of 15, 16.20 and 18 mm for *Proteus mirabilis*, *E. coli*, and *Staphylococcus aureus* respectively. The inhibitory effect of these essential oils is proportional to the concentrations tested, Gram positive bacteria seem to be more sensitive than Gram positive bacteria.

Thus, this study allows to conclude that clove oil has an important antibacterial activity.

Keywords: multidrug resistance, *Syzygium aromaticum*, essential oil, antimicrobial activity, aromatogram.

Liste des abréviations

- : Négatif.	McF : McFarland.
% : Pourcentage.	MDG : Méthyl-D-glucoside.
°C : Degré Celsius.	MEL : Mélibiose.
+ : Positif.	MH : Muller Hinton.
≤ : Inférieur ou égale.	MHA : Muller Hinton Agar.
≥ : Supérieur ou égale.	Mm : millimètre.
ADH : Arginine dehydrolase	MI : millilitre.
AFNOR : Association Française de Normalisation.	MLT : Malate.
AMY : Amygdaline	Na₂SO₄ : Sulfate de sodium anhydre.
Api : Application Programming.	nd : non déterminer.
ARA : Arabinose.	NEO : Neomycine.
BCP : Pourpre de Bromocrésol.	Ø : Diamètre.
CIP : Ciprofloxacine.	ODC : Ornithine decarboxylase.
CIT : Citrate.	ONPG : Ortho-nitro-phenyl-galactoside.
CN : Gentamycine.	P : Pénicilline G.
CO₂ : Dioxyde de Carbone.	PH : potentiel hydrogène.
CTX : Cefotaxime.	S : Sensible.
D.O : Densité optique.	SAC : Saccharose
DMSO : Diméthylsulfoxyde.	SOR : Sorbitol.
FRU : Fructose.	SP : Spiramycine.
g : gramme.	STAPH : Staphylococcus.
GEL : Gélatine.	T : Témoin.
GLU : Glucose.	TDA : Tryptophane désaminase.
H : heure.	TI : Ticarclyline.
H₂ : gaz d'Hydrogène.	TRE : Trehalose.
H₂S : sulfure d'hydrogène.	TS : Très sensible.
HEs : Huile essentielle.	TSI : Triple Sugar Iron.
IND : Indol.	UFC : Unité Formant Colonie.
INO : Inositol.	UV : Ultra-violet.
LAC : Lactose.	VP : Voges-Proskauer.
LDC : Lysine décarboxylase.	XLT : Xylitol.
MAL : Maltose.	XYL : Xylose.
MAN : Manitol.	µm : micromètre.

Liste des figures

Figure 01 : Situation géographique des îles Moluques dans l'archipel indonésien.....	04.
Figure 02 : Un Giroflier de Madagascar.....	07.
Figure 03 : Branche de giroflier portant les clous en inflorescence terminale.....	07.
Figure 04 : Séchage des clous sur des nattes à Madagascar.....	08.
Figure 05 : Schéma du fonctionnement de la distillation à la vapeur d'eau.....	13.
Figure 06 : Schéma illustratif de l'hydrodistillation simple.....	14.
Figure 07 : Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion.....	14.
Figure 08 : Formule de l'isoprène.....	16.
Figure 09 : Exemples de composés aromatiques C ₆ -C ₃ caractéristiques des huiles essentielles.....	17.
Figure 10 : Exemples de composés aromatiques C ₆ -C ₁ rencontrés dans les huiles essentielles.....	17.
Figure 11 : Représentation de la structure des deux types de paroi Gram (+) et Gram (-).....	21.
Figure 12 : Aspects des colonies d' <i>E. coli</i> sur différents milieux de culture.....	24.
Figure 13 : Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique (X 20000).....	26
Figure 14 : Aspect du genre <i>Proteus</i> sur GN.....	31.
Figure 15 : Lecture de la densité optique des suspensions bactériennes sur un spectrophotomètre.....	36.
Figure 16 : Les graines du <i>Syzygium aromaticum</i>	38.
Figure 17 : Montage de l'extraction par hydro distillation.....	40.
Figure 18 : Etapes de séparation des phases de distillat.....	40.
Figure 19 : L'huile essentielle de <i>S. aromaticum</i> conservée.....	41.
Figure 20 : Détermination du pH d'HE de <i>S. aromaticum</i>	42.
Figure 21 : Schéma de coulage des boites avec la gélose MH.....	43.

Figure 22 : Schéma démonstratif des étapes de la standardisation de la suspension bactérienne à 0.5 Mc Ferland et leur étalement sur les boîtes gélosée de MH.....	44.
Figure 23 : schéma explicatif des étapes de la dilution des huiles essentiels de <i>Syzygium aromaticum</i> et leur dépôt sur les disques en papier :	46.
Figure 24 : Aspect macroscopique d' <i>Escherichia coli</i> sur gélose BGA :	48.
Figure 25 : Aspect macroscopique de <i>Proteus mirabilis</i> sur gélose BCP :	48.
Figure 26 : Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Chapman :	49.
Figure 27 : Coloration de Gram de différentes bactéries isolées (grossissement X100) :	50.
Figure 28 : Fermentation des sucres et production du gaz chez (<i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> et <i>staphylococcus aureus</i>) en milieu TSI :	51.
Figure 29 : Test de la catalase :	51.
Figure 30 : Résultats des tests biochimiques de la galerie classique :	52.
Figure 31 : Résultats des tests biochimiques des galeries : API 20 E et API STAPH :	54.
Figure 32 : résultats de l'antibiogramme <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Proteus mirabilis</i>	56.
Figure 33 : résultats de l'antibiogramme de <i>E. coli</i> :	57.
Figure 34 : représentation graphique des résultats de l'antibiogramme des entérobactéries étudiées :	58.
Figure 35 : représentation graphique des résultats de l'antibiogramme de <i>staphylococcus aureus</i>	59.
Figure 36 : les résultats de l'aromatogramme de <i>Staphylococcus aureus</i>	63.
Figure 37 : les résultats de l'aromatogramme de <i>Proteus mirabilis</i>	64.
Figure 38 : les résultats de l'aromatogramme de de <i>E. coli</i>	65.
Figure 39 : représentation graphique des résultats de L'aromatogramme avec l'HEs de <i>Syzygium aromaticum</i>	66.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification botanique du <i>Syzygium aromaticum</i>	05.
Tableau 02 : La classification d' <i>Escherichia coli</i>	23.
Tableau 03 : Classification de <i>Staphylococcus aureus</i>	26.
Tableau 04 : Facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	28.
Tableau 05 : Caractères biochimiques de <i>Proteus mirabilis</i>	30.
Tableau 06 : Classification de <i>Proteus mirabilis</i>	31.
Tableau 07 : liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme	37.
Tableau 08 : Les dilutions de l'huile essentielle dans le DMSO.....	45.
Tableau 09 : Résultats des tests biochimiques, et l'étude morphologique et de la mobilité des bactéries étudiées :.....	53.
Tableau 10 : Résultats des tests biochimiques (API STAPH) de <i>Staphylococcus aureus</i> et (API 20 E) de <i>Proteus mirabilis</i> et <i>Escherichia coli</i>	55.
Tableau 11 : Profils numériques des bactéries identifiées	56.
Tableau 12 : Résultats de l'antibiogramme des entérobactéries étudiées.....	57.
Tableau 13 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> étudiée.....	58.
Tableau 14 : Caractéristique organoleptiques d'HE de <i>Syzygium aromaticum</i>	60.
Tableau 15 : Quantités d'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> extraite par hydrodistillation	61.
Tableau 16 : Résultat du pH d'HE de <i>Syzygium aromaticum</i>	62.
Tableau 17 : Résultats de l'aromatogramme exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm)	66.

Table Des Matières

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction :	01.
-----------------------------	------------

Partie Bibliographique

Chapitre I. *Syzygium aromaticum*

I.1. Généralité :	03.
I.2. Histoire de l'épice :	03.
I.3. Description botanique de la plante :	05.
I.4. L'origine :	06.
I.5. Culture et récolte :	06.
I.6. Effet thérapeutique et Utilisation traditionnelle :	08.
I.7. Effet antimicrobien :	09.
I.8. Toxicité des huiles essentielles de clou de girofle :	09.

Chapitre II. Les Huiles essentielles

II.1. Définition :	11.
II.2. Répartition systématique des huiles essentielles :	11.
II.3. Procédés d'extraction des huiles essentielles :	12.
II.3.1. La distillation à la vapeur d'eau :	12.
II.3.2. L'hydro distillation :	13.
II.3.3. L'Hydrodiffusion :	14.

II.3.4. L'expression à Froid :	15.
II.3.5. L'extraction Par Solvants :	15.
II.3.6. L'enfleurage :	16.
II.4. Composition Chimique Des Huiles Essentielles :	16.
II.4.1 Les terpènes :	16.
II.4.2 Les composés aromatiques :	17.
II.4.3 Les composés d'origines diverses :	18.
II.4.4 Notion de chémotype :	18.
II.5. Facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles :	18.
II.6. Quelques domaines d'utilisation des huiles essentielles :	19.
II.7. La conservation des huiles essentielles :	19.

Chapitre III. Microorganismes cibles

III.1. Généralités :	20.
III.2. Les bactéries pathogènes :	20.
III.3. Les type de bactéries :	20.
III.3.1. Les bactéries à Gram Négatif :	21.
III.3.2. Les bactéries à Gram positif :	21.
III.4. Caractéristiques de quelques germes :	22.
III.4.1. <i>Escherichia coli</i> :	22.
III.4.1.1. Découverte :	22.
III.4.1.2. Caractéristiques :	22.
III.4.1.3. Habitat :	22.
III.4.1.4. Caractères cultureux :	23.
III.4.1.5. Le pouvoir pathogène et Mécanisme de pathogénicité :	24.
III.4.1.6. Résistance aux antibiotiques :	25.
III.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> :	25.

III.4.2.1. Caractéristiques :.....	25.
III.4.2.2. Habitat :.....	26.
III.4.2.3. Caractères cultureux :.....	27.
III.4.2.4. Pathogénicité et facteurs de virulence :	27.
III.4.2.5. Résistance aux antibiotiques :	28.
III.4.3. <i>Proteus mirabilis</i> :.....	29.
III.4.3. 1. Généralités :	29.
III.4.3. 2. Habitat :.....	29.
III.4.3. 3. Caractéristiques :	30.
III.4.3. 4. Caractères cultureux :	31.
III.4.3. 5. Le pouvoir pathogène :	32.
III.4.3. 6. Résistance aux antibiotiques :	32.

Partie Expérimentale

Chapitre IV. Matériel et méthodes

IV.1. L'Objectif du travail :	33.
IV.2. Matériel et méthodes :.....	33.
IV.2.1. Choix et origine des souches bactériennes testées :	33.
IV.2.2. Milieux de culture :.....	33.
IV.2.3. L'identification :	34.
IV.2.3.1. Etude macroscopique :	34.
IV.2.3.2. Etude microscopique :.....	34.
IV.2.3.3. Détermination des caractères biochimiques :	34.
IV.2.3.4. Calcul du profil numérique :.....	35.
IV.3. Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques :.....	35.
IV.3.2. Inoculation des géloses :	36.
IV.3.3. Dépôt des disques imprégnés d'antibiotiques :	37.
IV.3.4. Lecture des boîtes après incubation :.....	37.

IV.4. Effets antibactériens des huiles essentielles de <i>Syzygium aromaticum</i> :.....	38.
IV.4.1. Matériel végétal :	38.
IV.4.2. Extraction des HEs de <i>Syzygium aromaticum</i> par hydrodistillation:	38.
IV.4.3. La conservation de l'huile essentielle :.....	41.
IV.4.4. Calcul du rendement :	41.
IV.4.5. La mesure de PH :.....	42
IV.4.6. Aromatogramme :	43

Chapitre V : Résultats et discussion

V. Procédés d'études microbiologique :.....	47.
V.1. Identification des souches bactériennes :.....	47.
V.1.1. Examen macroscopique :.....	47.
V.1.2. Examen microscopique :.....	49.
V.1.3. Tests biochimiques :.....	50.
V.1.4. Calcul du profil numérique :.....	56.
V.2. Antibiogramme :.....	56.
V.3. Effets antibactériens des huiles essentielles de <i>Syzygium aromaticum</i> :	60.
V.3.1. Extraction des huiles essentielles de <i>Syzygium aromaticum</i> :	60.
V.3.2. Etude des propriétés organoleptiques :.....	60.
V.3.3. Rendement en huile essentielle	60.
V.3.4. La mesure de PH :.....	62.
V.3.5. Activité antimicrobienne (Aromatogramme) :	62.
Conclusion et Perceptives :.....	69.
Références bibliographiques :	71.
Annexe :.....	83.



Introduction
Générale



Introduction

L'antibiorésistance est reconnue comme un problème majeur en termes de santé humaine et animale au niveau international. En effet, l'émergence et la diffusion croissante des bactéries résistantes aux antibiotiques remettent en question l'efficacité de ces traitements tant chez l'homme que chez l'animal. ([Arabi, 2018](#))

Cette résistance se définit par leur capacité à résister à l'activité inhibitrice ou destructrice des antibiotiques employés selon plusieurs mécanismes : dégradation enzymatique, modification de la cible et modification de la perméabilité de la paroi cellulaire etc. ([Verraes et al., 2013](#)).

Ceci a poussé les recherches thérapeutiques vers des solutions alternatives, notamment la pharmacologie phytofilière et, en particulier, l'aromathérapie, source importante de médicaments potentiels grâce à leur richesse en métabolites secondaires (huiles essentielles, alcaloïdes, polyphénols...etc.) ([Girard, 2010](#)).

Actuellement, la recherche sur les plantes médicinales a permis de découvrir de nouveaux médicaments contre diverses maladies ([Derwich et al., 2010](#)). Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse des molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HEs) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire ([Bouzouita et Chaabouni, 2008](#)).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au giroflier (*Syzygium aromaticum*). Cette plante médicinale est utilisée traditionnellement, sa richesse en métabolites secondaires et plus spécifiquement en huile essentielle, confère plusieurs effets biologiques dont les activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anticancéreuses et antioxydantes, cependant, peu de personnes connaissent ses véritables propriétés. Les recherches sur l'histoire de cette plante montrent que les clous de girofle avaient autrefois beaucoup plus de valeur, dès leur essor durant les Grandes découvertes qui ont engendré le commerce des épices. Cette épice a su motiver plusieurs nations à partir à sa conquête et cela pendant plusieurs siècles ([Kacemi, 2017](#)).





Nous avons axé notre mémoire de fin d'étude sur le thème suivant : « Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* vis-à-vis quelques germes antibio-résistants ».

Ce mémoire est organisé en trois parties :

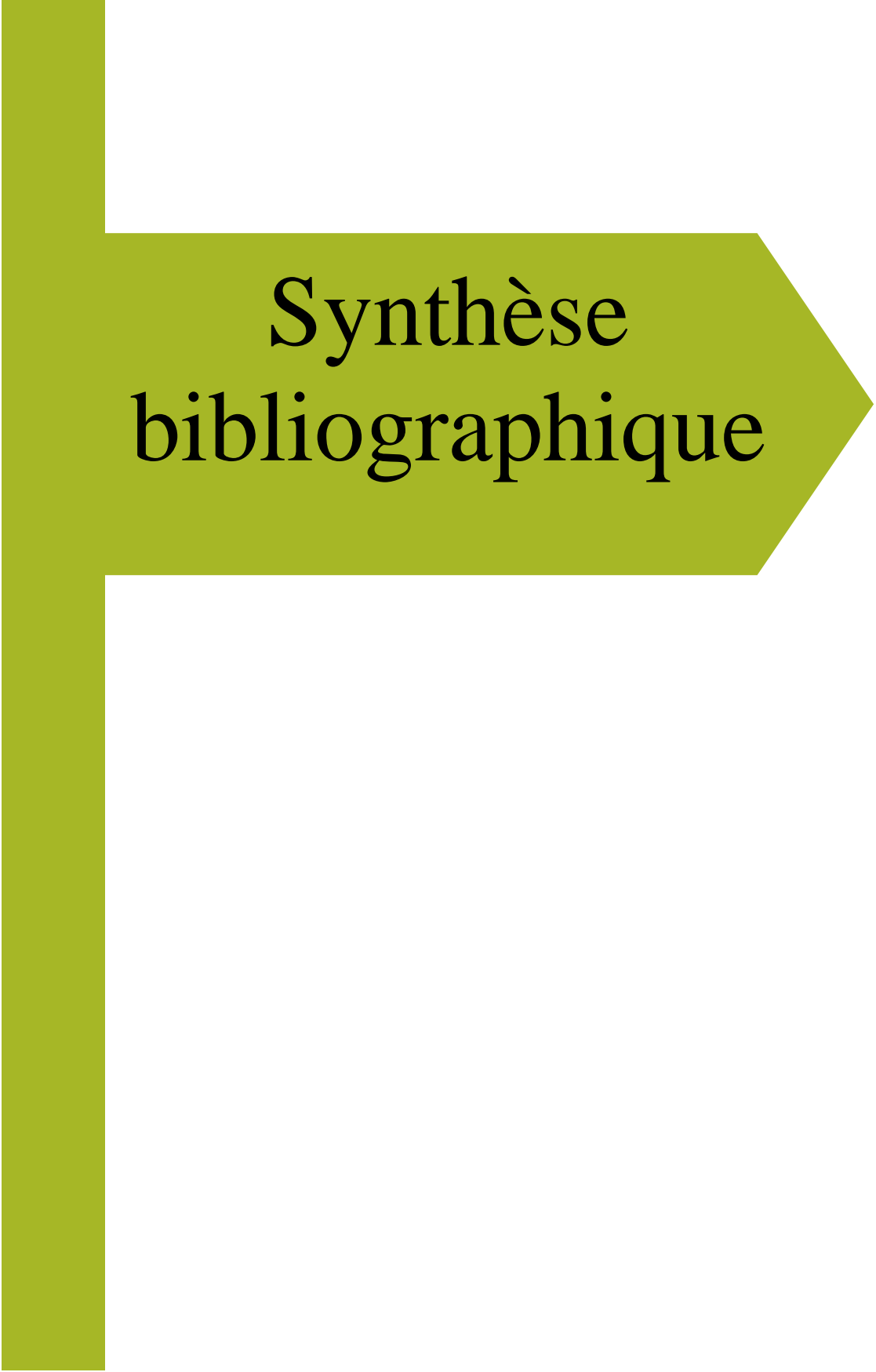
1. La partie bibliographique comporte trois chapitres :

- **Le premier chapitre** : est consacré à l'étude de la plante (*Syzygium aromaticum*), historique, origine et distribution, description botanique, culture et récolte, les propriétés thérapeutiques, toxicité de cette plante.
- **Le deuxième chapitre** : est une généralité sur les huiles essentielle (composition, répartition, et quelques domaines d'utilisation), en plus, il introduit les méthodes d'extraction les plus utilisées afin d'extraire ces composés aromatiques.
- **Le troisième chapitre** : est un aperçu sur le monde microbien (morphologie, le pouvoir pathogène, mécanisme de pathogénicité et la résistance bactérienne).

2. La partie expérimentale : elle comporte le protocole suivi (matériel et méthodes) qui consiste à extraire l'huile essentielle de cette espèce végétale par la méthode d'hydrodistillation afin de tester in vitro son activité antibactérienne par la réalisation d'un aromatoگرامme d'un côté et de l'autre côté la réalisation d'un antibiogramme.

3. La partie résultats et discussion : est une présentation des résultats obtenus et leurs discussions.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives à entreprendre à l'avenir.



Synthèse
bibliographique

Chapitre I





I. Syzygium aromaticum (Giroflier)

I.1. Généralité :

Syzygium aromaticum, communément appelé clou de girofle est un bouton floral non ouvert poussant sur un arbre appartenant à la famille des Myrtacées. Le bourgeon de clou de girofle est de couleur marron foncé et possède une odeur intense et légèrement astringente.

C'est une épice couramment consommée qui est utilisée pour la préparation de plusieurs plats raffinés dans de nombreux foyers, ce qui en fait une épice précieuse du monde. Les clous de girofle sont consommés sous forme d'épices entières ou moulus en poudre et mélangés à des régimes contenant des céréales, des légumineuses, des noix, des fruits, des légumes, du lait et des produits laitiers, outre son utilisation culinaire, il est également utilisé pour la gestion et le traitement de l'inflammation, des dommages au foie, du cancer, du diabète et d'autres maladies induites par le stress oxydatif pendant plusieurs siècles, probablement en raison de l'abondance de composés bioactifs tels que les constituants volatils et non volatils. (Adefegha et al, 2016).

L'huile de clou de girofle est médicinale et principalement utilisée pour aromatiser des pâtisseries, des sauces spéciales et des condiments, les utilisations courantes du girofle ont été attribuées à certaines de ses activités biologiques, insecticides et antioxydants (Oluwasina et al, 2019).

Le clou de girofle est une épice aromatique, cultivée en Inde, à Madagascar, au Sri Lanka, en Indonésie, dans le sud de la Chine et dans certaines régions d'Afrique.

Cette plante est considérée comme une plante exerçant un large éventail d'activités antibactériennes et anti oxydantes (Osanloo et al, 2018).

I.2. Histoire de l'épice :

Le clou de girofle était très bien connu des Chinois, et cela bien avant l'ère chrétienne. A cette époque, il fallait se rafraîchir l'haleine en mâchant quelques clous avant de pouvoir parler à l'Empereur, mais le giroflier n'était pas indigène à la Chine pour autant.

Il apparut en Europe vers le IV^{ème} siècle, lorsque l'empereur Constantin, offrit au pape Sylvestre des richesses d'or, d'argent, d'encens et d'épices parmi lesquelles plus de 50kg de clous de girofle. Il a également été rapporté qu'une petite boîte d'or contenant deux clous de girofle a été retrouvée dans une sépulture alsacienne datant du VI^{ème} siècle. Ce qui donne une idée de la valeur accordée à cette plante.





Il est d'usage de penser que les clous de girofle provenaient de Java, jusqu'à ce que les Portugais découvrent l'arbre producteur dans son pays d'origine : les îles Moluques.

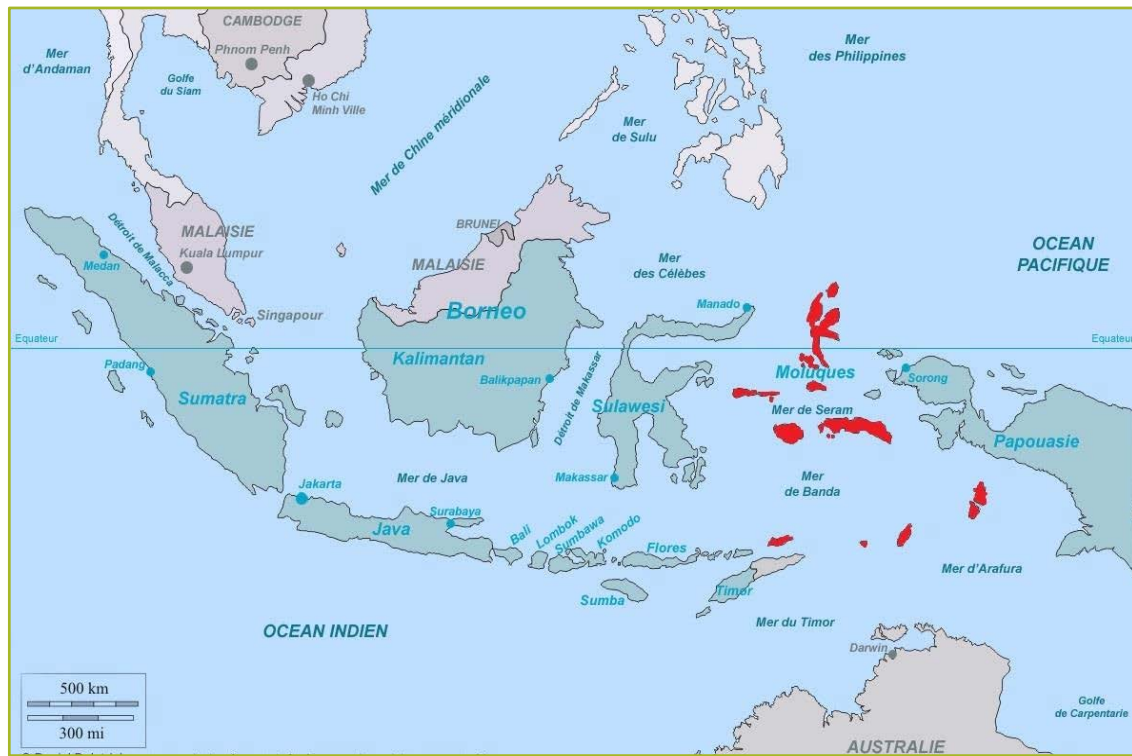


Figure 1 : Situation géographique des îles Moluques dans l'archipel indonésien (Barbelet, 2015)

En effet, autre fois, les arabes fournissaient l'Europe en épices, par l'intermédiaire de grands ports comme Venise. C'est à partir du XIII^{ème} siècle que commença une véritable course aux épices. En effet Marco Polo éleva Venise au rang du plus important port commercial. Les prix étaient tellement élevés que les autres pays européens ont contourné Venise et trouvé de nouveaux itinéraires pour ramener les épices.

Au Portugal, Vasco de Gama passa par le cap de bonne espérance et réussit à atteindre l'océan indien. Tout au long du XVI^{ème} siècle les portugais détinrent le monopole du clou de girofle. Celui-ci passa aux mains des hollandais en 1605.

A cette époque, les hollandais fournissaient main d'œuvre et bateaux aux grandes expéditions européennes. Ils ont su profiter de leur position dominante dans les transports maritimes pour prendre le contrôle des îles Moluques. Suite à une chute des prix, les hollandais brûlèrent les girofliers en vue de concentrer les plantations dans un petit groupe d'îles et notamment à Amboine, pour empêcher leurs





rivaux d'acheter les graines et de cultiver leurs propres arbres. Il était alors interdit d'en exporter les graines ou les plantules sous peine de mort. Les indigènes se révoltèrent dans une bataille sanglante car dans les îles Moluques, un giroflier était planté à chaque naissance. Les indigènes pensaient que le destin de l'arbre était lié au destin de l'enfant.

Malgré tous ces efforts pour garder l'exclusivité du commerce du clou de girofle, un compatriote, Pierre Poivre, intendant des îles de France et de Bourbon, réussit au terme de plusieurs années à faire sortir clandestinement le giroflier des îles Moluques en 1769. Parmi les cinq girofliers introduits à Bourbon, quatre périrent, et le survivant devient l'ancêtre de tous les girofliers présents aujourd'hui sur l'île. C'est par ce chemin que le giroflier fut introduit dans d'autres régions chaudes comme Cayenne, Saint Domingue et à la Martinique. Par la suite Zanzibar deviendra l'un des plus importants centres de production, puis viendra le tour de Madagascar et de l'Indonésie.

De nos jours, les clous de girofle sont disponibles dans toutes les grandes surfaces, à des prix accessibles, après avoir bouleversé des civilisations entières et couté la vie à de nombreux hommes (Barbelet, 2015).

I.3. Description botanique de la plante :

Tableau 01 : Classification botanique du *Syzygium aromaticum* (Goetz et al., 2010)

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Myrtaceae</i>
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i>



Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être nommé *Syzygium aromaticum*:

- *Caryophyllus aromaticus* L. (1753)
- *Eugenia caryophyllata* Thunb. (1788)
- *Eugenia caryophyllus* Spreng. (1825)
- *Eugenia aromatica* (L.) Baill. (1876)
- *Jambosacaryophyllus* (Thunb.) Nied. (1893)
- *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. (1939)

Actuellement, les noms *Syzygium aromaticum* et *Eugenia caryophyllus* sont tous les deux employés (Barbelet, 2015).

Cet arbre appartient à la famille des Myrtacées qui comprend des arbustes et des arbres avec environ 145 genres et plus de 500 espèces trouvées dans les régions tropicales et subtropicales du monde entier.

Le genre *Syzygium* comprend environ 500 espèces de plantes à fleurs à feuilles persistantes et les fruits de nombreuses plantes sont comestibles (Famuyide et al., 2019).

I.4. L'origine :

Le giroflier est un arbre originaire des îles Moluques en Indonésie. Ses boutons floraux, les clous de girofle, étaient au cœur du commerce des épices durant les grandes découvertes, et sont aujourd'hui produits en grande quantité à Madagascar, Zanzibar et toujours en Indonésie. (Barbelet, 2015)

I.5. Culture et récolte :

Le giroflier, comme beaucoup d'autres plantes de la famille des *Myrtacées*, est habitué aux climats tropicaux. Il a besoin d'humidité, de chaleur, et d'une altitude basse, ne dépassant pas 300 mètres. Les climats marins semblent favoriser son développement.

Le giroflier a besoin d'un sol volcanique (ou sédimentaire), au bord de mer, avec une forte pluviométrie bien répartie sur l'année, et un ensoleillement plus marqué à l'apparition des inflorescences (Karen, 2012)





Figure 02 : Un Giroflier de Madagascar (Barbelet, 2015)

La récolte des clous de girofle se fait au moment où ils contiennent le plus d'essence (lorsqu'ils sont roses et les pétales pas encore ouverts). Ces clous sont récoltés, après 6 à 8 ans de culture de l'arbre, 2 fois par an. Ce sont des boutons auxquels on ôte le pédicelle manuellement et que l'on met sécher au soleil jusqu'à ce qu'ils deviennent brun rouge : Boutons floraux appelés « clous ».



Figure 03 : Branche de giroflier portant les clous en inflorescence terminale (Barbelet, 2015)





Les racines, les rameaux, les feuilles les fleurs et les fruits contiennent tous une HE dont la composition diffère. Par exemple l'HE des feuilles contient seulement 2 à 3 % d'eugénol. L'huile essentielle de girofle provient de la distillation des boutons de girofler traités à la vapeur (Koroch et al., 2007)



Figure 04 : Séchage des clous sur des nattes à Madagascar (Barbelet, 2015)

I.6.Effet thérapeutique et Utilisation traditionnelle :

Le clou de girofle était connu des Egyptiens et faisait partie des offrandes retrouvées dans les tombeaux des momies. Les mandarins chinois l'utilisaient depuis 250 avant J.-C. pour parfumer leur haleine avant de s'adresser à l'empereur. Le clou de girofle a été retrouvé dans de la céramique syrienne de -1721 avant J.-C. le clou de girofle est connu dans les écrits ayurvédiques, où il est utilisé contre les douleurs, la sciatique, les problèmes rhumatologiques, comme antibactérien et antifongique et anesthésiant local dans le soin des plaies et dans les odontalgies. La médecine ayurvédique l'utilise dans les inflammations de la pitta. Les Yorubas d'Afrique de l'Ouest font une infusion pour les gastralgies, les douleurs dentaires, les problèmes gastriques, le vomissement, la fièvre et la diarrhée. Il serait aussi efficace dans le traitement de l'hyperglycémie. Au Maroc, les clous de girofle sont utilisés traditionnellement comme diurétiques, odontalgiques, tonicardiaques, aromates et condiments aux propriétés carminatives et stimulantes (Ghedira et al., 2010).



Le clou de girofle est un antiseptique, antispasmodique, antiparasitaire, antifongique, antibactérien, anesthésiant et antidépresseur du système nerveux central. L'huile essentielle de clou de girofle est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, c'est donc un anti-inflammatoire. C'est aussi un antiseptique puissant et un tonique gastro-intestinal et utérin, antinévralgique, anesthésiant local et un parasiticide (gale) (Aouadhi, 2010).

I.7. Effet antimicrobien :

Le girofle est composé de plus de 15% d'huile essentielle et de 70 à 90% d'eugénol, composé antibactérien, antiseptique et antifongique. Il y a, également, entre 9 et 15% d'acétate d'eugénol, qui possède également des propriétés antibactériennes, entre 5 et 12% de bêta-caryophyllène, qu'il a une action stabilisatrice sur la membrane des cellules basophiles, permet de réguler la libération d'histamine, D'autres actifs sont aussi présents, en plus petites quantités. (Dupont *et al* , 2007).

L'eugénol est un composé fortement anti-infectieux (bactéricide, virucide et parasiticide). Il est notamment actif sur la flore buccale. Il détruit les germes suivants : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Monilia albicans*...etc. Il détruit aussi les champignons à l'origine de certaines mycoses. (Werner *et al* , 2008).

1.8. Toxicité des huiles essentielles de clou de girofle :

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de *Citrus* contenant des furocoumarines). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux). Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le saffrole (*Sassafras*), l'estragole (*Artemisiadracunculus*), la β -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol (Abdelli, 2017)

Les huiles essentielles issues du giroflier peuvent contenir du Méthyl eugénol (en faible quantité). Il s'agit d'une substance classée comme génotoxique. Les mécanismes sont mal connus, mais l'hypothèse suggère que le méthyl eugénol pourrait induire une endoreduplication et inhiber la topoisomérase II. Ces phénomènes endommagent le matériel génétique des cellules.





Ce n'est pas la seule cause de cette toxicité. Un des facteurs principaux est la présence d'eugénol, ou plutôt la formation de son métabolite. En effet, l'eugénol est métabolisé en quinone méthide qui est lui toxique pour l'organisme. L'eugénol, en se métabolisant en quinone méthide produit un effet antioxydant (bénéfique), mais le métabolite ainsi formé est lui pro-oxydant (donc néfaste) ([Barbelet, 2015](#)).

Le clou de girofle peut être irritant pour les voies gastro-intestinales et devrait être évité chez des personnes ayant des ulcères gastriques, des colites ou le syndrome du côlon irritable.

Dans les surdoses, les clous de girofle peuvent aussi causer des vomissements, des nausées, la diarrhée et de fortes hémorragies digestives et peut également conduire à l'insuffisance rénale, des modifications de la fonction hépatique la dyspnée, la perte de conscience, des hallucinations et même la mort ([Aouadhi, 2010](#)).

Chapitre II





II. Les Huiles essentielles

II.1. Définition :

Les huiles essentielles, sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie ; l'aromathérapie (Arabi, 2018). Selon la norme ISO 9235, l'huile essentielle est un « produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de fruits de citrus (agrumes), soit par distillation sèche, après séparation de l'éventuelle phase aqueuse par des procédés physiques » (Barbelet, 2015). Il est important de distinguer huile essentielle et essence. Cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée. En revanche, une huile essentielle est le résultat d'extraction de l'essence, autrement dit, l'essence distillée et contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, l'huile essentielle ne contient pas de corps gras comme l'huile végétale (Dris, 2020).

II.2. Répartition systématique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales recensées, seulement 10% sont capables de synthétiser une essence. Ces plantes sont alors dites « aromatiques » (Abdelli, 2017). Dans le règne végétal, les huiles essentielles se retrouvent généralement chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont repartis dans une cinquantaine de familles dont beaucoup appartiennent aux ordres des Lamiales, des Astérales, des Rurales, des Laurales et des Magnoliales. Sur le plan quantitatif, les teneurs en huiles essentielles des plantes pouvant les contenir sont très faibles, souvent inférieures à 1 %. Des teneurs fortes comme celle du bouton floral du giroflier (15 %) sont rares et exceptionnelles (Samate, 2002).





II.3. Procédés d'extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses. Plusieurs techniques d'extraction des H.Es sont connues et utilisées elles sont choisies en fonction de la plante et de la fragilité de ses composants. À titre d'exemple pour extraire les HE du giroflier, la méthode de la distillation à la vapeur d'eau sera préférée (Barbelet, 2015).

II.3.1. La distillation à la vapeur d'eau :

C'est la technique la plus couramment utilisée pour la fabrication des HE, car elle minimise les altérations hydrolytiques (notamment des esters). Dans cette méthode, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. Cette opération s'accomplit dans un alambic. Un flux de vapeur d'eau traverse une cuve remplie de plantes aromatiques disposées sur des plaques perforées. Le but consiste à emporter avec la vapeur d'eau, les constituants volatils de la plante aromatique. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. Cette vapeur doit être juste assez chaude pour permettre le relâchement de l'HE, mais pas trop pour ne pas brûler l'élément végétal ou altérer l'HE. À la sortie de la cuve, cette vapeur saturée en composés volatils traverse un serpentin pour être refroidie. On obtient après refroidissement de l'eau liquide surmontée d'une couche d'huile essentielle insoluble dans l'eau. (Les HE ont une densité inférieure à l'eau donc elles flottent à la surface). Cette étape se fait dans un essencier (vase de décantation). Pour que la vapeur soit produite, la pression doit dépasser celle de l'atmosphère. Dans ces conditions, le point d'ébullition se situe au-dessus de 100°C, ce qui permet d'extraire plus vite l'HE tout en empêchant sa dégradation. Il n'y a plus qu'à séparer les deux phases : d'une part, l'huile essentielle, d'autre part, l'eau, qui contient des molécules aromatiques hydrosolubles : c'est l'**hydrolat aromatique** (appelé eau florale si ce sont des fleurs qui ont été distillées). Cet hydrolat est moins concentré que l'HE, il contient moins de 5% de molécules aromatiques. Pour certaines plantes, la distillation ne donne pas d'huile essentielle, mais uniquement de l'hydrolat aromatique (Laurent, 2017).

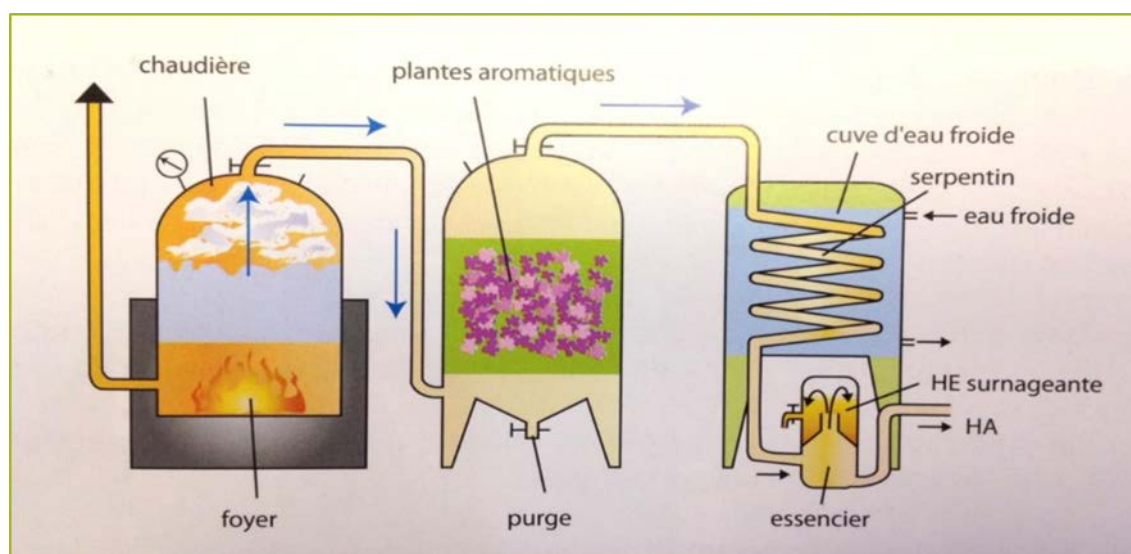
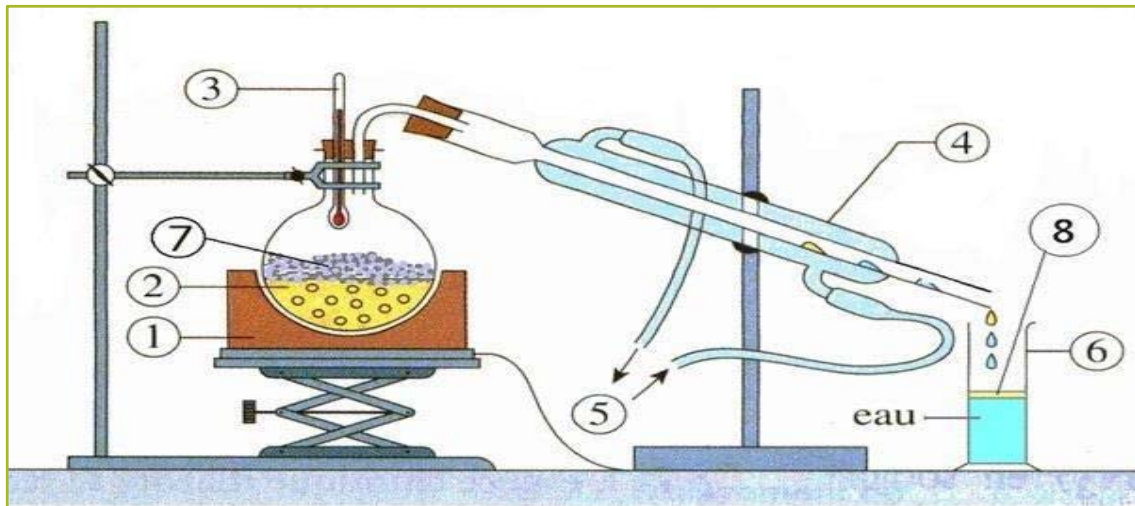


Figure 05 : Schéma du fonctionnement de la distillation à la vapeur d'eau (Barbelet, 2015)

II.3.2. L'hydro distillation :

C'est un procédé d'extraction parmi les plus anciens, apporté par les Arabes au IX^e siècle. Cette technique est très proche de la distillation à vapeur saturée. La seule grande différence est que la plante aromatique (entière ou broyée) est **directement immergée dans un alambic rempli d'eau**. Ce mélange est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide (Laurent, 2017) Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger. Cette méthode protège les huiles jusqu'à un certain point, dans la mesure où le fluide environnant agit comme barrière contre la surchauffe. À pression réduite (sous vide), la distillation à l'eau s'effectue en dessous 100°C, ce qui aide à protéger tant la matière végétale que l'HE qu'elle contient. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait (Lucchesi, 2005).



1- Chauffe ballon ; 2- Ballon ; 3- Thermomètre ; 4- Réfrigérant ; 5- Entrée et sortie d'eau ;
6- Erlenmeyer ; 7- Matière à extraire l'essence ; 8- Couche d'huile essentielle.

Figure 06 : Schéma illustratif de l'hydrodistillation simple (Laurent, 2017)

II.3.3. L'Hydrodiffusion :

C'est une variante de l'entraînement à la vapeur. Le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau-huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, elle permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (Arabi, 2018).

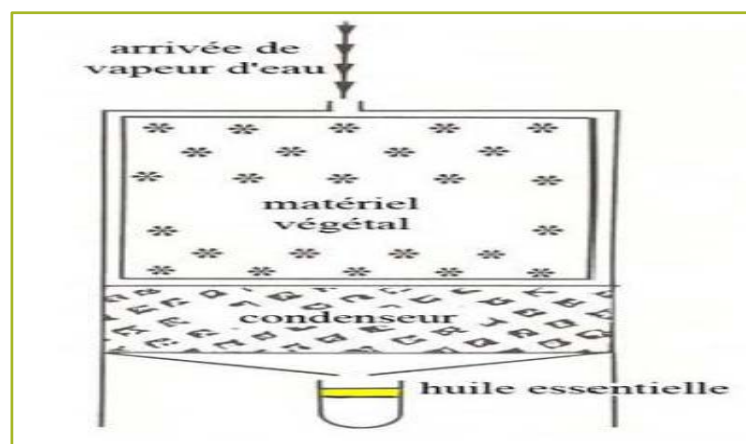


Figure 07 : Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion (Lucchesi, 2005)





II.3.4. L'expression à Froid :

Les huiles essentielles de fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid (Lucchesi, 2005). Le principe de cette technique consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (Arabi, 2018).

II.3.5. L'extraction Par Solvants :

L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet. La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer, dans un extracteur, un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement. Cependant, les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de la vapeur d'eau.

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient des hydrolysats (eau comme solvant), des alcoolats (éthanol dilué), des teintures (éthanol/eau), des résinoïdes (extraits éthanoliqes concentrés) et des concrètes (extraits à froid et à chaud au moyen de solvants divers). Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait, Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils, mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances (Boukhatem et al., 2019).



II.3.6. L'enfleurage :

Cette méthode se rapproche quelque peu de l'extraction par solvants volatils mais dans ce cas on utilise des graisses comme solvant, ces dernières ayant elles aussi une forte affinité avec les composés odorants, puis les huiles sont récupérées par dissolution dans l'alcool. Cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade (Lardry et haberkorn, 2007).

II.4. Composition Chimique Des Huiles Essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses (Lahlou, 2004). Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% de l'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces (Senatore, 1996). L'ensemble de ces constituants appartient, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Les huiles essentielles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (Abdelli, 2017).

II.4.1 Les terpènes :

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à cinq atomes de carbone (C_5H_8) (Hernandez-Ochoa, 2005 ; Fillatre, 2011).

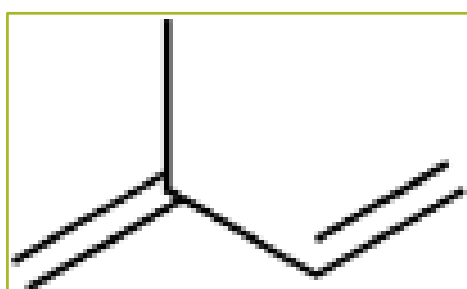


Figure 08 : Formule de l'isoprène (Fillatre, 2011)

Les composés terpéniques sont les constituants majoritaires des huiles essentielles, mais les molécules aromatiques n'en demeurent pas moins des composés importants, à l'exemple du Cinnamaldéhyde qui



Représente environ 75% de l'huile essentielle de cannelle (Garnéro, 1996).

II.4.2. Les composés aromatiques :

Les composés aromatiques des huiles essentielles sont principalement des dérivés du phénylpropane C₆-C₃, parmi lesquels se trouvent des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des phénols (chavicol, eugénol), des dérivés méthoxy (anéthol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, safrol) (Bruneton, 1999).

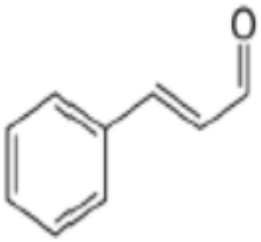
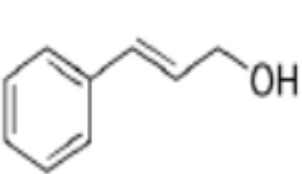
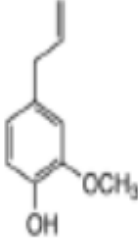


				
<i>Cinnamaldéhyde</i>	<i>Alcool cinnamique</i>	<i>Eugénol</i>	<i>Anéthole</i>	<i>Safrol</i>

Figure 09 : Exemples de composés aromatiques C₆-C₃ caractéristiques des huiles essentielles (Bruneton, 1999).

Il est cependant possible de rencontrer des composés C₆-C₁, comme la vanilline (assez fréquente) et l'antranilate de méthyle, ainsi que des lactones dérivées des acides cinnamiques (les coumarines, par exemple) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaient par la vapeur d'eau (Bruneton, 1999)

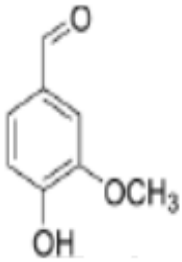
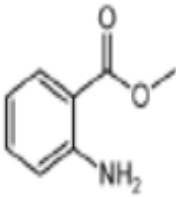
	
<i>Vanilline</i>	<i>Anthranilate de méthyle</i>

Figure 10 : Exemples de composés aromatiques C₆-C₁ rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999).



II.4.3. Les composés d'origines diverses :

Il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites odorantes, comme par exemple le (3Z)-hexen-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et α -linoléique) (Abdelli, 2017).

Si la concentration de ces composés est généralement très faible, ils peuvent cependant avoir une influence considérable à l'exemple de la β -damascenone. Cette molécule, issue de la dégradation des terpènes, ne représente que 0.14% de l'huile essentielle de rose (*Rosa damascena*). Elle est pourtant un contributeur majoritaire de l'odeur de cette huile (Dris, 2020).

II.4.4. Notion de chémotype :

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif présent dans l'huile essentielle. Cet élément permet de distinguer des huiles essentielles extraites d'une même variété botanique mais d'une composition biochimique différente (Abdelli., 2017).

Cette classification permet de sélectionner les huiles essentielles pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les huiles essentielles à chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (Pibiri, 2005).

II.5. Facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes (Garnéro, 1991 ; Bruneton, 1999). Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante (Abdelli, 2017).



II.6. Quelques domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont étroitement liées à l'histoire de l'humanité. En effet depuis les anciennes civilisations, l'homme utilise les substances odorantes à chaque instant de sa vie quotidienne, les principaux domaines d'application étant les suivants :

- **L'alimentation** : les huiles essentielles entrent dans la composition des aliments sous formes d'aromates ou d'épices et peuvent servir en même temps comme agents de conservation des aliments, grâce à leur effet antimicrobien, et ce d'autant plus qu'elles sont reconnues comme saines (Caillet Lacroix, 2007 et Obame, 2009).
- **L'industrie cosmétique** : C'est l'un des plus grands consommateurs des substances odorantes. En effet, les produits de toilettes (parfums, savons, laits, shampooings, pâtes et poudres, dentifrices), seront appréciés selon leur fragrance. L'homme étant toujours à la recherche de sensations nouvelles, les industries de la parfumerie et la cosmétique utilisent abondamment les substances odorantes volatiles pour l'élaboration des gammes de produits de plus en plus diversifiés (Lucchesi, 2005)
- **Domaine médical** : l'emploi des huiles essentielles en thérapeutique est lié à leurs propriétés Pharmacodynamiques diverses et souvent marquées. Parmi les plantes à huiles essentielles, on trouve les antiseptiques surtout employés dans les maladies des voies respiratoires ou urinaires, certaines agissent comme stimulants du système nerveux central, pouvant provoquer des convulsions à hautes doses.

Les huiles essentielles renferment des substances antivirales, elles ont aussi des propriétés antifongiques dues au menthol, au néo-menthol, à la menthone et à l'acétate de menthyle, des propriétés antibactériennes et également des activités antioxydants (Obame, 2009)

II.7. La conservation des huiles essentielles

Après distillation, les huiles essentielles doivent être filtrées, puis stockées dans des cuves hermétiques inaltérables entreposées dans une cave fraîche. Leur mise en bouteille doit se faire uniquement dans des flacons en verre opaque brun ou bleu pour assurer leur conservation à l'abri de la lumière et de l'oxygène (Laurent, 2017).

Chapitre III





III. Microorganismes cibles

III.1. Généralités :

Plusieurs chercheurs suspectaient l'existence des êtres vivants invisibles provoquaient les maladies, les premières observations au microscope furent sans doute réalisées entre 1625 et 1630 sur des abeilles et des charançons par l'Italien Francesco Stelluti à l'aide d'un microscope probablement fabriqué par Galilée. Cependant la première personne qui réellement observa et décrit des microorganismes est un Hollandais, amateur de microscope (Escott et al, 2006).

III.2. Les bactéries pathogènes :

Le monde bactérien, comprend plusieurs milliers d'espèces mais, seulement près d'une centaine est pathogène pour l'homme et l'animal. Une bactérie pathogène est susceptible d'induire, lorsqu'elle infecte un hôte, une maladie se traduisant par des signes anormaux, l'un des plus constants étant la fièvre. Mais il faut distinguer, les pathogènes authentiques qui déclenchent régulièrement une maladie chez des individus aux défenses immunitaires normales, des pathogènes dits opportunistes qui, dans la grande majorité des cas, ne sont à l'origine d'infections que chez des sujets aux défenses immunitaires altérées. (Leclerc et al, 1995).

III.3. Les type de bactéries :

On peut diviser le domaine des "*Bacteria*" en trois grands groupes. Les procaryotes à Gram négatif pourvus d'une paroi, les procaryotes à Gram positif pourvus d'une paroi et les procaryotes dépourvus de paroi ». La classification de Bergey sépare les bactéries en 4 divisions, selon la présence ou non d'une paroi et selon la nature de cette paroi, que l'on peut déterminer grâce à la coloration de GRAM. (Garrity et al, 2005)

1. Les bactéries à GRAM négatif.
2. Les bactéries à GRAM positif.
3. Les mycoplasmes (bactéries sans paroi).
4. Les archaebactéries.



III.3.1. Les bactéries à Gram Négatif :

Ils représentent plus de 66 % des bactéries répertoriées dans la classification de Bergey. Elles possèdent une paroi qui donne à la cellule sa forme. Cette paroi est formée d'une couche de peptidoglycane comprise entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique (Huc, 2011).

III.3.2. Les bactéries à Gram positif :

Moins nombreuses que les GRAM négatif. Leur paroi est plus simple mais plus épaisse. D'un aspect uniforme, elle est constituée de peptidoglycane dans lesquels sont dispersés d'autres composants comme les acides teïchoïques. (Huc, 2011)

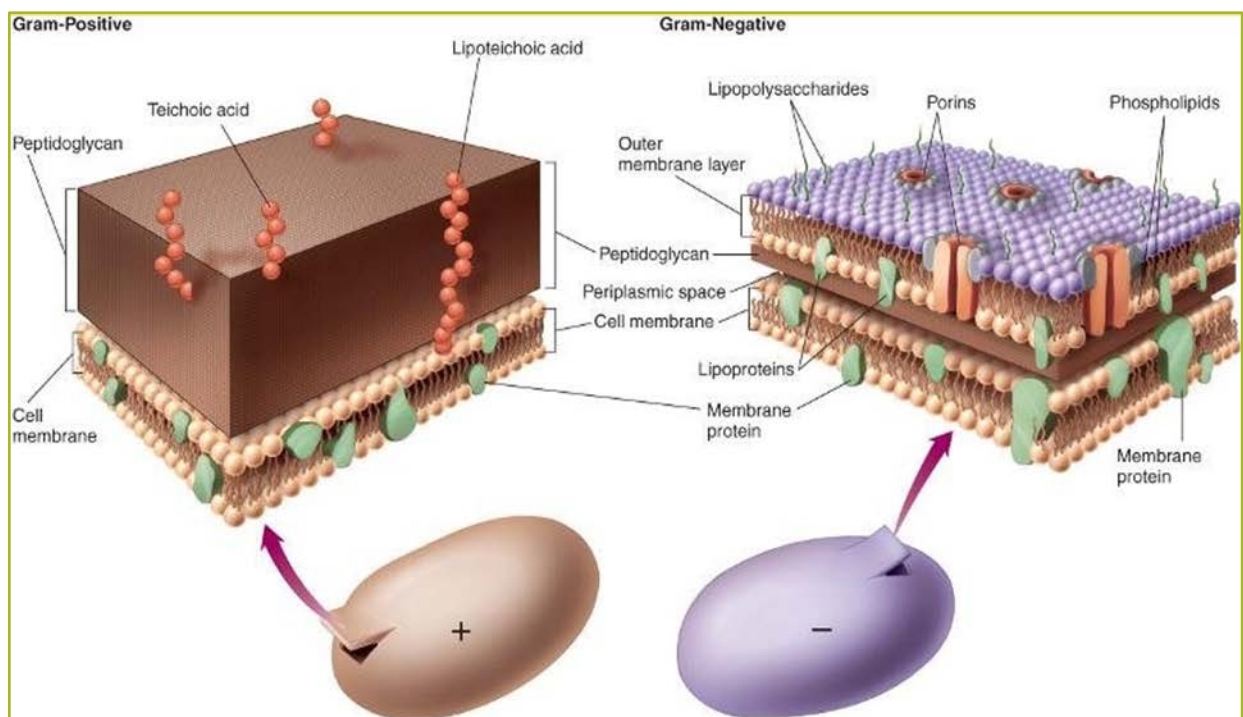


Figure 11 : Représentation de la structure des deux types de paroi Gram (+) et Gram (-)
(Huc, 2011)





III.4. Caractéristiques de quelques germes :

III.4.1. *Escherichia coli* :

III.4.1.1. Découverte :

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois la bactérie *Escherichia coli*, bactérie isolée à partir des selles de nourrissons, qu'il nomma tout d'abord *Bacterium coli commune*. Ce n'est que 70 ans plus tard que le nom d'*Escherichia coli* (*E.coli*) est réellement retenu en hommage aux travaux de T. Escherich (Diallo, 2013).

III.4.1.2. Caractéristiques :

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Entérobactériaceae*, appartenant à la classe des Protéobactéries. Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille à Gram négatif, aero-anaérobie facultatif, non halophile possédant une nitrate réductase et une catalase et dépourvue d'oxydase. *E.coli* est une bactérie mobile avec une structure flagellaire péritriche (quelques souches rares sont devenues immobiles) et non sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires, elle fermente le lactose et produit de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC) et l'ornithine décarboxylase (ODC). La majorité des souches fermentent le sorbitol (Baliere, 2016).

III.4.1.3. Habitat :

E.coli constitue une espèce bactérienne sous-dominante du microbiote aero-anaérobie facultatif intestinale de l'Homme et des animaux. La colonisation du tube digestif commence dès les premières heures après la naissance et le rythme de division d'*E. Coli* lui permet de garder pendant toute la vie de l'individu sa place dominante dans la flore (une division toutes les 20 min à 37 °C et en conditions favorables. Cela fait de cette bactérie un excellent indicateur de la présence de matière fécale dans les eaux. Cependant, certaines souches d'*Escherichia coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastroentérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies Cette bactérie représente 80 à 90 % des coliformes thermotolérants ou coliformes fécaux (capables de fermenter le lactose à 44.5°C). L'espèce *E.coli* est une bactérie versatile qui comprend à la fois les bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (Diallo, 2013 ; Loukiadis, 2007).





Tableau 02 : La classification d'*Escherichia coli*. (Soumaila, 2012).

Règne	Procaryote
Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

III.4.1.4. Caractères culturaux :

Elle se développe en 24 heures à 37 °C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées Sur gélose au sang.

Les colonies de *E. coli* sont lisses, gris terne, et de 2 à 3 mm de diamètre. Sur milieu Mac Conkey, Les colonies d'*E. coli* Lactose-positives, sont de couleur rose à rouge, plates, sèches et de 2 à 3 mm de diamètre, elles sont généralement entourées d'une zone rose plus foncée des sels biliaires précipités.

Les colonies *E. coli* lactose négatif produisent des colonies incolores sur Mac qui sont de 2 à 3 mm de diamètre. **la figure 12** représente la culture d'*Escherichia coli* lactose positif sur milieu Mac Conkey. (Hart et al., 1999).

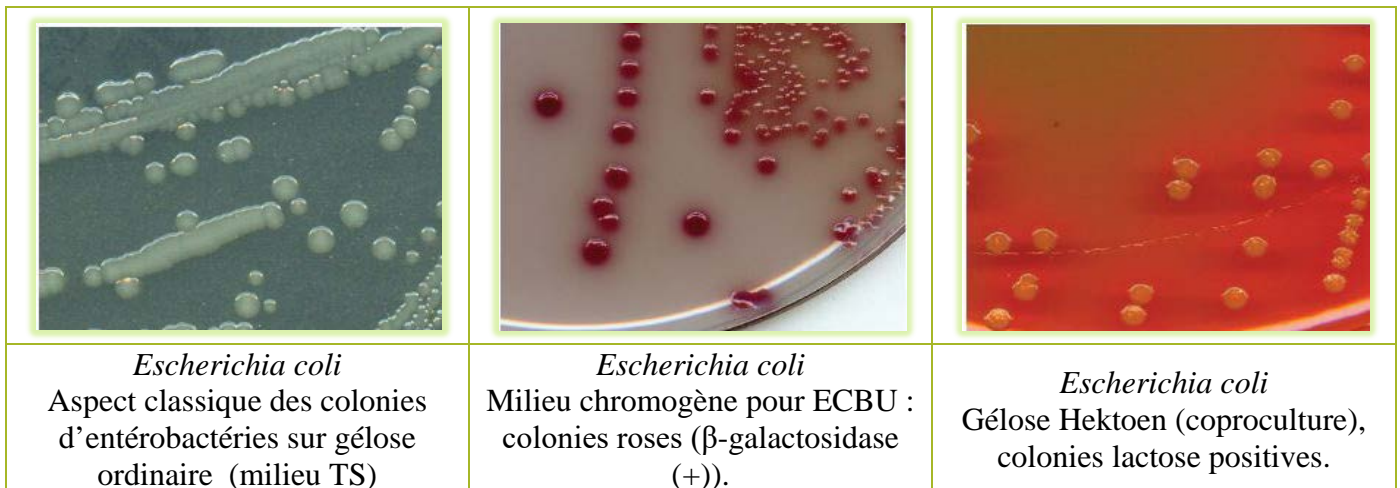


Figure 12 : Aspects des colonies d'*E. coli* sur différents milieux de culture ([Biokar site web](#)).

III.4.1.5. Le pouvoir pathogène et Mécanisme de pathogénicité :

Lors d'un processus infectieux, les pathogènes doivent pouvoir pénétrer dans l'organisme hôte, s'y établir de façon durable en échappant aux mécanismes de défenses de l'hôte et s'y reproduire. Durant l'évolution, les souches pathogènes d'*E. coli* ont acquis de nombreux déterminants de pathogénicité. Des facteurs de virulence intervenant à toutes les étapes du processus infectieux, de même que dans différents types d'infections, peuvent être décrits chez les diverses souches d'*E. coli* (Toe, 2018).

Chez les souches d'*E. coli* responsables de diarrhées, le mécanisme de pathogénicité se déroule de façon générale selon les étapes suivantes : après l'entrée des bactéries, une adhésion à la surface des cellules épithéliales se fait, grâce à des fimbriae et des adhésines.

- Des **adhésines**: conférant aux souches qui les possèdent la propriété de se fixer aux cellules épithéliales. De nature protéique, elles sont portées le plus souvent par des pili communs. L'adhérence constitue une étape essentielle de la pathogénèse des infections dues aux bactéries entériques.
- Autres facteurs : capsule, des **protéines** de la membrane externe et le **LPS**, les sidérophores. (Khayar, 2011).

Il se produit ensuite une colonisation de la muqueuse iléale, expression de la virulence qui mobilise le système de l'hôte et favorise une multiplication cellulaire abondante. A partir de cette étape, la suite du





mécanisme dépend du type de pathovars. Certaines souches détruisent les cellules de la bordure en brosse de la muqueuse intestinale, d'autres produisent une enterotoxine cytotoxique, provoquant une diarrhée aqueuse. Les pathovars dotés de cette propriété, envahissent la muqueuse et /ou produisent des toxines destructrices de tissus cellulaires suscitant une dysenterie et le plus souvent une réaction inflammatoire chez l'hôte (Toe, 2018).

III.4.1.6. Résistance aux antibiotiques :

E.coli est l'un des microorganismes les plus fréquemment isolés dans les échantillons cliniques. La résistance à plusieurs médicaments chez *E.coli* est devenue un problème bouleversant observé chez l'homme et a été reconnu comme contribuant à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Le contrôle de la dissémination des souches multirésistantes est problématique en raison du très petit nombre d'antibiotiques disponibles. En raison de la résistance croissante aux Céphalosporines, aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides, les carbapénèmes sont progressivement devenus le dernier agent de résistance aux infections potentiellement mortelles d'*E.coli* en raison de leur agent antimicrobien à large spectre. Néanmoins, avec une consommation croissante de carbapénèmes, l'émergence d'*E.coli* résistants aux carbapénèmes est devenue un grave problème de santé publique dans le monde entier (Tian et al., 2020).

III.4.2. Staphylococcus aureus :

III.4.2.1. Caractéristiques :

Staphylococcus aureus est un pathogène humain majeur qui a été mis en évidence en 1881 par Alexander Ogston. Après une analyse microscopique d'infections purulentes, Ogston a découvert des bactéries rondes, groupées en forme de grappes de raisin d'où l'association des termes grecs staphyle, grappe de raisin et kokkos, grain. Il est maintenant établi que *S. aureus* est une bactérie Gram-positif, aéro-anaérobie facultative qui produit une catalase et une coagulase, et qui peut tolérer une activité en eau très réduite ($A_w=0.83$). Dans des conditions optimales, la division cellulaire se produit approximativement tous les 20 min avec un diamètre de cellule allant de 0.5 à 1.5 μ m. *S.aureus* est capable de croître sur une large gamme de milieux de culture sélectifs ou non sélectifs.

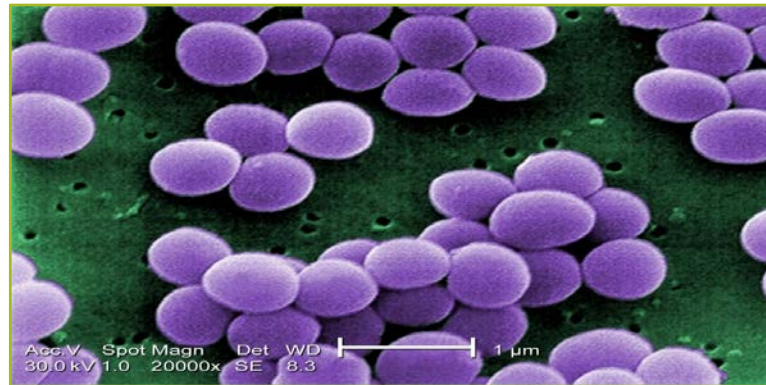


Figure 13 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000) (Alioua, 2015)

Les Staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif, leur ADN est faible en % GC, dans le phylum des Firmicutes, classe des *Bacilli*, ordre des *Bacillales* et de la famille de *Staphylococcaceae* (Belkacem, 2017).

Tableau 03 : Classification de *Staphylococcus aureus* (Belkacem, 2017).

Règne	Bacteria
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

III.4.2.2. Habitat :

C'est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses dont la niche principale est la fosse nasale. La colonisation est définie comme le portage asymptomatique de la bactérie et concerne environ





30 à 50% de la population générale au niveau nasal. D'autres sites peuvent également être colonisés par *S. aureus* tels que le pharynx, l'intestin, le périnée, la peau et les aisselles. Si l'Homme est le principal réservoir, ces bactéries sont également retrouvées dans l'environnement (eau, air, surfaces, aliments) et chez l'animal, notamment d'élevage (Couderc, 2015).

III.4.2.3. Caractères culturels :

Staphylococcus aureus sont des germes peu exigeants sur le plan nutritif et tolèrent de grandes variations, se cultivent facilement sur milieux usuels simples en aérobie dans des températures de 7 à 48,5 °C avec un optimale de 30 à 37 °C et un pH de 4,5 à 9,3 avec un optimal de 7 à 7,5. Il est capable de se multiplier dans des milieux contenant 5 à 10 % de NaCl. Ces caractéristiques confèrent à *S. aureus* la capacité de coloniser une grande variété d'aliments (Alioua, 2015).

En milieu liquide, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigments en milieu liquide.

Sur milieux solides, les colonies observées après 24 heures d'incubation sur gélose ordinaire sont larges (diamètres de 1 à 3 mm) circulaires, légèrement bombées lisses, luisantes. La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune ou jaune orangé (Belkacem, 2017).

III.4.2.4. Pathogénicité et facteurs de virulence :

Les infections à *S.aureus* sont dans la majorité de cas causées par les souches commensales du patient suite à l'expression d'un ensemble de facteurs qui lui procure son pouvoir pathogène et sa virulence. Les infections suppuratives superficielles dues à ce germe sont causées par les facteurs d'adhésion et des protéines de surface afin d'adhérer aux cellules et aux tissus de l'hôte causant ainsi des impétigos et infections de plaies. L'infection peut aller à un stade plus grave grâce aux enzymes dont le rôle est la dégradation des tissus pour atteindre la circulation sanguine, elles peuvent être plus profondes et même graves (septicémie, endocardites) en cas d'absence ou de non efficacité du traitement. De plus, *S.aureus* synthétise des toxines responsables du syndrome du choc toxique, des entérotoxines causant des toxi-infections alimentaires et d'autres facteurs dans le but d'échapper aux systèmes immunitaires de l'hôte (Davido, 2010).



Tableau 04 : Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Davido, 2010).

Facteur de virulence	Mécanisme d'action
Composants de l'enveloppe	
Capsule	Résiste à la phagocytose et diminue l'accès des neutrophiles à la bactérie, lui donnant le pouvoir de persistance dans le tissu infecté.
Facteur d'adhésion	
Protéine A(FnbpA)	Cette protéine s'adhère au fibrinogène et au plasma de l'hôte ce qui favorise l'attachement de <i>S.aureus</i> . D'autre part la protéine Ase lie sur la région Fc des Ig G dans une mauvaise orientation ce qui perturbe l'opsonisation et la phagocytose.
Biofilm	La formation de biofilm par les souches de <i>S. aureus</i> procure à cette dernière une persistance et une dispersion dans l'environnement et une meilleure résistance.
Enzyme	
Coagulase	La liaison du Clumping factor au fibrinogène du plasma et sa transformation en fibrine coagule le plasma De l'hôte ce qui favorise la dissémination du germe et sa résistance à la phagocytose.
Toxine	
Leucocidine de pantovalentine (PVL)	S'insère sur la membrane cytoplasmique des leucocytes et forme des pores. Elle est responsable de pneumonie nécrosante et des infections cutanées contagieuses.
Hémolysines	Des toxines ayant la capacité de former des pores sur la membrane des cellules eucaryotes provoquent une fuite osmotique. Comme elles ont aussi une activité cytolytique vis-à-vis des plaquettes et des monocytes.
Super antigènes	Ce sont des immuno-simulateurs de nature protéique résistant la chaleur et aux protéases, impliqués dans le syndrome du choc toxique et des gastro-entérites. Ils ont la faculté de déclencher la synthèse rapide des cytokines (IL2, IFN α , IFN β) à des niveaux toxique ce qui cause une altération des organes

III.4.2.5. Résistance aux antibiotiques :

Staphylococcus aureus est à l'origine de diverses infections d'origine communautaire et associées aux soins. De plus, *S.aureus* présente la capacité de former un biofilm sur les tissus natifs ou les dispositifs médicaux implantés, ce qui entraîne une tolérance aux concentrations élevées d'antimicrobiens. Les infections causées par des bactéries intégrées au biofilm sont difficiles à éradiquer en raison d'une matrice polymère extracellulaire, qui les protège des antimicrobiens et des cellules





immunitaires de l'hôte. En effet, l'hétérogénéité des populations de cellules de biofilm, y compris les cellules persistantes tolérantes aux antibiotiques caractérisées par un état lent ou non croissant, rend les bactéries intégrées au biofilm nettement moins sensibles aux antimicrobiens que leurs homologues planctoniques. De plus, l'émergence de la propagation de souches de Staphylocoques résistantes à différents agents antimicrobiens, dont la méthicilline, la vancomycine, la daptomycine et /ou la rifampicine, représente une menace sérieuse pour la santé mondiale. Ce scénario est encore compliqué par le fait que les pipelines de production pour le développement de nouveaux antibiotiques se sont taris au cours des dernières décennies, entraînant une exigence cruciale pour identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contrôler les infections bactériennes principalement dues à des bactéries multirésistantes intégrées dans un biofilm (Tkhilaishvili et al., 2020 ; Couderc, 2015).

III.4.3. *Proteus mirabilis*

III.4.3. 1. Généralités :

Le genre *Proteus* a été découvert par un pathologiste allemand nommé Gustav Hauser. C'est par analogie à Protée, Dieu de l'océan dans la mythologie grecque, qui avait le pouvoir de changer de forme à volonté, que Hauser a donné le nom à cette bactérie qui se caractérise par l'envahissement de la gélose. Les deux premières espèces *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* ont été initialement décrites par Hauser. (Leulmi, 2015). *Proteus mirabilis* causent 90% de ces infections. En raison de leurs habitats variés, elles ont plusieurs voies possibles d'infections humaines (Liu, 2010).

III.4.3. 2. Habitat :

Les *Proteus* sont largement distribués dans l'environnement naturel, y compris l'eau polluée, le sol et le fumier. En raison de leur activité protéolytique, leur capacité d'hydrolyser l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone, ainsi que de la désamination oxydative des acides aminés, ces bactéries sont impliquées dans la décomposition de la matière organique d'origine animale. Ils sont également présents dans les intestins des êtres humains et des animaux. Par conséquent, ils sont souvent isolés de matières fécales humaines et animales, ainsi que des sources associées telles que les eaux usées et de la viande en décomposition. *P. mirabilis* a été le plus souvent isolé des chiens, des vaches et des oiseaux (Leulmi, 2015).





III.4.3. 3. Caractéristiques :

Proteus est un Bacille à Gram négatif ; très polymorphe ; dans les cultures jeunes, il existe des formes longues et filamenteuses ces formes longues peuvent disparaître pour donner des petits bacilles droits de 0,3 à 3 μm , généralement elles sont très mobiles, possèdent des ciliatures très abondantes et longues (bactérie envahissante) (Leulmi, 2015). *Proteus* est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz, H₂S +, oxydase négatif, catalase positif, possède une nitrate-réductase, Rouge de méthyle positif et Voges- proskauer négative. Les caractères TDA, ONPG. Indiquent qu'il s'agit d'un *Proteus mirabilis*. Elle peut utiliser l'urée, forme des films transparents sur un milieu de croissance, utilise le citrate. Elle peut vivre dans des environnements hautement alcalins. Ces caractères biochimiques sont facilement mis en évidence sur les galeries miniaturisées (Archambaud, 2004). Les caractères biochimiques d'identification de l'espèce sont présentés dans le (tableau 05).

Tableau 05 : Caractères biochimiques de *Proteus mirabilis* (Archambaud, 2004)

Caractères biochimiques	<i>Proteus mirabilis</i>
Glucose	+
Lactose	-
Saccharose	-
H ₂ S	+
Citrate	-
Mannitol	-
Urée	+
Indole	+
TDA	+
VP	-
RM	+
ADH	-
LDC	-
ODC	+

La classification des bactéries de genre *Proteus* a changé au cours du XXe siècle. Le genre *Proteus* est actuellement défini comme appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* au sein de l'ordre *Enterobacteriale* qui regroupe l'espèce *Proteus mirabilis* (Bergey's, 1998).



Tableau 06 : Classification de *Proteus mirabilis* (Bergey's ,1998).

Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Entrrobacteriale
Famille	Entrrobacteriaceae
Genre	<i>Proteus</i>
Espèce	<i>Proteus mirabilis</i>

III.4.3. 4. Caractères cultureux :

Proteus mirabilis se développe en aéro-anaérobiose. Elle n'a pas d'exigence particulière. Il pousse bien sur milieux ordinaires (c'est une Entérobactérie) à 37°C. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Selon l'espèce, on identifie le caractère macroscopique de la colonie : type R (rugueux), type M (muqueux), type S (Smooth=lisse) (Leulmi, 2015).

- Sur milieu liquide (bouillon nutritif, bouillon trypto-caséine soja, eau peptonée) sont abondantes avec souvent un voile en surface et un dépôt, dégagent une odeur fétide particulière.

- Sur milieu solide gélose (envahissement) plusieurs facteurs favorise l'envahissement : concentration d'agar, température d'incubation ; présence d'électrolytes (Archambaud, 2004).



Figure 14 : Aspect du genre *Proteus* sur GN ([Www.slideplayer.fr](http://www.slideplayer.fr))



III.4.3. 5. Le pouvoir pathogène :

Les *Proteus* sont des pathogènes opportunistes, provoquant différents types d'infections, y compris les infections de plaies, la méningite du nouveau-né ou des nourrissons, la polyarthrite rhumatoïde (PR) et la gastro-entérite, cependant, ces bactéries sont rarement associées aux infections d'origine alimentaire. Ils peuvent également coloniser le tractus urinaire, dans certaines circonstances, où il est considéré comme un pathogène opportuniste et l'une des principales causes des infections des voies urinaires (UTI) chez les patients hospitalisés avec sondes urinaires ou à des anomalies structurelles et / ou fonctionnelles au niveau des voies urinaires, comme après une intervention chirurgicale dans le système génito-urinaire (Khayar,2011)

P. mirabilis provoque une infection urinaire avec la fréquence la plus élevée parmi toutes les espèces de *Proteus*. Il est impliqué dans les infections compliquées et les infections chez les patients cathétérisés pendant une longue durée. Les *Proteus* sont souvent associés aux infections nosocomiales et peuvent causer deux types d'infections urinaires, les infections hématogènes et les infections ascendantes, cependant, ces dernières sont les plus causées par ces micro-organismes (Leulmi, 2015).

III.4.3. 6. Résistance aux antibiotiques :

Les souches de *P. mirabilis* indole-négatif sont généralement plus sensibles aux antibiotiques que celles de *P. vulgaris*, *P. penneri*, et *P. hauseri*. *P. mirabilis* a une résistance intrinsèque à la nitrofurantoïne et la tétracycline résiste naturellement à la colistine, aux polymyxines et aux furanes, mais généralement il est sensible aux amino et uréido-pénicillines (ampicilline, amoxicilline, pipéracilline), aux céphalosporines, aux aminosides (amikacine, gentamicine et tobramycine), imipénème, ciprofloxacine, et triméthoprime-sulfaméthoxazole. Toutefois, des niveaux élevés de résistance à la ciprofloxacine ont été signalés pour *P. mirabilis* dans les hôpitaux où l'utilisation de cet agent est libre. La résistance intrinsèque à la tétracycline peut être utilisée comme un marqueur d'identification de ce micro-organisme (Esskouri, 2011).

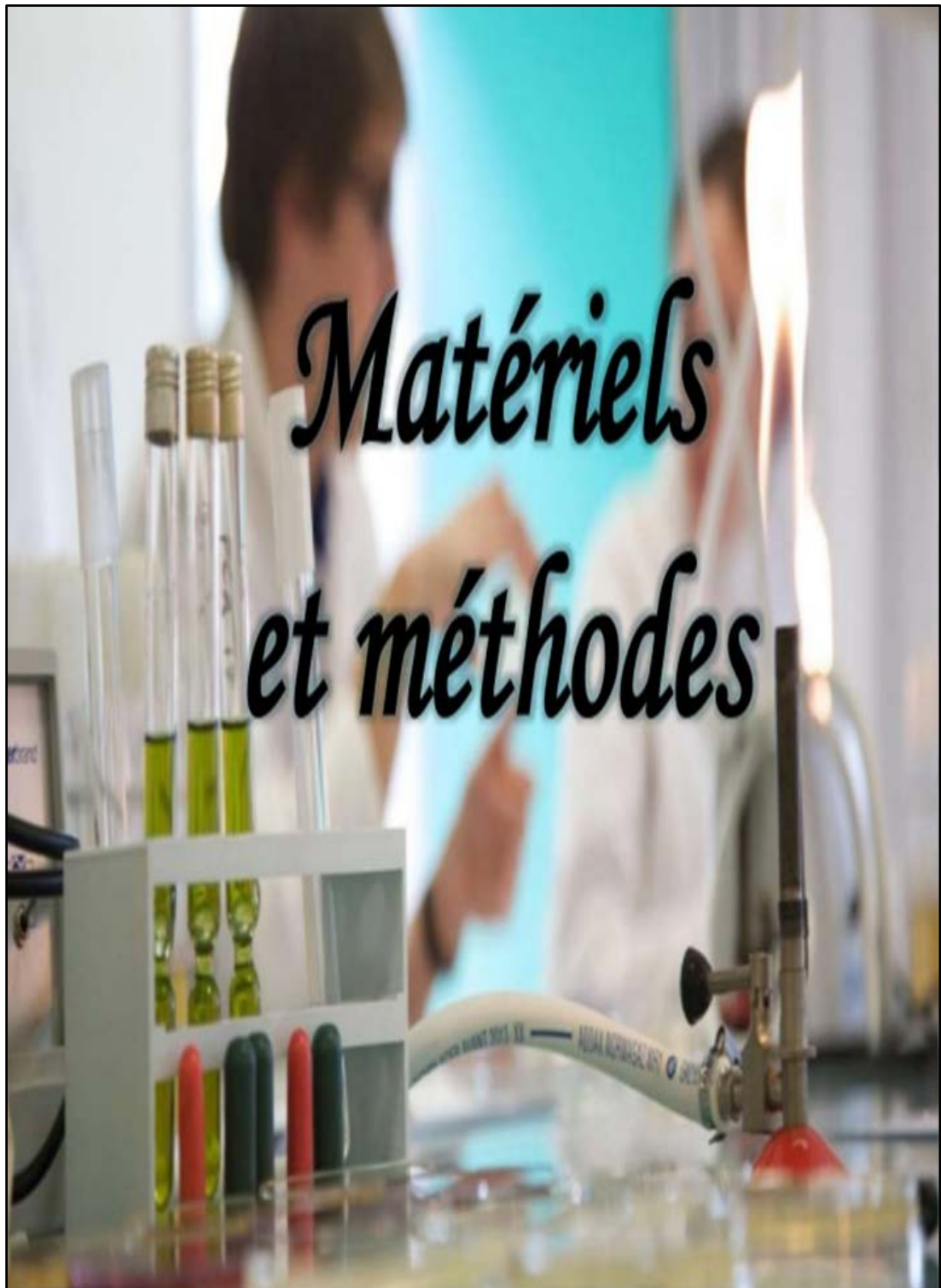
Une épidémie de *P. mirabilis* résistant à la fois à la gentamicine et à l'antiseptique chlorhexidine, ainsi que sept autres agents antimicrobiens, a été signalée comme étant la cause des infections des voies urinaires chez 90 patients en Angleterre en 1987. Lors d'une épidémie inhabituelle dans une pouponnière de l'hôpital, la souche de *P. mirabilis* qui était responsable de bactériémies et méningites des nouveau-nés était sensible à la tétracycline. Ce modèle antimicrobien très inhabituel a été utilisé comme marqueur de retracer l'épidémiologie (Leulmi, 2015).





Partie
Expérimentale

Chapitre IV





IV.1. L'Objectif :

La résistance aux antibiotiques est devenue une véritable préoccupation à cause de ceci beaucoup des études ont été réalisées pour la recherche des composés antimicrobiens alternatifs, en particulier à partir des extraits des plantes cela est devenu plus important que jamais grâce aux vertus thérapeutiques dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès scientifique d'aromathérapie.

Les huiles essentielles possèdent des activités antibactériennes importantes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants. Ce qui nous a conduit à évaluer scientifiquement, l'activité antimicrobienne de la plante *Syzygium aromaticum* (clous de girofle) pour prouver leur efficacité contre des bactéries multi-résistantes.

Cadre de l'étude :

La partie expérimentale de cette étude a lieu au laboratoire pédagogique de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem (UMAB) et au laboratoire des analyses médicales de l'hôpital Adjel Belatrech de Ain Tedeles (Mostaganem) de la période allant du mois d'Avril jusqu'au mois de Juin 2021.

IV.2. Matériel et méthodes :

IV.2.1. Choix et origine des souches bactériennes testées

Les souches bactériennes destinées aux tests antibactériens sont des souches cliniques relativement résistantes aux antibiotiques. Elles nous ont été aimablement fournies par le laboratoire des analyses médicales de l'hôpital d'Ain Tedeles (Mostaganem). Il s'agit d'*E. coli*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus*.

IV.2.2. Milieux de culture :

Tous les milieux de culture et d'identification utilisés pour l'isolement et la purification des souches bactériennes pathogènes d'origine clinique sont mentionnés dans l'**annexe (2)**. La gélose nutritive a été utilisée pour le repiquage de l'ensemble des souches étudiées ainsi que pour la conservation des souches à 4°C et la gélose Mueller-Hinton pour la réalisation des tests d'antibiogramme et d'aromatogramme.



IV.2.3. L'identification :

La confirmation de l'identité des souches bactériennes pathogènes isolées a été faite par des examens macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

IV.2.3.1. Etude macroscopique :

Les souches cibles ont été isolées sur des milieux sélectifs pour garantir leur pureté. L'examen macroscopique consiste à étudier l'aspect des colonies obtenues sur milieux solides après 24 heures de culture et à une température de 37°C d'incubation. Il nécessite une observation à l'œil nu, en lumière naturelle ou artificielle, afin de déterminer la taille, la forme, la pigmentation, la viscosité, le contour, la couleur des colonies bactériennes et la consistance parfois caractéristique de chaque espèce.

IV.2.3.2. Etude microscopique :

L'examen microscopique, permet d'étudier la morphologie des cellules bactérienne et leur mode d'association afin de les classer (Joffin et Leyral, 1996). Il inclut l'observation à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes) et l'observation après coloration, le plus souvent sur frottis sèches et fixes (coloration de gram). (**Annexe 1**).

La coloration de gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne pour distinguer et classer les bactéries à gram positif (+) et les bactéries à gram négatif (-), non seulement d'après leur forme, mais aussi selon leur affinité pour les colorants, liée à la structure de leur paroi (Brelière et al., 2009).

IV.2.3.3. Détermination des caractères biochimiques :

L'identification biochimique permet d'identifier les souches bactériennes en s'appuyant sur leurs caractères biochimiques, ces derniers peuvent révéler des informations vitales nécessaires pour identifier avec précision les genres et les espèces de diverses bactéries dans un échantillon.

Parmi les tests d'identification effectués nous avons le TSI (Triple Sugar Iron), le citrate de Simmons, le nitrate réductase, le mannitol mobilité, la catalase (**Annexe 1**), en plus des galeries d'identification biochimiques en tubes (macro-galerie) et de type API (Application



Programming Interface) soit l'API 20E et l'API Staph nécessaires pour déterminer le genre et l'espèce (**annexe 3**).

Les galeries, inoculées par des suspensions préalablement préparées, sont incubées pendant 24 heures à 37°C puis révélées à l'aide des réactifs spécifiques fournis avec les galeries (Holt *et al.*, 1994).

Enfin, à partir des suspensions précédentes, une gélose nutritive inclinée estensemencée puis incubée pour permettre la conservation des bactéries identifiées à 4°C.

IV.2.3.4. Calcul du profil numérique

Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupe de trois (chaque groupe de trois+ tests est numéroté 1, 2 et 4 et séparé du groupe voisin par un trait vertical). Chaque test donnant une réaction négative prend la valeur 0 (**annexe 3**).

Pour chaque groupe de trois, uniquement les chiffres positifs sont additionnés, on obtient un nombre à sept chiffres qui constitue le profil numérique de la souche étudiée (Joffin *et al.*, 1998).

IV.3. Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques (antibiogramme) :

L'antibiogramme est réalisé selon la méthode de diffusion de disques en milieu gélosé et permet de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (Burnichon *et texier*, 2003). Cette étude a pour but de comparer l'effet des antibiotiques avec l'effet de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*. Les antibiotiques testés sont mentionnés dans **le tableau 09**.

IV.3. 1. Préparation de l'inoculum :

La suspension est préparée à partir d'une culture jeune sur gélose nutritive de 18 à 24 heures, où quelques colonies des souches cibles ont été prélevées, diluées dans un tube à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif stérile, puis bien homogénéisées par la suite à l'aide de vortex.

Après 18 à 24 heures, la suspension bactérienne préparée et bien homogénéisée a été par la suite standardisée à 0.5 McF (McFarland), soit une D.O de 0,08 à 0,10 lue à une longueur



d'onde de 625 nm, par utilisation d'un spectrophotomètre UV (JENWAY 670) (**figure 15**). Le spectrophotomètre permet d'ajuster l'inoculum. L'appareil doit être calibré contre un étalon d'échelle de [McFarland](#).



Figure 15 : Lecture de la densité optique des suspensions bactériennes sur un spectrophotomètre (**photo originale 2021**)

IV.3.2. Inoculation des géloses :

L'inoculum bactérien doit être idéalement employé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

L'ensemencement des boites de pétri est réalisé à l'aide d'un écouvillon en coton stérile, un volume de suspension microbienne standardisée a été ensemencé par étalement sur un milieu de culture gélosé approprié (Mueller Hinton), tout en éliminant l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boites. L'écouvillonnage doit être effectué sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions. Cette étape est suivie par un séchage qui peut durer entre 10 à 15 min à température ambiante ([Denis et al., 2011](#)).



IV.3.3. Dépôt des disques imprégnés d'antibiotiques :

Les disques d'antibiotiques correspondants ont été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose inoculée et séchée sans être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide. Il est important que les diamètres des zones d'inhibition soient mesurables. Donc le nombre maximum de disques est de six pour les boîtes de 90 mm de diamètre.

Les boîtes de pétri ont été fermées et incubées idéalement (à température ambiante) dans les 15 min qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30 min. Elles ont été par la suite portées à incubation à 37°C pendant 18 à 24 h. Les boîtes, si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies.

IV.3.4. Lecture des boîtes après incubation :

La lecture des résultats a été faite par la mesure de la zone d'inhibition représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondant, ce qui permet de classer la bactérie dans l'une des catégories ; sensible (s), résistante (r) ou intermédiaire (i). Selon la standardisation nationale de l'antibiogramme en médecine humaine et vétérinaire de l'année 2011 et le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2018). (Ammari *et al.*, 2011 ; Jehl *et al.*, 2015).

Tableau 07 : liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

(Ammari *et al.*, 2011 ; Jehl *et al.*, 2015).

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge de disque en μg
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5
Pénicillines	Tétracycline	TE	30
Céphalosporines	Cefotaxime	CTX	30
Aminosides	Neomycine	NEO	30
	Gentamycine	CN	15
Bêtalactamines	Pénicilline G	P	1
Macrolides	Spiramycine	SP	100





IV.4. Effets antibactériens des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* :

IV.4.1. Matériel végétal :

Le choix de la plante aromatique *Syzygium aromaticum* (figure 16) a été dicté par sa richesse en substances naturelles, les graines de clou de girofle ont été achetées, sous forme séchée chez un herboriste de la ville de Mostaganem, tout en tenant compte de l'odeur forte et la couleur éclatante caractéristique de cette épice. Ces dernières ont été conservées dans des sachets hermétiques pour servir ultérieurement à l'extraction d'huile essentielle par la méthode de l'hydrodistillation (figure 17).



Figure 16 : Les graines du *Syzygium aromaticum* (photo original 2021).

IV.4.2. Extraction des HEs de *Syzygium aromaticum* par hydrodistillation :

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétaux. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter ; la distillation reste la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés aromatiques très volatils qui sont facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse (Bendjilali, 2004).

Plusieurs paramètres tels que l'état et la quantité du matériel végétal, la nature du solvant et la quantité d'eau utilisée, la durée de l'extraction, influent sur le rendement. Il a été vérifié que le rendement diminue fortement d'une part, quand la charge du matériel végétal augmente, et d'autre part, quand une



quantité d'eau trop importante est utilisée. La quantité d'eau optimale a été estimée au 1/10ème (p/v) de la quantité de la plante par rapport à l'eau (Boutedjiret, 1990).

Principe de l'hydro-distillation

Selon les recommandations de Bagard, (2008), le principe de l'hydro-distillation est le suivant :

La substance contenant l'espèce volatile à extraire est mélangée avec de l'eau et l'ensemble est porté à l'ébullition.

La phase gazeuse, contenant l'espèce volatile et la vapeur d'eau, arrive en haut de la colonne de distillation, passe dans le réfrigérant pour se condenser et donner le distillat qui comporte deux phases liquides séparables par décantation.

Technique

L'extraction des huiles essentielles du clou de girofle (HE) sont obtenues par la méthode d'hydro distillation réalisée à l'aide d'un dispositif d'entraînement à la vapeur d'eau illustré dans la **Figure 17**. Les graines du *Syzygium aromaticum* ont été nettoyées et débarrassés de tous éléments étrangers, ensuite ils ont été déposés dans la cuve sur une grille qui sépare entre la matière végétale et l'eau distillée.

La distillation a été réalisée par ébullition de 500g de matériel végétal pendant 3 h avec 2000 ml d'eau distillée jusqu'à l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur (Duru et al., 2003).

La vapeur d'eau et les molécules aromatiques condensées ont été récupérées dans une ampoule à décantée dans laquelle la décantation a été effectuée. L'huile essentielle obtenue a été séchée en utilisant le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) (**figure 18**), puis stockée à l'obscurité à 4°C dans un flacon en verre opaque (Gardeli et al., 2008).

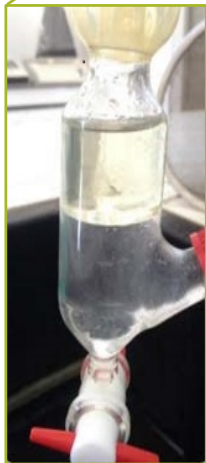
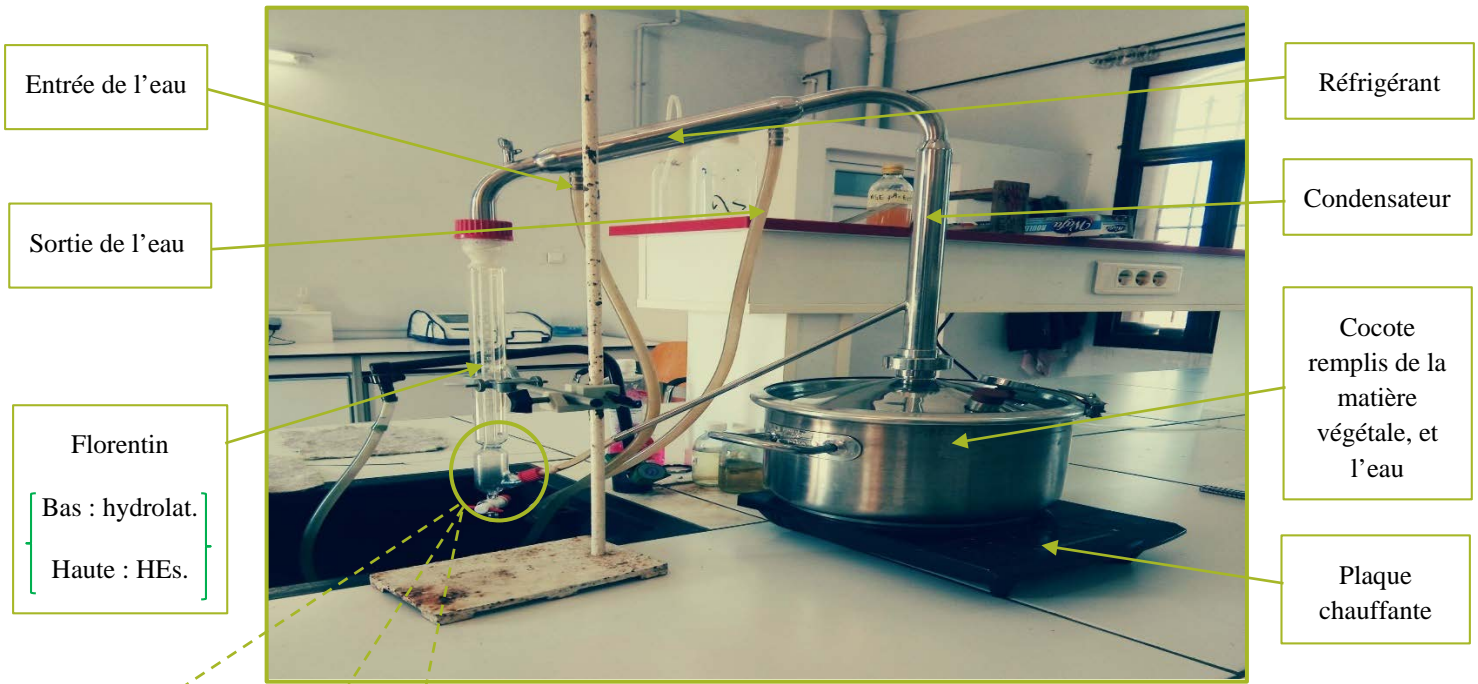


Figure 17 : Montage de l'extraction par hydro distillation (photo originale 2021).

La phase aqueuse (eau distillée + traces d'huile)

La phase organique (HEs)



Figure 18 : Etapes de séparation des phases de distillat (photo originale 2021).





IV.4.3. La conservation de l'huile essentielle :

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables, après l'extraction l'HEs a été préservée aseptiquement dans un flacon en verre opaque bien scellé de manière à la protéger de la lumière afin éviter toute dégradation des molécules, il faut également éviter le contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée de flacon), par la suite il faudra garder le flacon à une température basse entre (4 -5 °C) pour une utilisation ultérieure (Bekhechi *et al.*, 2008).



Figure 19 : L'huile essentielle de *S. aromaticum* conservée (photo originale 2021)

IV.4.4. Calcul du rendement :

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = (M'/M) \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en (%).

M': Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la plante en gramme.



IV.4.5. La mesure de PH :

Le pH ou « potentiel d'hydrogène » mesure l'activité chimique des ions Hydrogènes (H⁺) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre : elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7. (Hamadou et Touki, 2017).



Figure 20 : Détermination du pH d'HE de *S. aromaticum* (photo originale 2021).

Ainsi, les HE extraites ont été caractérisées par leur pH. La mesure de pH se fait à l'aide d'un papier pH. Quelques gouttes des HEs extraites ont été mises sur un bout de papier pH, le changement de la couleur du papier est comparé avec une gamme de couleurs qui varient selon le pH.



IV.4.6. Aromatogramme :

L'aromatogramme est un test de laboratoire qui permet aux phytothérapeutes d'analyser *in vitro* l'activité antibactérienne des huiles essentielles et de sélectionner plus précisément ceux qui sont capables de supprimer ou de détruire les germes pathogènes (Damian, 1995).

Il existe différents types d'aromatogrammes tout dépend des milieux utilisés : solides ou bien liquides. Alors que, dans la pratique quotidienne, le milieu solide est le plus simple et le plus facilement reproductible (Pibiri, 2005).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose (Hazzit *et al.*, 2009). On prépare des boîtes de pétri (90 mm de diamètre) en versant 20 ml de milieu Agar Mueller Hinton (MHA) et on laisse solidifier et sécher pendant 30 minutes.

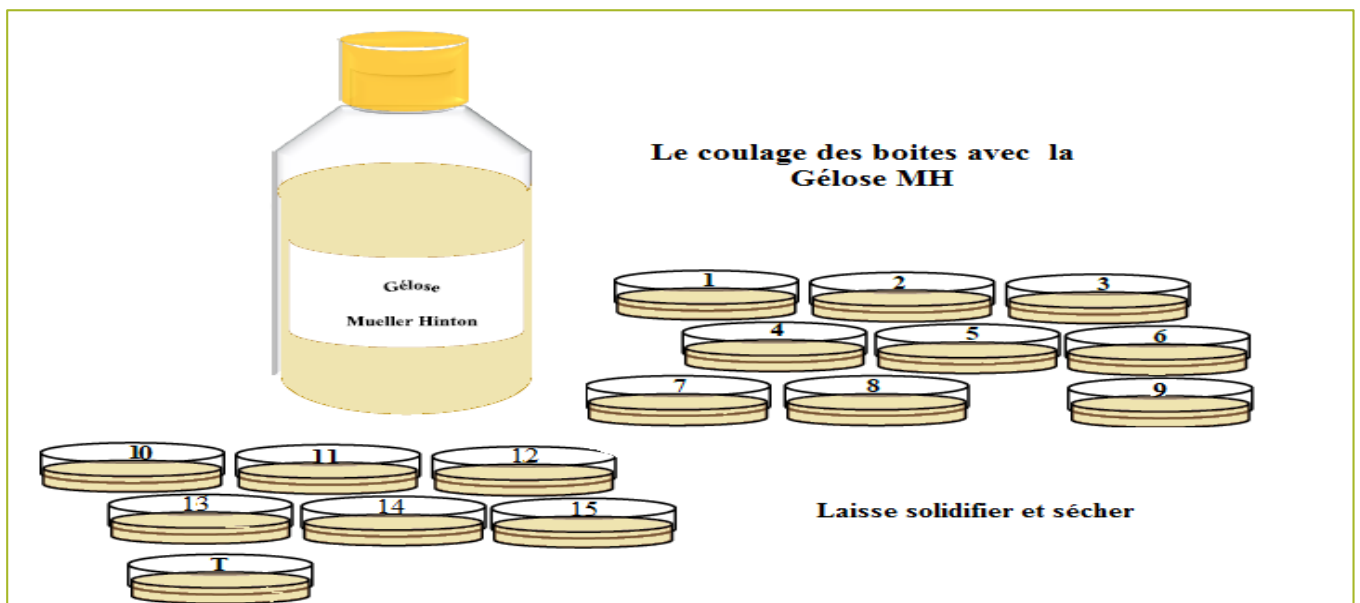


Figure 21 : le coulage des boîtes avec la gélose MH.

Entre-temps, la densité des suspensions bactériennes a été ajustée avec le bouillon nutritif stérile en utilisant un spectrophotomètre UV (Jenway 670) pour atteindre la concentration finale de 10^6 UFC/ml (Mohapatra *et al.*, 2011). Un volume de suspension microbienne standardisée a été ensemencé par étalement et étendu uniformément sur la gélose (MH) et laisser sécher pendant 5 min(**figure 22**).

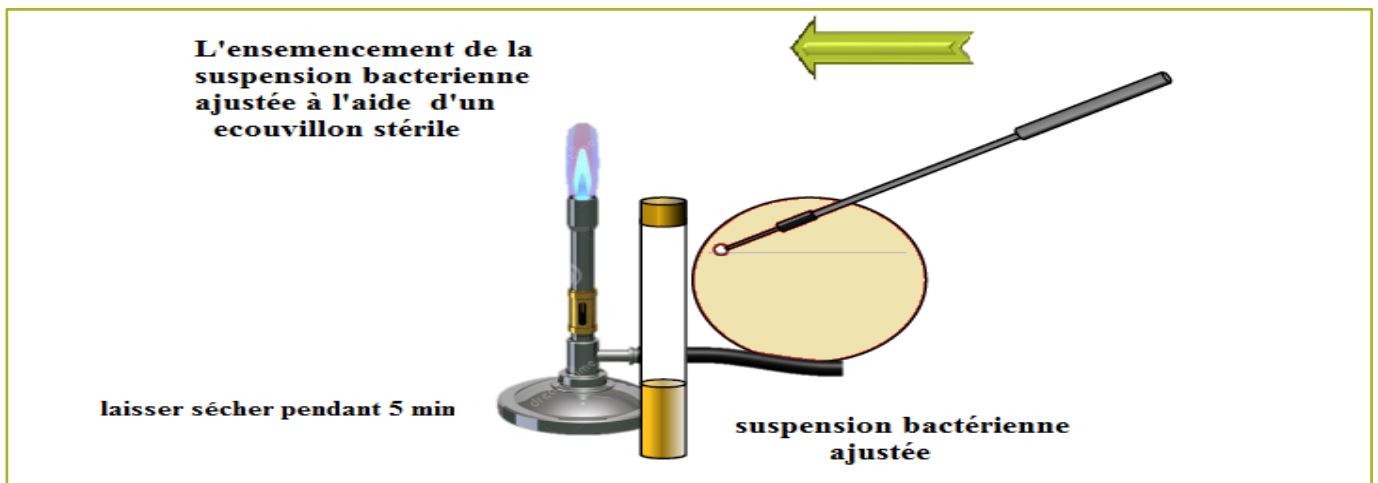
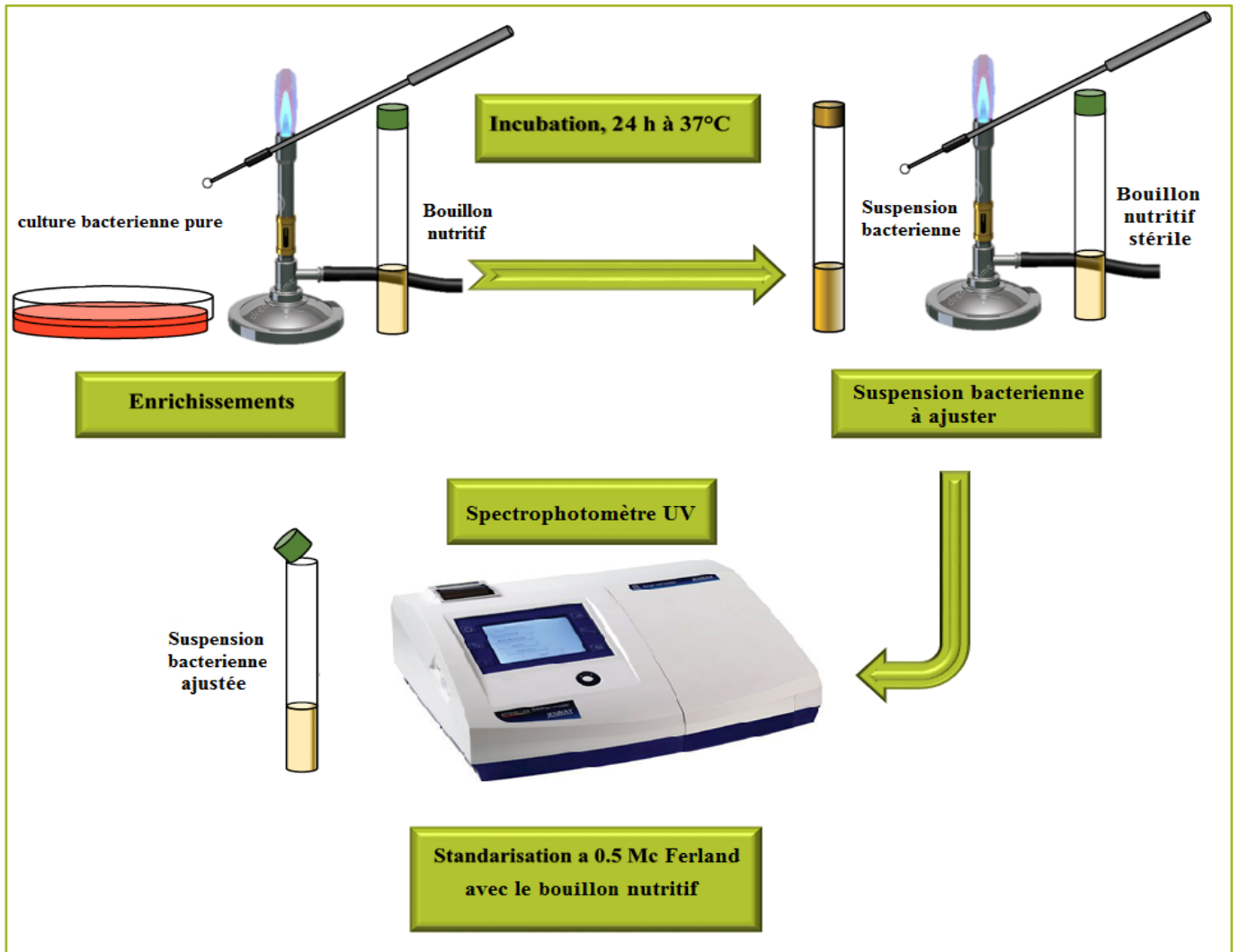


Figure 22 : les étapes de la standardisation de la suspension bactérienne à 0.5 Mc Ferland et leur étalement sur les boites gélosées de MH.



L'huile essentielle est diluée avec le DMSO afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les microorganismes testés. Les dilutions préparées sont mentionnées dans le **Tableau 08**.

Tableau 08 : Les dilutions de l'huile essentielle dans le DMSO.

Les concentrations (%)	Quantité de l'HE	Quantité de DMSO	Volume finale
100 %	5 ml	0 ml	5 ml
75 %	3,75 ml	1,25 ml	5 ml
50 %	2,5 ml	2,5 ml	5ml
20 %	1 ml	4 ml	5ml
5 %	0,25 ml	4,75 ml	5 ml
0 %	0 ml	5 ml	5ml

Des disques de papier Wattman stériles de 6 mm de diamètre sont déposés sur la surface des boîtes pétri qui sont préalablement coulé et inoculé avec les bactéries testées, ensuite ces disques ont été imprégnés avec 5 μ l d'huile essentielle de déférente concentration à l'aide d'une micropipette, sachant que la concentration exprimée avec 0 % est le contrôle négatif qui a été effectué par le dépôt de 5 μ l de DMSO comme boîte témoin (**Annexe 3**). Les boites sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 15 min à température ambiante puis incubées à 37 ° C pendant 24 heures. Chaque essai a été réalisé en trois répétitions. Comme il est mentionné à la (**Figure 23**)

Le diamètre des halos qui apparaissent autour des disques traduisant l'activité antimicrobienne a été mesuré à l'aide d'une règle. La sensibilité des bactéries testées à l'huile essentielle est classée selon les diamètres d'inhibition : bactéries résistantes ($\emptyset < 8$ mm), bactéries sensibles ($9 \text{ mm} < \emptyset < 14$ mm), bactéries très sensibles ($15 \text{ mm} < \emptyset < 19$ mm) et bactéries extrêmement sensibles ($\emptyset > 20$ mm) Les diamètres sont mesurés en mm et le résultat étant la moyenne des trois essais. ([Dris, 2020](#)).

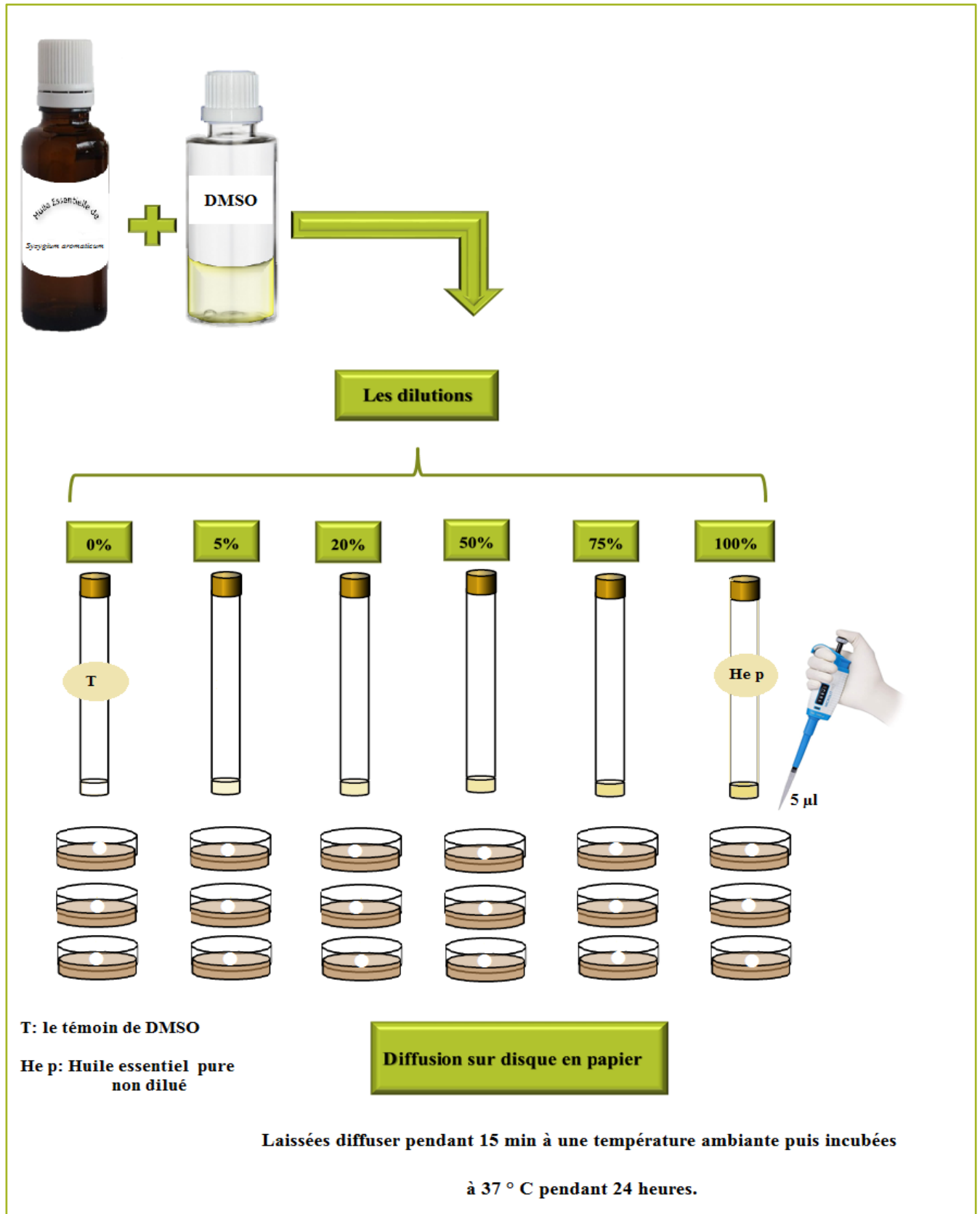


Figure 23 : les étapes de la dilution des huiles essentiels de *Syzygium aromaticum* et leur dépôt sur les disques en papier.



Chapitre V





V. Procédés d'études microbiologique

V.1. Identification des souches bactériennes

V.1.1. Examen macroscopique

L'observation macroscopique des colonies permet de l'étude de l'aspect des colonies à l'œil nu, dont la taille, la forme, la couleur, la consistance de chaque espèce.

Sur milieu BGA, des colonies (de 1 à 2 mm de diamètre) rondes plus ou moins régulières de couleur jaune claire, peu bombées, caractérisent le genre *Escherichia* (**Figure 24**).

Le milieu BCP facilite la différenciation des colonies par le caractère lactose. Il inhibe l'envahissement de la surface de la boîte par des nappes de *Proteus* car il ne contient pas d'électrolytes. Il contient une base nutritive ordinaire permettant la croissance des bactéries non exigeantes et le lactose comme un critère de différenciation : la fermentation du lactose est révélée par le virage de couleur du milieu.

- Colonies jaunes ; bactéries lactose (+).
- Colonies bleues ; bactéries lactose (-).

Sur ce milieu (**Figure 25**), l'observation macroscopique montre des colonies de taille moyenne (1 à 2 mm) pourpres (lactose négative), entourées de plusieurs vagues successives envahissant la gélose, rondes plus ou moins régulières, peu bombées, transparentes avec une odeur désagréable. Ces caractères cultureux correspondent au *Proteus mirabilis*.

La présence d'une β -galactosidase conduit à la dégradation du lactose présent dans le milieu, le pH de celui-ci diminué et est révélé par le virage de l'indicateur coloré, le pourpre de bromocrésol ([Vernozy-rozand et al., 1997](#)).

La culture de *S. aureus* obtenue sur milieu Chapman (**Figure 26**), se caractérise par des colonies (de 1 à 2 mm de diamètre), ayant des formes sphériques, lisses, luisantes et bombées, certaines souches produisent un pigment jaune orangé, mais cette production est irrégulière, car certaines donnent des colonies blanches ; le caractère pigmentaire n'est pas propre à l'espèce ([Avril et al., 2000](#)).

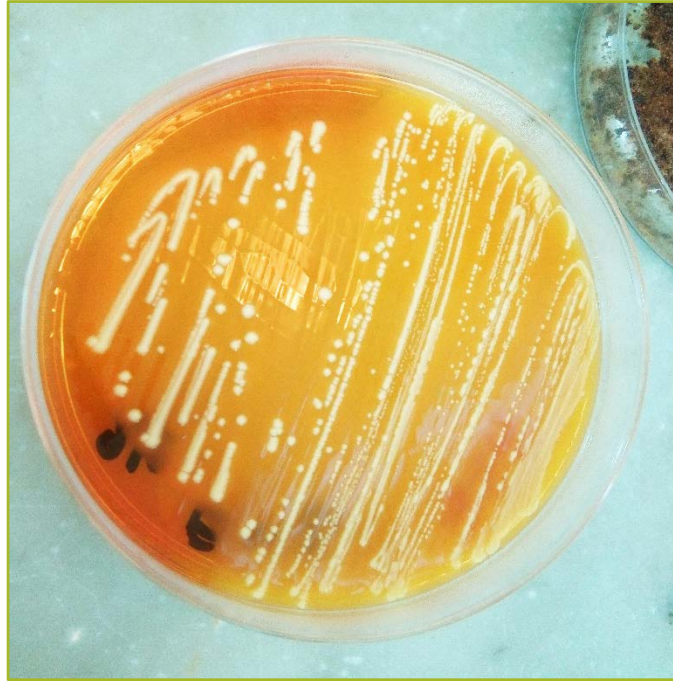


Figure 24 : Aspect macroscopique d'*Escherichia coli* sur gélose

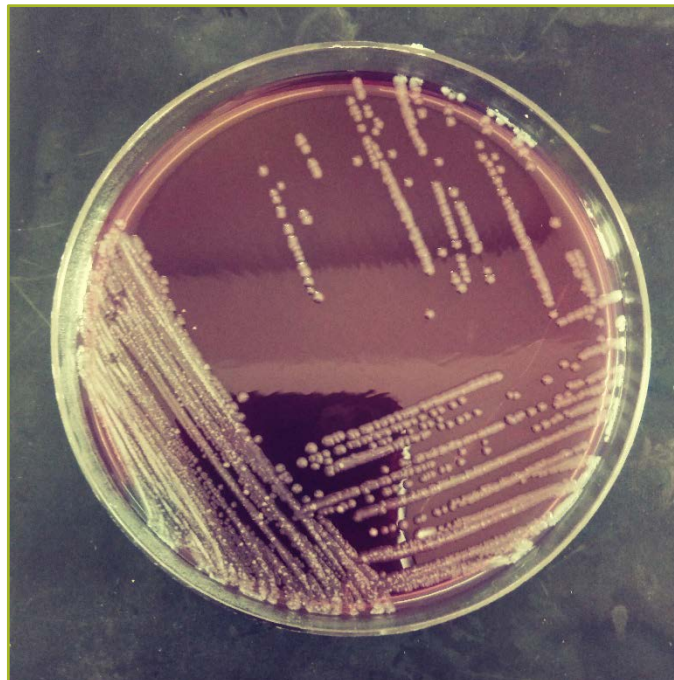


Figure 25 : Aspect macroscopique de *Proteus mirabilis* sur gélose





Figure 26 : Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur gélose

V.1.2. Examen microscopique

V.12.1. Etat frais

Les bactéries examinées à l'état frais apparaissent mobiles ou immobile selon l'espèce (**tableau 09**).

V.1.2.2. Coloration de gram

Sous microscope optique et à émergence au grossissement X100, la coloration de Gram réalisée à partir des colonies distinctes, montre la présence de bactéries roses donc à coloration de Gram (-) négatif, de forme bacillaire et coccobacille ainsi que d'autres bactéries violettes à coloration de Gram positif, de forme cocci (**Figure 27**).



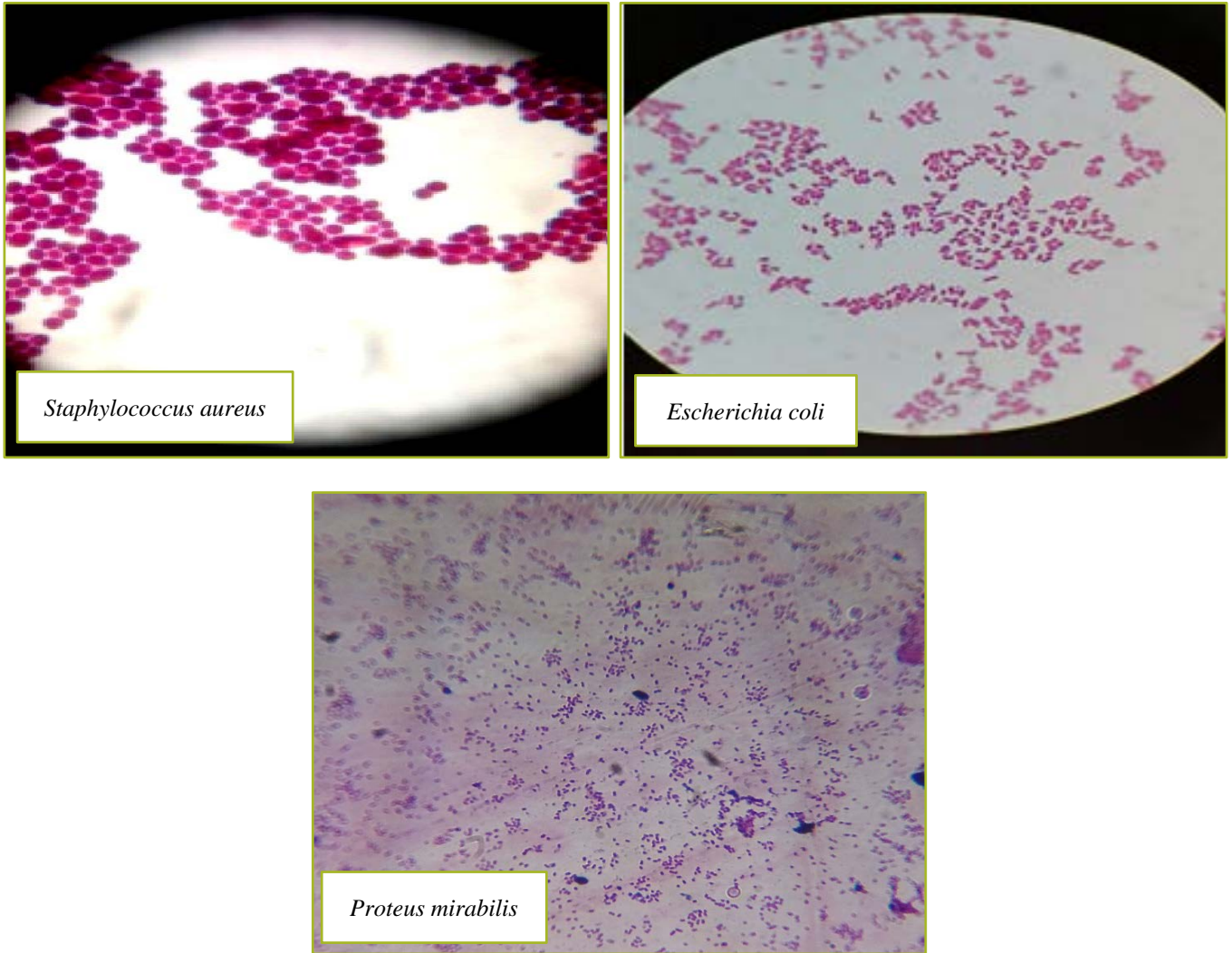


Figure 27 : Coloration de Gram des différentes bactéries isolées (grossissement X100).

V.1.3. Tests biochimiques

Le TSI en tube est un milieu utilisé pour la différenciation des entérobactéries, basé sur la production de sulfure d’hydrogène et la fermentation du lactose, du saccharose et du glucose.

Après incubation, la production d’acide sur la pente et dans le culot, et les productions de gaz et d’H₂S sont observés (**figure 28**). Une pente alcaline et un culot acide (rouge/jaune) indique la fermentation du glucose uniquement. Une pente acide et un culot acide (jaune/jaune) indique la fermentation du glucose, du lactose et/ou du saccharose. Une pente alcaline et un culot alcalin (rouge/rouge) indique que ni le glucose ni le lactose n’ont été fermentés. Des fissures ou des bulles dans le milieu indiquent une production de gaz. Un précipité noir dans le culot montre une production d’H₂S.

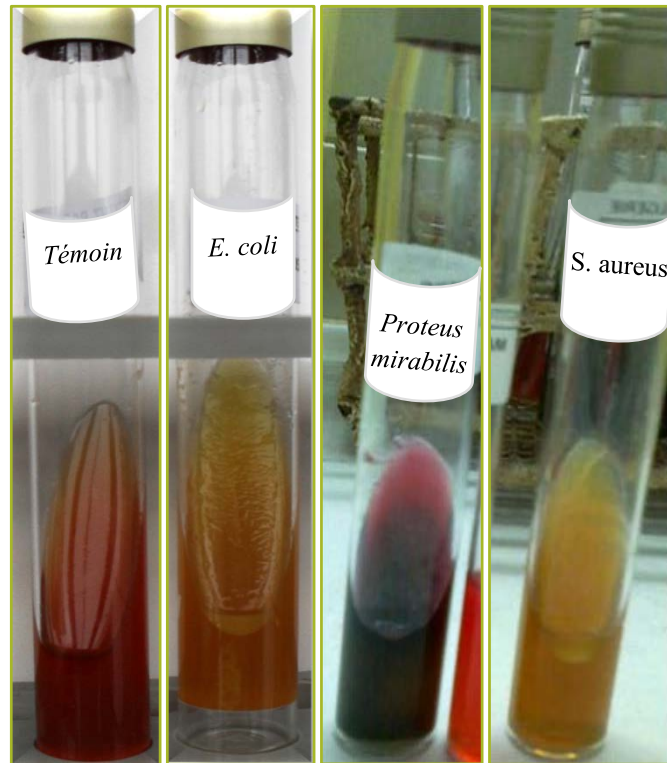


Figure 28 : Fermentation des sucres et production du gaz chez (*E. coli*, *Proteus mirabilis* et *staphylococcus aureus*) en milieu TSI

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La présence d'une catalase active (**figure 29**) chez les bactéries isolées est traduite par un dégagement gazeux abondant sous la forme de mousse ou de bulles d'oxygène, due à la dégradation de l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène comme l'indique la réaction suivante (Holt *et al.*, 1994) :



Figure 29 : Test de la catalase





Figure 30 : Résultats des tests biochimiques de la galerie classique





Les résultats obtenus à partir de l'étude morphologique et les tests biochimiques des souches étudiées sont indiqués dans le **tableau 09**. Les réactions produites (**figure 30**) au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages de couleurs spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Annexes 3**).

Tableau 09 : Résultats d'étude morphologique, de mobilité et des tests biochimiques des bactéries étudiées

Souches Milieu	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Gram	Négatif (-)	Positif (+)	Négatif (-)
Forme	Coco bacille	Cocci en amas	Bacille
TSI	GLU+ LAC+ Gaz (+) H ₂ S (-)	GLU+ LAC+ Gaz (+) H ₂ S (-)	GLU+ LAC - Gaz (+) H ₂ S (+)
Mannitol et Mobilité	Mannitol (+) Mobile	Mannitol (+) Immobile	Mannitol (-) Mobile
Citrate de Simmons	Négatif (-)	Positif (+)	Positif (+)
Nitrate Réductase	Positif (+)	Positif (+)	Positif (+)
Recherche de Catalase	Positif (+)	Positif (+)	Positif (+)
Clark et Lubs	VP (-) RM (+)	VP (+) RM (-)	VP (-) RM (+)

Négative : (-).

Positive : (+).



Les résultats obtenus à partir des galeries API 20 E et API STAPH, sont indiquées dans le **tableau 10**. Les réactions produites (**figure 31**) au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages de couleurs spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Annexes 3**).

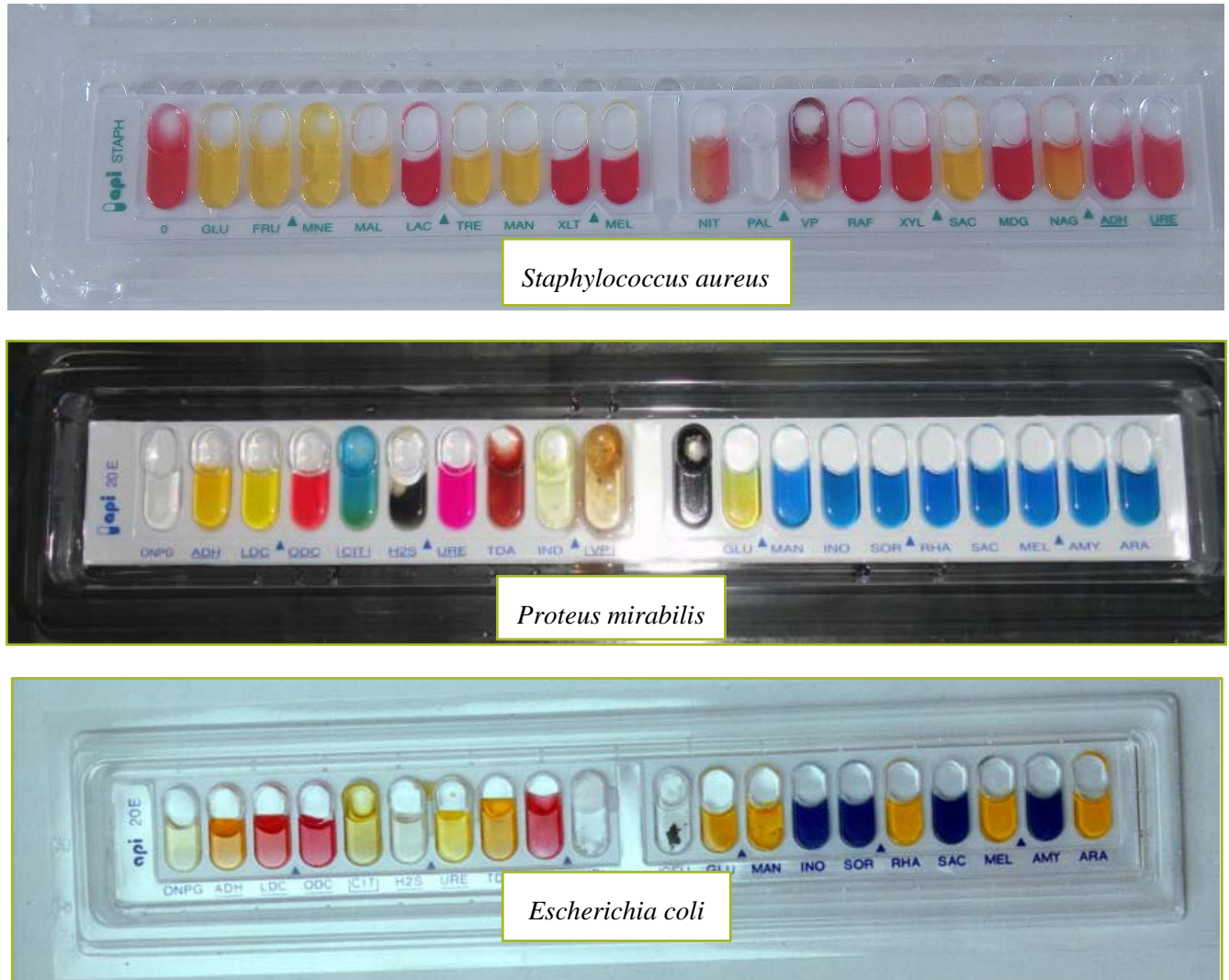


Figure 31 : Résultats des tests biochimiques des galeries API 20 E et API STAPH.





Tableau 10 : Résultats des tests biochimiques (API STAPH) de *Staphylococcus aureus* et (API 20 E) de *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli*.

Testes	Bactéries		Testes	Bactéries
	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>
ONPG	-	+	0	-
ADH	-	-	GLU	+
LDC	-	+	FRU	+
ODC	+	+	MNE	+
CIT	+	-	MAL	+
H ₂ S	+	-	LAC	+
URE	+	-	TRE	+
TDA	+	-	MAN	+
IND	+	+	XLT	-
VP	-	-	MEL	-
GEL	-	-	NIT	+
GLU	+	+	PAL	+
MAN	-	+	VP	+
INO	-	-	RAF	-
SRO	-	+	XYL	-
RHA	-	+	SAC	+
SAC	-	+	MDG	+
MEL	-	+	NAG	+
AMY	-	-	ADH	+
ARA	-	+	URE	+

Négative : (-).

Positive : (+).



V.1.4. Calcul du profil numérique

Les nombres à sept chiffres obtenus à l'aide du système informatique en ligne ApiWeb (annexe 3), constituent les profils numériques des souches étudiées (**tableau 11**).

Tableau 11 : Profils numériques des bactéries identifiées

Isolat bactérienne	Profils numériques
<i>E.coli</i>	7154572 (47)
<i>Proteus mirabilis</i>	1736020 (57)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6736173

V.2. Antibiogramme

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques habituellement utilisés dans la thérapie des bactéries isolées à été testée par la méthode des disques et illustrées dans les (**figures 32 et 33**).

L'observation des boîtes après incubation à 37°C pendant 24-48 heures nous a donné les résultats indiqués dans les **tableaux (12 et 13)**.

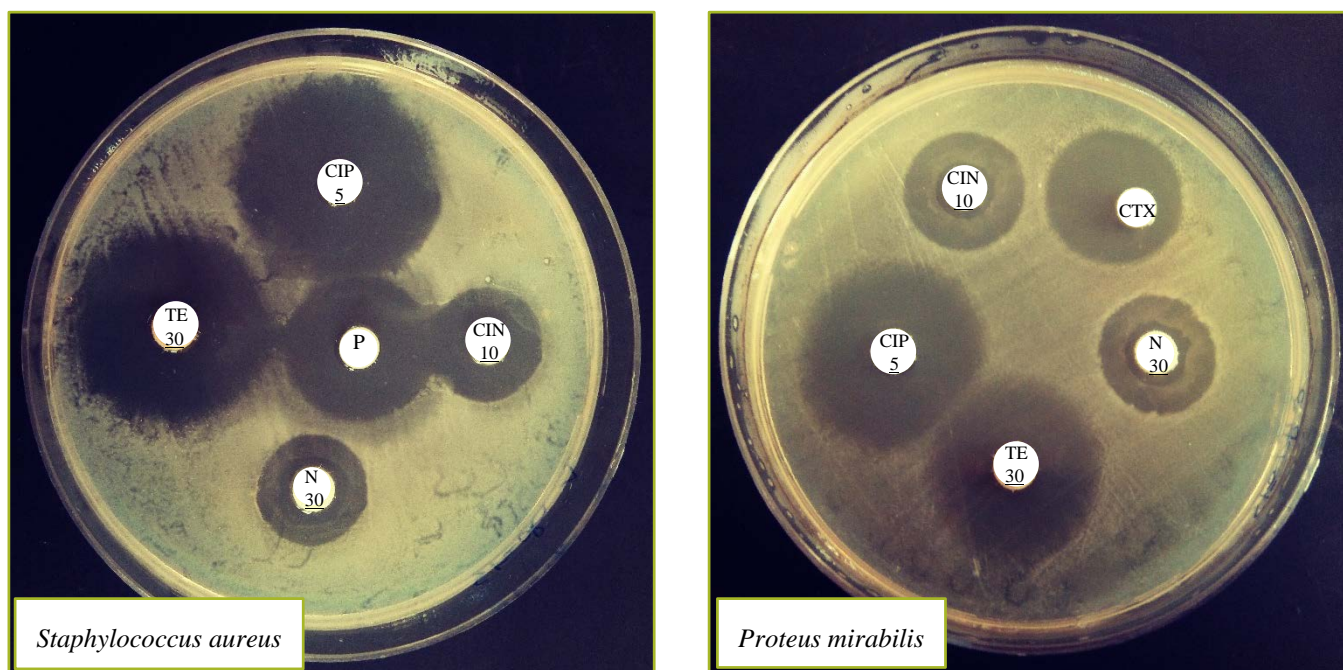


Figure 32 : Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* et *Proteus mirabilis*.

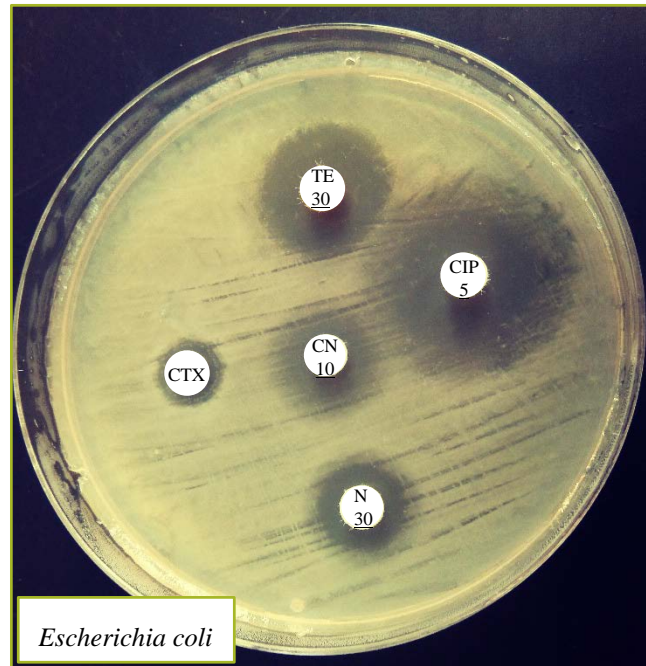


Figure 33 : Résultats de l'antibiogramme de *E. coli*

Tableau 12 : Résultats de l'antibiogramme des entérobactéries étudiées

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			<i>E. coli</i>		<i>Proteus mirabilis</i>	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
CTX	≤ 23	24-25	≥ 26	8	R	15	S
TE	≤ 17	18	≥ 19	17	R	17	R
CIP	≤ 15	16-20	≥ 21	22	S	22	S
N	≤ 15	16	≥ 17	13	R	18	S
CN	≤ 16	17	≥ 18	14	R	15	R

R : résistant.

S : Sensible.

I : Intermédiaire

CTX : Cefotaxime, CN : Gentamycine, N : Neomycine, TE : Tetracycline, CIP : Ciprofloxacine.



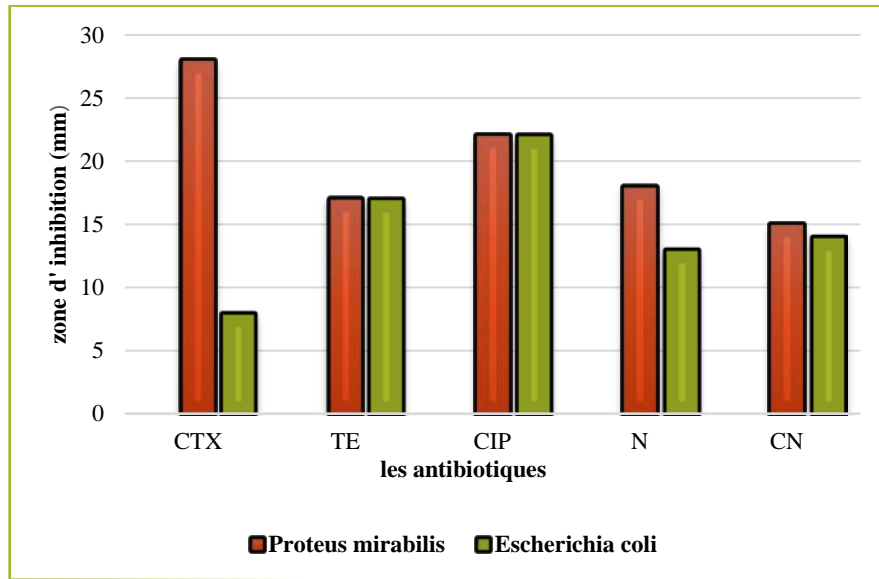


Figure 34 : Représentation graphique des résultats de l’antibiogramme des entérobactéries étudiées

Tableau 13 : Résultats de l’antibiogramme de *Staphylococcus aureus* étudiée

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			<i>Staphylococcus aureus</i>	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultats
CN	< 20		> 20	17	R
NEO	< 15	15-16	≥ 17	18	S
TE	≤ 19	20-21	≥ 22	22	S
P	<29		≥ 29	15	R
CIP	< 20		> 20	24	S

R : résistant.

S : Sensible.

I : Intermédiaire.

CN : Gentamycine, NEO : Neomycine, TE : Tetracycline, CIP : Ciprofloxacine, P : Pénicilline G.

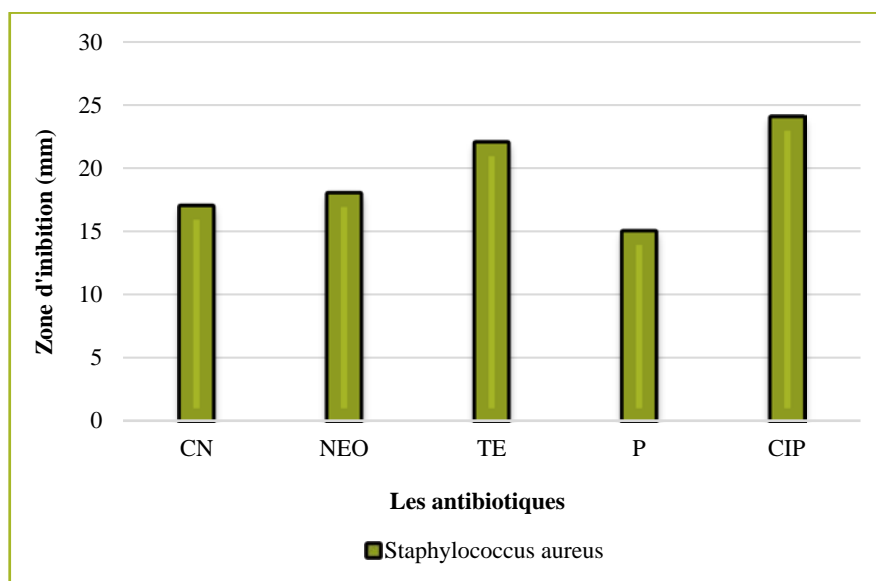


Figure 35 : Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Les résultats indiqués dans le (**tableau 12**) montrent que le groupe des entérobactéries a présenté une résistance importante, notamment *E. coli* vis-à-vis à la cefotaxime, la tetracycline, la neomycine et la gentamycine et dont les diamètres d'inhibition sont respectivement de 8, 17, 13 et 14 mm. Les mêmes résultats ont été notés pour *Proteus mirabilis* soit une résistance à deux ATB : la tetracycline et la gentamycine, mais il a présenté une certaine sensibilité vis-à-vis la ciprofloxacine, la neomycine et la cefotaxime.

La bactérie *Staphylococcus aureus* a présenté une résistance vis à vis la Gentamycine et la Pénicilline G, alors qu'elle s'est montré sensible vis-à-vis la neomycine, tetracycline, et la ciprofloxacine (**tableau 13**).

Globalement, les résultats de l'antibiogramme ont exprimé une résistance acquise et multiple des trois bactéries étudiées vis-à-vis des antibiotiques utilisés habituellement dans la thérapie. Cet échec nous a ainsi pousser de chercher une alternative naturelle pour limiter cette résistance croissante.





V.3. Effets antibactériens des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum*

V.3.1. Extraction des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum*

V.3.2. Etude des propriétés organoleptiques

Les résultats mentionnés dans le **tableau 14**, montrent une comparaison entre les caractéristiques de notre huile essentielle extraite de l'espèce *Syzygium aromaticum* avec les normes d'**AFNOR 1992**.

Tableau 14: Caractéristiques organoleptiques

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR 1992.	Liquide mobile Limpide parfois, légèrement visqueux.	Jaunes très claire.	Epicée caractéristique de l'eugénol.
Huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>.	Liquide mobile limpide.	Jaunes très claire.	Epicée.

Selon ces résultats, on déduit que l'huile essentielle obtenue par la technique d'hydrodistillation présente des caractéristiques dont l'aspect, la couleur et l'odeur qui sont identiques à celles décrites par la norme **AFNOR (1992)**.

V.3.3. Rendement en huile essentielle

Pour chaque essai, après une durée de 3 heures d'hydrodistillation de 1 Kg de matière végétale fraîche effectuée en deux extraction, des quantités d'huile essentielle ont été obtenues (**tableau 15**), ce qui nous a permis de calculer le rendement d'extraction (**RHE**) selon la formule suivante :

$$\text{RHE} = \frac{\text{MHE (g)}}{\text{MMV (g)}} \times 100$$



Tableau 15 : Quantités d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* extraites par hydrodistillation

Essai N°	Masse du matériel végétal utilisé en g	Volume d'eau distillée utilisé en ml	Masse des huiles essentielles extraites en g
01	500	2000	27.31
02	500	2000	27.85

$$\text{RHE (01)} = \frac{27.31}{500} \times 100 = 5.462\%.$$

$$\text{RHE (02)} = \frac{27.85}{500} \times 100 = 5.57\%.$$

$$\text{RHE} = \frac{\text{RHE (1)} + \text{RHE (2)}}{2} = 5.516\%.$$

RHE = 5.516%.

Les clous de girofle *Syzygium aromaticum* renferme un taux moyen de 5,516 % d'huile essentielle. Par comparaison, cette valeur est similaire à la norme établie par **AFNOR (1992)**. Par contre notre résultat ne coïncide pas à ceux obtenus par d'autres auteurs ayant utilisés la même technique d'hydrodistillation, c'est le cas de **Atmani et Baira, (2015)**, qui ont obtenu un rendement plus faible 3%. Il en est de même pour **Boukhatem, (2017)** avec un taux de 3.3%. En revanche, la valeur de notre rendement est inférieure à celle rapportée par **Benali et Bencheikh, (2016)** soit 9.83% ainsi que celle enregistrée par **Andrea (2004)** avec un rendement qui varie de 10 à 14%.

Par ailleurs, une autre étude réalisée par **Abdeli, (2015)** sur l'espèce a montré un rendement en huiles essentielles assez proche estimé à 5%.

Selon certains auteurs, la composition chimique et le rendement en HEs varient selon diverses conditions, parmi lesquels des facteurs écologiques tels que la température, l'humidité relative l'insolation et la nature du sol qui peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles (**Oliveira et al., 2005**). Aussi la période de la récolte des plantes peut avoir un effet la composition en HEs et par conséquent sur l'activité antimicrobienne (**Bounatirou et al., 2007**). Selon (**Naili, 2013**), Le rendement en huile essentielle peut être influencé par le génotype de la plante, son origine géographique,



la période de récolte, le climat, les propriétés physico-chimiques du sol ainsi que, la méthode d'extraction employée, les parties végétales utilisées et les conditions de séchage.

V.3.4. La mesure de pH

Selon le résultat obtenu, le pH de l'huile essentielle est acide (pH= 06) (**tableau 16**) ; ceci est due à la composition chimique des HEs de *Syzygium aromaticum* qui se considère comme donneur des H⁺.

Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle. Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes ; ce qui permettra à ces huiles essentielles de jouer le rôle de conservateurs dans les produits alimentaires ([Hamadou et Touki, 2017](#)).

Tableau 16 : Résultat du pH d'HEs de *Syzygium aromaticum*

	Huile Etudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	Maximum
pH	06	05,5	07

V.3.5. Activité antimicrobienne (Aromatogramme)

Dans le but d'estimer le potentiel microbien de notre l'huile essentielle (*syzygium aromaticum*), le choix s'est porté sur plusieurs souches cibles, car chacune d'elle possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielles de *syzygium aromaticum* par la méthode de diffusion des disque sur milieu gélosé permet de mesurer la capacité de notre l'huile à inhiber la croissance microbienne *in vitro*.

Elle est ainsi basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition obtenus et mesurés avec précision. Les résultats présentés dans le **tableau 17** et les **figure 36, 37 et 38** illustrées ci-dessous :

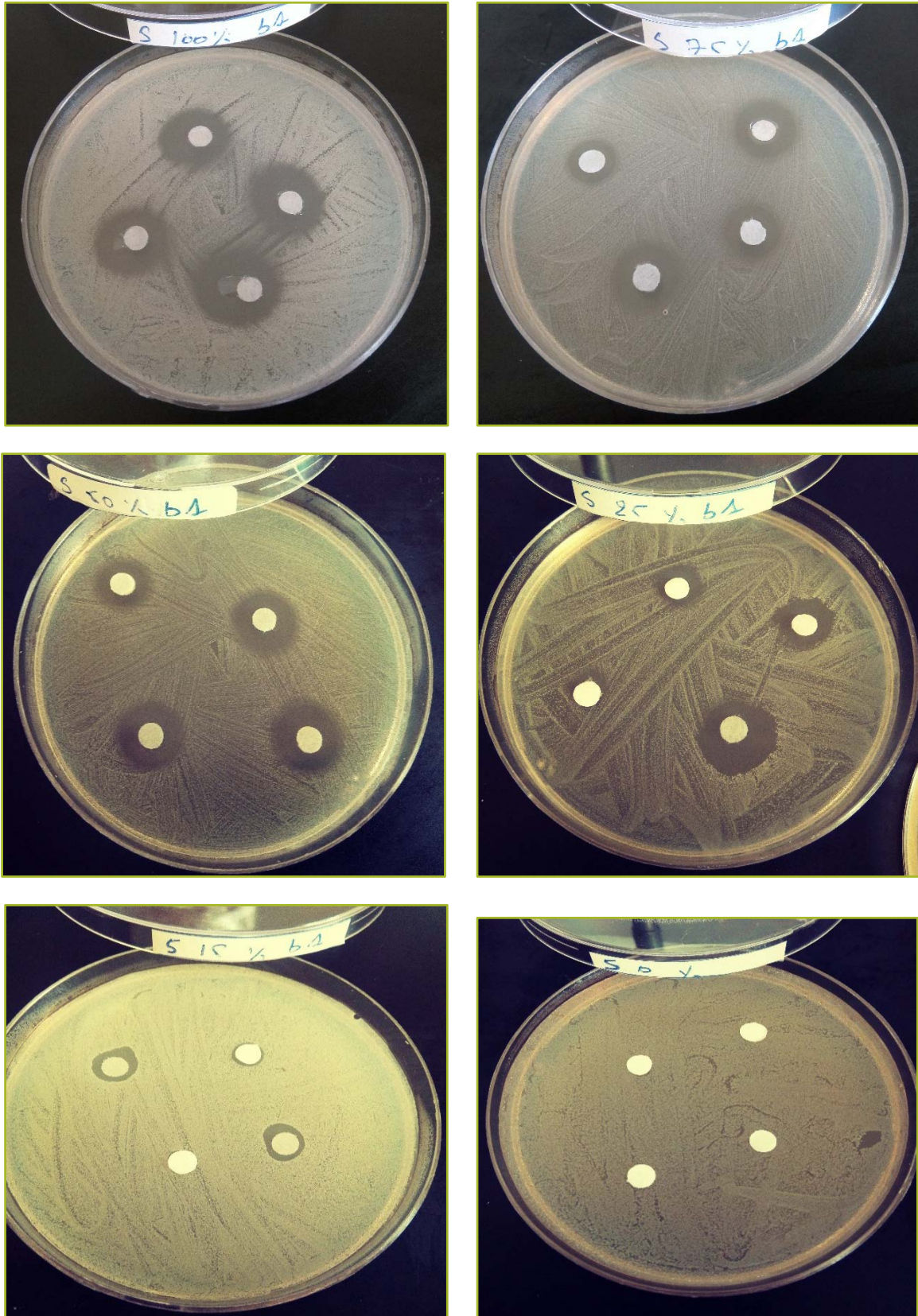


Figure 36 : Résultats de l'aromatogramme de *Staphylococcus aureus*

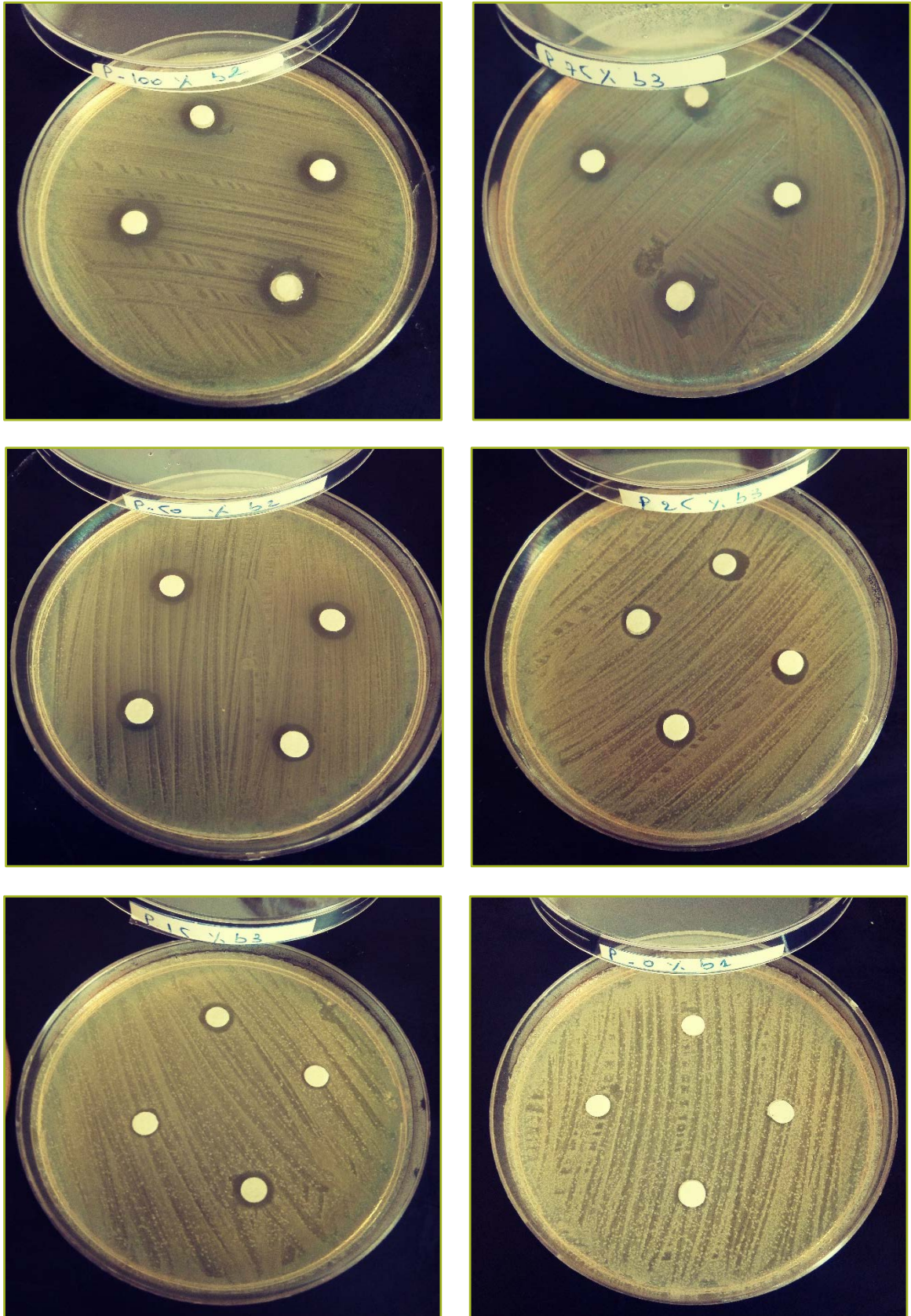


Figure 37 : Résultats de l'aromatogramme de *proteus mirabilis*



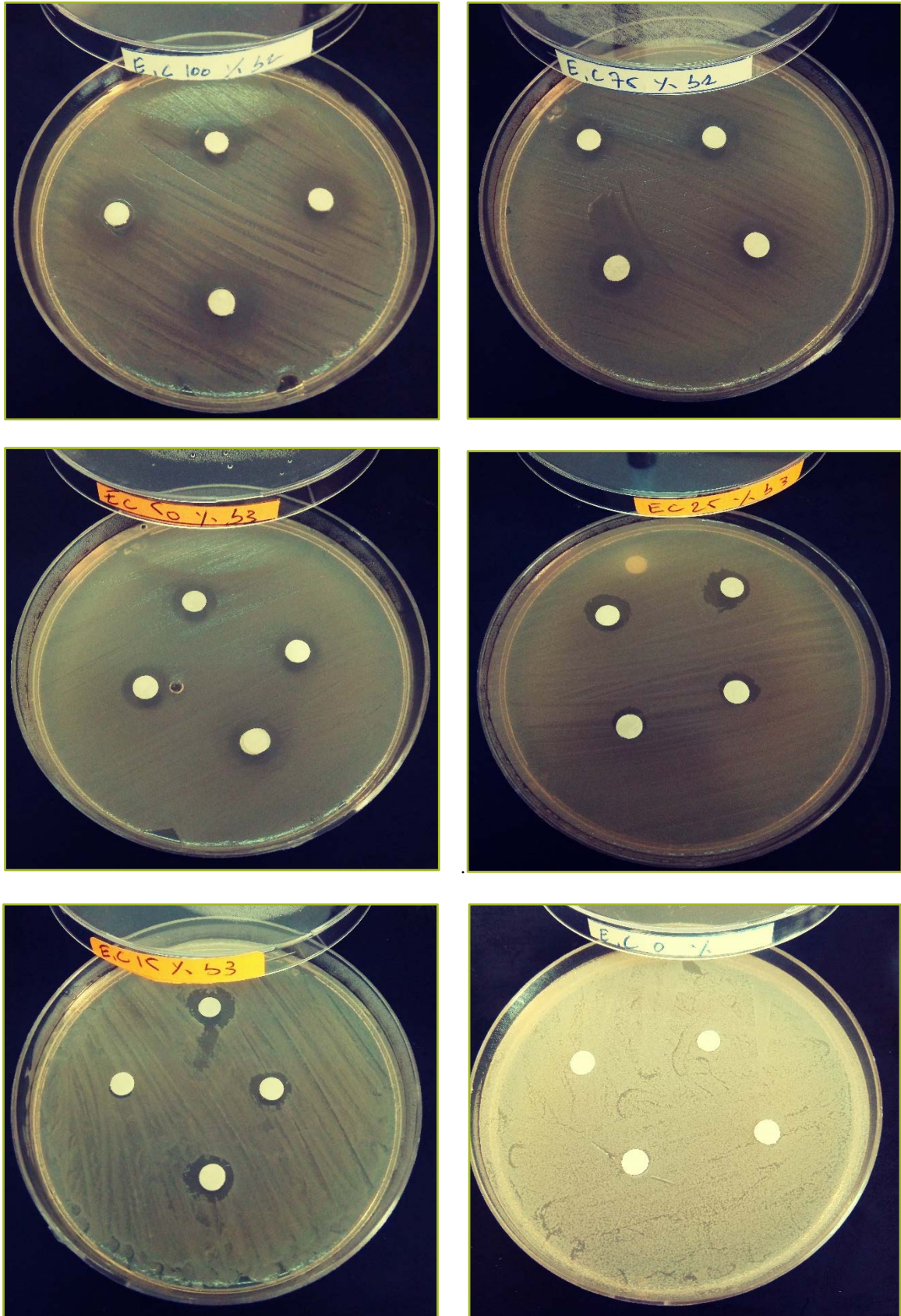


Figure 38 : Résultats de l'aromatogramme de *E. coli*



Tableau 17 : Résultats de l'aromatogramme exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm)

Souche cibles	Les dilutions					
	Contrôle Négatif DMSO 0%	05%	20%	50%	75%	HES Pure 100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	03.20	04.90	07.5	11.70	18
<i>Proteus mirabilis</i>	0	01.70	03.20	06.20	08.20	15
<i>Escherichia coli</i>	0	02.50	04.70	07.50	09.50	16.20

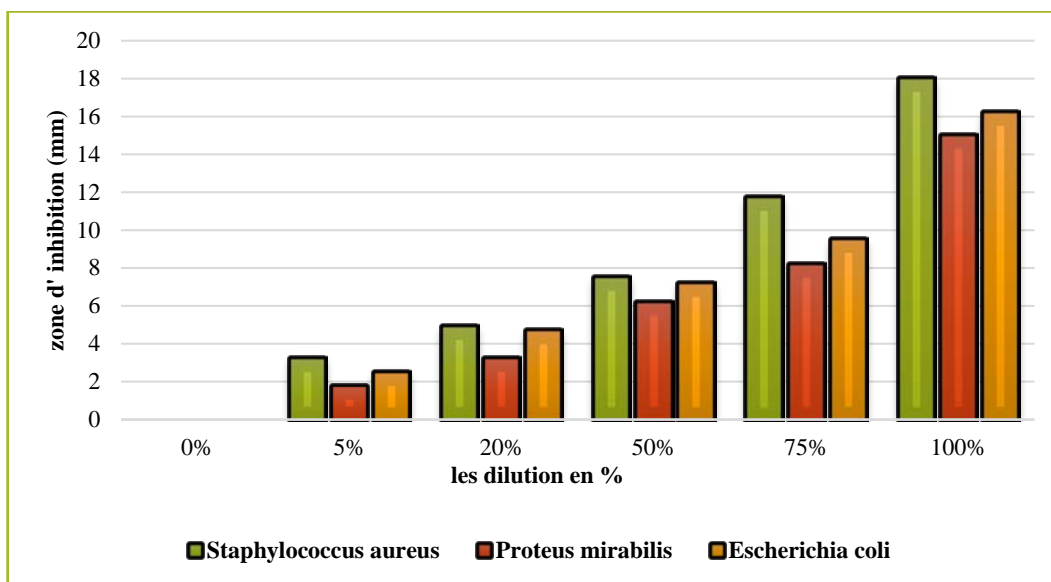


Figure 39 : Représentation graphique des résultats de l'aromatogramme de l'HES de *syzygium aromaticum*



De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que :

La méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des clous de girofle vis-à-vis des bactéries testées. Selon la classification de [Ponce et al., \(2003\)](#), toutes les souches sont sensibles à l'huile essentielle de *S.aromaticum*.

L'action de l'antimicrobien sur les microorganismes dépend, d'une part de la structure membranaire de la cellule cible, puisqu'elles possèdent un effet inhibiteur beaucoup plus sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram-, et d'autre part de la composition de l'huile essentielle elles-mêmes qui leur confère un pH acide (pH= 6,40) ([Mouas et al., 2017](#)).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire ([Guinoiseau, 2010](#)).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de clou de girofle exhibent une activité contre trois souches bactériennes testées en dépit de leur morphologie et de leur Gram. En effet l'HE de *Syzygium aramaticum* exerce une forte activité sur les bactéries à Gram positif, comme on peut le voir dans le **tableau 17**.

Les diamètres des zones d'inhibition nous ont permis de classer les espèces bactériennes en fonction de leur sensibilité à l'huile essentielle testée en se référant au spectre indiqué dans le chapitre IV ([Dris, 2020](#)). Dans le cas des bactéries à coloration de Gram positif, *Staphylococcus aureus* s'est avéré plus sensible avec un diamètre d'inhibition maximale de 18 mm (**figure 36**). Pour les bactéries à coloration de Gram négatif, les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues chez *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli* soient 16.20 et 15 mm, respectivement (**figure 37 et 38**). On a donc considéré que ces microorganismes étaient plus sensibles à l'huile. La variabilité des résultats est probablement due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les microorganismes testés et les huiles essentielles utilisées ([Pattnaik et al., 1997](#)).

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis de l'huile testée, nous constatons que l'efficacité de cette huile diffère d'une bactérie à une autre. Cependant, *Staphylococcus aureus* est la plus sensible à l'huile testée puis *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. Ces résultats sont en accord avec la littérature selon lesquelles les bactéries à Gram+ montrent la plus grande sensibilité par rapport aux





bactéries à Gram- (Bakkali et al, (2008) ; Burt, (2004) ; Holley et Patel, (2005) ; Russell, (1991) ; Souza et al, 2005).

Le volume des huiles essentielle influence l'activité antibacterienne, plus le volume de l'huile essentielle augmente plus les diamètres d'inhibitions est important (Emiroğlu et al., 2010). Cela s'applique aux résultats que nous avons obtenus par l'HEs de *Syzygium aromaticum*

Les diamètres des halos d'inhibition montrent que le pouvoir antimicrobien est proportionnel à la concentration. La différence dans la sensibilité des espèces microbiennes enregistrée suggère la susceptibilité des différents microorganismes aux divers composants de l'huile essentielle.



Conclusion et
perspectives



Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Avec la prévalence des microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, on note un regain d'intérêt pour les molécules naturelles extraites à partir de ces espèces végétales.

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer scientifiquement, l'activité antimicrobienne *in vitro* de la plante médicinale (*Syzygium aromaticum*) et pour prouver leur efficacité contre des bactéries multi-résistantes.

L'extraction de l'huile essentielle du clou de girofle par hydrodistillation a révélé un bon rendement de l'ordre de 5.516%

Les résultats de l'antibiogramme nous ont permis de constater que *Escherichia coli* était résistante sous l'action de quatre antibiotiques (CTX), (TE), (NEO) et (CN) avec des diamètres des zones d'inhibition (08, 17, 13 et 14 mm) respectivement, par contre elle était sensible sous l'action de l'antibiotique (CIP) avec un diamètre de zone d'inhibition (22 mm). Les mêmes résultats sont obtenus pour *Proteus mirabilis* soit une résistance aux deux ATB : la (TE) et la (CN), mais a montré une certaine sensibilité vis-à-vis (CTX), (NEO) et (CIP). Enfin *Staphylococcus aureus* a présenté une résistance vis à vis à la (CN) et à la (P), Alors qu'elle a montré une sensibilité vis à vis la (NEO), Tétracycline et la (CIP).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a permis de montrer par la méthode d'aromatogramme, une activité inhibitrice contre les trois souches cliniques testées. Pour les Gram positif, la plus sensible étant *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 18 mm, alors que chez les Gram négatif, les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues chez *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* (6.20 et 15 mm, respectivement).

Le volume des huiles essentielle influence l'activité antibactérienne, plus le volume de l'huile essentielle augmente plus les diamètres d'inhibitions est important En comparant les résultats de l'aromatogramme avec les résultats de l'antibiogramme, il est clair que l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* possède un pouvoir antimicrobien supérieur à celui des agents antimicrobiens standards utilisés. En effet, les diamètres des zones d'inhibitions enregistrés sont plus grands. De



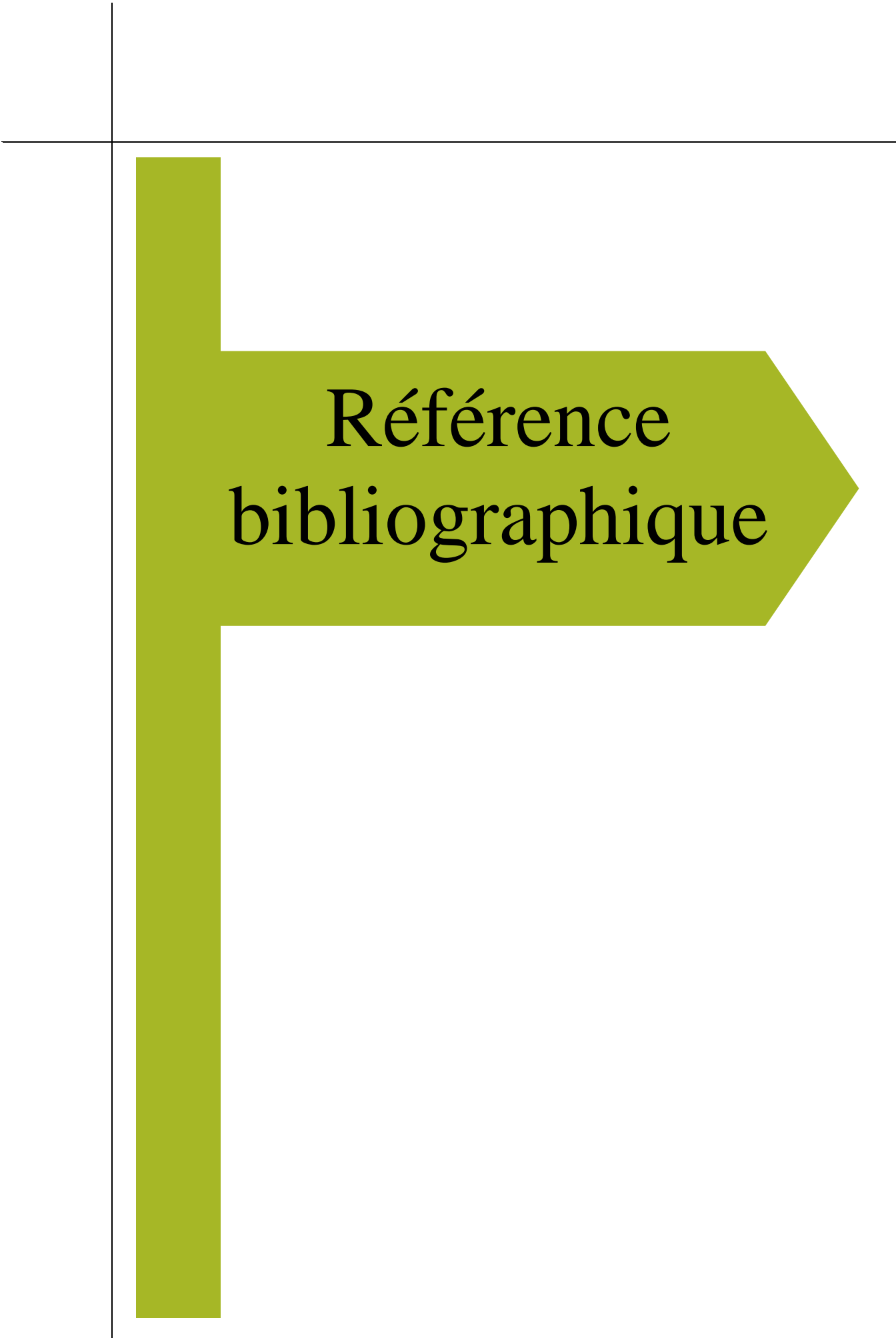
plus, la croissance de toutes les souches microbiennes a été inhibée par l'huile essentielle ; ce qui n'est pas le cas de tous les antibiotiques.

A partir des résultats obtenus au cours de notre étude, on peut conclure et prédire que l'huile essentielle du clou de girofle pourrait servir comme base de lutte biologique contre les germes responsables des maladies infectieuses et pourrait être de ce fait, une alternative aux antibiotiques.

Perspectives

Dans l'ensemble, cette étude appuie davantage sur la vision selon laquelle *Syzygium aromaticum* est prometteuse comme source naturelle avec une activité antibactérienne et confirme ainsi ses utilisations potentielles en tant qu'un agent antimicrobien pour des applications industrielles telles que la conservation des produits pharmaceutiques, de la parfumerie et alimentaires.

Néanmoins, des tests d'isolement et d'identification de la composition des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et des études *in vivo* devraient être menées pour justifier et évaluer leur utilisation potentielle.



Référence
bibliographique



Abdelli W, (2017). Caractérisation Chimique Et Etude De Quelques Activités Biologiques Des Huiles Essentielles De *Juniperus phoenicea* Et De *Thymus vulgaris*. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie. Pages : 14-15.

Adefegha S.A, Oboh G, Oyeleye S.I et Osunmo K, (2016). Alternation of Starch hydrolyzing enzyme inhibitory properties, antioxydant activities and phenolic profile of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) by cooking duration. Food Science and Nutrition. Pages : 250-251.

Adli Dj.E.H, (2015). Effets Prophylactique De L'administration D'un Extrait De *Syzygium Aromaticum* (Clou De Girofle) Chez Les Rats Wistar En Croissance Intoxiqués Au Plomb Et Au Manganèse. Etude Biochimique, Histologique Et Neurocomportementale. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. Pages : 114.

AFNOR (Association Française de Normalisation), (1986). Recueil des normes françaises "huiles essentielles". AFNOR, Paris, pages : 57.

AFNOR (Association Française de Normalisation), (1992). Recueil des normes françaises « Huiles essentielles », 4ème édition, Paris.

AFNOR (Association Française de Normalisation), (2000). Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1, Monographie Relative Aux Huiles Essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2, Monographie Relative Aux Huiles Essentielles, pages : 663.

Alioua M, (2015). Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar- Annaba (Algérie). Pages : 20.

Ammari H, Benslimani A, Rahal K, Tali-Maamar H, Kechih-Bounar S, (2011). Standardisation De L'antibiogramme A L'échelle Nationale (Medecine Humaine Et Veterinaire), 6e édition, OMS.

Anderia T.S, (2004). Contribution à l'étude d'huile essentielle de gingembre en une meilleure exploitation école supérieur polytechnique- d'Antananarivo, pages : 23-25.





Aouadhi S (2010). Atlas Des Risques De La Phytothérapie Traditionnelle ‘ ‘ Étude De 57 Plantes Recommandées Par Les Herboristes’’. Faculté de médecine de Tunis – Doctorat en toxicologie.

Arabi A, (2018). Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multi résistantes de la microflore digestive humaine. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie. Pages : 20,21.

Archambaud M et Clave D, (2004). Fiche technique : Bactériologie 051 en ftbac, Laboratoire de Bactériologie. Hygiène CHU Toulouse Rangueil. Vol1, page 04.

Atmani H et Baira K, (2015). Mise en évidence de l’activité antibactérienne et antifongique et l’étude des caractères Physico-chimique de l’huile essentielle du clou de girofle *Syzygium aromaticum* L. Thèse de Doctorat , Biologie et physiologie végétale. Algérie : Université Frères Mentouri 1 Constantine, pages : 64-86.

Avril J.L, Dabernat H, Denis F et Monteil H, (2000). Bactériologie clinique, Ellipses 2ièmeédition, Paris, France, page : 602.

B

Bagard S (2008). Physique-Chimie 1e S : Tout-en-un, *Ed. Bréal*, 432 pages.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), pages :446-475.

Baliere C (2016). Les *Escherichia coli* Potentiellement Pathogènes Dans L’environnement Littoral : Cas Des STEC Et Des EPEC. Thèse de Doctorat, université de Bretagne occidentale. Pages : 23.

Barbelet S (2015). Le Giroflier : Historique, Description et Utilisation de la plante et de son huile essentielle. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France. Pages : 12-64.

Bekhechi C, Atik-Bekkara F et Abdelouahid D (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d’*Origanum glandulosum* d’Algérie. *Phytothérapie*, 6(3), pages : 153-159.



Belkacem I (2017). Stratégies de lutte contre les biofilms bactériens responsables d'intoxications alimentaires : polyphénols naturels. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie). Pages : 34.

Benjlali 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. *Le pharmacien du Maghreb*. Pages :17-59.

Benzeggouta N (2015). Evaluation des effets biologiques des extraits aqueux de plantes médicinales seules et combinés. Thèse de Doctorat, Université Mentouri, Constantine (Algérie). Pages : 49.

Boukhatem F, (2017). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de deux épices : *Syzygium aromaticum* et *Illicium verum*, *Mémoire de Master, Université de Mostaganem*, pages :48.

Boukhatem M. N, Ferhat et Kameli A (2019). Méthodes D'extraction Et De Distillation Des Huiles Essentielles : Revue De Littérature. *Revue D'Agrobiologia* vol **9**(2), pages :1656.

Boukhobza F et Goetz, P, (2014). Phytothérapie en odontologie-*Editions CdP: Initiatives Santé*.

Bounatirou S, Smiti S, Miguel M.G, Faleiro L, Rejeb M.N, Neffati M et Pedro L.G, (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from tunisian *Thymus capitatus* Hoff et Link. *Food chemistry*, pages :105, 146 et 155.

Boutedjiret C, (1990). L'huile essentielle d'Artémisia herba-Alba Asso d'Algérie. Approche des conditions optimales se sont extraction par entrainement à la vapeur d'eau. Contribution à son étude analytique. Mémoire de magister en génie chimique, Ecole national polytechnique d'Alger.

Bouzouita, N, Kachouri, F., Ben Halima, M et Chaabouni, M, (2008). Composition Chimique Et Activités Antioxydante, Antimicrobienne Et Insecticide De L'huile Essentielle De *Juniperus phoenicea*. *J. Soc. Chim. Tunis*, **10**, pages: 119-125.

Brelière B, Cerrato M, Martinez A et Romoli V (2009). Microbiologie BEP : Les Savoirs En Situation (Broché), Ed. Hachette Technique, pages : 24.



Brossard H, Leyral G et Terry O (1997). Activités Technologiques En Microbiologie : Classes De Première BGB. Bactériologie Systématique, Vol 2, Collection Biologie technique, Ed. CRDP d'Aquitaine, Bordeaux, pages : 15,75 et 83.

Bruneton J (1999). Pharmacognosie. Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Tec & Doc.Lavoisier, Paris, pages : 1120.

Burt S, (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), pages : 223-253.

C

Couderc C (2015). Impact des antibiotiques sur l'histoire naturelle de la colonisation nasale par *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat, L'université Pierre Et Marie Curie, École Doctorale Pierre Louis de Santé Publique ED 393 Épidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale (France). Pages : 19.

D

Derwich E., Benaabidate L., Zian A., Sadki O et Belghity D (2010). Chemical Composition and in Vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Cedrus Atlantica*. *International Journal of Agriculture and Biology* 12(3); pages: 381-385.

Davido B (2010). Etude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à *Staphylocoque doré*. Thèse de Doctorat, Université Denis Diderot, Paris (France). Pages : 14-16.

Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy MC, Quentin R (2011). Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles. 2nd Edition Elsevier Masson, pages : 640.

Diallo AA (2013). *Escherichia Coli* Pathogènes Et Résistantes Aux Antibiotiques Dans Les Effluents D'origine Humaine Et Animale : Prévalence Et Caractérisation Avant Et Après Traitement Epuratoire. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, France. Pages : 13.



Dris I (2020). Caractérisation chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. Evaluation du pouvoir antimicrobien et antioxydant. Thèse de Doctorat, Centre Universitaire De Tissemsilt, Algérie. Pages : 4.

Dupont F, Guignard J (2012). Botanique : les familles des plantes. 15e édition. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson. Pages : 16.

E

Escott, Harlein et Klein (2006). Microbiologie 2^e édition française, de e book, pages :02.

Esskouri Z (2011). Sensibilité Des Enterobacteries Urinaires A La Fosfomycine Et à La Nitrofurantoïne. Thèse de Doctorat, L'Ecole Royale du service de Santé Militaire. Université Mohammed V. Faculté De Médecine Et De Pharmacie, Rabat, Maroc. Pages : 48-52.

F

Fillatre Y (2011). Produits Phytosanitaires : Développement D'une Méthode D'analyse Multirésidus Dans Les Huiles Essentielles Par Couplage De La Chromatographie Liquide Avec La Spectrométrie De Masse En Mode Tandem. Thèse de doctorat. Université d'Angers. France. Pages : 288.

Famuyide IM, Aro AO, Fasina FO, Eloff J.N et Mc Gaw LJ (2019). Antibacterial activity and mode of action of acetone crude leaf extracts of under- investigated *Syzygium* and *Eugenia* (Myrtaceae) species on multidrug resistant porcine diarrhogenic *Escherichia coli*. BMC Veterinary Research. Pages : 3-4.

G

Garnéro J (1996). Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, K 345, Paris, pages : 39.

Garrity GM, Leventhal J, et Lilburn TG (2005). Taxonomic Outline of the Procaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Release 6.0. ed. Springer-Verlag, New York.





Ghedira K, Goetz P, et Le Jeune R, (2010). *Syzygium aromaticum* (l) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie*, Vol.8. Pages : 37-38.

Girard G, (2010). Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaires d'hier à aujourd'hui. *Thèse de Doctorat. Nancy I. France*, pages : 6-8.

Gill A.O et Holley R.A, (2004). Mechanisms Of Bactericidal Action Of Cinnamaldehyde Against *Listeria Monocytigenes* And Of Eugenol Against *L.Monocytigenes* And *Lactobacillus Sakei*. *Applied And Environmental Microbiology*. 70 (10), pages : 57,50 et 55.

Glasset B, (2016). Approche combinatoire pour la caractérisation des souches de *Bacillus cereus* à l'origine d'infections chez l'homme. *Thèse de Doctorat, Université Paris-Saclay, Paris (France)*. Pages : : 13.

Goetz P et le Jeune R, (2010). *Syzygium Aromaticum(L)* Merr and Perry (Myrtaceae) giroflier, phytothérapie, pages: 37-43.

Guinoiseau E, (2010). Molécules Antimicrobiennes Issues D'huiles Essentielles Séparation, Identification Et Mode D'action. *Thèse de doctorat à l'université de Corse, France*.

Guiraud JP, (1998). *Microbiologie alimentaire*, Dunod, Paris, pages : 72 et 74.

H

Hamadou F et Touki S, (2017). Extraction, Caractérisation des huiles essentielles des épices : Girofle, Poivre Noir.

Hart T et Shears P, (1999). *Atlas De Poche De Microbiologie*. Flammarion Médecine- Science. Paris. Pages : 118.

Hernandez-Ochoa LR, (2005). Substitution De Solvants Et Matières Actives De Synthèse Par Combiné « Solvant/Actif ». D'origine Végétale. *Thèse de doctorat. Institut National Polytechniques de Toulouse. France*.



Holt J, (1986). Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore MD, Vol. I & II.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT Et Williams ST, (1994). Bergey`S Manual Of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. 9th Edn, Pages : 518-537.

Holley R.A et Patel D, (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant Essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), pages : 273-292.

HUC. E, (2011). O-mycoloylation : Caractérisation D'une Nouvelle Modification Post-Traductionnelle De Petites Protéines D'enveloppe Chez Les Corynebacterineae. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, France. Pages : 12.

J

Jehl F, Lina G, Bonnet R, Bru JP, Caron F, Cattoir V, Chardon H, Courvalin P, Dubreuil L Jarlier V, Lambert T, Lefort A, Merens A, Nicolas-Chanoine MH, Plesiat P, Poly MC, Soussy CJ, Varon E et Weber P, (2015). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Recommandation de 2015). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST, pages : 117.

Joffin J.N. et Leyral G, (2001). Microbiologie Technique. 1- Dictionnaire des techniques. Collection Biologie technique 3ème éd. CRDP d'Aquitaine, Bordeaux, pages : 320.

Joffin J.N et Leyral G (1996). Microbiologie Technique. Centre Regionale De Documentation Pédagogique D'aquitaine Bordeaux, France, Pages : 219-223.

Joffin J.N, Leyral G et Boineau F (1998). Microbiologie technique. 2 : Documentation technique Centre Régional de Documentation Pédagogique, Bordeaux (France). Pages : 200-225.

K

Kacemi Ben Sultane F (2017). Activité Antioxydant Des Huiles Essentielles Du Gingembre (*Zingiber officinale*) et du Clou De Girofle (*Syzgium aromaticum*). Thèse de Doctorat. Université Mohammed V. Faculté De Médecine Et De Pharmacie, Rabat, Maroc. Page : 12.





Karen R, (2012). Evolution historique et état des lieux de la filière girofle à Madagascar. Thèse de Doctorat, Sciences agronomiques. Université d'Antananarivo. Madagascar. Pages : 135.

Khayar Y, (2011). Comportement Des Enterobacteries Isolees Des Urines Vis-A-Vis De L'amoxicilline – Acide Clavulanique L'imipeneme Et L'ertapeneme. Thèse de Doctorat, L'Ecole Royale du service de Santé Militaire 'llilititi. Universite Mohammed V. Faculté De Medecine Et De Pharmacie, Rabat, Maroc. Pages : 10-14.

Koroch A, Ranarivelo L, Behra O, Juliani HR, et Simon JE, (2007). Quality Attributes of Ginger and Cinnamon Essential Oils from Madagascar in: Issues in new crops and new uses. Ed by Janick and A. Whipkey. ASHS Press, Alexandria, VA, pages: 338-341.

L

Lahlou M (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, **18**, pages :436.

Lardry J M et Haberkorn V (2007). Les Huiles Essentielles, principes d'utilisation, Revue de Kinesitherapy, **61** pages : 18.

Laurent J (2017). Conseils Et Utilisations Des Huiles Essentielles Les Plus Courantes En Officine. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, France. Pages : 107.

Le Minor L et Richard C (1993). Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries, Ed Institut Pasteur, Paris, pages : 163, 165, 177 et 178.

Leclerc H, Gaillard J-L et Simonet M (1995). Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.

Leulmi Z (2015). Les Proteus Incriminés Dans Les Infections Communautaires Et Hospitalières : Etude Moléculaire De La Résistance Aux Antibiotiques. Thèse de Doctorat, *Université des Frères Mentouri* , Constantine (Algérie). Pp : 30-34.

Liu D (2010). Molecular Detection of Foodborne Pathogens. CRC Press: Boca Raton.

Loukiadis E (2007). Facteurs de virulence et dissémination dans l'environnement via les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC). Thèse de Doctorat, L'université Toulouse III (France). Pages : 17.



Lucchesi ME (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France. Pages : 12-64.

M

Manou I, Bouillard L, Devleeschouwer M.J et Barel A.O, (1998). Evaluation Of The Preservative Properties Of Thymus Vulgaris Essential Oil In Topically Applied Formulations Under Challengetest. *Journal Of Applied Microbiology*. 84, pages : 368-376.

Max W et Robert A. (2003). Plantes thérapeutiques. Deuxième édition. Librairie professionnelle internationale Lavoisier. Pages : 119, 120.

Mouas Y, Benrebiha F. Z, et Chaouia C, (2017). Évaluation De L'activité Antibacterienne De L'huile Essentielle Et De L'extrait Méthanolique Du Romarin *Rosmarinus Officinalis L.*, 7(1), pages : 363-370.

N

Naili N.E.P (2013). Activité antibactérienne du Cumin velu *Ammodaucus leucotrichus*. Mémoire de Master, en Botanique médicale et Cryptogamie

O

Obame E. L.C, (2009). Etude Phytochimique, Activités Antimicrobiennes et Antioxydantes de Quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines. Thèse de Doctorat, Pôle Régional d'Excellence en Biotechnologies d'Ouagadougou (PREBO). Pages : 18.

Oliveira M.J, Iani F.P.C, Oliveira C.B.A, Santos M.R, Souza P.S, Santos S.C, Seraphin J.C, et Ferri P.H, (2005). Influence Of Growth Phase On The Essential Oil Composition Of *Hypissuaveolens*. *Biochemical Systematics And Ecology*, 33, pages :275-285



Oluwasina O.O, Ezenwosu I.V, Ogidi C.O, et Oyetayo V.O, (2019). Antimicrobial potentiel of toothpaste formulated from extracts of *Syzygium aromaticum*, *Dennettia tripetala* and *Jatropha curcas* latex against some oral pathogenic microorganisms. *AMB express*. Pages : 2.

Osanloo M, Sedaghat M.M, Esmaeili F et Amani A, (2018). Larvicidal activity oil of *Syzygium aromaticum* (clove) in comparison with its Major Constituent, Eugenol against *anopheles stephensi*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. Pages: 361.

Ouar-Korichi M.N, (2015). Médecine du Maghreb.

P

Pattnaik S, Subramanyam V.R, Bapaji M & Kole C.R, (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89, pages : 39-46.

Paul S et Ferdinand P (2005). Guide des plantes médicinales (Analyse, Description et Utilisation de 400 plantes). Pages : 339.

Ponce A.G, Fritz R, Del Valle C, Roura S.I, (2003). Antimicrobial Activity Of Essential Oils On The Native Microflora Of Organic Swiss Chard. *Food Science And Technology*, 36(7), pages :679-684

Pibiri M C, (2005). Assainissement Microbiologique De L'air Et Des Systèmes De Ventilation Au Moyen D'huile Essentielle. Thèse de doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne. France.

R

Raffa K.F et Smalley E.B, (1995). Interaction Of Pre-Attack And Induced Monoterpene Concentrations In Host Conifer Defense Against Bark Beetle-Fungal Complexes. *Oecologia*, 102, pages : 285-295.

S

Singleton P, (2005). Bactériologie : Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6ème édition, DUNOD, Paris, pages : 468 et 326.



Samate A.D, (2002). Compositions Chimiques D'huiles Essentielles Extraites De Plantes Aromatiques De La Zone Soudanienne Du Burkina Faso : Valorisation. Thèse de Doctorat, Université Ouagadougou. Pages: 4.

Senatore F, (1996). Influence of Harvesting Time on Yield and Composition of the Essential Oil of Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food. Chem*, **44** pages: 1327.

Soumaila G.A, (2012). Caractérisation Phénotypique Et Génétique Des Escherichia coli Isolés Des Cas De Colibacillose Aviaires Au Sénégal. Thèse de doctorat. Université cheikh anta diop de Dakar. Pages : 79.

Souza E.L.d, Stamford T.L.M, Lima E.d.O, Trajano V.N, et Barbosa Filho J. M, (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(4), pages : 549-558.

T

Tian X., Zheng X., Sun Y., Fang R., Zhang S., Lin J., Cao J and Zhou T, (2020). Molecular Mechanisms and Epidemiology of Carbapenem Resistant *Escherichia coli* isolated from chinese patients during 2002-2017. *Infection and Drug Resistance*. Vol. 13. Pages: 501-512.

Tkhilaishvili T, Wang L, Tavanti A, Trampuz A et Diluca M, (2020). Antimicrobial Efficacy of Two Commercially Available Bacteriophage Formulation, Staphylococcal Bacteriophage against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevention and Eradication of Biofilm formation and control of a systemic Infection of *Galleria mellonella* Larvae. *Frontiers in Microbiology*. Vol.11. Pages : 1.

Toe E, (2018). Evaluation des facteurs de risques de biocontamination par *Salmonella* et *Escherichia coli* virulents de la chaine alimentaire des Légumes à Abidjan (Côte d'Ivoire). Pages : 12-29.

V



Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Ray-Gueniot S, Boutrand-Loeï S, Meyrand S et Richard Y, (1997). Detection Of *Escherichia Coli* O157 In French Food Samples Using An Immunomagnetic Separation Method and the VIDAS™*E. Coli* O157. *Journal of applied microbiology*.

Verraes C., Van Boxstael S., Van Meervenne E, Van Coillie E., Butaye P., Catry B., de Schaetzen M.-A., Van Huffel X., Imberechts H., Dierick K., Daube G., Saegerman C., De Block J., Dewulf J., Herman L, (2013). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **10**(7); pages: 2643-2669.

W

Werner M, Von Braunschweig R (2008). L'aromathérapie : principes, indications, utilisations. Paris : Ed. Vigot. Pages : 334.

Web site:

1/ www.biokar-diagnostics.fr.

2/ www.slideplayer.fr.



Annexe



TECHNIQUE

COLORATION DE GRAM

PRINCIPE

Le principe de cette technique est la fixation des colorants basiques sur les composants cytoplasmiques. Chez les bactéries gram+, la paroi est épaisse, de composition chimique particulière et constitue une barrière à l'alcool-acétone pour la décoloration négative. Le cytoplasme demeure coloré en violet (suite à l'ajout du violet de gentiane), ce qui n'est pas le cas des bactéries gram- dont la paroi plus fine et plus perméable laisse passer l'alcool-acétone qui décolore le cytoplasme. Ce dernier devient rose après être passé sous un autre colorant (la fuschine) (**brelière et al., 2009**). Les bactéries gram+ sont colorées en violet, tandis que les bactéries gram- sont colorées en rose. La coloration de gram reste une étape essentielle dans l'analyse médicale pour la détermination des bactéries pathogènes (gram -).

MODE D'EMPLOI

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50 - 60° (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de cristal violet pendant 1 mn.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du lugol pendant 1 mn en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°. Les lames doivent être parfaitement sèches.
- Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.





UTILISATION DE CITRATE DE SIMMONS

PRINCIPE

Le milieu de citrate de simmons est utilisé pour la recherche de l'utilisation de citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie (**Brossard et al., 1997**). Sachant que le citrate est utilisé selon la réaction :



L'utilisation du citrate s'accompagnera d'une alcalinisation mise en évidence par le bleu de bromothymol.

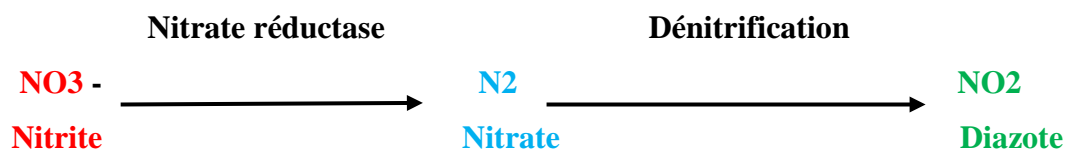
LECTURE

Si le citrate est positif, cela se traduit par le bleuissement du milieu en donnant souvent une culture abondante.

RECHERCHE DE LA NITRATE REDUCTASE

PRINCIPE

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne (**le minor et richard, 1993**). Au cours de ce test, on détecte si une bactérie peut utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction jusqu'à une dénitrification.



LECTURE

- Si le milieu devient **rouge** : présence de nitrites, donc la bactérie possède une nitrate réductase. Résultat nr+.



- Si le milieu reste **inchangé** : on ajoute de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis-à-vis des nitrites.

Coloration **rouge** : on a donc transformation des nitrates en nitrites par le **zinc**. La bactérie ne possède pas cette enzyme résultat **NR-**.

Pas de coloration : Les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat **NR+**.

UTILISATION DU MANNITOL MOBILITE

PRINCIPE

Ce milieu contient du mannitol, des nitrates et du rouge de phénol (indicateur de pH) qui permet de déceler l'attaque du mannitol et la mobilité du germe (**Guiraud, 1998**). La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes (acide méthanoïque, acide éthanoïque...).

Mannitol → fructose → acides à chaînes courtes

Rouge de phénol

Jaune orangé

PH = 7.6

PH < 5

L'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est en général insuffisante pour permettre le virage du rouge de phénol du fait de l'importance du pouvoir tampon du milieu. Ce milieu convient donc plus particulièrement à l'étude des bacilles Gram négatif fermentatifs.

La présence de nitrates permet la recherche de nitrate réductase en ajoutant les réactifs de Griess (à la surface du milieu). Par contre, si l'addition de zinc est nécessaire, la lecture peut être un peu plus délicate. Les nitrates inhibent l'hydrogène lyase, enzyme catalysant la production de CO₂ et H₂ à partir de l'acide méthanoïque (HCOOH). Dans le cas de bactéries mannitol +, le seul gaz produit est donc le CO₂. Pour celles qui sont mannitol -, l'utilisation des peptones ne produit pas de gaz : le CO₂ est alors sous forme d'hydrogénocarbonate, le milieu restant alcalin. L'apparition de bulles pour une bactérie mannitol - ne peut donc être due qu'à la respiration des nitrates et le gaz est alors de l'azote (N₂). Une bactérie aérobie



stricte pourra, si elle possède une nitrate réductase, se développer dans toute la masse du milieu (**Joffin et Leyral, 2001**).

LECTURE

Si le mannitol est fermenté (mannitol +), le milieu vire au jaune (teinte du rouge de phénols en milieu acide). Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu (gélose molle), les bactéries immobiles se développent uniquement le long de la strie d'ensemencement.

TEST DES TROIS SUCRES (T.S.I)

PRINCIPE

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H₂S (gaz qui est produit à partir d'un acide aminé : la cystéine) (Guiraud, 1998). La fermentation de ces glucides provoque une production d'acide, qui est détectée par l'indicateur au rouge de phénol. Des changements de couleurs en résultent, et le milieu vire au jaune en cas de production d'acide, ou au rouge en cas d'alcalinisation. En cas de pH neutre ou alcalin, l'acide sulfhydrique (produit à partir du thiosulfate de sodium) réagit avec le sel d'ammonium ferreux et entraîne la formation de sulfure de fer noir.

LECTURE

- Virage du culot au jaune : culture glucose positive et bactérie aéro-anaérobie.
- Virage du culot au rouge : culture glucose négative ou bactérie aérobie stricte
- Pente virant au jaune : culture lactose et/ou saccharose positive.
- Pente virant au rouge : culture lactose et saccharose négative
- Présence d'un précipité noir : culture H₂S positive.
- Bulle dans la masse du milieu : production du gaz.





PRODUCTION D'INDOLE

PRINCIPE

Certaines espèces bactériennes dégradent le tryptophane en indole, grâce à une tryptophanase. Ces bactéries sont dites indologènes (**Brossard *et al.*, 1997**).



LECTURE

La présence d'indole est révélée par un anneau rouge en surface.

RECHERCHE DE L'UREASE

PRINCIPE

L'uréase est une enzyme responsable de l'hydrolyse de l'urée, entraînant sa transformation en carbonates d'ammonium (**Brossard *et al.*, 1997**).



LECTURE

Le virage du milieu du jaune grâce à l'indicateur de pH (rouge de phénol) au rouge violacé traduit une forte alcalinisation donc hydrolyse de l'urée.



MISE EN EVIDENCE DE LA CATALASE

PRINCIPE

Dans les conditions d'aérobiose, certaines bactéries produisent le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). La catalase peut décomposer le peroxyde d'hydrogène en H₂O₂ avec dégagement d'oxygène (Singleton, 2005).

La catalase est habituellement présente chez les bactéries Gram + sauf les genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

LECTURE

Le dégagement de gaz (O₂) indique un résultat positif.

TEST DE CLARK ET LUBS (RM-VP)

PRINCIPE

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude de la voie de fermentation du glucose : différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

Le test RM (rouge de méthyle) permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation "acides mixtes" par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

Les bactéries dites Voges-Proskauer positives possèdent une voie métabolique particulière dans la fermentation des hexoses. A partir de l'acide pyruvique (produit d'oxydation du glucose), elles peuvent former de l'acétyl-méthyl-carbinol ou de l'acétoïne et du butane-diol-2-3. En milieu alcalin, ces produits sont oxydés en diacétyl qui réagit avec des peptones pour produire un complexe de couleur rose rouge en présence de l' α -naphthol qui accélère la réaction. D'une façon générale, les bactéries qui possèdent cette voie métabolique présentent une réaction peu acide (virage au jaune du rouge de méthyle ou RM-) (Larpent *et al.*, 1997).

Le test VP est beaucoup plus spécifique que le test RM qui ne donne qu'une idée globale du métabolisme. Le test VP est particulièrement intéressant pour caractériser le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* des entérobactéries. Cette distinction des deux voies peut justifier une règle



parfois contestable mais fréquemment vérifiée : les bactéries VP+ sont toujours RM-, les bactéries RM+ sont VP-. Les bactéries oxydatives ne sont pas concernées (**Joffin et Leyral, 2001**).

LECTURE

Une coloration rouge franche indique une réaction de RM+. Le milieu reste incolore indique une réaction de RM-. Si la réaction est une RM positif c a d le VP est négatif.



MILIEUX DE CULTURE

Milieu d'enrichissement utilisé : selon (Guiraud, 1998).

1. Bouillon Nutritif (BN) :

- Peptone : 10g.
- Extrait de viande : 5g.
- Chlorure de sodium (facultatif selon la formule) :
5g.

PH 7,2 Autoclave 20minutes à 120C°.

Milieux de culture utilisés : selon (Guiraud, 1998).

Milieu Chapman (= Gélose Mannitol) :

- Extrait de viande : 1g.
- Peptones : 10g.
- Chlorure de sodium : 75g.
- Mannitol : 10g.
- Rouge de phénol : 0,025g.
- Agar... 15g.

PH 7,4. Autoclaver 15 minutes à 120C°.

LE MILIEU BCP (BROMOCRESOL POURPRE)

- Peptone : 5,0 g.
- Extrait de viande : 3,0 g..
- Lactose : 10,0 g.
- Bromocrésol pourpre : 0,025 g.
- Agar : 11,0 g.
- Eau distillée : qsp 1 L.

pH = 6,8. Autoclaver 15 minutes à 120C°.

Brilliant Green Agar (BGA) :

- Extrait de levure : 3,0 g.
- Protéose peptone BD Bacto™ : 10,0 g.
- Lactose : 10,0 g.





- Saccharose : 10,0 g.
- Chlorure de sodium : 5,0 g.
- Rouge de phénol : 0,08 g.
- Gélose : 20,0 g.
- Vert Brillant : 12,5 mg.

PH 6,9 ± 0,2. Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performance imposés.

Milieux d'identification : selon (Guiraud, 1998).

Simmons (Gelose Au Citrate De Sodium).

- Sulfate de magnésium0,2g.
- Phosphate monoammoniaqué 1g.
- Phosphate dipotassique1g.
- Citrate de sodium 2g.
- Chlorure de sodium 5g.
- Bleu de bromothynnol0,080g.
- Agar..12g.

PH 6,8 répartir en tube à essais (6 à 8ml). Autoclaver 20mn à 120C° solidifier en position inclinée ou semi-inclinée.

TSI (=Gelose Glucose-Lactose-Saccharose- H2s)

- Peptone 20g.
- Extrait de viande 3g.
- Extrait de levure 3g.
- Chlorure de sodium 5g.
- Glucose 1g.
- Lactose 10g.
- Saccharose10g.
- Citrate de fer0,5g.
- Hyposulfite de sodium0,5g.
- Rouge de phénol 0,025g.
- Agar..... 12g.

PH 7,4 répartir en tubes à essais (7 à 9ml). Autoclaver 15mn à 195C° solidifier en position semi inclinée.



Mannitol- Mobilite (MM)

- Peptone :20g.
- Nitrate de potassium : 1g.
- Mannitol : 2g.
- Rouge de phénol : 0,0004g.
- Agar : 4g.

pH 8,1 répartir en tubes à essais (8 à 10ml) Autoclaver 15mn à 120C°. solidifier en culot.

Clark Et Lubs (Milieu De Culture)

- Peptone : 10g.
- Phosphate dipotassique : 2g.
- Glucose : 5g.

pH 7, répartir en tubes à essais (5ml). Autoclaver 20mn à 120C°.

Mueller Hinton (Gelose Pour AntibioGramme)

- Extrait de viande : 2g.
- Hydrolysat acide de caséine : 17,5g.
- Amidon : 1,5g.
- Agar : 10g.

pH 7,4. Autoclaver 15mn à 120C°.



Produits, Réactifs Et Equipements

FICHE TECHNIQUE	GALERIE API 20E ®	MICRO-GALERIE							
<p>PRINCIPE : Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.</p> <p>Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.</p> <p>Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les <u>Entérobactéries</u>. Elle comprend 20 tests biochimiques.</p>									
<p>TECHNIQUE :</p> <p>⇒ Préparation de la galerie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. • Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation <p>⇒ Préparation de l'inoculum</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ouvrir une ampoule de Suspension Medium (ou un tube d'eau distillée stérile) • Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé • Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland) <p>⇒ Inoculation de la galerie</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Remplir les tubules et les cupules des tests du type [CIT]</td> <td style="width: 10%; text-align: center; vertical-align: middle;"> </td> <td rowspan="3" style="width: 40%; padding: 5px; vertical-align: top;"> <p>Remplissage des tubes :</p> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Remplir les tubules des tests du type ADH et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l'anaérobiose.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: middle;"> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Remplir uniquement les tubules des tests restants</td> <td style="text-align: center; vertical-align: middle;"> </td> </tr> </table> <p style="margin-top: 10px;">Remplir en posant la pipette contre la paroi de la cupule.</p>			Remplir les tubules et les cupules des tests du type [CIT]		<p>Remplissage des tubes :</p>	Remplir les tubules des tests du type ADH et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l' anaérobiose .		Remplir uniquement les tubules des tests restants	
Remplir les tubules et les cupules des tests du type [CIT]		<p>Remplissage des tubes :</p>							
Remplir les tubules des tests du type ADH et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l' anaérobiose .									
Remplir uniquement les tubules des tests restants									
<p>Remarque : il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (GAZ+)</p>									
<p>RESULTATS :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées. • Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : Test VP, TDA, IND, Nitrate réductase... 									
<p>IDENTIFICATION :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Avec le tableau d'identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau : chaque cellule de ce tableau contient les pourcentages de positivité • Avec le catalogue analytique : Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification • Avec un logiciel d'identification 									





TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ /N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		





TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ ⁻ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		





TABLEAU D'IDENTIFICATION / PERCENTAGE TABLE / PROZENTTABELLE / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / TABLA DE IDENTIFICACION

api 20 € (V32)

	DNPG	ADH	LDL	SDC	COU	SD	UBE	TD4	ME	SP	DEL	GU	MAN	MO	SPR	R4A	SAC	MEI	AMY	ARA	SV	NO ₂	B ₂	MOS	MGC	CEO	OFF
<i>Buttiauxella agrestis</i>	100	0	3	85	86	0	0	0	0	0	0	100	100	0	9	100	0	82	100	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Budvicia aquatica</i>	100	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	100	100	
<i>Cedecea davisae</i>	100	77	0	100	77	0	0	0	0	85	0	100	100	15	0	0	100	0	100	0	0	99	0	87	100	100	
<i>Cedecea lapagei</i>	90	100	0	0	90	0	0	0	0	100	0	100	90	0	0	0	10	100	10	0	99	0	87	100	100		
<i>Cedecea neteri</i>	100	80	0	0	100	0	0	0	0	86	0	100	100	20	100	0	100	0	100	20	0	99	0	87	100	100	
<i>Citrobacter diversus/amalonaticus</i>	97	50	0	93	82	0	2	0	92	0	0	100	99	4	92	94	27	17	96	95	0	100	0	95	100	100	
<i>Citrobacter freundii</i>	83	32	0	32	73	69	3	0	7	0	0	100	98	11	95	58	35	66	61	99	0	98	0	95	100	100	
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	0	0	100	99	0	94	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0	100	0	0	75	0	100	0	100	100	100	
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0	100	99	1	94	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	100	0	98	100	100	
<i>Enterobacter cloacae</i>	93	75	1	98	85	0	1	0	0	85	0	100	98	12	80	79	96	83	99	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	93	0	93	98	60	0	2	0	0	73	0	99	99	93	99	93	99	99	99	99	0	100	0	97	100	100	
<i>Enterobacter agglomerans 1</i>	99	0	0	1	16	0	3	2	1	60	8	99	99	20	13	66	77	26	57	84	0	85	0	85	100	100	
<i>Enterobacter agglomerans 2</i>	100	0	0	0	92	0	0	3	57	51	23	100	87	46	67	66	98	83	100	100	0	85	0	85	100	100	
<i>Enterobacter agglomerans 3</i>	100	2	1	2	88	0	0	1	30	80	24	99	97	11	19	64	69	91	100	97	0	85	0	85	100	100	
<i>Enterobacter agglomerans 4</i>	96	0	0	3	62	0	1	1	1	93	1	99	99	90	51	66	62	84	86	96	0	85	0	85	100	100	
<i>Enterobacter agglomerans 5</i>	99	0	0	13	44	0	13	13	56	1	1	99	91	31	13	69	1	88	99	99	0	85	0	85	100	100	
<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	96	26	1	100	52	0	0	0	0	78	0	100	99	0	1	100	99	96	99	99	0	100	0	92	100	100	
<i>Enterobacter amnigenus 2</i>	93	79	1	100	90	0	0	0	0	40	0	100	99	0	99	100	5	100	99	99	0	100	0	100	100	100	
<i>Enterobacter intermedius</i>	99	1	2	100	1	0	0	0	0	11	0	100	95	0	65	100	32	100	99	99	0	100	0	92	100	100	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	100	0	35	100	70	0	95	0	0	91	0	100	99	25	0	100	99	100	99	100	0	100	0	90	100	100	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	100	93	0	89	94	0	1	0	41	81	37	100	100	85	44	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100	100	
<i>Enterobacter taylorae</i>	100	68	0	99	98	0	0	0	0	89	0	100	100	0	0	100	1	0	100	100	0	100	0	99	100	100	
<i>Erwinia spp</i>	13	3	1	0	5	0	0	0	0	88	17	97	77	3	26	1	91	19	42	41	0	85	0	85	100	100	
<i>Erwinia nigrifluens</i>	11	0	0	11	0	0	0	0	0	67	56	100	100	78	99	100	100	100	100	100	0	85	0	85	100	100	
<i>Escherichia coli 1</i>	83	5	74	70	0	3	2	0	89	0	0	99	97	3	90	82	41	67	20	82	0	100	0	95	100	100	
<i>Escherichia coli 2</i>	47	10	45	30	0	2	1	0	77	0	0	97	84	2	42	35	4	34	12	90	0	98	0	5	100	100	
<i>Escherichia fergusonii</i>	96	1	93	100	1	0	0	0	99	3	0	100	99	0	0	87	0	3	99	97	0	100	0	93	100	100	
<i>Escherichia hermannii</i>	100	0	6	100	5	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0	97	44	0	97	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Escherichia vulneris</i>	100	64	42	0	0	0	1	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	78	85	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Ewingella americana</i>	90	0	0	0	96	0	0	0	0	99	1	100	100	0	0	5	0	0	90	1	0	100	0	60	100	100	
<i>Hafnia alvei 1</i>	62	1	93	95	57	0	15	0	0	56	0	99	99	0	1	97	1	0	26	98	0	100	0	85	100	100	
<i>Hafnia alvei 2</i>	52	1	97	98	5	0	1	0	0	15	0	95	92	0	1	1	1	0	5	18	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	100	0	92	99	92	0	75	0	100	50	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	89	0	80	0	89	0	76	0	99	44	0	100	100	98	100	54	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	100	0	73	0	79	0	75	0	0	75	0	100	90	73	99	95	100	99	99	99	0	100	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae ozaenae</i>	94	23	30	0	20	0	1	0	0	1	0	98	94	49	57	65	8	79	90	83	0	92	0	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis</i>	25	0	2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	100	71	71	42	67	1	92	25	0	100	0	0	100	100	
<i>Kluyvera spp</i>	89	0	30	99	56	0	0	1	76	0	0	100	99	0	37	93	88	99	95	99	0	95	0	94	100	100	
<i>Koserella trabulsii</i>	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	100	0	100	0	0	100	100	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	100	0	0	0	0	15	0	86	0	30	100	100	100	0	4	100	55	100	99	100	0	100	0	100	100	100	
<i>Moellerella wisconsinensis</i>	86	0	0	0	29	0	0	0	21	7	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	90	0	0	100	100	
<i>Morganella morganii</i>	1	1	5	98	2	1	99	91	97	0	0	97	1	0	0	0	1	0	0	1	0	88	0	95	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	1	98	57	83	99	98	2	4	63	96	1	0	0	0	1	1	1	1	0	93	0	95	100	100	
<i>Proteus penneri</i>	0	0	0	0	3	17	100	99	0	0	17	100	0	0	0	0	100	0	1	0	0	99	0	85	100	100	
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0	31	83	98	99	92	0	52	97	1	1	0	4	89	0	65	1	0	100	0	94	100	100	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0	0	0	94	0	0	99	99	0	0	99	2	2	0	0	8	0	0	2	0	100	0	96	100	100	
<i>Providencia rettgeri</i>	1	1	0	0	70	0	98	99	90	0	0	98	82	78	2	42	34	0	11	1	0	98	0	94	100	100	
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	0	89	0	30	90	97	0	0	98	3	84	0	0	16	0	0	3	0	100	0	85	100	100	
<i>Rahnella aquatilis</i>	100	0	0	0	66	0	0	7	0	100	0	100	100	0	98	98	100	85	98	95	0	100	0	6	100	100	
<i>Salmonella arizonae</i>	98	48	96	98	50	97	0	0	0	0	0	100	99	0	99	96	1	64	0	99	0	100	0	99	100	100	
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	22	97	97	4	65	0	0	0	0	0	100	99	0	85	95	0	20	0	0	0	100	0	95	100	100	
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	1	0	99	0	5	0	0	0	0	0	100	99	0	99	99	0	96	0	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Salmonella spp</i>	3	69	96	95	75	85	0	0	0	0	0	100	97	33	93	93	2	78	1	94	0	100	0	94	100	100	
<i>Salmonella typhi</i>	0	2	93	0	0	8	0	0	0	0	0	100	99	0	99	0	0	94	0	0	0	100	0	97	100	100	





REF 20 500

07468J - fr - 2009/04

IVD

Système d'identification des staphylocoques, microcoques et apparentés

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION (coffret de 25 tests)

- 25 galeries API Staph
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules d'API Staph Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION**Galerie**

La composition de la galerie API Staph est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

Milieu

API Staph Medium 6 ml	Extrait de levure	0,5 g
	Bactopeptone (origine bovine/porcine)	10 g
	NaCl	5 g
	Oligoéléments	10 ml
	Eau déminéralisée	qsp 1000 ml
	pH : 7,0 - 7,4	

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS**Réactifs**

- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Réactifs : VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422)
NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
ZYM A (Réf. 70 494)
ZYM B (Réf. 70 493)
- McFarland Standard (Réf. 70 900)
- Catalogue Analytique API Staph (Réf. 20 590) ou logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

Matériel

- Pipettes ou PSipettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoule
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- **Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.**
- **Pour usage professionnel uniquement.**
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
 - Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
 - Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
 - Bien enfoncer le bouchon.
 - Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
 - Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
 - Enlever délicatement le bouchon.
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.
- Il est recommandé de réaliser un contrôle qualité avant d'utiliser chaque nouvelle ampoule de réactif ZYM B.





CONTROLE DE QUALITE

Les milieux, galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur avec la souche

1. *Staphylococcus xylosus* ATCC® 700404 de préférence ou l'une des souches suivantes :

2. *Staphylococcus lentus*

ATCC 700403

3. *Staphylococcus capitis*

ATCC 35661

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
1.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V	-	+	+	-	+	-	+
2.	-	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-
3.	-	+	+	+	-	-	-	V	-	-	+	-	+	-	-	-*	-	-	+	-

* Ce résultat peut varier en fonction du milieu de culture utilisé.

Profils obtenus après culture des souches sur gélose au sang de mouton.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Le système API Staph est destiné à l'identification des espèces mentionnées dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice), et à elles seules. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'Identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

- Staphylocoques
 - 2104 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
 - 92,49 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
 - 4,42 % des souches n'ont pas été identifiées.
 - 3,09 % des souches ont été mal identifiées.

Microcoques/Kocuria

171 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :

- 87,72 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
- 7,60 % des souches n'ont pas été identifiées.
- 4,68 % des souches ont été mal identifiées.

ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.





TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge *	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NiTRates en nitrites		
				incolore-rose pâle	rouge
PAL	β-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	<u>ZYMA + ZYMB / 10 min</u>	
				jaune	violet
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				incolore-rose pâle	violet-rose
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFfinose)	rouge	jaune
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl-αD- glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl-αD- Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
ADH	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatif (0) et positif (GLU).

* Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. III
TABLES DES SYMBOLES	p. IV

bioMérieux, le logo bleu, API et apiweb sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.

Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.



bioMérieux SA
 au capital de 12 029 370 €
 RCS LYON 673 620 399
 69280 Marcy-l'Etoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tél. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France





TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /
TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE

% de réactions positives après 24 h à 35-37°C / % of reactions positive after 24 hrs. at 35-37°C /
% der positiven Reaktionen nach 24 Std. bei 35-37°C /
% de las reacciones positivas después de 24 H a 35-37°C / % di reazioni positive dopo 24 ore a 35-37°C

API STAPH	V4.0	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0	
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0	
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0	
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0	
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0	
<i>Staphylococcus cohnii ssp. cohnii</i>	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0	
<i>Staph. cohnii ssp. urealyticum</i>	0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0	
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0	
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0	
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0	
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0	
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0	
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0	
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0	
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0	
<i>Staphylococcus xylosum</i>	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0	
<i>Kocuria kristinae</i>	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97	
<i>Kocuria varians/rosea</i>	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95	
<i>Micrococcus spp</i>	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91	





3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
 Fax (314) 286-7828
 email: techserv@sigma.com
 sigma-aldrich.com

Product Information

Dimethyl sulfoxide

Product Number **D 8418**
 Store at Room Temperature

Product Description

Molecular Formula: C_2H_6OS
 Molecular Weight: 78.13
 CAS Number: 67-68-5
 Melting Point: 18.45 °C
 Boiling Point: 189 °C
 Density: 1.1 g/ml
 Dielectric Constant: 45
 Viscosity: 1.1 centipoises (27 °C)
 Synonyms: DMSC, methyl sulfoxide, dimethyl sulphoxide

This product is designated as Molecular Biology grade and is suitable for molecular biology applications. It has been analyzed for the presence of nucleases and proteases.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a highly polar organic reagent that has exceptional solvent properties for organic and inorganic chemicals. Among its uses in organic synthesis is the oxidation of thiols and disulfides to sulfonic acids.² Other reactions in which DMSO participates include the hydrolysis of epoxides, the thioalkylation of phenols, and the oxidation of primary alcohols, primary halides, and esters of primary alcohols to aldehydes.³

Protocols have been reported for the use of DMSO in column-loading buffers for poly(A)⁺ RNA selection, in buffers for the transformation of competent *E. coli*, in the polymerase chain reaction (PCR), the amplification of cDNA libraries, DNA sequencing, DEAE-dextran mediated transfection of cells, and polybrene-mediated DNA transfection.⁴ A procedure that uses DMSO to recover DNA from membrane filters for subsequent PCR amplification has been described.⁵ A capillary electrophoresis technique for DNA sequencing incorporates 2 M urea with 5% DMSO (v/w), and can be modified to use 100% DMSO as needed.⁶ A study of the contribution of various DMSO concentrations to melting temperatures in oligonucleotides has been published.⁷

DMSO is also widely utilized in the storage of human and animal cell lines and bacteriophage λ as a cryoprotective agent.⁴ A protocol to prepare a DMSO solution for freezing cells is as follows:

- 1) Prepare freezing medium containing culture medium with 10-20% serum and 5-10% DMSO.
- 2) Remove adherent cells with trypsin or other appropriate means. (For optimal results, cells should be in the log phase of growth.)
- 3) Gently pellet the cells by centrifugation (10 minutes at $250 \times g$, 4 °C) and remove the culture medium.
- 4) Resuspend the cells in the freezing medium at 10^6 - 10^7 cells/ml.
- 5) Aliquot into freezing vials.
- 6) Freeze cells according to standard freezing protocols. Store at -70 °C or below.

For cell fusion, a 10% DMSO solution in 40-50% polyethylene glycol (PEG) may be prepared.⁴

The use of DMSO in the modification of phosphoserine and phosphothreonine residues in proteins for MS analysis of phosphorylation states has been described.⁸ A study of leuprolide degradation in water and in DMSO has been reported.⁹

The compatibility of DMSO with various materials is listed below:

- Compatible: LDPE, HDPE, polypropylene, PPCO (polypropylene copolymer), polymethylpentene, nylon, teflon FEP
- Moderately compatible: polystyrene, ECTFE/ETFE
- Incompatible: polysulfone, flexible and rigid PVC tubing, polycarbonate

Precautions and Disclaimer

For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.





Preparation Instructions

This product is miscible in water (1 ml DMSO + 1 ml H₂O), yielding a clear, colorless solution. DMSO is a very hygroscopic liquid and should be protected from exposure to moisture. DMSO is also soluble in ethanol, acetone, ether, benzene, and chloroform.¹

Storage/Stability

DMSO supercools easily and remelts slowly at room temperature. The product may arrive as a solid instead of a liquid. The solidified product can be reliquified by warming to room temperature without detriment to the product. DMSO is stable up to 100 °C in alkaline, acidic and neutral conditions. At temperatures approaching its boiling point, DMSO is stable in neutral or alkaline conditions.

To prepare a sterile filtered DMSO solution, it is recommended to use a teflon or nylon membrane. Cellulose acetate membranes are not recommended.

References

1. The Merck Index, 12th ed., Entry# 3308.
2. Lowe, O. G., Oxidation of thiols and disulfides to sulfonic acids by dimethyl sulfoxide. *J. Org. Chem.*, **41**(11), 2061 - 2064 (1976).
3. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, March, J., John Wiley & Sons (New York, NY: 1991), pp. 376-377, 1168, 1193-1195.
4. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Sambrook, J. and Russell, D.W., CSHL Press (Cold Spring Harbor, NY: 2001), pp. 1.105-1.106, 2.36, 7.16, 8.9, 8.23, 11.64, 12.39, 16.28, 16.43-16.45.
5. Chong, K. Y., et al., Post-hybridization recovery of membrane filter-bound DNA for enzymatic DNA amplification. *Biotechniques*, **14**(4), 575-578 (1993).
6. Kotler, L., et al., DNA sequencing of close to 1000 bases in 40 minutes by capillary electrophoresis using dimethyl sulfoxide and urea as denaturants in replaceable linear polyacrylamide solutions. *Electrophoresis*, **23**(17), 3062-3070 (2002).
7. von Ahsen, N., et al., Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg²⁺, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin. Chem.*, **47**(11), 1956-1961 (2001).
8. Thaler, F., et al., A new approach to phosphoserine and phosphothreonine analysis in peptides and proteins: chemical modification, enrichment via solid-phase reversible binding, and analysis by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**(3), 366-373 (2003).
9. Hall, S. C., et al., Characterization and comparison of leuprolide degradation profiles in water and dimethyl sulfoxide. *J. Pept. Res.*, **53**(4), 432-441 (1999).

GCY/ALF/HLD/NSB 12/03

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

