

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie « ALLAH » tout puissant de m'avoir donné la force, la volonté et le courage pendant toutes ces années d'études pour concrétiser ce travail, sans oublier d'exprimer mes plus vifs remerciements à :

❖ **M^r. KACEM Brahim**; Maître de Conférences A à l'Université de Mostaganem qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse.

❖ **M^r. DJIBAOUI Rachid**; Directeur de thèse et maître de Conférences A à l'Université de Mostaganem, qu'il soit s'assuré de ma plus profonde reconnaissance et de mes chaleureux remerciements pour son soutien et sa disponibilité tout au long de cette étude.

❖ **M^r. BELAHCENE Miloud**; Professeur à l'Université de Mostaganem qui m'a fait l'honneur de participer au Jury de soutenance; je l'en remercie profondément.

❖ Je remercie **M^r. MEKHALDI Abdelkader**; Maître de Conférences A à l'Université de Mostaganem d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail.

❖ **M^{me} TALEB, M^{me} MOUFFOK et M^r Badreddine**; personnel et responsable du service d'entérologie du l'Institut Pasteur d'Alger qui m'ont préparé l'environnement extraordinaire pour réalisé une grande partie de ce travail de recherche.

❖ **M^r BENYAMINA Mehdi**; Laborantin au laboratoire d'hygiène de Mostaganem, pour son orientation vers ces propres cadres supérieurs.

❖ **LAZRAGUE Hafida**; Responsable du laboratoire de microbiologie à l'université de Mostaganem; pour sa présence continue au cours de la réalisation de ce travail.

- ❖ Je tiens à exprimer mes remerciements les plus chaleureux à ma femme **M^{me} ARABI-SISBANE I** ; Magister en Hygiène et sécurité agroalimentaire, pour son soutien et ces encouragements tout au long de mes études et de ma vie.
- ❖ **M^r. Benmehdi T, M^{me} Benmehdi F, MEKAOUI S, MOUDJAHIDA** je leur exprime ici toute ma reconnaissance pour m'avoir donné la possibilité de réaliser une partie de mon travail au sein du Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem.
- ❖ *Mes parents, mes frères et sœurs*, mes remerciements les plus chaleureux, pour leurs soutiens, leurs amours, gentillesse et encouragement tout au long de mes études.
- ❖ **M^r CHAA Houari**; Maître de Conférences A et responsable du laboratoire de biotechnologie végétale de l'université des sciences technologiques d'Oran, qui m'a aidé surtout pour la conservation des souches.
- ❖ Je voudrais également remercier l'ensemble des étudiants de ma promo avec lesquels j'ai vécu de bons moments.

Mes remerciements vont également à l'adresse de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

ARABI Abed

الملخص

إليكوباكتر بيلوري هي بكتيريا تعيش في معدة الإنسان و تعتبر من الأنواع الميكروبية النادرة و التي تستطيع العيش في وسط حامضي.

حاليا العدد المتزايد للنكسة العلاجية يعود إلى مقاومة هذه الميكروبات للمضادات الحيوية المستعملة.

المرحلة الأولى من عملنا هذا إختصرت على زرع وتحديد هذا النوع من البكتيريا الصارة بإستعمال وسط غذائي

خاص يدعى كولومبيا مضاف له 10% من دم الحصان, تبع هذا بإختبارات بيوكيميائية.

مقاومة إليكوباكتر بيلوري للمضادات الحيوية هي العامل الذي دفعنا إلى تفعيل خاصية المضاد البكتيري للزيوت الأساسية المتواجدة في نبات محلي يدعى الدرو, هذه الأخيرة تم إستخلاصها عن طريق عملية التقطير و ذلك بمردود يعادل 0,23%.

و أخيرا أجرينا ما يسمى بالأروماتوغرام بتركيز مختلفة للزيوت الأساسية المستخلصة (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78% و 0.39%) على إليكوباكتر بيلوري وكذلك على بكتيريا أخرى تدعى إشريشيا كولي و المسببة لإلتهابات الجهاز الهضمي عند الأطفال.

النتائج المنحصلة عليها بينت أن سلالة إليكوباكتر بيلوري كانت حساسة جدا للزيوت الأساسية على عكس إشريشيا كولي, و بالتالي يمكننا القول أنه من الممكن إستعمال هذا العلاج ضد العدوة بالإليكوباكتر بيلوري.

الكلمات الرئيسية: إليكوباكتر بيلوري, الدرو, الزيوت الأساسية, المضاد البكتيري.

Résumé

Helicobacter pylori vit dans l'estomac humain. Elle est considérée parmi les rares microorganismes connus pouvant survivre dans un environnement aussi acide. Actuellement le nombre croissant d'échecs thérapeutiques est dû à la résistance de cette bactérie aux antibiotiques usuels.

En premier lieu notre travail consistait à mettre en culture et à identifier cette bactérie pathogène par réalisation d'une culture en microaérophilie sur gélose Columbia au sang de cheval suivie des tests biochimiques.

La résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques nous à poussé à exploité les effets antibactériens des huiles essentielles d'une plante médicinale d'Algérie, *Pistacia lentiscus L*, extraites par hydrodistillation avec un rendement de 0, 23%.

Enfin, nous avons effectué un aromatogramme à différentes concentrations (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78% et 0.39%) des huiles essentielles extraites sur *Helicobacter pylori* et une souche de *E.coli* gastro-entérique infantile.

Les résultats obtenus ont montré que la souche testée de *Helicobacter pylori* était fortement sensible aux huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* par rapport à *E.coli*. Les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* peuvent être utilisées comme un traitement naturel vis-à-vis de *Helicobacter pylori*.

Mots clés : *Helicobacter pylori*, *Pistacia lentiscus L*, huiles essentielles, effet antibactérien.

Abstract

Helicobacter pylori live in the human stomach. It is considered among the rare known micro-organisms being able to survive in such an acid environment. Currently the number growing of therapeutic failures is due to the resistance of this bacterium to usual antibiotics.

Initially our work consisted in putting in culture and identifying this pathogenic bacterium by realization of a culture in microaérophilie on growth Columbia with the blood of horse followed by the biochemical tests.

The resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics us to thorough to exploited the antibactériens effects of the essential oils of a medicinal plant of Algeria, *Pistacia lentiscus L*, extracted by hydrodistillation with an output from 0, 23%.

Lastly, we carried out an aromatogramme with various concentrations (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78% and 0.39%) of the essential oils extracted on *Helicobacter pylori* and a stock from infantile gastro-enteric *E.coli*.

The results obtained showed that the stock tested of *Helicobacter pylori* was strongly sensitive to essential oils of *Pistacia lentiscus L* compared to *E.coli*. Essential oils of *Pistacia lentiscus L* can be used like a natural treatment with respect to *Helicobacter pylori*.

Key words: *Helicobacter pylori*, *Pistacia lentiscus L*, essentials oils, antibacterial effect.

Liste des abreviations

ADH Arginine dihydrolase
ADN : Acide désoxynucleique
AMP_c : Adénosine monophosphate cyclique
AMY: Amygdaline
AN : Acide Nalidixique
ARA: Arabinose
ARNr : Acide rubonucleique ribosomal
ATCC: American Type Culture Collection
ATPases: Adénosine-triphosphate
Aw: Activité de l'eau
AX : Amoxiciline
BCP : Pourpre de bromocrésol
BHIB : Brain Heart Infusion Broth
C.L.E.D: Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient
C: Carbone
C¹³ : Carbone marqué 13
Cag A : Cytotoxin-associated gene A
CD4+ : Cluster de différenciation 4
CD8 : Cluster de différenciation 8
CFA : Colonization Factor Antigen
CH: Clarithromycine
CHO : Ovaire de hamster chinois
CIT : Citrate
CMB : Concentration minimale bactéricide
CMH II : Classe II du complexe majeur d'histocompatibilité
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CNNLS : Clinical and Laboratory Standards Institut
CO₂ : Dioxyde de carbone
DA : Double aveugle
DNU : dyspepsie non ulcéreuse
E : Erythromycine
E. coli : *Echerichia coli*
E.H.E.C : Entero-Hemorrhagic-Colitis *Echerichia coli*
E.I.E.C : Entero-Invasive *Echerichia coli*
E.P.E.C : Entero-Pathogenic *Echerichia coli*
E.T.E.C : Entero-Toxigenic *Echerichia coli*
ECA : Enterobacterial Common Antigen
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fla A : Flagelline majeur A
Fla B : Flagelline mineure B

G + C : Guanine + Cytosine
g : Gramme
G : Guanidine
G.E.I. :Gastro-entérites infantiles
GEA : Gastroentérite aiguë
GEL : Gélatinase
GLU : Glucose
GMP_c : **GMP cyclique** : guanosyl monophosphate cyclique.
h: heure
H₂ : Hydrogène
H₂S: Thiosulfate
HE : Huilles essentielles
HELA: Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire cancéreuse utilisée en biologie cellulaire et en recherche médicale.
Hp : *Helicobacter pylori*
Hp+ : malade sélectionné sur la base d'une sérologie positive
HPLC–DAD–MS
Hsp; Heat shock protein
Ig : Immunoglobuline
IND : Indole
INO : Inositol
IPP : Inhibiteur pompe de proton
ITT: en intention de traiter
KDa : Kilo dalton
L : Lansoprazole
LDC : Lysine décarboxylase
LPS : Lipopolysaccharides
LT : Thermolabile
MALT: Mucosa-associated lymphoid tissue
MAN: Mannitol
MEL: Mélibiose
mg : Milligramme
ml: Millilitre
MTR: Metronidazole
MUGD : Maladies d'Ulceré Gastro-Duodéal).
N : Nombre
N₂: Azote
O : oméprazole
O₂ : Oxygène
ODC: Ornithine décarboxylase
OF⁵: Ofloxacin
ONPG : Orthonitrophényl-β-galactoside ou 2-nitrophényl-β-D-galactopyrannoside.

P : Pantoprazole
PCR : Polymerase chain reaction
PDA : Barrette de diodes
pH : force d'Hydrogène
RAPD: Random amplified polymorphic DNA
RBC : Ranitidine-bismuth citrate
SA : simple aveugle
ST : Thermostable
TTR Tartrate de Jordan
UD: ulcère-duodéal.
UFC : Unité forma colonie
UGD : ulcère gastroduodénale
Ure: Urée
Vac A : Cytotoxine vacuolisante
µg : Microgramme
µm : Micromètre

Liste des tableaux

Tableau n°01 : Propriétés de la toxine cholérique et des toxines LT et ST des <i>Escherichia coli</i>	13
Tableau n°02 : Principaux caractères de distinction des différentes espèces de <i>Echerichia</i>	15
Tableau n°03 : Classification de <i>Helicobacter pylori</i>	22
Tableau n°04 : Caractères phénotypiques de 15 espèces de <i>Helicobacter</i>	23
Tableau n°05 : Différents types de gastrites chroniques	43
Tableau n°06 : Résumé de l'étude MACH 1	51
Tableau n°07 : Trithérapie IPP double dose, amoxicilline 1 g x 2 / jour, clarithromycine 500 mg x 2 / jour, pendant 7 jours : résultats des principales études avant 2000	52
Tableau n°08 : la variation saisonnière de la composition chimique des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> obtenue par GC-MS	71
Tableau n°09 : les proportions des différents composés des huiles essentielles de trois régions	73
Tableau n°10 : Résultats des tests biochimiques d'identification de <i>Helicobacter pylori</i>	92
Tableau n°11 : Sensibilité de la souche de <i>Helicobacter pylori</i> aux antibiotiques testés	95
Tableau n°12 : Lecture des résultats d'une galerie biochimique API 20 E de <i>E.coli</i>	101
Tableau n°13 : Sensibilité de la souche de <i>E.coli</i> aux antibiotiques testés	103
Tableau n°14 : Quantités des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation	105
Tableau n°15 : Effet inhibiteur des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> vis-à-vis <i>Helicobacter pylori</i> et <i>E.coli</i>	107

Liste des figures

Figure n°	Titre	N° de page
Figure n° 01	: Répartition des bactéries le long du tube digestif humain	5
Figure n°02	: Marshall Barry et Warren Robin , Prix Nobel de Physiologie ou de Médecine en 2005	21
Figure n° 03:	Diagramme illustre la relation des <i>Helicobacter pylori</i> avec d'autres membres du genre de <i>Helicobacter</i> aussi bien qu'à des membres des genres <i>Wolinella</i> et <i>Campylobacter</i>	24
Figure n° 04	: La morphologie spirale de <i>Helicobacte pylori</i>	25
Figure n° 05	: Microphotographie électronique de <i>Helicobacter pylori</i> possédant les flagelles multiples	25
Figure n° 06	: Différentes parties de l'estomac humain	30
Figure n° 07	: Schéma récapitulatif des différentes étapes impliquant <i>Helicobacter pylori</i> dans les maladies gastro-duodénales	35
Figure n° 08	: Structure génomique de l'uréase de <i>Helicobacter pylori</i>	36
Figure n°09	: Les facteurs de la carcinogénèse de l'estomac	46
Figure n°10:	Diagnostic de <i>Helicobacter pylori</i> par le test respiratoire à l'urée marquée au ¹³ C ₄₈	
Figure n°11:	Description botanique de <i>Pistacia lentiscus L.</i>	55
Figure n°12:	Aire de répartition de <i>Pistacia lentiscus L.</i> autour du bassin Méditerranéen	56
Figure n°13	: Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau	60
Figure n°14	: Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation	60
Figure n°15	: Principe schématisé de l'appareillage de Turbodistillation	62
Figure n°16	: Principe schématisé de l'appareillage de système de l'hydrodistillation sous micro-ondes	63
Figure n°17	: Schéma du procédé de récupération de l'huile essentielle de citron et autres agrumes	65
Figure n°18:	Schéma d'une batterie d'extraction par solvant pour végétaux bruts	66
Figure n°19	: Schéma du système d'extraction CO ₂ des solides	67
Figure n°20	: Chromatogramme des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L.</i>	73
Figure n°21:	Constituants chimiques des huiles essentielles des différentes parties de <i>Pistacia lentiscus L.</i>	74
Figure n°22	: Milieu de culture et additifs nécessaires de sélectivité	80
Figure n°23:	Système GENbag microaérophile	80
Figure n°24	: Densimètre pour l'ajustement de la turbidité en McFarland	83
Figure n° 25:	Sérum test trivalent 4	84
Figure n°26	: Schéma du montage d'hydrodistillation (Clevenger)	86
Figure n° 27:	Aspect macroscopique de <i>Helicobacter pylori</i> sur milieu Columbia additionnée de 10% de sang de cheval	91
Figure n° 28	: Aspect microscopique à l'état frais de <i>Helicobacter pylori</i>	91
Figure n° 29	: Coloration de Gram de <i>Helicobacter pylori</i>	91
Figure n° 30:	Test de la catalase de <i>Helicobacter pylori</i>	93
Figure n° 31	: Test de l'oxydase de <i>Helicobacter pylori</i>	93
Figure n° 32	: Test de l'uréase de <i>Helicobacter pylori</i>	93
Figure n° 33:	Ajustement de la turbidité à 3 McFarland à l'aide du densimètre	94
Figure n° 34:	Antibiogramme de <i>Helicobacter pylori</i>	96
Figure n° 35:	Antibiogramme de <i>Helicobacter pylori</i>	96
Figure n° 36	: Aspect macroscopique de <i>E.coli</i> sur gélose BCP	99
Figure n° 37	: Coloration de Gram de <i>E.coli</i>	99
Figure n° 38	: <i>E.coli</i> en milieu KIA	100
Figure n° 39	: Résultats de l'API 20E de <i>E.coli</i>	100
Figure n° 40:	Tests de sérotypages d' <i>E.coli</i> vis-à-vis du sérum test trivalent 4	102
Figure n° 41:	Antibiogramme de <i>E.coli</i>	104
Figure n° 42:	Antibiogramme de <i>E.coli</i>	104
Figure n° 43	: Procédé d'extraction des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> par hydrodistillation	106
Figure n° 44	: Aromatogramme de <i>Helicobacter pylori</i>	109
Figure n° 45	: Aromatogramme de <i>E.coli</i>	110
Figure n° 46	: Détermination de la CMI d'huiles essentielles sur <i>E.coli</i>	110
Figure n° 47	: Détermination de la CMB d'huiles essentielles sur <i>E.coli</i>	110
Figure n° 48	: Effet inhibiteur des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> sur <i>Helicobacter pylori</i> et <i>E.coli</i>	111

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction Générale	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : Ecologie bactérienne du tube digestif humain	
I.1. Flore bactérienne normale du tube digestif	3
I.1.1. Répartition topographique de la flore digestive	3
I.1.2. Composition classique d'une flore intestinale humaine	4
I.1.3. Rôles de la flore intestinale humaine	6
I.1.4. Stabilité apparente de la flore	7
I.2. <i>Escherichia coli</i>	8
I.2.1. Généralités	8
I.2.2. Définition	8
I.2.3. Habitat	9
I.2.4. Rôle bénéfique de <i>E.coli</i>	9
I.2.4.1. Rôle microbiote normal	9
I.2.4.3. Rôle de la biotechnologie	9
I.2.4.2. Utilisation thérapeutique	10
I.2.5. Physiopathologie	10
I.2.5.1. Souches pathogènes pour l'homme	10
I.2.5.1.1. Infections intestinales	12
I.2.5.1.2. Infections urinaires	14
I.2.5.1.3. Méningites néo-natales	14
I.2.5.1.4. Suppurations diverses	14
I.2.5.2. Pouvoir pathogène pour l'animal	14
I.3. Caractérisation d'une souche de <i>E.Coli</i>	15
I.3.1. Caractères cultureux et métaboliques	15
I.3.2. Diagnostic différentiel	15
I.3.3. Caractères antigéniques	16
I.3.4. Diagnostic biologique d'une infection a <i>E.coli</i>	16
I.3.4.1. Infections intestinales	16
I.3.4.2. Infections urinaires	17
I.3.4.3. Autres infections	18
I.4. Traitement de l'infection à <i>E.coli</i>	18
I.5. Facteurs d'agression de la flore intestinale	18
1.5.1. L'antibiothérapie	18
1.5.2. L'utilisation des traitements anti-acide	18
1.5.4. Gastroentérite aiguë	19
1.5.3. Carence en fibres alimentaires	19

Chapitre II : Taxonomie et généralités sur *Helicobacter pylori*.

II.1. Historique	20
II.2. Taxonomie de <i>Helicobacter Pylori</i>	22
II.3. Critères Morphologiques	24
II.4. Critères Physiologiques et métaboliques chez <i>Helicobacter pylori</i>	25
II.5. Critères cultureux	26
II.5.1. Source de carbone	26
II.5.2. pH et activité de l'eau	27
II.5.3. Température	27
II.6. Critères génétiques	27

Chapitre III : Pathologies associées à *Helicobacter pylori* et traitements

III.1. Épidémiologie	29
III.1.1. Réservoir bactérien	30
III.1.1.1. L'estomac	30
III.1.1.2. La cavité buccale	31
III.1.1.3. Les selles	31
III.1.1.4. Chez les animaux	31
III.1.1.5. L'environnement	31
III.1.2. Circonstances et modes de transmission	31
III.1.2.1. Rôle de l'environnement	31
III.1.2.2. Rôle des conditions de vie	32
III.1.2.3. Mode de transmission	32
III.1.2.3.1. Transmission oro-orale	32
III.1.2.3.2. Transmission féco-orale	33
III.1.2.3.3. Transmission par le matériel d'endoscopie	33
III.2. Physiopathologie	34
III.2.1. Colonisation de la muqueuse gastrique par <i>Helicobacter pylori</i>	35
III.2.1.1. Mobilité	35
III.2.1.2. Uréase	36
III.2.1.3. Adhérence aux cellules cibles de la muqueuse gastrique	37
III.2.2. Persistance au niveau de l'estomac	37
III.2.2.1. Environnement acide	38
III.2.2.2. Facteurs métaboliques intrinsèques	38
III.2.2.3. Résistance à la phagocytose	38
III.2.3. Induction de la maladie	38
III.2.3.1. Facteurs d'agression de la muqueuse gastrique	38
III.2.3.1.1. Effet sur le Mucus	39
III.2.3.1.2. Facteurs bactériens de pathogénicité	39
III.2.3.2. Réponse de l'hôte	40
III.2.3.2.1. Réponse locale de la muqueuse gastrique	40
III.2.3.2.2. Réponse immunitaire générale	41
III.2.4. <i>Helicobacter pylori</i> et les gastrites	43
III.2.5. Gastrites chroniques	43
III.2.6. <i>Helicobacter pylori</i> et l'ulcérogenèse	45

III.2.7. Mécanisme de cancérogenèse	45
III.3. Diagnostic et traitement de l'infection par <i>Helicobacter pylori</i>	47
III.3.1. Diagnostic	47
III.3.1.1. Méthodes diagnostiques	47
III.3.1.1.1. Les tests invasifs	47
III.3.1.1.2. Les tests non invasifs	47
II.3.2. Quand faut-il rechercher <i>Helicobacter pylori</i> (selon la conférence de consensus en France 1996) ?	49
III.3.3. Traitements de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	49
III.3.3.1. Historique du traitement anti- <i>Helicobacter pylori</i>	49
III.3.3.1.1. Les monothérapies	49
III.3.3.1.2. Les bithérapies	50
III.3.3.1.3. Les trithérapies	50
III.3.3.2. Schémas thérapeutiques	51
III.3.3.2.1. Les trithérapies IPP-Amoxicilline-Clarithromycine	51

Chapitre IV : Présentation de *Pistacia lentiscus L* et l'aromathérapie

IV.1. Introduction	53
IV.2. Classification systématique et description botanique	53
IV.2.1. Classification taxonomique	53
IV.2.2. Description botanique	54
IV.2.3. Produits et dérivés à base de <i>Pistacia lentiscus L</i>	56
IV.2.4. Etude chimique de l'espèce <i>Pistacia lentiscus L</i>	57
IV.3. Les Huiles essentielles	58
IV.3.1. Définition	58
IV.3.2. Répartition systématique	58
IV.3.3. Localisation des huiles essentielles dans les tissus	58
IV.3.4. Méthodes et équipement d'extraction	59
IV.3.4.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	59
IV.3.4.2. Extraction par hydrodistillation	60
IV.3.4.3. Hydrodistillation sous pression	61
IV.3.4.4. Le système de thermopompage	61
IV.3.4.5. Turbodistillation	61
IV.3.4.6. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes	62
IV.3.4.7. L'hydrodistillation assistée par ultrasons	64
IV.3.4.8. L'expression à froid	64
IV.3.4.9. Autres extractions et méthodes	65
IV.3.5. Composition des huiles essentielles	68
IV.3.5.1. Les composés volatils des huiles essentielles	68
IV.3.5.2. Les chimotypes	68
IV.3.6. Propriétés d'utilisation des huiles essentielles	69
IV.3.7. Mode d'action des huiles essentielles	70
IV.3.8. Les huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i>	70
IV.3.8.1. Aspects pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>Pistacia lentiscus L</i>	75
IV.3.8.2. Données toxicologiques de <i>Pistacia lentiscus L</i>	76

Partie expérimentale

Chapitre V : Matériel et méthodes

V.1. Objectif du travail.....	77
V.2. Bactéries de choix	77
V.3. Origine des souches	77
V.4. Culture et identification de <i>Helicobacter pylori</i>	78
V.4.1. Subculture de <i>Helicobacter pylori</i>	78
V. 4.1.1. Milieux de culture	78
V. 4.1.2. Conditions de culture	78
V.4.2. Identification de <i>Helicobacter pylori</i>	81
V.4.2.1. Examen macroscopique	81
V.4.2.2. Observation microscopique a l'état frais	81
V.4.2.3. Examen microscopique	81
V.4.2.4. Tests biochimiques	82
V.4.3. Conservation	82
V.4.4. Antibiogramme	82
V.5. Culture et confirmation de l'identification de <i>E.coli</i>	84
V.5.1.Examen macroscopique	84
V.5.2.Examen microscopique	84
V.5.3.Tests biochimiques	84
V.5.4. Antibiogramme	85
V.6. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> vis-à-vis de <i>Helicobacter pylori</i> et de <i>E.coli</i>	86
V.6.1.Matériel végétal	86
V.6.2. Extraction des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i>	86
V.6.3. L'effet des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> sur les deux germes testés	87
V.6.4. Détermination de la CMI et la CMB des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> sur les deux germes testés	87
V.6.4.1. Préparation des dilutions des huiles essentielles	87
V.6.4.2. Méthode de diffusion de disques en milieu solide	88
V.6.4.3. Méthode en milieu liquide	88

Chapitre VI : Résultats et discussion

VI.1. Culture et identification de <i>Helicobacter pylori</i>	90
VI.1.1. Examen macroscopique	90
VI.1.2. Etat frais	90
VI.1.3. Examen microscopique	90
VI.1.4. Tests biochimiques	92
VI.1.5. Antibiogramme	94
VI.2. Culture et confirmation de l'identification de <i>E.coli</i>	97
VI.2.1. Examen macroscopique	97

VI.2.2. Examen microscopique	97
VI.2.3. Tests biochimiques	97
VI.2.4. Le sérotypage de <i>E.coli</i>	102
VI.2.5. Le test d'antibiogramme	103
VI.3. Effet antibactérien des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i>	105
VI.3.1. Extraction des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i>	105
V.3.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> vis-à-vis <i>Helicobacter pylori</i> et <i>E.coli</i>	107
V.3.2.3. Détermination de la CMI et la CMB des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus L</i> vis-à-vis <i>E.coli</i>	108
Conclusion	112
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Introduction

Les échecs d'éradication des microorganismes responsables des maladies infectieuses, sont dus principalement à la multirésistance de ces derniers aux antibiotiques habituellement utilisés dans la thérapie. Les antibiotiques ne sont pas totalement inoffensifs pour l'organisme et peuvent provoquer, en plus de leur action antimicrobienne un certain nombre d'effets indésirables, comme par exemple la modification des effets physiologiques et métaboliques de la microflore digestive **(Cummings, 1997)**.

En effet l'usage des plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé, mais avant de pouvoir recommander l'usage de telle ou telle plante pour une maladie, il est nécessaire de valider l'usage traditionnel, qui en est fait. En d'autres termes il convient d'évaluer scientifiquement l'activité antimicrobienne de la plante médicinale retenue et apprécier si celle-ci confirme sa réputation. En réponse à des problèmes de santé, l'usage des plantes médicinales peut être perçu comme une alternative aux médicaments conventionnels **(Mahady et al., 2005)**.

Helicobacter pylori est une bactérie qui infecte les muqueuses de la paroi de l'estomac humain. Elle est notamment responsable des gastrites chroniques, des ulcères duodénaux et joue un rôle important dans la genèse de certains cancers gastriques. Cette infection s'acquiert à l'enfance et dans la très grande majorité des cas, elle devient chronique, s'accompagne d'une inflammation de la muqueuse gastrique et est la cause de 90 % de toutes les gastrites chroniques **(Jiang et Doyle, 1998)**.

La transmission est intra-familiale (mère/enfant, fratrie) et perdure pendant des décennies, voire toute la vie de la personne infectée. Environ 10% des personnes infectées, développeront une maladie ulcéreuse.

Helicobacter pylori vit exclusivement dans l'estomac humain et est l'un des rares microorganismes connus pouvant survivre dans un environnement aussi acide. Elle possède une forme hélicoïdale (d'où le nom de « *Helicobacter* ») et peut littéralement s'insérer dans la paroi stomacale afin de la coloniser. L'estomac produit deux substances, l'acide chlorhydrique et la pepsine. Ces substances très irritantes sont tenues à distance de la paroi stomacale par le mucus **(Huwez et Thirlwell, 1998)**.

Les pathologies apparaissent lors d'une sécrétion trop grande d'acide ou lors d'une protection insuffisante par le mucus.

Les bactéries ne résistent pas au milieu acide de l'estomac, cependant *Helicobacter pylori* sécrète une enzyme (uréase) qui lui permet de survivre aux sucs gastriques en le neutralisant. La bactérie agit alors de deux façons, elle augmente la sécrétion des sucs gastriques et affaiblit la structure de la muqueuse gastro-duodénale. Moins protégée, la paroi de l'estomac ou du duodénum est alors attaquée par les sucs gastriques.

En effet, malgré les résultats remarquables obtenus avec la trithérapie, associant un inhibiteur de la pompe à proton et deux antibiotiques (en particulier l'amoxicilline et la clarithromycine) avec un taux d'éradication > 90% (**Lind et al., 1999**). Les cliniciens sont actuellement devant un nombre croissant d'échecs thérapeutiques. Ainsi, dans les études françaises, les résultats obtenus sont plus modestes avec des taux d'éradication en moyenne inférieurs à 80% (**Laurent et al., 1999**).

La résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques usuels nous a poussé à exploiter les effets antibactériens des huiles essentielles d'une plante médicinale d'Algérie, *Pistacia lentiscus L*, c'est un arbuste appartenant à la famille des *Anacardiaceae*, ayant un feuillage dense, d'où seront extraits les huiles essentielles à tester en adjonction avec les rameaux (**Baudoux, 2003**). Son activité a été aussi testée sur une souche de *E.coli*, dans le but de percevoir son effet sur un autre germe du tractus digestif. Pour effectuer ce travail nous avons réalisé les étapes suivantes :

- Une recherche bibliographique sur *Helicobacter pylori* et *Echerichia coli* et leurs pathologies infectieuses,
- Obtention des souches de *Helicobacter pylori* et de *Echerichia coli*,
- Mises en culture et identification des souches,
- Réalisation d'un antibiogramme,
- Extraction des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L*,
- Effet antibactérien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* et détermination de la CMI et de la CMB.

Chapitre I : Ecologie bactérienne du tube digestif humain

La flore bactérienne de l'appareil gastro-intestinal est complexe, elle varie selon les espèces (animale et humaine), l'âge, les régimes alimentaires et l'utilisation des antibiotiques (Cumings, 1997).

I.1. Flore bactérienne normale du tube digestif :

Chez l'homme la microflore intestinale renferme environ 100 000 milliards de bactéries appartenant à plus de 400 espèces différentes. Il s'agit d'une biomasse considérable dont l'activité se traduit par la production *in vivo* d'enzymes et de métabolites. On ne peut pas séparer l'étude de la microflore intestinale de son contexte environnemental, à savoir l'hôte et les aliments. L'ensemble constitue un écosystème intégré, aux interrelations multiples. Toute modification de l'un ou de l'autre de ses constituants est susceptible de perturber l'équilibre et le fonctionnement de l'ensemble (Mountzouris et al., 2002).

À la naissance, le tube digestif est stérile, les microorganismes entrent avec la première alimentation. Les germes de colonisation initiale varient selon la source de nourriture. Chez les enfants nourris au sein, le *Bifidobactérium* représente 90% de la flore intestinale. Les *Entérocooccus* sont présents, mais peu nombreux, les *Staphylococcus*, les *Lactobacillus* et les *Clostridium* sont pratiquement absents. Chez les enfants allaités au biberon, le *Bifidobactérium* n'est pas prédominant, il cohabite avec d'autres bactéries comme les *Entérocooccus*, les *Lactobacillus*, et les *Clostridium*. (Ducluzeau et Raibaud, 1979).

I.1.1. Répartition topographique de la flore digestive :

La répartition de la flore varie selon les segments du tube digestif. Elle dépend de la teneur du milieu en oxygène, des sécrétions du tube digestif haut, des nutriments disponibles et de la vitesse du transit (rapide de la bouche au *caecum*, plus lent ensuite) (Backhed et al., 2004).

Globalement, il existe un gradient croissant oral-aboral :

- D
ans l'estomac, du fait d'un pH bas, la flore est presque inexistante (inférieure à 10^3 UFC/g de contenu gastrique),
- D
ans l'intestin grêle, on observe une variation quantitative (duodénum : 10^3 - 10^4 UFC/g, jéjunum : 10^4 - 10^6 UFC/g, iléon : 10^6 - 10^8 UFC/g) et qualitative : diminution progressive des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies strictes. Les bactéries habituellement présentes dans l'intestin grêle appartiennent aux genres : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, et à quelques espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* à des concentrations faibles jusqu'à l'iléon où elles apparaissent dominées par des espèces anaérobies à Gram négatif appartenant au genre *Bacteroides* (Espoir et al., 2005).
- D
ans le côlon, le transit, très fortement ralenti, est à l'origine d'une stase d'où l'augmentation importante de la population bactérienne (de 10^9 à 10^{11} UFC/g). C'est une véritable chambre de fermentation, siège de très nombreuses biotransformations des aliments non assimilés au niveau du grêle. Le côlon est la seule zone colonisée de façon permanente: la flore microbienne essentiellement anaérobie est dense et active, produisant localement de nombreux métabolites (Cebra, 1999).

Les bactéries présentes dans le tube digestif sont des xénobiotiques (toute substance étrangère à l'organisme et reconnue comme telle par celui-ci) qui, n'étant pas reconnues par l'hôte, devraient être rejetées. Or, cette masse bactérienne énorme est tolérée et est même responsable d'une stimulation non spécifique du système immunitaire. La seule stase ne permet pas de l'expliquer ; il est vraisemblable que les souches bactériennes possèdent des capacités d'adhésion soit aux mucines, soit aux cellules coliques par des systèmes spécifiques (adhésines) ou non spécifiques (liaisons ioniques, liaisons hydrogène) (Eckburg *et al.*, 2005).

I.1.2. Composition classique d'une flore intestinale humaine :

On peut définir une flore normale par l'ensemble des espèces présentes dans l'écosystème de façon constante et capables de s'y multiplier dans les conditions environnementales du tube digestif (Figure n° 01) (Mountzouris *et al.*, 2002). Mais il existe de très grandes variations dans les résultats publiés, selon les modes de prélèvement, les méthodes microbiologiques, la présence éventuelle de bactéries d'origine alimentaire, la physiologie intestinale et le contexte environnemental. On est loin de connaître toutes les espèces et leurs différents types, donc de bien appréhender les variations de flore induites par les modifications de régime alimentaire, les bactéries exogènes, les substances antibiotiques... (Gronlund *et al.*, 1999).

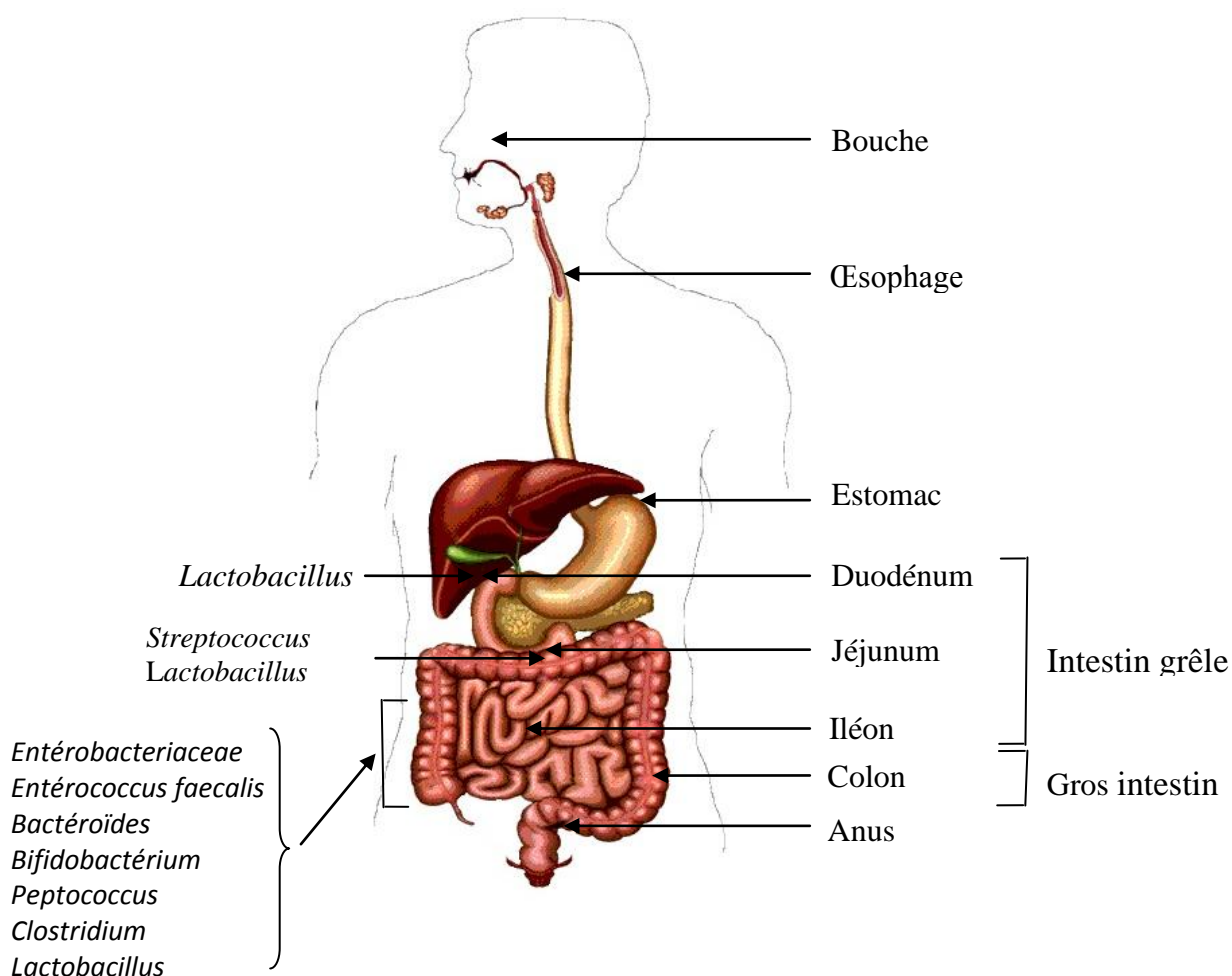


Figure n° 01 : Répartition des bactéries le long du tube digestif humain
(d'après Mountzouris *et al.*, 2002).

Dans le côlon, il faut distinguer 4 types de flore :

- F
flore dominante ($N > 10^9$ UFC/g) exclusivement anaérobie : *Bactéroïdes*, *Eubacterium*,
Bifidobacterium, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*,
- F
flore sous dominante ($10^6 > N > 10^8$ UFC/g) : différentes espèces de la famille des
Enterobacteriaceae (surtout *Escherichia coli*) et les genres *Streptococcus*,
Enterococcus, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *desulfovibrio*, *Methanobrevibacter*,
- F
flore résiduelle ($N < 10^6$ UFC/g) : bactéries en transit ou réprimées par la flore résidente,
- F
flore fécale : facilement accessible pour l'analyse, elle renferme de nombreuses espèces
mortes et n'est pas représentative des différentes niches écologiques de l'écosystème
microbien digestif. L'analyse de la flore fécale ne donne qu'une vue très limitée de
l'écosystème mais permet de retrouver des souches pathogènes ou potentiellement
pathogène pour l'hôte (**Hopkinst et al., 2001**).

I.1.3. Rôles de la flore intestinale humaine :

a) Effets digestifs : E

Effets digestifs :

Des modifications anatomiques et histologiques liées à la présence de la microflore sont mises en évidence en comparant ce qui se passe chez l'animal conventionnel par rapport à l'animal axénique (dépourvu de germes) (**Cebra, 1999**). C'est ainsi que l'on constate que :

- L
l'absence de flore entraîne un ralentissement du transit intestinal et dilatation du
caecum (effet sur la motricité),
- L
la vitesse du renouvellement cellulaire et l'index mitotique sont significativement réduits
chez l'animal axénique (effet sur la trophicité) (**Jijon et al., 2004**).

b) Effets nutritionnels : E

Effets nutritionnels :

- P
la production d'acide gras à chaîne courte diminuant la synthèse hépatique du cholestérol ;
l'un d'eux, l'acide butyrique, est la principale source d'énergie de la muqueuse
colique,
- D
la dégradation des hydrates de carbone non absorbés (amidon, pectine, glycoprotéines)
aboutissant à la production d'acides organiques assimilables par l'hôte (acétate,
propionate, butyrate) et de gaz (CO_2 , H_2),

- H
ydrolyses des lipides alimentaires non absorbés grâce aux lipases bactériennes et à la conjugaison des acides biliaires primaires, indispensables pour une bonne absorption des graisses,

- D
égradation de certaines protéines et de certains acides aminés (tryptophane), permettant la récupération de l'azote,

- A
pport vitaminique : certaines bactéries anaérobies facultatives (*E.coli*, *E.aerogenes*) sont capables de synthétiser *in vitro* un large éventail de vitamines (biotine, riboflavine, acide pantothénique, pyridoxine et vitamine K). Des bactéries anaérobies strictes (*C.butyricum*, *Veillonella sp.*) sont capables de synthétiser la vitamine B₁₂, d'une grande utilité pour la croissance locale bactérienne. Il n'existe pas de données précises sur l'utilisation de ces vitamines par l'hôte, notamment par l'homme (Espoiret *al.*, 2005).

c) Protection contre l'infection :

Elle s'exerce d'abord par l'effet de barrière exercé par la flore résidente vis-à-vis des bactéries exogènes (résistance à la colonisation), par élimination totale de la souche exogène (effet drastique), ou par maintien de la souche exogène en sous-dominance (effet permissif). Les mécanismes expliquant ces phénomènes, mal connus, sont étroitement liés aux souches anaérobies strictes dominantes de la flore résidente (Ley *et al.*, 2005).

La flore digestive stimule aussi l'immunité locale, comme l'ont montré les comparaisons du statut immunitaire des animaux conventionnels et axéniques. Ces deux effets peuvent, dans certaines conditions, être augmentés par quelques souches bactériennes probiotiques en transit (bactéries lactiques) (Hopkinst *et al.*, 2001).

d) Effet défavorables pour l'hôte :

- Métabolisme glucidique : les activités de types β -glucuronidase libèrent à partir des β -glucuronides des aglycones à pouvoir cancérigène,

- Métabolisme azoté : la dégradation par la microflore des nitrates et des amines secondaires aboutit à la production de nitrosamines cancérigènes,

- Métabolisme des xénobiotiques : possibilité d'inactivation de médicaments (inactivation de la digoxine par *Eubacterium lentum*) ou de production de métabolites toxiques (Kelly *et al.*, 2004). Ainsi les myrosinases d'origine bactériennes, capables d'hydrolyser les glucosinates des crucifères (choux, choux de Bruxelles, navets...) peuvent être responsables de diarrhées. De même, après consommation importante et prolongée de choux, les métabolites dérivés de la 5-vinyl-oxazolidine-2-thione (goitrine) sont responsable d'une diminution importante de la captation de l'iode par la thyroïde (Jijon *et al.*, 2004).

I.1.4. Stabilité apparente de la flore :

Avec les techniques classiques de microbiologie, on constate, chez un même individu, une assez bonne stabilité de la flore. On a encore beaucoup à apprendre sur ce sujet et notamment sur l'influence que peuvent avoir différents types

d'agressions comme le jeûne alimentaire, la modification brutale de régime, le ralentissement du transit, les modifications du péristaltisme, l'antibiothérapie (à l'origine d'un dysmicrobisme et de diarrhées), avec comme conséquences des modifications des effets physiologiques, métaboliques et immunitaires de la microflore digestive de l'hôte (**Rakoff-Nahoum et al., 2004**).

La microflore intestinale fait partie d'un écosystème complexe dont la connaissance devrait beaucoup progresser grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire. On peut espérer, grâce à ces nouvelles approches, mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la colonisation du tube digestif, qui régissent les interactions bactériennes, la résistance à la colonisation, la stimulation de l'immunité et qui modulent les propriétés métaboliques des bactéries présentes (**Jijon et al., 2004**).

Néanmoins, cette flore bien que saprophyte, une certaine population de germes la composant peuvent acquérir une pathogénicité suite à une antibiothérapie mal adaptée ou un régime alimentaire sévère au cours d'une maladie quelconque, les germes pathogènes d'origine exogène peuvent aussi perturber le bon déroulement de l'écosystème digestif du processus naturel auquel contribuent la flore digestive normale. (**Mountzouris et al., 2002**).

I.2. *Escherichia coli* :

I.2.1. Généralités :

C'est en 1885 que le pédiatre allemand Théodore Escherich isole et décrit pour la première fois le bacille *Bacterium coli*, fréquemment présent dans les selles des nourrissons (**Escherich, 1885**). En 1919, en hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli* (**Grimont, 1987**). Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* qui regroupe des espèces fréquemment isolées du tube digestif ou des fèces des mammifères. Cette famille regroupe des bacilles droits à Gram négatif, non acido-résistants, mesurant 0,3 à 1,0 µm de large sur 1,0 à 6,0 µm de long. Non sporulés, parfois capsulés, ils possèdent une ciliature péritriche pour les espèces mobiles. Chimio-organotrophes, ils sont aéro-anaérobies, et possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif. Ils fermentent le glucose (avec ou sans production de gaz), et sont catalase positifs, oxydase négatifs, nitrate réductase positifs. Ces bacilles sont capables de croître sur des milieux ordinaires à base de peptone ou d'extraits de viande et non halophiles. Enfin, ils possèdent l'antigène de Kunitz (également appelé ECA pour « Enterobacterial Common Antigen ») et possèdent un pourcentage en (G + C) compris entre 38 et 60 (**Euzéby, 2007**).

En plus de l'espèce *E. coli*, le genre *Escherichia* comprend cinq autres espèces : *E. albertii* ; *E. blattae* ; *E. fergusonii* ; *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce d'*Escherichia* présente des caractéristiques biochimiques propres permettant de les différencier les unes des autres (**Feng et al., 2002**).

I.2.2. Définition :

Escherichia coli possède tous les caractères décrits plus haut comme étant communs aux *Enterobacteriaceae*. Cette espèce est plus souvent mobile et qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. Au cours des dernières décennies, le rôle de certaines catégories de *E.coli* dans les syndromes diarrhéiques a été précisé et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analysés (**Euzéby, 2007**).

I.2.3. Habitat :

E. coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans l'intestin, c'est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de 10^7 à 10^9 UFC/g de selles. La recherche de *E.coli* dans l'eau d'alimentation (colimétrie) est faite pour apprécier sa potabilité. La présence de *E.coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente et la rend impropre à la consommation.

E. coli colonise de façon asymptomatique le tractus digestif des nouveaux-nés dans les premières heures qui suivent la naissance et constitue dès lors l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin (**Fotadar et al., 2005**).

I.2.4. Rôle bénéfique de *E.coli*:

Les souches inoffensives de *E.coli* font partie de la flore normale de l'intestin et peuvent bénéficier de leurs hôtes par la production de la vitamine K et en empêchant l'établissement des bactéries pathogènes dans l'intestin. Cette bactérie peut également être cultivée facilement et économiquement dans le laboratoire, elle a été intensément étudiée depuis plus de 60 ans. *E.coli* est le microorganisme modèle le plus largement étudiée et l'espèce importante dans les domaines de la biotechnologie et de la microbiologie, où il a servi comme organisme hôte pour la majorité des travaux de l'ADN recombinant (**Madigan et Martinko, 2006**).

I.2.4.1. Rôle microbiote normal :

E.coli colonise normalement le tractus gastro-intestinal d'un bébé dans les 40 heures suivant la naissance, en arrivant avec la nourriture, l'eau ou avec les manipulations des individus avec l'enfant. Dans le gros intestin il adhère à la muqueuse. Il est le principal anaérobie facultatif de l'appareil gastro-intestinal humain (**Fotadar et al., 2005**).

I.2.4.2. Utilisation thérapeutique :

Escherichia coli non pathogène est utilisé comme un agent probiotique dans la médecine, principalement pour le traitement de diverses maladies gastro-entérologiques, y compris les maladies inflammatoires de l'intestin (**Darnton et al., 2006**).

I.2.4.3. Rôle de la biotechnologie :

En raison de sa longue histoire de culture en laboratoire et la facilité de manipulation, *E.coli* joue également un rôle important dans la génie biologique et la microbiologie industrielle moderne afin de créer l'ADN recombinant, elle est devenue une fondation de la biotechnologie.

E.coli est considéré comme un hôte très polyvalent pour la production des protéines, les chercheurs peuvent introduire des gènes dans les microorganismes en utilisant des plasmides, permettant la production de protéines dans les procédés de la fermentation industrielle. Des systèmes génétiques ont également été développés qui permettent la production de protéines recombinantes. Une des premières applications utiles de la technologie de l'ADN recombinant a été la manipulation de *E.coli* pour le développement du vaccin, la bioremédiation, la production de l'insuline humaine et l'immobilisation d'enzymes (**Madigan et Martinko, 2006**).

I.2.5. Physiopathologie :

I.2.5.1. Souches pathogènes pour l'homme :

Escherich, devant la fréquence des diarrhées néonatales, soupçonnait dès 1885 l'implication des *E. coli* dans l'apparition des entérites. En 1945, Bray a démontré que certaines épidémies de diarrhée chez les enfants, non associées à *Salmonella sp* ou à *Shigella sp*, avaient pour origine des souches pathogènes de *E.coli* (**Braun, 1974**).

Développée dès 1947, la technique de sérotypage a permis de distinguer les différentes souches de *E.coli*, en particulier les souches pathogènes, grâce à leurs antigènes de surface (**Faith et al., 1996**). Le sérotype de la souche est défini par l'antigène de paroi lipopolysaccharidique « O » (plus de 170 antigènes différents sont actuellement répertoriés). Au sein d'un même sérotype O, le sérotype de la souche est déterminé par l'identification de l'antigène flagellaire protéique « H » (plus de 50 antigènes différents recensés) et éventuellement de l'antigène capsulaire polysaccharidique « K ». Ainsi, à partir des années 1950, de nombreuses souches de *E. coli* appartenant à des sérotypes particuliers ont été répertoriées, chez l'homme comme chez l'animal, comme étant des souches pathogènes responsables de affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères voire mortelles (**Kaper et al., 2004; Levine, 1987; Nataro et Kaper, 1998**).

Au cours des dernières décennies, des progrès importants ont été faits dans la compréhension des mécanismes contribuant à la virulence de certaines catégories de *E. coli* (**Nataro et Kaper, 1998**).

I.2.5.1.1. Infections intestinales :

L'existence de diarrhées à *E.coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies.

Les différents syndromes cliniques sont dus à des *E.coli* différents dont nous précisons plus loin le support de la virulence. On reconnaît 4 types de souches responsables de diarrhées (**Nataro et Kaper, 1998**).

A. Les souches entéro-pathogènes ou "Entero-Pathogenic *E.coli*" (E.P.E.C) :

Elles étaient responsables, dans les années 50, de diarrhées infantiles graves ou toxiques survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités. Ces souches encore appelées *E.coli* G.E.I. (des gastro-entérites infantiles) sont plus rarement rencontrées aujourd'hui, elles sont alors isolées de cas sporadiques. Elles appartiennent à des sérotypes particuliers : O26, O55, O86, O125, O119, O127, O126, O128 et, plus rarement en Europe, O124, O114 et O142.

Le mécanisme de leur pouvoir pathogène est mal connu. Ces souches ne produisent généralement ni entérotoxines ST, ni LT. Elles sont capables d'adhérer aux entérocytes par des mécanismes qui restent à préciser. Elles possèdent une toxine désignée comme

Verotoxine (VT) parce qu'un surnageant d'une culture produit un effet cytotoxique irréversible sur des cellules Vero en culture. (Evans et al., 2007).

B. Les souches entérotoxigènes ou "Enterotoxigenic *E.coli*" (E.T.E.C) :

Elles sont responsables de diarrhées très liquides survenant dans les pays en développement. Ces diarrhées s'observent aussi chez les voyageurs. Elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays (Kamada et al., 2005).

Pour être pathogènes, ces souches doivent à la fois posséder des adhésines et produire des entérotoxines.

B.1. Les adhésines ou antigènes d'adhésion :

Ce sont des structures filamenteuses (appelées pili ou fimbriae) de nature protéique, qui entourent les corps bactériens à la manière d'une fourrure. Elles permettent aux bactéries d'adhérer spécifiquement aux bordures en brosse des entérocytes de la partie haute de l'intestin grêle. Les souches qui les possèdent peuvent alors s'y maintenir malgré les mouvements péristaltiques (Shanahan, 2002).

Ces adhésines confèrent aux bactéries la propriété d'hémagglutiner les globules rouges. Cette hémagglutination est mannose-résistante ; elle persiste en présence de mannose contrairement à celle due aux pili communs.

Les adhésines sont antigéniques. Au moyen d'immun-sérums on peut en distinguer plusieurs types :

- CFA/I (Colonization Factor Antigen), CFA/II et CFA/III ont été décrits chez des souches responsables de diarrhées souvent cholériformes.

- K 88 est présent chez des souches responsables de diarrhées du porcelet.

- K 99 est trouvé chez des souches de diarrhées du veau ou de l'agneau.

Ces différentes adhésines sont codées par des plasmides transférables qui peuvent porter simultanément les gènes codant la production d'entérotoxines (Orskov et Orskov, 1985).

B.2. Les entérotoxines :

Les souches d'E.T.E.C. peuvent produire deux types d'entérotoxines mises en évidence par leur « pouvoir de dilater l'anse de lapin ligaturée », par l'accumulation de liquide qu'elles provoquent lorsqu'elles sont injectées dans l'intestin grêle.

B.2.1. L'entérotoxine LT, thermolabile :

C'est une protéine, inactivée par un chauffage à 60°C. Elle est mise en évidence par son pouvoir cytopathogène sur les cellules Y1 de surrénale de souris ou sur les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO).

Sa structure et son mécanisme d'action sont très voisins de ceux de la toxine de *Vibrio cholerae*. La sous-unité A1 stimule l'adénylate-cyclase en augmentant la concentration d'AMP cyclique des entérocytes. La sous-unité B est responsable de sa fixation qui élève la concentration d'AMP cyclique intra-entérocytaire à un récepteur membranaire (Yan et Polk, 2002).

B.2.2. L'entérotoxine ST, thermostable :

Elle est moins bien connue et plusieurs formes de l'entérotoxine ST existent. Elle est mise en évidence par l'accumulation de liquide après injection dans l'estomac du souriceau nouveau-né (test de Dean). Elle stimule l'activité guanylate-cyclase en augmentant le GMP cyclique des entérocytes.

En fonction des plasmides qu'elles hébergent, les souches d'E.T.E.C. produisent, soit l'une, soit les deux entérotoxines. La diarrhée est plus intense avec les souches qui

produisent à la fois LT et ST qu'avec celles qui produisent uniquement ST (Tableau n° 01) (Evans et al., 2007).

Tableau n°01 : Propriétés de la toxine cholérique et des toxines LT et ST des *Escherichia coli* (Evans et al., 2007).

Propriétés	<i>Vibrio cholerae</i>	ETEC	
		LT	ST
Poids moléculaire	83000	86000	1 500 à 5 000
Sous-unités	A et B	A et B	non identifiés
récepteur cellulaire	ganglioside GM 1	ganglioside GM 1	non identifié
Mécanisme d'action	active l'adénylate-cyclase	active l'adénylate-cyclase	active la guanylate-cyclase
Immunogénicité	proche de LT	proche de la toxine cholérique	non antigénique
Mise en évidence	Modèles animaux, cultures de cellules et propriétés immunologiques	Modèles animaux, cultures de cellules et propriétés immunologiques	Modèles animaux seuls
Déterminisme	Chromosomique	Plasmidique	Plasmidique

C. Les souches entéro-invasives ou "Entero-Invasive *E.coli* "(E.I.E.C.) :

Elles sont isolées de syndromes dysentériques tant chez l'adulte que chez l'enfant. La présence de leucocytes dans les selles est le témoignage du processus invasif (Evans et al., 2007).

Ces souches pénètrent dans les cellules de la muqueuse intestinale où elles provoquent des ulcérations et des micro-abcès.

Le pouvoir invasif de ces souches peut être mis en évidence soit par le test de Sérény (kérato-conjonctivite après instillation d'une suspension bactérienne dans l'œil d'un cobaye), soit par leur aptitude à pénétrer dans des cellules HELA en culture (Sansonetti, 1985).

D. Les souches entéro-hémorragiques ou "Entero-Hemorrhagic-Colitis *E.coli* "(E.H.E.C.)

Ces souches ont été décrites en Amérique du Nord où elles ont été responsables d'épidémies de diarrhée aqueuse puis hémorragique. Elles appartiennent à un sérotype particulier O157. Un produit alimentaire contaminé peut être à l'origine de la diffusion de l'épidémie. Ces souches sont aussi responsables du syndrome hémolytique-urémique. Les souches d'E.H.E.C. produisent également une toxine VT, dont le rôle n'est pas clairement établi (Nataro et Kaper, 1998).

I.2.5.1.2. Infections urinaires :

La majorité des infections urinaires de la femme jeune observées en pratique médicale de ville est due à *E.coli*. Les souches provenant de la flore fécale contaminent les urines par voie ascendante. C'est la classique « colibacillose » (Shanahan, 2002).

Les souches responsables d'infections urinaires, en particulier celles isolées de pyélonéphrites, possèdent des facteurs de virulence particuliers. La présence de fimbriae (de type P, de type 1), de certains antigènes O, de polysaccharides capsulaires (antigènes KI), la production d'hémolysine, d'aérobactine, et la résistance au pouvoir bactéricide du sérum (par le complément) sont les facteurs principaux (Bopp et al., 1999).

I.2.5.1.3. Méningites néo-natales :

Un tiers d'entre elles sont dues à *E.coli*. La plupart des souches en cause possèdent un antigène polysaccharidique de type KI dont la composition est proche de l'antigène capsulaire de *Nisseria meningitidis* de type B (Mountzouris et al., 2002).

I.2.5.1.4. Suppurations diverses :

Les *E.coli* de la flore fécale peuvent être en cause dans des péritonites, des cholécystites, des salpingites et des suppurations post-opératoires.

Toutes ces infections, si elles sont insuffisamment traitées, peuvent être à l'origine de septicémies (Nataro et Kaper, 1998).

I.2.5.2. Pouvoir pathogène pour l'animal :

Certaines souches de *E.coli* productrices de toxines ou possédant des propriétés invasives sont particulièrement pathogènes pour les animaux et provoquent des diarrhées chez les veaux ou les porcelets. Ces diarrhées sont, par leur fréquence et la mortalité qu'elles entraînent, causes de pertes économiques importantes (Shanahan, 2002).

I.3. Caractérisation d'une souche de *E.Coli* :

E.coli possède tous les caractères comme étant communs aux *Enterobacteriaceae*. Cette espèce est le plus souvent mobile (Evans et Evans, 1983).

I.3.1. Caractères culturels et métaboliques :

E.coli 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 les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang elles peuvent être hémolytiques.

Les principaux caractères positifs sont :

- indole (+) (exceptions),
- ONPG (+) (exceptions),
- mannitol (+).

Les caractères suivants sont positifs de façon moins constante : mobilité, LDC, ODC, sorbitol [les souches 0157:H7, E.H.E.C. sont le plus souvent sorbitol (-) et décarboxylases (+)], production de gaz lors de l'attaque du glucose.

Sont en souvent négatifs : inositol, urée, TDA, VP, gélatinase, citrate de Simmons.

Les souches de *E.coli* entéro-invasives ont souvent une faible activité métabolique (Sansone, 1985).

I.3.2. Diagnostic différentiel :

Trois autres espèces de *Escherichia* sont rarement rencontrées dans les prélèvements. Ce sont : *E.hermanii*, *E.fergusonii* et *E.vulneris* (Tableau n°02).

Les caractères ci-dessous permettent de distinguer les différents *Escherichia*. *E.hermanii* est sorbitol (-) comme *E.coli* O157:H7 et possède une bêta-lactamase comme les *Klebsiella* (Yan et Polk, 2002).

Tableau n°02: Principaux caractères de distinction des différentes espèces de *Echerichia* (Yan et Polk, 2002).

	Indole	ODC	accharos e	Pigment jaune	PGR	TTR
<i>E. coli</i>	+	d	d	-	d	-
<i>E. hermannii</i>	+	+	d	+	-	+
<i>E. fergusonii</i>	+	+	-	-	-	-
<i>E. vulneris</i>	-		-	±	-	-

+ : Au moins 85 p. cent des souches donnent un résultat positif.

- : Au moins 85 p. cent des souches donnent un résultat négatif.

d : Résultat positif pour 16 à 50 p. cent des souches.

Des souches de *E.coli* à la fois immobiles et agazogènes, antérieurement désignées comme *Aikalescens-Dispar*, peuvent parfois poser des problèmes d'identification avec les *Shigella*. La recherche de la lysine-décarboxylase et le test au citrate de Christensen sont généralement positifs avec les *E.coli*, alors qu'ils sont toujours négatifs avec les *Shigella* (Orskov et Orskov, 1985).

I.3.3. Caractères antigéniques :

- **Antigènes O**, somatiques ou lipopolysaccharidique. Il existe environ 160 antigènes O différents. Au moyen d'immun-sérums spécifiques, il est possible de classer sérologiquement les souches de *E.coli* dans les groupes O. Cette sérotypie est la seule à être utilisée en routine pour reconnaître notamment les souches E.P.E.C.

- **Antigènes K**, capsulaires, polysaccharidiques. Environ 70 antigènes d'enveloppe différents ont été reconnus. Leur subdivision en antigènes L, A et B semble devoir être abandonnée. La majorité des souches responsables de méningites possèdent l'antigène K 1. De ces antigènes capsulaires on rapproche les antigènes protéiques ou adhésines en rapport avec la présence de pili permettant l'adhérence aux bordures en brosse (K 88, K 99).

- **Antigènes H** ou flagellaires, protéiques. On en connaît 52 types. Ils ne sont présents que chez les souches mobiles (Sansonetti, 1985).

I.3.4. Diagnostic biologique d'une infection a *E.coli* :

I.3.4.1. Infections intestinales :

Les selles doivent êtreensemencées sur un milieu gélosé non inhibiteur pour *E. coli* : Drigalski, Mac Conkey, éosine-bleu de méthylène.

La recherche des E.P.E.C ne se fait que chez les enfants de moins de 1 ou 2 ans. Leur présence est sans signification chez les individus plus âgés.

Après 18 heures d'incubation à 37°C, des colonies suspectes d'être un *E.coli* (lactose (+)) sont examinées à l'aide d'un sérum nonavalent, contenant des anticorps dirigés contre les 9 sérotypes les plus fréquents. La recherche de l'agglutination peut être faite en tube ou sur lame. Sur lame, pour être positive une agglutination doit être rapide et se faire en moins de 5 secondes. Une agglutination positive avec le sérum nonavalent n'a qu'une valeur d'orientation et doit être précisée en utilisant des sérums monovalents (Yan et Polk, 2002).

La caractérisation des E.T.E.C. est comme celle des E.I.E.C., n'est pas faite en routine. Elle est faite par des laboratoires spécialisés lorsque les données cliniques et épidémiologiques suggèrent leur utilité.

- La recherche des antigènes d'adhésion CFA/I et CFA/II est faite à l'aide d'antisérums spécifiques.
- L'entérotoxine LT est recherchée par inoculation d'un surnageant de culture sur des cellules Y 1 ou CHO. Différentes méthodes plus simples sont en cours d'évaluation : agglutination de particules de latex sensibilisées, immuno-précipitation en gel à l'aide d'un antisérum de lapin (Biken-test).
- L'entérotoxine ST est détectée par inoculation intra-gastrique du surnageant au souriceau nouveau-né.
- Le milieu de Mac Conkey au sorbitol permet la détection des souches *E.coli* 0157:H7 qui en général n'attaquent pas le sorbitol (**Strockbine et al., 1998**).

I.3.4.2. Infections urinaires :

La recherche de germes se fait sur des urines prélevées au milieu du jet,ensemencées immédiatement ou conservées dans des conditions appropriées (+ 4°C ou milieu de transport) (**Yan et Polk, 2002**).

La numération des bactéries permet de distinguer une infection urinaire authentique (nombre de bactéries supérieur à 10⁵/ml) d'une contamination par des bactéries urétrales lors de la miction (nombre de bactéries inférieur à 10⁴/ml).

Ici l'emploi d'une gélose C.L.E.D (Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient) est recommandé, car il évite l'envahissement de la culture par un éventuel contaminant (**Gross et Rowe, 1985**).

I.3.4.3. Autres infections :

L'isolement d'un *E.coli* ne pose pas de problème technique particulier puisque cette bactérie se développe bien sur les milieux usuels (**Johnson, 1991**).

I.4. Traitement de l'infection à *E.coli*:

I.4.1. Infections intestinales :

Le traitement curatif d'une diarrhée aiguë est avant tout un traitement symptomatique par la réhydratation.

La diarrhée des voyageurs peut être prévenue par des mesures d'hygiène ou par la prise d'antibiotiques pour certains. Les fluoroquinolones ou le cotrimoxazole sont utilisés à titre curatif (**Jallat et al., 1991**).

I.4.2. Autres infections :

Les souches de *E.coli* sont généralement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles Gram négatif : amino-pénicillines, céphalosporines, quinolones, aminosides, triméthoprime-sulfaméthoxazole. Néanmoins cette sensibilité doit toujours être vérifiée par un antibiogramme (**Yan et Polk, 2002**).

I.5. Facteurs d'agression de la flore intestinale:

Un certain nombre de facteurs thérapeutiques ou diététiques altèrent durablement la flore intestinale.

1.5.1. L'antibiothérapie :

Qu'elle soit administrée par voie orale ou intraveineuse, en particulier aux phases cruciales d'implantation et de développement d'une flore bifide dominante, toute antibiothérapie doit être parfaitement indiquée et adaptée à la situation, tout particulièrement chez le nouveau-né et le nourrisson.

Des travaux récents suggèrent un lien entre antibiothérapie en période néonatale et asthme (**Alm et al., 2008**).

Une étude récente, réalisée chez 1098 enfants atteints de maladie de Crohn et 6550 contrôles nés entre 1973 et 1997, suggère un lien entre l'administration précoce d'antibiotiques, entre la période néonatale et l'âge de cinq ans et la survenue d'une maladie de Crohn (**Hildebrand et al., 2008**).

1.5.2. L'utilisation des traitements anti-acide :

Elle altère également la flore notamment dans le cadre du reflux gastro-œsophagien avéré ou malheureusement simplement suspecté devant des douleurs abdominales.

L'absence de prokinétiques efficaces a conduit à une augmentation majeure de la prescription d'inhibiteurs de la pompe à protons. Malheureusement, l'alcalinisation gastrique supprime l'une des principales barrières à la colonisation par des bactéries de l'environnement, éventuellement pathogènes. Il a été montré que les traitements anti-acides augmentent le risque de diarrhée infectieuse et de pneumonie (**Canani et al., 2006**).

1.5.3. Carence en fibres alimentaires :

Une alimentation ne comprenant pas ou si peu de fibres alimentaires ne favorise pas l'implantation et surtout le maintien d'une flore équilibrée avec une proportion suffisante de bifides (**Bach, 2002**).

1.5.4. Gastroentérite aiguë :

Une banale gastroentérite aiguë (GEA) virale ou, plus rarement, d'origine bactérienne altère la flore intestinale. La plupart des enfants des pays à haut niveau de vie guérissent rapidement d'une GEA. Cependant, certains développent le classique tableau de diarrhée grave prolongée postinfectieuse dont une des composantes est un déséquilibre durable de la flore intestinale avec toutes les conséquences que ses nombreux rôles physiologiques laissent supposer (**Bufford et Gern, 2005**).

Il ne faut sous-estimer aucun de ces facteurs. En raison du rôle de la flore intestinale dans le développement des fonctions immunitaires et dans l'acquisition de tolérance, des modifications durables de celle-ci, notamment en raison d'antibiothérapies répétées, ont forcément un impact même s'il est difficile de le mesurer avec précision (**Rautava et al., 2006**).

Le principal agent assurant de graves affections gastro-intestinales en incriminant l'espèce la plus fréquemment retrouvée chez les patients des services de gastro-entérologie est *Helicobacter pylori*.

Chapitre II : Taxonomie et généralités sur *Helicobacter pylori*.

II.1. Historique :

La présence incidente de bactéries spiralées au niveau de l'estomac du fait de son pH bas a été rapportée dans des observations très anciennes (**Warren, 1997**).

Ces bactéries ont d'abord été observées dans l'estomac des chiens puis des rats et des chats à la fin du XIX^e siècle. Au début du XX^e siècle, ces bactéries avaient été mises en évidence dans l'estomac de patients atteints de cancer gastrique, puis chez des patients atteints de pathologie ulcéreuse gastro-duodénale (**Boudinet et Gallaud, 2008**).

En 1954, les travaux de Palmer à partir de 1180 biopsies conclurent en l'absence de bactéries spiralées dans l'estomac, ceci avait mis un point final à la théorie de l'infection chronique de l'estomac. Ainsi l'intérêt sur le sujet déclina rapidement.

En 1975, Steer et Colin Jones rapportaient la présence d'une bactérie à la partie profonde de la couche de mucus chez des patients présentant un ulcère, mais la culture des biopsies aboutissait à l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agissait en fait d'une contamination des canaux à biopsie.

En 1979, Robert Warren remarqua la présence de bactéries incurvées et spiralées dans des biopsies d'estomac. En 1982, il obtient avec Barry Marshall des colonies sur des cultures oubliées pendant 5 jours dans l'incubateur. Les bactéries cultivées furent dénommées successivement *Campylobacter pyloridis* en raison de leur ressemblance avec *Campylobacter jejuni*, puis *Campylobacter pylori* ; et plus tard le genre *Helicobacter* fut créé avec *Helicobacter pylori* (*Hp*). Ils posent alors l'hypothèse de son association à la gastrite et aux ulcères. Ceci a mené à une nouvelle ère en microbiologie clinique, quand des bactéries se sont avérées une cause des ulcères peptiques (**Boudinet et Gallaud, 2008**).

En 1984, Zangenberg et autres démontrèrent la production d'une grande quantité d'uréase par *Hp* en culture.

En 1985, l'ingestion volontaire d'une suspension de *Helicobacter pylori* par Marshall est suivie d'un syndrome dyspeptique aigu avec apparition d'une gastrite aiguë sur les biopsies effectuées au dixième jour. Ainsi la découverte du rôle pathogène de *Helicobacter pylori* pour la muqueuse gastro-duodénale a confirmé les conceptions sur la maladie ulcéreuse (**Mobley, 1996**).

Les multiples travaux effectués apportent un niveau de preuve scientifique élevé, ont entraîné une refonte complète de l'approche physiopathologique, des implications diagnostiques et du traitement de la MUGD (Maladies d'Ulçère Gastro-Duodéal).

La réduction des récurrences ulcéreuses après éradication réussie renforce la responsabilité de *Helicobacter pylori* dans la pathologie gastro-duodénale.

A partir de 1990, des conférences de consensus furent organisées pour harmoniser les démarches des uns et des autres afin d'instaurer des schémas diagnostiques et thérapeutiques consensuels (**Mobley, 1996**).

En 1994, l'Organisation Mondiale de la Santé a intégré *Helicobacter pylori* à la liste des carcinogènes de groupe 1.

La corrélation entre infection et pathologies associées - gastrites chroniques, ulcères gastroduodénaux, cancers gastriques - mise en évidence par Marshall et Warren, leur a valu le Prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2005 (Figure n°02) (**Boudinet et Gallaud, 2008**).

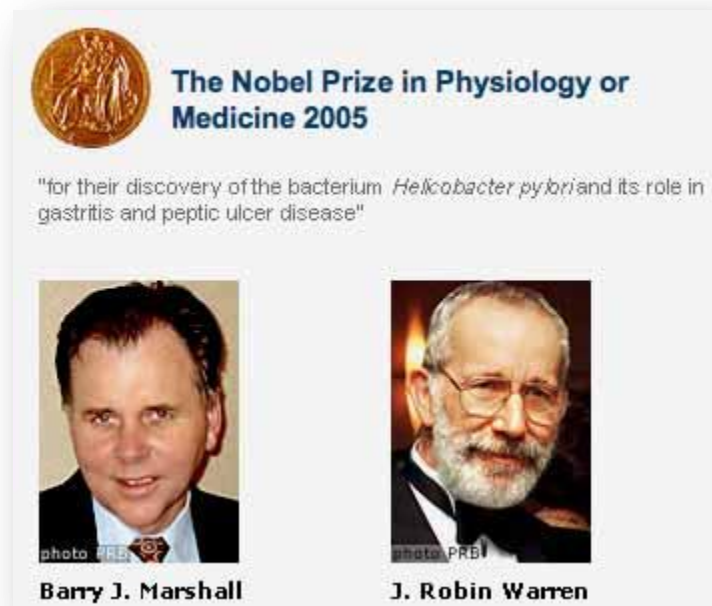


Figure n°02 : Marshall Barry et Warren Robin, Prix Nobel de Physiologie ou de Médecine en 2005(<http://nobelprize.org/medicine/laureates/2005/index.html>)

Helicobacter pylori est actuellement identifié comme microbe pathogène important (Warren, 1997).

Il cause l'infection persistante dans un pourcentage élevé de la population; en particulier dans les pays avec une proportion élevée de groupes socio-économiques inférieurs (*Helicobacter Foundation, 1994*). Une fois l'infection acquise, *Helicobacter pylori* persiste dans la majorité d'individus pendant des années, des décennies et dans certains cas pendant la vie. L'infection cause l'inflammation gastrique du mucus (gastrite chronique superficielle) et de l'infiltration polymorphonucléaire (gastrite chronique active). Cependant, l'effet de l'infection change d'individu à individu avec les porteurs asymptomatiques devenant de majorité, alors que d'autres développent les ulcères peptiques. Dans certains cas, les individus peuvent développer la gastrite atrophique chronique, un facteur de risque pour le développement de l'adénocarcinome et le lymphome gastrique. Les résultats cliniques de l'infection à *Helicobacter pylori* sont déterminés par une interaction complexe des influences environnementales, et par des facteurs liés à la virulence et au foyer microbiens. Les *Helicobacter pylori* sont des bactéries qui portent des gènes de CagA et de VacA ont augmenté la pathogénicité (Mobley, 1996).

II.2. Taxonomie de *Helicobacter Pylori* :

Les classifications taxonomiques sont basées sur l'hybridation et le séquençage de l'ARN ribosomal. *Helicobacter pylori* fait partie d'un nouveau groupe taxonomique de bactéries caractérisées par leur adaptation au mucus digestif de l'homme et des animaux.

Le genre *Helicobacter* appartient au Groupe VI des bactéries à Gram négatif qui comprend 4 genres : *Campylobacter* - *Arcobacter* et *Wolinella*.

Le genre *Helicobacter* appartient à la famille des *Helicobacteriaceae* ordre des *Campylobacterales* classe des *Epsilon Proteobacteria*, division des *Proteobacteria*

(Tableau n° 03). Le genre *Helicobacter* comprend une dizaine d'espèces chacune adaptée à la muqueuse gastrique d'animaux différents (Tableau n° 04).

Tableau n° 03 : Classification de *Helicobacter pylori* (Goodwin, 1989).

Règne	<i>Bacteria</i>
Division	<i>roteobacteria</i>
Classe	<i>psilon Proteobacteria</i>
Ordre	<i>campylobacterales</i>
Famille	<i>elicobacteraceae</i>
Genre	<i>elicobacter</i>
Espèce	<i>ylori</i>

Tableau n° 04 : Caractères phénotypiques de 15 espèces de *Helicobacter* (Mobley, 1996).

Espèces	Hôte habituel	GC%	Nbre Fla	Ox	Cat	Ure	NO ₃ Red	Pase	G Glut Trans 4	NAL	Cft
<i>H.pylori</i>	Homme	35-37	4-8 pol	+	+	+	-	+	+	R	S
<i>H.musteloe</i>	Furet	36	4-8 per	+	+	+	+	+	+	S	R
<i>H.félis</i>	Chat	42	14-20 pol	+	+	+	+	+	+	R	S
<i>H.muridarm</i>	Rongeurs	10	14 pol	+	+	+	-	+	+	R	R
<i>H.acinonyx</i>	Guépard	30	2-5 pol	+	+	+	-	+	+	R	S
<i>H.nemestrinoe</i>	Singe	24	4-8 pol	+	+	+	-	+	NF	R	S
<i>H.fennelioe</i>	Homme (intestin)	35	2 pol	+	+	-	-	+	-	R	S
<i>H.cinaedi</i>	Homme (intestin)	37-38	1-2 pol	+	+	-	+	-	-	S	I
<i>H.hepaticus</i>	Souris Foie	2 pol	NF	+	+	+	+	NF	NF	R	R
<i>H.bilis</i>	Foie	NF	3-14 pol	+	+	+	+	NF	NF	R	R
<i>H.pulorum</i>	Foie	34-35	1 pol	+	+	-	+	-	NF	R	R
<i>H.pametensis</i>	Foie	38	2 pol	+	+	-	+	+	-	S	S
<i>H.canis</i>	Chien	48	2 pol	+	+	-	+	+	-	S	S
<i>F.rappini</i>	Cosmopolite	34	10-20 pol	+	+	+	-	-	+	R	R
<i>H.heilmanii</i>	Cosmopolite	NF	x pol	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

GC % : pourcentage guanine - cytosine; Fla : Flagelles; NO₃ Red : Nitrate réductase; Ox : Oxydase; Cat : Catalase; Ure : Uréase; G Glut Trans 4 : Gamma Glutamyl transpeptidase; NAL : Acide nalidixique; Cef : Cefotaxime; Pase : Phosphatase acide; pol : polaire; NF : Non fait; *F rappini* : *Flexispira rappini* ; + : positif ; - : négatif.

L'espèce *Helicobacter pylori* est un bacille de 3 à 5µm de long et 0,5 à 1 µm de large. Elle se présente sous forme hélicoïdale à Gram négatif, mobile par une ciliature polaire, microaérophile à croissance lente (**Bigard et Colin, 1997**).

L'isolement de la bactérie par Warren et Marshall a été à l'origine appelé des *Campylobacter pyloridis*. La microscopie électronique et les études génétiques plus tard ont indiqué que *Helicobacter pylori* a un ordre unique du rRNA 16S, des flagelles engainés et des structures de membrane externe distinctives (**Meyers, 2007; Chalmers**

et *al.*, 2004). Ces structures étaient suffisamment différentes de ceux de *Campylobacter* c'est pour cela qu'elles ont mené à la création du nouveau genre *Helicobacter*. Des bactéries en spirale de Warren et de Marshall ont alors donné la désignation courante de *Helicobacter pylori* (Meyers, 2007) (Figure n° 03).

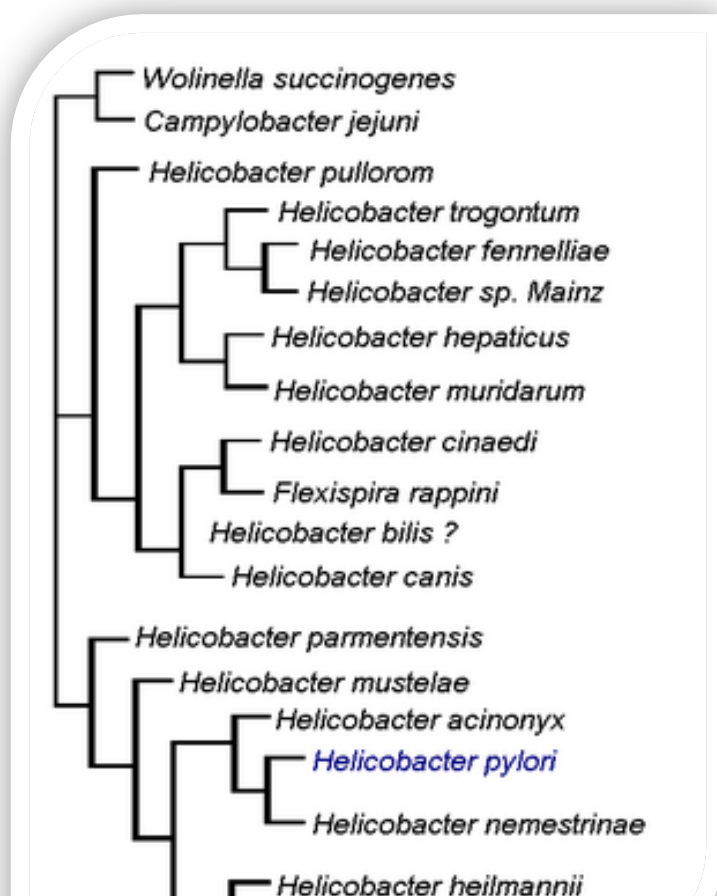


Figure n° 03: Diagramme illustre la relation des *Helicobacter pylori* avec d'autres membres du genre de *Helicobacter* aussi bien qu'à des membres des genres *Wolinella* et *Campylobacter* (Bischoff, 2006).

II.3. Critères Morphologiques:

Helicobacter pylori est une bactérie Gram négative à deux membranes (Curry et Jones, 1990). Une fois observés par Warren et Marshall dans des échantillons de biopsie provenant des patients atteints de gastrite, *Helicobacter pylori* est avérée avoir une forme en spirale ; cependant cette bactérie a été également observée de forme incurvée, tige bacillaire ou forme circulaire (coccoïde) (Meyers, 2007 ; Chalmers et *al.*, 2004). *Helicobacter pylori* a typiquement entre quatre à sept flagelles localisés à un pôle de la bactérie (Figures n° 04 et n°05). La combinaison de sa forme incurvée et flagelles unipolaires permet à des *Helicobacter pylori* de se déplacer facilement sur la couche épaisse du mucus de l'estomac humain (Salysers et Whitt, 2002).

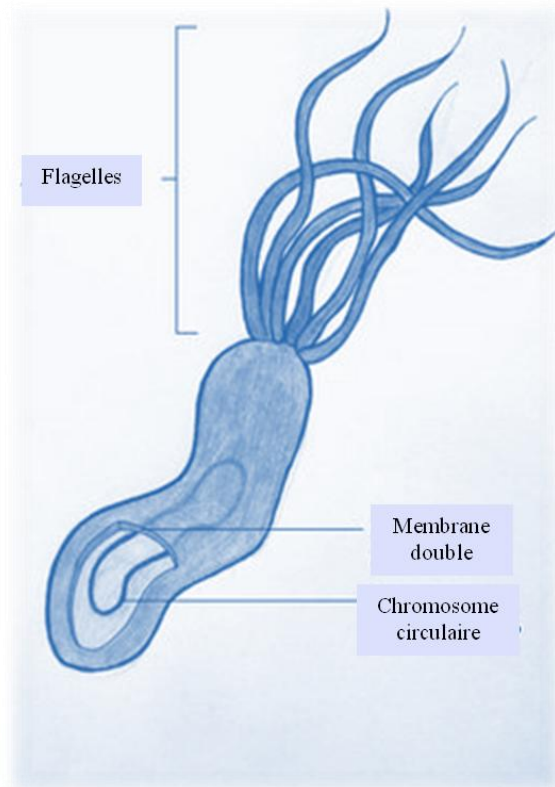


Figure n° 04 : La morphologie spirale de *Helicobacter pylori* (Meyers, 2007).

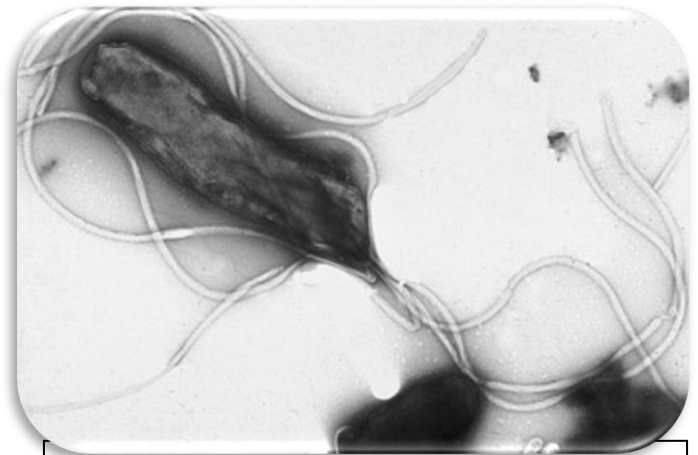


Figure n° 05 : Microphotographie électronique de *Helicobacter pylori* possédant les flagelles multiples (<http://info.fujita-hu.ac.jp/~tsutsumi/profile.htm>)

Les études entreprises par **Azevedo et autres (2006)** ont montré que des *Helicobacter pylori* circulaires ou de formes coccoïdes ont été trouvées au centre de la colonie tandis que les formes en spirale étaient trouvées aux bords et se divisaient activement. On constate que la forme circulaire de *Helicobacter pylori* est inactive et représente une adaptation de survie qui permet de croître dans des conditions défavorables (en biofilm) (**Curry et Jones, 1990**). On constate également que c'est les formes coccoïdes qui sont impliquées dans la transmission des *Helicobacter pylori*.

II.4. Critères Physiologiques et métaboliques chez *Helicobacter pylori* :

Helicobacter pylori a tendance à proliférer dans un environnement pauvre en oxygène (microaérophilie) (**Helicobacter Foundation, 2006**). L'analyse du génome de *Hp* (**Tomb et al., 1997**) indique que le glucose était la source primaire de carbone employé pour la production d'énergie.

Un autre aspect intéressant de la physiologie de *Hp* est qu'il prospère à un pH neutre de 7. Afin de se protéger contre l'environnement acide de l'estomac, les *Helicobacter pylori* creusent dans la doublure du mucus de l'estomac. Ils emploient l'uréase puissante enzyme pour maintenir un pH favorable en décomposant l'urée dans l'estomac en ammoniacque et les bases bicarbonate-fortes qui neutralise le pH de l'estomac. L'activité enzymatique de l'uréase s'est avérée essentielle à la colonisation de *Helicobacter pylori* par conséquent, *Hp* a développé une uréase unique de 2 sous-unités et qui est exceptionnellement puissante (**Chalmers et al., 2006**).

Hp obtient ses aliments en tirant profit de la réponse inflammatoire humaine. Le corps humain enverra les aliments supplémentaires au secteur colonisé par des *Helicobacter pylori* afin d'aider les leucocytes d'attaquer les bactéries. *Helicobacter pylori* cependant, sont inaccessibles à ces cellules en raison de leur emplacement dans le mucus et peuvent donc employer les aliments excessifs fournis par leur hôte (**Helicobacter Foundation, 2006**).

II.5. Critères culturels :

Les caractéristiques physiologiques de *Helicobacter pylori* ont suscité relativement peu d'attention. C'est une bactérie à coloration de gram Gram négative et de forme spirale, bien que sa morphologie ne soit pas constante. Dans des conditions défavorables elle devient coccoïdes, mais il y a polémique au sujet de la nature de cette forme. Quelques chercheurs ont déclaré que cette forme est un contaminant ou une bactérie morte (**Kusters et al., 1996**), mais d'autres la considèrent comme étant une forme métaboliquement active qui ne peut pas être cultivée *in vitro* (**Bode et al., 1993; Nilius et al., 1993**). On a également suggéré que quelques coques puissent retourner à leur forme en spirale originale (**Andersen, 1997**).

Helicobacter pylori est microaérophile ; la croissance optimale se produit en présence de 5-15% d'oxygène (**Goodwin, 1989**).

L'incubation en aérobiose a pour conséquence la survie réduite (**West et Miller, 1992**) et elle se développe mal dans les conditions anaérobies (**Goodwin, 1990**).

II.5.1. Source de carbone :

Le glucose n'est pas obligatoire pour la croissance (**Albertson et al., 1998; Reynolds et Penn, 1994**). Le rendement de cellules n'est pas influencé par la présence du glucose, du pyruvate, du succinate, ou du citrate, mais la survie est augmentée par leur présence. L'incubation prolongée avec des sources de carbone améliore la viabilité du microorganisme (**Albertson et al., 1998**). *Helicobacter pylori* dépend de la présence de divers acides aminés pour la croissance, y compris l'arginine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine et la valine. Dans des conditions difficiles de culture il a besoin également d'alanine, de sérine, de proline, et de tryptophane (**Reynolds et Penn, 1994**).

II.5.2. pH et activité de l'eau :

Les *Helicobacter pylori* peuvent être cultivés dans une marge de pH 4,5-9. Aux basses valeurs du pH (par exemple 3,5), l'addition de l'urée augmente la survie.

Le microbe pathogène est sensible dans un environnement où il y'a une basse activité de l'eau [aw] : la croissance est empêchée aux valeurs < 0,98. Dans une étude, les concentrations en *Helicobacter pylori* sont devenues indétectables dans le milieu de culture *in vitro* pendant trois jours car l'aw a baissé jusqu'à 0,96 (**Jiang et Doyle, 1998**).

II.5.3. Température :

H.pylori se développe seulement aux températures de 30-37°C. Toutes les conditions exigées de croissance sont réunies dans l'appareil gastro-intestinal de tous les animaux à sang chaud.

Aux températures en-dessous de 30 °C, *Helicobacter pylori* pourraient survivre sur les fruits et les légumes frais, la volaille ou les poissons frais, les viandes fraîches, et quelques produits laitiers (Banwart, 1979). Les *Helicobacter pylori* ont survécu à 30°C dans des milieux de laboratoire (Jiang et Doyle, 1998), l'eau (West et Miller, 1992) et le lait (Fan, 1998), et ont survécu plus longtemps à de plus basses températures (Jiang et Doyle, 1998).

II.6. Critères génétiques :

Le statut génomique de *Helicobacter pylori* est bien établi, et le génome de deux souches différentes a été entièrement séquencé .

Hp a un génome circulaire d'environ 1.600.000 paires de base.

La valeur plus basse du coefficient de chargaff (G+C) de son ADN varie entre 36% et 37%, se distingue du genre *Wolinella* (G+C = 46-49%) et du groupe *Vibrio* (G+C = 38-51%).

Hp possède un grand polymorphisme génomique associé à un monomorphisme phénotypique.

Les mécanismes de la diversité génétique sont :

- Les substitutions nucléotidiques non synonymes ;
- L'existence de gènes mosaïques ;
- La régulation de l'expression des gènes ;
- La diversité plasmidique.

De ce fait, l'établissement de la carte génomique et de la position relative de gènes connus (codant pour l'uréase, flagelline, ferritine, adhésine, protéine *Cag A*, cytotoxine et chaperonine) montre une organisation génétique différente d'une souche à une autre, indiquant une possibilité de réarrangement des génomes.

Ainsi il a été mis en évidence une variabilité considérable dans la taille des génomes de *Hp* entre les souches isolées en Occident (1,6 à 1,73 mégabases) et celles isolées au Japon (1 à 1,8 mégabases).

Il existerait même autant de souches que d'individus infectés.

Différents phénotypes ont été décrits. Les variations portent sur :

- La cytotoxine vacuolisante ou *Vac A* codée par le gène *vac A* ;
- L'antigène *Cag A* (protéine associée à cette cytotoxine) codée par le gène *cag A* ;
- L'aptitude à activer les neutrophiles ;
- L'aptitude à stimuler la synthèse d'Interleukine.

L'association très forte entre l'antigène *Cag A* et la maladie ulcéreuse semble suggérer un lien étroit entre cet antigène précocement immunogène et la maladie ulcéreuse. La détection de *Cag A* permet de déterminer les souches virulentes.

Ces différentes approches moléculaires des caractères génétiques de *Helicobacter pylori* présentent un intérêt majeur du point de vue diagnostique et thérapeutique :

-Au plan diagnostique :

L'amplification génique permet la détection des bactéries. Elle est directement applicable sur le matériel biologique (biopsies gastriques, liquide gastrique, plaque dentaire, selles);

Le typage génotypique est indispensable dans les études épidémiologiques, permet la détection des marqueurs de pathogénicité et de virulence.

-Au plan thérapeutique l'espoir réside :

Dans le clonage des gènes et leur expression chez *E.coli* permettant la production en masse d'antigènes recombinants facilement purifiables et utilisables lors des immunisations ;

Dans la construction de souches isogéniques permettant de définir la nature des cibles antigéniques et celle des antigènes vaccinaux à produire. Ainsi, une souche de *Helicobacter pylori* est incapable de coloniser la muqueuse gastrique en l'absence d'activité uréasique, ce qui fait de l'uréase une cible antigénique de choix dans une approche vaccinale ;

Pour le suivi thérapeutique des malades, le typage moléculaire permet de préciser si les rechutes d'infection à *Helicobacter pylori* sont dues à des échecs de l'éradication ou à des réinfections; la détection de la résistance aux macrolides (**Sharma et al., 1984**).

Chapitre III : Pathologies associées à *Helicobacter pylori* et traitements

III.1. Épidémiologie :

L'acquisition de l'infection survient surtout dans l'enfance, et en particulier au cours des cinq premières années de la vie. Elle est possible chez l'adulte, mais très rare (**Broutet, 2000**).

Dans les pays industrialisés, le taux d'incidence annuel est estimé entre 0,3 à 1% (**Bigard et Colin, 1997**).

L'infection à *Helicobacter pylori* est universellement répandue. Elle est toujours plus élevée dans les pays en développement (prévalence estimée entre 70 et 90%) que dans les pays industrialisés (20 à 30%) (**Bigard et Colin, 1997**). Les prévalences sont d'autant plus élevées que les niveaux socio-économiques sont faibles, que la taille de la famille et la promiscuité augmentent, et ceci tant au sein d'un même continent que d'un même pays. Il n'existe pas de différence de prévalence entre les sexes. En revanche, dans les pays industrialisés, la prévalence augmente avec l'âge, mais ceci traduit un effet de génération: en effet, de nombreuses études retrouvent une diminution de la prévalence avec les années de naissance, même si celle-ci s'amorce avec des pentes différentes et à des niveaux différents selon les pays, notamment la différence entre les pays d'Europe du nord comme la Finlande où la prévalence est très faible et les pays d'Europe du sud comme le Portugal où la prévalence reste encore élevée. Cette décroissance semble être liée à deux facteurs principaux ; l'un étant la diminution de la transmission avec l'amélioration des conditions de vie et d'hygiène, et l'autre une moins bonne acquisition de l'infection dans la jeune enfance, avec l'utilisation large des antibiotiques et une amélioration de l'état nutritionnel permettant une meilleure défense lors de l'infection aiguë (**Broutet, 2000**).

En France, le taux de prévalence dans la population adulte est estimé à environ 30% (**Bigard et Colin, 1997**).

Le mode de transmission de l'infection est encore mal élucidé. La transmission à partir de l'environnement semble peu probable, compte tenu de la grande fragilité de la bactérie. Une contamination par les eaux a pu être évoquée. La transmission interhumaine directe est la plus probable, par l'intermédiaire du liquide gastrique, de la salive ou des selles (**Broutet, 2000**).

Malgré le nombre important de travaux effectués, des zones d'ombre demeurent quant à son mode de transmission et l'existence éventuelle d'autres réservoirs et surtout les risques de réinfection.

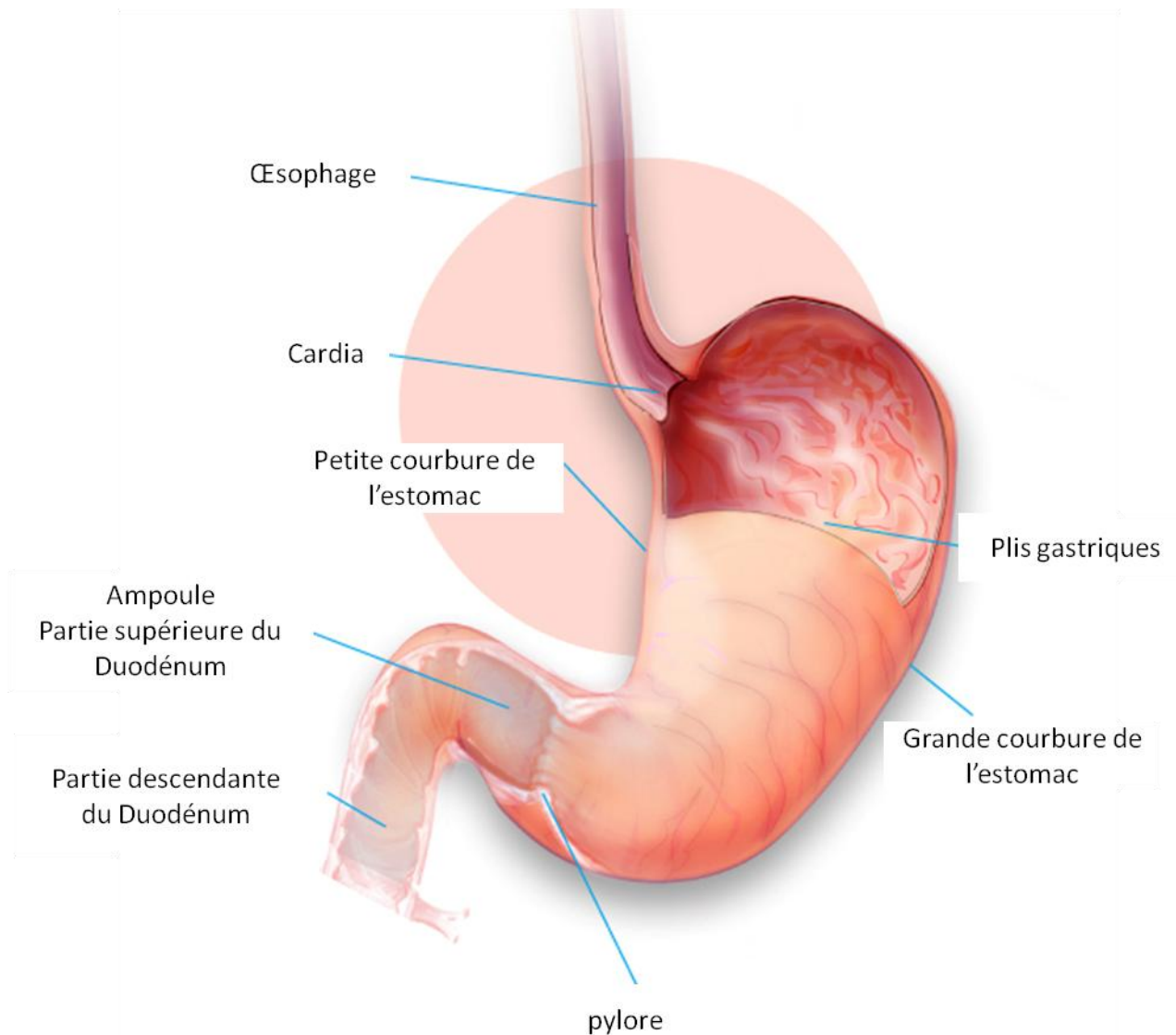
III.1.1. Réservoir bactérien :

Seul l'estomac des primates est identifié comme réservoir bactérien.

III.1.1.1. L'estomac :

Le pouvoir pathogène de *Helicobacter pylori* s'exprime surtout dans l'antra, et les lésions de gastrite y sont les plus importantes ; mais la colonisation est aussi fréquente et de même intensité dans toutes les parties de l'estomac (Figure n°06) (10^6 à 10^7 bactéries par gramme de muqueuse).

Les localisations ectopiques de la muqueuse gastrique peuvent également être colonisées : zones de métaplasie gastrique de l'œsophage, du duodénum, du diverticule de Meckel, voir du rectum (**Boudinet et Julien, 2008**).



III.1.1.2. La cavité buccale :

Des recherches de *Helicobacter pylori* effectuées dans la bouche semblent indiquer que cette bactérie pouvait être présente dans la cavité buccale. Ainsi dans la salive des traces d'ADN ont pu être détectées par amplification génique (PCR), des corps bactériens ont pu être visualisés en immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux et la culture a été positive.

Dans la plaque dentaire, la bactérie a aussi pu être isolée par culture chez un sujet porteur de gastrite à *Helicobacter pylori* bien que de nombreux essais soient restés négatifs.

Des traces génomiques de *Helicobacter pylori* y ont été observées par PCR (Broutet, 2000).

III.1.1.3. Les selles :

La présence de traces génomiques dans les selles est en faveur du passage de *Helicobacter pylori* à travers l'intestin, sans toutefois présumer de leur éventuel pouvoir infectieux. Les rares cas de culture positive à partir des selles sont isolés et difficiles à confirmer (Remot, 1994).

III.1.1.4. Chez les animaux :

Seules quelques espèces de primates (macaques, babouins) hébergent *Helicobacter pylori* dans leur estomac.

Des études chinoises ont rapporté des chats infectés dont la culture était positive et l'identification a été confirmée par amplification des gènes codant pour l'ARN 16S. La présence de *Helicobacter pylori* chez certains chats reste cependant controversée (**Bigard et Colin, 1997**).

III.1.1.5. L'environnement :

Malgré l'émission de *Helicobacter pylori* dans les selles, son existence dans l'environnement reste très difficile à confirmer. En effet, la multiplication de *Helicobacter pylori* est exclue dans un milieu aérobie et en plus elle ne sporule pas.

L'amplification génique a permis d'évoquer la présence de la bactérie dans l'eau sans possibilité de renseignement sur leur viabilité.

Donc jusqu'à présent aucun autre réservoir que l'estomac des primates n'a été clairement identifié (**Boudinet et Julien, 2008**).

III.1.2. Circonstances et modes de transmission :

III.1.2.1. Rôle de l'environnement :

Les viandes impliquées dans la transmission des *Campylobacter* ont été suspectées. *Helicobacter pylori* peut en effet être implanté expérimentalement chez certaines espèces de porcs et dans des abattoirs il a pu être observé, une séroprévalence plus élevée chez les travailleurs au contact des viandes, que chez le personnel du bureau. Une transmission de *Helicobacter pylori* des animaux à l'homme apparaît de ce fait probable (**Husson, 1991**).

L'eau a également été suspectée comme vecteur potentiel et que ce soit pour les viandes d'alimentation ou pour l'eau, le rôle de l'environnement dans la transmission de *Helicobacter pylori* s'avère donc difficile à faire apparaître (**Vincent, 1993**).

III.1.2.2. Rôle des conditions de vie :

En confirmation des fortes prévalences déjà signalées chez les personnes institutionnalisées, un travail a rapporté un taux élevé d'infections dans les équipages de sous-marins, qui vivent confinés dans des espaces réduits, pendant des durées prolongées (**Vincent, 1993**). Le risque accru d'infection pourrait donc être lié à l'accroissement des contacts entre les individus, ou à la limitation en équipement sanitaire qui prévaut dans ces circonstances. Le niveau d'hygiène semble moins déteignant, que la proximité entre les individus et la possibilité de contact entre eux, puisque des prévalences élevées ont pu être observées en pays industrialisés, dans des structures de type hospitalier, avec du personnel médicalisé. Les contacts rapprochés qui découlent de la forte densité, semblent bien constituer le caractère commun aux groupes hautement infectés, des pays en développement et des pays industrialisés. Tous les travaux, qui font ressortir le rôle prédisposant des contacts étroits entre les individus, suggèrent un mode de transmission interhumaine de l'infection à *Helicobacter pylori*.

Les conditions de vie qui découlent de la haute densité de la population (nombres de personnes par logement, voire par lit, nombre de personnes partageant le même équipement sanitaire, etc...), constitueraient le facteur de fond, dont les conditions socio-économiques, apparemment si déterminantes, ne seraient qu'un marqueur (**Fauchere, 1994; Glupczynski, 1994**).

III.1.2.3. Mode de transmission :

Le mode de transmission de l'infection est encore mal élucidé. La transmission à partir de l'environnement semble peu probable, compte tenu de la grande fragilité de la bactérie. Une contamination par les eaux a pu être évoquée. La transmission interhumaine directe est la plus probable, par l'intermédiaire du liquide gastrique, de la salive ou des selles (**Broutet, 2000**).

III.1.2.3.1. Transmission oro-orale :

L'infection gastrique à *Helicobacter pylori*, s'accompagne d'une excrétion dans le milieu extérieur de bactéries conservant leur viabilité. La part relative de la salive et des selles dans cette excrétion, ainsi que ses conséquences épidémiologiques, sont encore mal comprises.

L'hypothèse de la contamination à partir de la salive (transmission oro-orale), s'appuie sur plusieurs arguments : c'est le mode prédominant de transmission des *Helicobacter* chez l'animal; chez l'homme, le visage de l'enfant en contact étroit avec celui des adultes qui l'entourent, est hautement exposé à leurs projections salivaires (**Giacomo, 1994**). Des cas de coinfection mère-enfant (même souche hébergée par les deux) ont été décrits, ainsi qu'un risque accru d'infection lorsque la mère mastique préalablement les aliments, qu'elle va donner au jeune enfant.

La mise en évidence de *Helicobacter pylori* au niveau de la plaque dentaire et la détection du génome bactérien dans la salive, sont aussi en faveur d'une transmission oro-orale (**Vincent, 1994**).

III.1.2.3.2. Transmission féco-orale :

L'isolement récent de *Helicobacter pylori* dans des selles de sujets africains, oriente plutôt vers une transmission de type féco-orale (**Remot, 1994**).

L'hypothèse de la contamination à partir des selles a été longtemps écartée, du fait que l'excrétion fécale de la bactérie est difficile à mettre en évidence, en raison des concentrations bactériennes inférieures à celles des micro-organismes pathogènes, habituellement rencontrés. En fait, contrairement à ces derniers, *Helicobacter pylori* n'est pas dégradé dans l'estomac, mais il y est métaboliquement stimulé par activation de son uréase. Il est donc possible, que des doses faibles soient infectantes. Les arguments en faveur de la transmission féco-orale sont, l'exposition particulière de l'enfant, qui porte facilement ses doigts à la bouche après la manipulation d'objets souillés (**Vincent, 1994**).

III.1.2.3.3. Transmission par le matériel d'endoscopie :

On peut certainement contaminer un sujet au cours d'une endoscopie digestive haute, ce risque de transmission de *Helicobacter pylori* est l'un des motifs de désinfection du matériel endoscopique entre deux examens.

Par ailleurs, la survenue quelques jours après une gastroscopie d'un syndrome dyspeptique aigu, doit faire suspecter une gastrite à *Helicobacter pylori* (**Vincent, 1993**).

Ce risque de l'endoscopie touche également les endoscopistes, car il s'est avéré que le taux d'infection par *Helicobacter pylori* de ceux-ci, est supérieur à celui d'une population témoin. Le port de gants lors de gastroscopies apparaît donc recommandé (**Vincent, 1994**).

III.2. Physiopathologie :

L'infection est probablement contractée lors de l'ingestion de la bactérie. La bactérie, grâce à ses propriétés uréasiques extrêmement actives, résiste à l'agression chlorhydropeptique lors de son passage dans la lumière gastrique.

Elle pénètre ensuite le mucus et colonise la surface épithéliale où elle prolifère. Une fois implantée, la bactérie crée une situation d'infection chronique (**Bigard et Colin, 1997**).

Les sujets infectés par des *Helicobacter pylori* restent ainsi colonisés alors qu'ils développent de très forte réponse de type humorale et cellulaire (avec un taux élevé d'anticorps dont on observe une décroissance entre 6 à 12 mois environ après éradication de la bactérie) suggérant ainsi que le système immunitaire de l'hôte est incapable de générer des réponses protectrices contre la bactérie ou de l'éliminer.

Glupczynski et autres (1992) ont montré que 98 % des sujets *Helicobacter pylori* positifs avaient une réponse anticorps systémique, les 2 % restant ont probablement une réponse anticorps seulement locale (**Glupczynski et al., 1992**).

L'infection à *Helicobacter pylori* est fortement liée à la gastrite chronique, et à la maladie ulcéreuse gastro-duodénale. Cet agent pathogène est également considéré comme un facteur de risque associé aux adénocarcinomes et aux lymphomes de type MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). On retrouve la même forte liaison (90%) entre *Helicobacter pylori* et ulcère duodéal, *Helicobacter pylori* et ulcère gastrique (si on exclut, dans ce dernier cas, les ulcères apparus sous traitement anti-inflammatoire non stéroïdien: AINS) (**Bigard et Colin, 1997**).

Il est bien admis que *Helicobacter pylori* est le facteur causal de la gastrite chronique. Ainsi, on a pu observer ces lésions après ingestion de *Helicobacter pylori* et leur disparition avec normalisation de la muqueuse après éradication de la bactérie. De même pour l'ulcère duodéal : cicatrisation de l'ulcère et diminution de rechute (inférieure à 5% en 1 an) ont été obtenues après guérison de l'infection. Les preuves sont moins documentées pour l'ulcère gastrique.

Helicobacter pylori est reconnue comme l'agent pathogène principal des pathologies gastro-duodénales. Son pouvoir pathogène se traduit par sa capacité à coloniser la muqueuse gastrique, à survivre dans l'estomac en échappant aux mécanismes de défense de l'hôte ; et enfin par sa capacité à induire des lésions pouvant conduire à la maladie (Figure n°07) (**Delchier, 1999**).

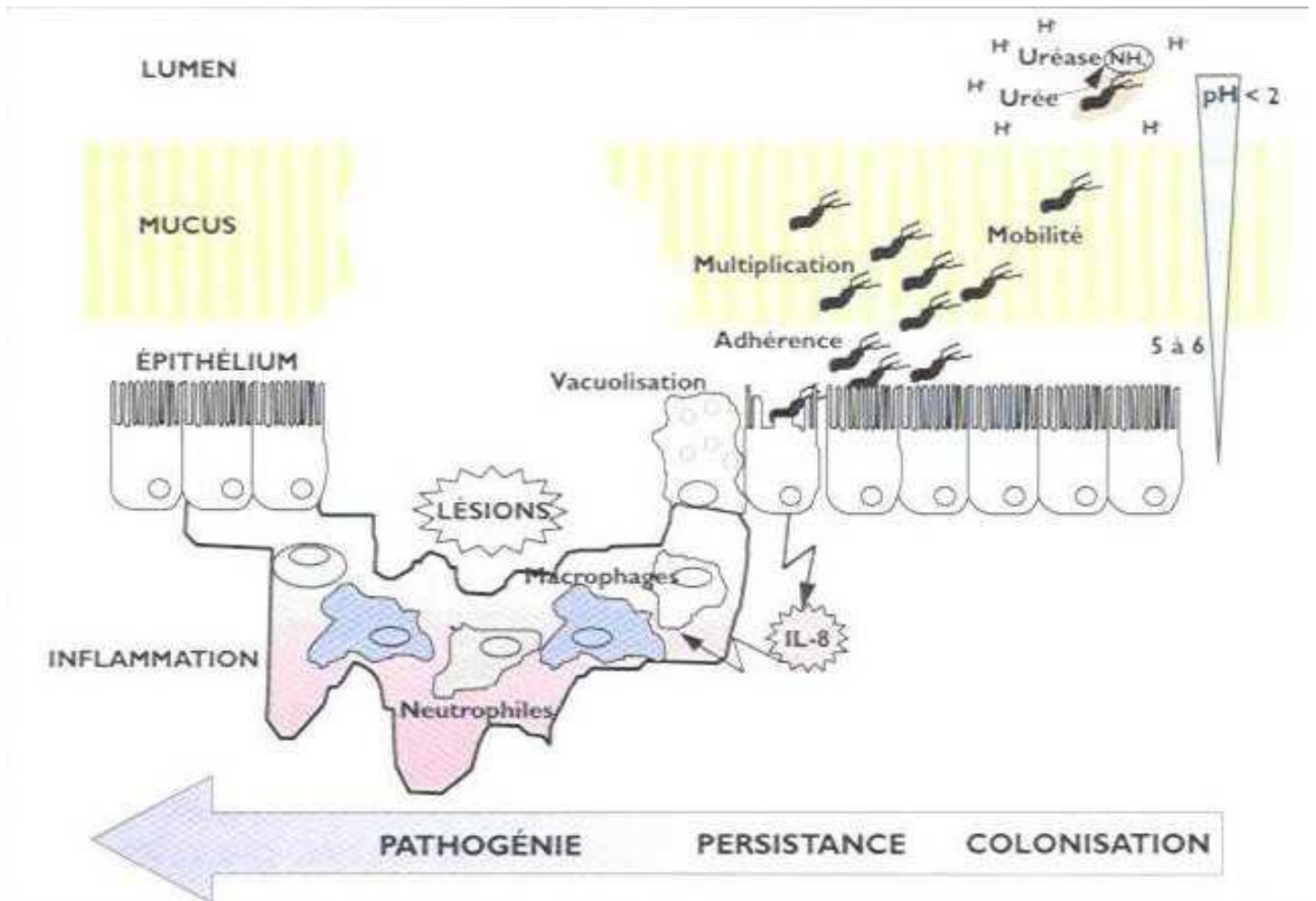


Figure n° 07 : Schéma récapitulatif des différentes étapes impliquant *Helicobacter pylori* dans les maladies gastro-duodénales (Delchier, 1999)

L'induction de la maladie découle des facteurs pathogènes bactériens et de la réponse de l'hôte.

III.2.1. Colonisation de la muqueuse gastrique par *Helicobacter pylori* :

Les mécanismes impliqués dans la colonisation de l'estomac par *Helicobacter pylori* sont ; la mobilité et la résistance à l'acidité gastrique.

III.2.1.1. Mobilité :

La morphologie spiralée de *Helicobacter pylori* ainsi que la présence des flagelles unipolaires permettent à la bactérie de traverser la couche de mucus gastrique.

Ces flagelles sont protégés par une gaine protéique résistante à l'acidité, et permettent à la bactérie de bouger même quand la viscosité est de 200 centipoises.

Chaque flagelle est constitué de 2 types de flagelline nécessaires pour la mobilité ; une flagelline majeure *Fla A* et une flagelline mineure *Fla B*. Une mutation dans le gène *fla A* la rendrait immobile (Bigard et Colin, 1997).

III.2.1.2. Uréase :

Helicobacter pylori s'implante dans l'estomac grâce à la production d'uréase. Cette dernière est une métallo-enzyme multimérique à ions nickel, qui hydrolyse l'urée avec libération de l'ammoniaque.

L'ammoniaque tamponne le milieu suffisamment longtemps pour permettre à la bactérie d'atteindre les cellules muqueuses gastriques.

L'uréase, pour être catalytiquement active, requiert l'expression de 2 sous unités structurales, *Ure A* et *Ure B*, assemblées en apoenzyme, et de 4 protéines dites auxiliaires *Ure E*, *Ure F*, *Ure G* et *Ure H* (Figure n°08) qui permettent l'activation de l'uréase en enzyme fonctionnelle par incorporation des ions nickel au sein des sites actifs (**Lin et al., 2005**).

La synthèse de l'uréase est cytoplasmique et sous la dépendance de sept gènes chromosomiques dont l'inactivation de l'un d'entre eux fournit un mutant uréase-négative incapable de coloniser l'estomac du porc (**Broutet, 2000**).

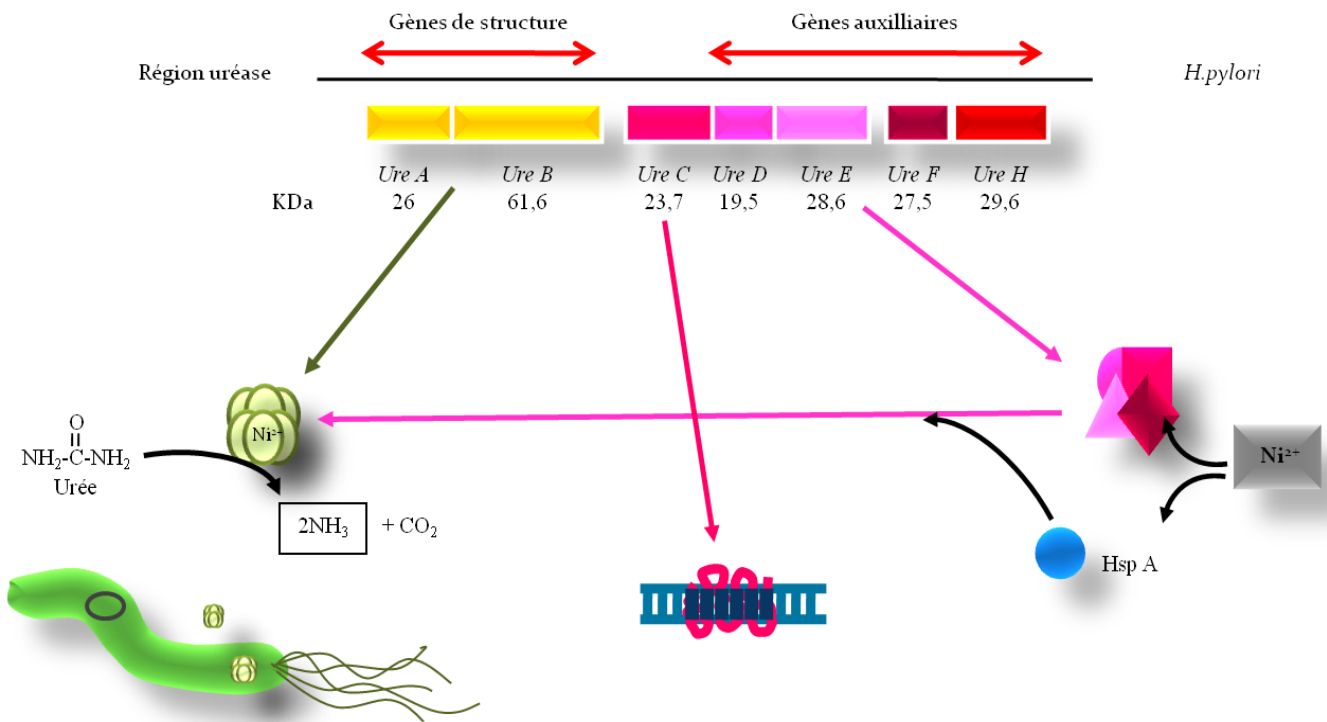


Figure n° 08 : Structure génomique de l'uréase de *Helicobacter pylori* (**Lin et al., 2005**)

Cela suggère que le rôle de l'uréase ne soit pas limité à la colonisation mais pourrait également intervenir dans la survie de la bactérie au niveau de l'estomac, ainsi que comme facteur d'agression pour la muqueuse gastrique.

L'uréase crée un gradient de pH à travers la muqueuse gastrique favorable à la mobilité de *Helicobacter pylori*.

Sans uréase la mobilité de la bactérie serait réduite de 40%, ce qui pourrait limiter considérablement son établissement dans la muqueuse gastrique.

A côté de l'uréase, diverses enzymes sont sécrétées ; la sialidase qui dégrade le mucus, les polysaccharides et la phospholipase A2 qui altèrent l'hydrophobicité de la muqueuse gastrique (**Bigard et Colin, 1997**).

III.2.1.3. Adhérence aux cellules cibles de la muqueuse gastrique :

Elle est la première étape de l'infection considérée comme un facteur indispensable pour la colonisation gastrique. Grâce à plusieurs systèmes d'adhésion, *Helicobacter pylori* se fixe spécifiquement sur des récepteurs cellulaires de

l'épithélium gastrique. Ces adhésines sont des glycoprotéines qui se fixent sur des récepteurs cellulaires qui sont soit des sialyl-carbohydrates soit des glycolipides.

Deux types d'adhésines ont été caractérisés génétiquement et biochimiquement :

- Une adhésine *Bab A2* impliquée dans l'interaction avec l'antigène du groupe sanguin Lewis b exprimé à la surface des cellules gastriques.
- Deux adhésines homologues *Alpha A* et *Alpha B* produites par tous les isolats de *Helicobacter pylori* et permettant à cette bactérie d'interagir avec les tissus gastriques.

Trois types de récepteurs ont été identifiés:

- Une structure fimbrielle capable de s'associer à un récepteur de type N-acétylneuraminyl-lactose non spécifique de l'estomac.
- Une «exoenzyme S» capable de s'associer au glycérolipide de type phosphatidyl éthanolamine.
- Un matériel superficiel capable d'adhérer aux lignées cellulaires de type HEpA.

Sur la muqueuse, les bactéries sont surtout localisées au niveau des jonctions inter cellulaires qui apparaissent altérées (**Akamatsu et al., 1996**).

III.2.2. Persistance au niveau de l'estomac

Helicobacter pylori dispose des mécanismes lui permettant de survivre pendant de longue période dans l'environnement hostile de l'estomac à côté des mécanismes de résistance de la défense immunitaire de l'hôte. La réponse immunitaire intense et complète qui suit la colonisation de l'estomac par *Helicobacter pylori* se révèle incapable d'éradiquer la bactérie (**Olson et al., 1995**).

III.2.2.1. Environnement acide :

Helicobacter pylori a besoin d'un environnement acide pour survivre en présence d'urée, ceci a été montré par l'utilisation de souches uréase positive et un mutant isogénique uréase négative. Il a été aussi montré que l'absence de survie de *Helicobacter pylori* en présence d'urée était due à l'élévation du pH plutôt qu'à la toxicité propre de l'ammoniaque. De même l'acidification peut stimuler la libération de l'uréase qui amplifierait les lésions observées (**Warren, 1997**).

III.2.2.2. Facteurs métaboliques intrinsèques :

• Les Phospholipides :

L'hydrophobicité et la composition lipidique de *Helicobacter pylori* sont des facteurs qui peuvent contribuer à la survie de cette bactérie dans l'environnement acide de l'estomac humain.

• Les ATPases bactériennes : Ils s'agiraient de :

- L'ATPase de type F typique non affectée par les dérivés du benzimidazole, mais son rôle n'est pas encore entièrement bien établi.
- L'ATPase de type P membranaire pourrait être vitale pour la bactérie et d'autant qu'elle serait une cible de l'oméprazole (**Bigard et Colin, 1997**).

III.2.2.3. Résistance à la phagocytose :

Helicobacter pylori échappe à la phagocytose par le fait de facteurs bactériens qui diminueraient l'efficacité du processus phagocytaire :

- La diminution du pouvoir des anticorps opsonisants ou leur saturation par les antigènes produits par la bactérie ou simplement leur destruction par des protéases bactériennes ;

- Masquer ces antigènes de surface en se couvrant d'immunoglobulines fixées par leur fragment Fc;
- La résistance à la bactéricidie en cas de phagocytose par des enzymes comme la catalase, super oxyde dismutase;
- L'uréase peut agir à ce niveau en diminuant l'activité bactéricide du polynucléaire en alcalinisant le phagolysosome (Nista et al., 2006).

III.2.3. Induction de la maladie :

C'est la résultante des facteurs de pathogénicité bactériens et la réponse de l'hôte.

III.2.3.1. Facteurs d'agression de la muqueuse gastrique :

Ces facteurs sont impliqués dans la création de lésions muqueuses avec altération du mucus.

III.2.3.1.1. Effet sur le Mucus :

Chez les patients atteints de gastrite à *Helicobacter pylori*, la couche de mucus gastrique est plus fine et son hydrophobicité est diminuée.

Helicobacter pylori semble exercer un effet mucolytique aux dépens des résidus peptidiques et possède une activité lipolytique qui serait à l'origine d'une sécrétion accrue de mucines de type sialique (Bigard et Colin, 1997).

III.2.3.1.2. Facteurs bactériens de pathogénicité :

Bien qu'il n'ait jamais été vu en situation intracellulaire, *Helicobacter pylori* va agir sur les cellules épithéliales par différents facteurs.

a) Uréase et Ammoniaque :

L'uréase de *Helicobacter pylori* est un facteur de pathogénicité car l'ammoniaque produite a une action toxique sur les cellules épithéliales.

Son action est de type lysosomotrope. Il peut entraîner suivant la dose soit une vacuolisation des granules lysosomiaux (signe de souffrance cellulaire) soit leur destruction.

L'activité de l'uréase dépend du pH et est plus élevée à pH 5-7 (Broutet, 2000).

b) La Cytotoxine :

La cytotoxine vacuolisante *Vac A* et la protéine associée à l'îlot de pathogénicité *Cag A* (cytotoxin-associated gene) sont connues pour être les deux facteurs de virulence majeurs de *Helicobacter pylori*. Ces deux toxines vont interférer dans les voies de signalisation cellulaires et affecter l'organisation corticale, l'adhérence et la prolifération des cellules épithéliales gastriques (Glupczynski et al., 1992).

La cytotoxine vacuolisante est une protéine fortement antigénique, elle est rencontrée chez les souches associées aux ulcères dans 60 % des cas. Elle a une action du même type que l'ammoniaque sur les cellules par son effet vacuolisant. Cet effet est inhibé par l'acidification du milieu de même que pour l'effet vacuolisant de l'ammoniaque. Elle est sous la dépendance d'un gène nommé *vac A* présent dans toutes les souches de *Helicobacter pylori*. Cependant, seules certaines souches produisent la toxine.

La variabilité importante dans la séquence des nucléotides du gène *vac A* est à l'origine de cette différence de phénotype.

Ainsi deux types de gènes appelés S1 et S2 ont été isolés ; le type S1 est le plus souvent associé à l'antigène *Cag A*, qui est l'un des antigènes immunodominants de *Helicobacter pylori* (Nista et al., 2006).

c) La Phospholipase

Toutes les souches synthétisent une phospholipase de type C dont l'activité peut affecter l'intégrité des cellules épithéliales de la muqueuse gastrique et altérer la perméabilité des membranes cellulaires.

d) Les Lipopolysaccharides (LPS) :

Composant de la paroi bactérienne capable d'induire différentes réactions biologiques. Ces réactions ont pour but principal d'éliminer les bactéries de l'organisme. Cependant, elles peuvent conduire à l'altération du tissu et contribuer à la maladie ulcéreuse.

Ainsi par ces lipopolysaccharides, *Helicobacter pylori* participerait à la destruction de l'intégrité du mucus gastrique (Akamatsu et al., 1996).

III.2.3.2. Réponse de l'hôte :

Cette réponse de l'hôte est à la fois locale et générale.

III.2.3.2.1. Réponse locale de la muqueuse gastrique :

Elle comporte des phénomènes inflammatoires et des phénomènes immunitaires à la fois cellulaires et humoraux.

a) Induction d'une réaction inflammatoire :

La colonisation de la muqueuse gastrique par *Helicobacter pylori* provoque localement une réaction inflammatoire importante caractérisée au niveau tissulaire par un infiltrat de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages.

Helicobacter pylori reste extracellulaire et ne traverse pas l'assise épithéliale de la muqueuse contrairement aux nombreuses substances antigéniques bactériennes qui sont probablement les initiateurs de la réponse inflammatoire.

Le contact des substances antigéniques bactériennes avec les cellules épithéliales stimule la sécrétion d'IL en particulier l'IL8 qui provoque le recrutement des polynucléaires, des macrophages, des mastocytes puis des lymphocytes et des plasmocytes (Bigard et Colin, 1997).

L'association entre la présence d'un type particulier du gène *fla A* et la production d'IL8, cytokine impliquée dans le processus inflammatoire, suggère que la flagelline joue un rôle important dans le développement des lésions gastriques.

L'effet cytotoxique des radicaux libres et des formes activées de l'oxygène des phagocytes activés, combiné à la protéolyse des enzymes sécrétées par les neutrophiles, sont capables de provoquer des lésions tissulaires et donc de participer à la pathogénie des maladies gastro-duodénales associées à *Helicobacter pylori*.

Les LPS de *Helicobacter pylori* peuvent induire le recrutement et l'activation des macrophages. En effet les LPS sont capables de stimuler la production de TNF alpha par les macrophages, ainsi que d'activer la mitogénicité des lymphocytes et la libération de leurs cytokines (TNF, IL8, IL6, INF) au niveau local. La protéine *Cag A* serait associée à la production de cytokines. Certains antigènes bactériens pourraient s'internaliser dans la cellule épithéliale, et se lier aux molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II) et favoriser la surexpression cellulaire de ces molécules.

L'expression de ces molécules du CMH II serait associée à un infiltrat lymphocytaire de type T (Nista et al., 2006).

b) Réponse immunitaire locale :

La muqueuse gastrique constitue l'une des barrières anti-microbiennes les plus efficaces du tube digestif du fait de ces propriétés physico-chimiques.

La réponse immunitaire locale confère une protection efficace sans induire la destruction de l'épithélium fragile ni provoquer des perturbations des fonctions très spécialisées de la muqueuse digestive fragile. La présence de *Helicobacter pylori* est associée à une augmentation significative des populations plasmocytaires productrices d'IgA, d'IgM et d'IgG dans la lamina propria.

Les IgA sécrétrices, immunoglobulines principales des sécrétions muqueuses sont sensibles à l'hydrolyse acide et au clivage protéolytique, du fait qu'elles ne comportent habituellement pas de pièce sécrétoire, ce qui fait que le pouvoir de protection de ces anticorps anti-*Helicobacter pylori* est diminué. Elles sont capables néanmoins d'induire un phénomène de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps.

Quant aux IgG produites par les plasmocytes locaux, elles rejoignent passivement la lumière gastrique et sont détruites en partie par les protéases gastriques. La formation de complexes immuns à IgG activant le complément pourrait au contraire provoquer des dommages à la muqueuse.

Une réponse locale spécifique à IgM a été mise en évidence en cas de gastrite aiguë, cette réaction immunitaire locale est aussi cellulaire.

Une réponse lymphocytaire T spécifique de certains antigènes de *Helicobacter pylori* a été mise en évidence aussi bien au niveau des lymphocytes circulants que des lymphocytes muqueux. Dans la lamina propria, les lymphocytes T du type suppresseur/cytotoxique (CD8) sont plus nombreux chez les sujets infectés par *Helicobacter pylori* que chez ceux indemnes de l'infection alors que le nombre de lymphocytes T auxiliaires (CD4+) est le même. Ainsi en dépit de la réaction immunitaire locale spécifique l'infection à *Helicobacter pylori* évolue sur un mode chronique (Akamatsu et al., 1996).

III.2.3.2.2. Réponse immunitaire générale :

L'infection par *Helicobacter pylori* s'accompagne d'une réponse anticorps systémique intense qui se manifeste par la présence d'anticorps anti-*Helicobacter pylori* circulants spécifiques d'IgG, IgA et IgM. Ces anticorps sont retrouvés dans le sang, mais également dans la salive et dans les urines. Ils sont notamment dirigés contre certains antigènes de surface (Hsp 54, protéines de 120-128 KDa, cytotoxine vacuolisante, peptides de 15 à 40 KDa). *In vitro*, ils ont une activité antibactérienne complément et phagocytes dépendante.

En effet, son caractère extracellulaire en fait un pathogène dont l'élimination devrait être assurée par les phagocytes éventuellement aidés du complément et des anticorps.

En dépit d'une réponse immunitaire spécifique, l'infection par *Helicobacter pylori* est persistante et éventuellement récidivante. Plusieurs hypothèses expliquent la chronicité de l'inflammation muqueuse liée à la colonisation de l'estomac par *Helicobacter pylori*.

Il pourrait s'agir de:

- Une réaction croisée entre les antigènes bactériens et des antigènes de l'hôte. Ces antigènes pourraient être les protéines de stress (heat shock protein: Hsp) très

immunogènes et reconnus par les lymphocytes T. Cette réaction pourrait jouer un rôle dans la persistance de l'inflammation après éradication de *Helicobacter pylori*.

- Une inhibition par *Helicobacter pylori* de la réponse immunitaire locale. Cette action immunosuppressive de *Helicobacter pylori* serait davantage en rapport avec des modifications fonctionnelles des lymphocytes qu'avec une activation des lymphocytes T suppresseurs.

- Une saturation des anticorps opsonisants par une abondante sécrétion par *Helicobacter pylori* de motifs antigéniques.

La réponse anti-*Helicobacter pylori* est alors inopérante pour éradiquer la bactérie parce que les effecteurs de cette réponse sont absents ou inefficaces au niveau de la muqueuse gastrique (**Dubois et al., 1994**).

Les bactéries recouvertes d'anticorps peuvent survivre et même se multiplier puisque ces anticorps ne font le plus souvent que sensibiliser les bactéries à la phagocytose (opsonisation) ou à l'action du complément. Les anticorps ainsi produits sont de précieux stigmates de l'infection utilisables à des fins diagnostiques. Ainsi le pouvoir pathogène de *Helicobacter pylori* serait lié à sa mobilité lui permettant de traverser la couche de mucus, l'uréase qui facilite la survie en milieu acide par production d'ammoniaque et les adhésines bactériennes permettant l'adhésion aux cellules épithéliales.

La cytotoxine vacuolisante (sous la dépendance du gène vac A) et l'antigène Cag A (sous la dépendance du gène cag A), entraînent une sécrétion accrue de cytokines responsables de l'inflammation gastrique.

L'existence d'une réaction immunitaire locale avec augmentation des plasmocytes à IgA et IgM et une réaction générale à IgG et IgM surtout et accessoirement à IgA n'ont pas suffi à vaincre la bactérie (**Nista et al., 2006**).

III.2.4. *Helicobacter pylori* et les gastrites :

L'infection à *Helicobacter pylori* une fois acquise, persiste en l'absence d'éradication thérapeutique. La colonisation de l'estomac par *Helicobacter pylori* provoque d'abord une gastrite aiguë qui peut être responsable d'une phase d'achlorhydrie transitoire. L'évolution conduit presque toujours à une gastrite chronique définie par l'existence, au sein de la muqueuse gastrique, d'un infiltrat inflammatoire de lymphocytes et de plasmocytes souvent localisés dans le chorion. La présence de polynucléaires neutrophiles est constante et définit le critère d'activité de la gastrite. Des lésions épithéliales au niveau du revêtement de surface et des cryptes y sont associées (**Bigard et Colin, 1997**).

III.2.5. Gastrites chroniques :

Le terme de gastrite désigne toutes les affections inflammatoires de la muqueuse gastrique. Ainsi parmi les gastrites chroniques, 5 types étiologiques peuvent être différenciés : les gastrites chroniques auto-immunes, les gastrites chroniques non auto-immunes, les gastrites lymphocytaires, les gastrites granulomateuses et les gastrites à éosinophiles (Tableau n°05) (**Akamatsu et al., 1996**).

Tableau n°05 : Différents types de gastrites chroniques (Akamatsu et al., 1996).

	Histologie	Etiologie	Endoscopie	Clinique
astrite non auto-immune Gastrite antrale non rrophique Gastrite atrophique ultifocale	Infiltrat à polynucléaires neutrophiles + lymphoplasmocyte Métaplasie intestinale, atrophie	<i>Helicobacter pylori</i>	Normale ou gastrite nodulaire, érythème, fragilité	Asymptomatique ou ulcère gastrique, ou duodénale, ou dyspepsie
astrite auto-immune	Infiltrat lymphocytaire ± atrophie fundique	Gastrite atrophique autoimmune <i>Helicobacter pylori</i>	Aspect en fond d'oeil du fundus	Anémie pernicieuse
astrite mphocytaire	Infiltrat lymphocytaire intraépithélial	Intolérance au gluten <i>Helicobacter pylori</i>	Normale, ou gastrite varioliforme, ou hyperplasique	Parfois associée à une maladie coeliaque
astrite anulomateuse	Granulome épithélioïdegiganto-cellulaire	Tuberculose syphilis, parasitoses, mycoses, Crohn, sarcoïdose	Normale ou ulcère parfois volumineux, ou lis hypertrophiques	Dépend de la cause
astrite à sinopholies	Infiltrat riche en polynucléaires éosinophiles	Inconnue	Normale ou ulcères ou plis hypertrophiques	astroentérite à éosinophiles, nausées, vomissements, carence martiale, amaigrissement diarrhée

L'infection à *Helicobacter pylori* intervient comme un facteur déterminant dans la gastrite chronique non auto-immune. Cependant, comme l'a souligné Courillon-Mallet, les patients infectés par *Helicobacter pylori* ne développent pas tous la même gastrite : certains développent la gastrite antrale prédominante et d'autres la gastrite multifocale. Elles sont associées à des pathologies gastroduodénales différentes.

Dans la gastrite antrale prédominante, les lésions épithéliales sont peu intenses, et les glandes ont un aspect normal (un faux aspect d'atrophie peut être dû à l'importance de l'infiltrat inflammatoire qui sépare les glandes) (Akamatsu et al., 1996).

La gastrite antrale hypersécrétoire, plus fréquente dans les pays industrialisés, est la plus souvent asymptomatique, et s'associe à une maladie ulcéreuse duodénale dans 10% des cas.

Dans la gastrite atrophique multifocale, le volume global des glandes diminue, et l'épithélium lésé est remplacé par la fibrose ou la métaplasie intestinale. La gastrite atrophique multifocale, plus nombreuse dans les pays à faible niveau de développement socio-économique, est elle aussi asymptomatique mais représente un risque majoré pour l'ulcère gastrique et le cancer de l'estomac.

En fait, on estime, dans environ 10 % des cas, l'évolution de la gastrite à *Helicobacter pylori* vers l'atrophie glandulaire progressive de la muqueuse gastrique et la métaplasie intestinale. Ce type de lésion est susceptible de favoriser le développement d'un cancer gastrique (Dubois et al., 1994).

Les facteurs responsables de l'évolution de la gastrite vers l'atrophie ne sont pas parfaitement connus. La responsabilité des *Helicobacter pylori* dans la survenue de gastrites chroniques atrophiques a longtemps été discutée du fait de la faible prévalence de l'infection sur des biopsies gastriques de muqueuse atrophique. En effet, la densité de la colonisation bactérienne diminue au fur et à mesure que l'atrophie et la métaplasie intestinale se développent.

Schématiquement, l'adhérence de *Helicobacter pylori* aux cellules épithéliales induit une cascade de réactions inflammatoires et une accélération de l'apoptose conduisant à la destruction de l'épithélium superficiel glandulaire.

En réponse à cette agression, survient alors soit une régénération correspondant à une réépithélialisation dans sa forme originelle, soit une cicatrisation. Dans ce dernier cas, l'épithélium est remplacé soit par une fibrose, soit par un épithélium en métaplasie intestinale. Plusieurs facteurs interviennent pour déterminer ces mécanismes de régénération ou de cicatrisation : des facteurs de virulence bactérienne (certaines souches de *Helicobacter pylori* - souches Cag A - semblent avoir des propriétés proinflammatoires accrues), des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux (la consommation de fruits et légumes frais préviendrait de l'évolution vers la métaplasie, et la consommation excessive de sel pourrait favoriser l'évolution vers l'atrophie) (Bigard et Colin, 1997).

III.2.6. *Helicobacter pylori* et l'ulcérogenèse :

A partir des études prospectives, un lien chronologique a pu être établi entre la gastrite chronique et l'ulcère. En effet, le risque de survenue d'ulcère est environ dix fois plus élevé chez les malades porteurs d'une gastrite chronique que chez les témoins, suggérant ainsi que la gastrite chronique précède bien la maladie ulcéreuse (Bigard et Colin, 1997).

La responsabilité de *Helicobacter pylori* est également admise dans l'entretien de la maladie ulcéreuse duodénale ou gastrique.

Deux mécanismes pourraient intervenir dans l'ulcérogenèse: un mécanisme direct d'agression de la muqueuse faisant intervenir les propriétés cytotoxiques de la bactérie et son effet promoteur sur les médiateurs de l'inflammation et une action indirecte d'augmentation de la sécrétion gastrique acide par le biais d'une dysrégulation des mécanismes neuro-hormonaux (Bigard et Colin, 1997).

Dans le cadre de l'ulcère duodénal, cette agression entraîne d'abord un remplacement de l'épithélium intestinal de la muqueuse duodénale par un épithélium gastrique (métaplasie gastrique), une colonisation secondaire par *Helicobacter pylori*, puis le développement d'une inflammation, une érosion et enfin un ulcère. L'ulcère peut à son tour cicatriser sous forme de métaplasie gastrique, favorisant l'auto-entretien de la maladie.

On estime qu'environ 10% des cas d'infections à *Helicobacter pylori* aboutissent à des ulcères et 1% à des cancers.

III.2.7. Mécanisme de cancérogenèse :

L'infection par *Helicobacter pylori* est un facteur de risque reconnu dans le cancer du tiers distal de l'estomac. Le rôle de *Helicobacter pylori* s'inscrit parfaitement dans la séquence classique de physiopathogénie du cancer gastrique, établit bien avant la découverte de *Helicobacter pylori* : « **inflammation** → **gastrite atrophique** → **métaplasie intestinale** → **cancer** ».

Helicobacter pylori intervient surtout aux phases précoces (phases de l'inflammation), pour peu à peu disparaître aux stades avancés de l'atrophie gastrique et de métaplasie intestinale.

Helicobacter pylori interviendrait dans la carcinogénèse gastrique en favorisant la prolifération cellulaire, mais aussi en augmentant la réponse inflammatoire et l'apoptose (lié au gène P53). Puis, lors de l'évolution de l'infection à *Helicobacter pylori*, la bactérie va disparaître au fur à mesure de l'apparition d'une métaplasie

intestinale, s'accompagnant de décroissance de l'apoptose, ce qui faciliterait l'apparition du cancer (Figure n°09) (Sobala et al., 1991).

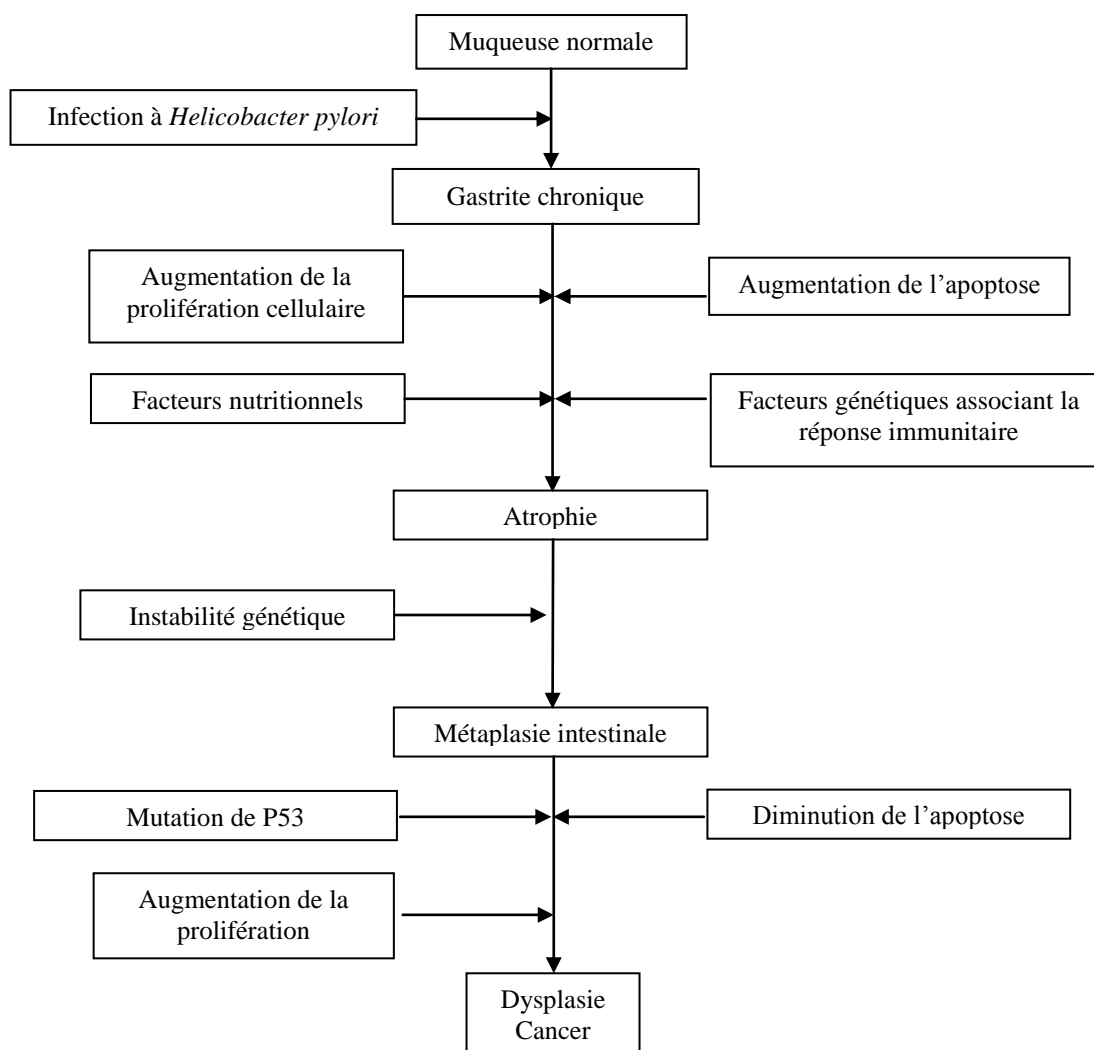


Figure n°09 : Les facteurs de la carcinogénèse de l'estomac (Sobala et al., 1991)

Le cancer gastrique est une pathologie plurifactorielle, dont les facteurs de risque sont multiples, liés d'une part à *Helicobacter pylori* et d'autre part à l'environnement et à l'hôte :

- Facteur lié à *Helicobacter pylori* : il existe une hétérogénéité pathogénique des bactéries selon les souches. D'après plusieurs travaux (Sobala et al., 1991), les souches *Cag A* des *Helicobacter pylori* provoqueraient un risque majoré d'atrophie, de métaplasie et de cancer gastrique. Les études de génotypage plus récentes suggèrent le rôle d'autres gènes, qu'il faudrait confirmer.

- Facteurs non liés à *Helicobacter pylori* :

1. Alimentaires et environnementaux
2. Génétiques (risque majoré chez des apparentés de premier degré)
3. Sujet à débit acide bas : en effet, chez le sujet à débit acide élevé, le risque d'ulcère duodéal est majoré avec cependant une limitation à la zone antrale et peu de risque de cancer, alors que le sujet à débit acide bas développerait une pangastrite, puis une atrophie avec un risque augmenté de cancer gastrique (Tytgat, 1995).

III.3. Diagnostic et traitement de l'infection par *Helicobacter pylori* :

III.3.1. Diagnostic :

En pratique, la recherche d'une infection à *Helicobacter pylori* ne se justifie que dans des situations cliniques qui aboutissent à une attitude thérapeutique active.

Les méthodes diagnostiques reposent sur la mise en évidence de la bactérie (anatomie pathologique, culture bactérienne), de son génome (PCR), de son enzyme (test à l'uréase, tests respiratoires), ou d'anticorps spécifiques (sérologie) (**Glupczynski, 1994**).

Ces méthodes sont soit invasives (nécessitant une endoscopie et des biopsies), soit non invasives.

III.3.1.1. Méthodes diagnostiques :

III.3.1.1.1. Les tests invasifs :

- Les tests à l'uréase sont pratiqués à partir de biopsies, lors de l'endoscopie, et peuvent donner une réponse très rapide en moins d'une heure. Leur sensibilité est évaluée à 80-85 % et peut être améliorée en mettant deux biopsies dans un même test. Leur spécificité est bonne (supérieure à 95 %) (**Bigard et Colin, 1997**).

- L'examen anatomopathologique des biopsies a une sensibilité et une spécificité proches de 95 %, pouvant varier selon le nombre de biopsies et l'expérience de l'observateur. Cet examen a l'avantage supplémentaire de préciser l'état de la muqueuse gastrique et d'évaluer le degré d'activité de la gastrite associée à *Helicobacter pylori*.

- La culture, à partir des biopsies, est la seule méthode totalement spécifique. En revanche, sa sensibilité dépend des conditions techniques (transport, nombre de biopsies, laboratoire,...). Le délai de réponse est de plusieurs jours. Elle permet en outre l'étude de la sensibilité aux antibiotiques et le typage éventuel des souches.

- Les techniques d'amplification génique (PCR) à partir des biopsies semblent sensibles et spécifiques. Leur disponibilité actuelle reste très limitée.

III.3.1.1.2. Les tests non invasifs :

- La sérologie est un examen sensible (85-95 %) et spécifique (90-95 %) par les tests ELISA standard. La diminution significative des anticorps n'est observée que six à huit mois après éradication des *Helicobacter pylori*, ce qui limite son utilisation pour le contrôle précoce (Figure n° 10) (**Bigard et Colin, 1997**).

- Le test respiratoire à l'urée marquée au ¹³C a une bonne sensibilité (89-100%) et une bonne spécificité (90-100%), comparables à celles de l'examen anatomopathologique. La spectrométrie de masse est la référence pour le contrôle de l'éradication en pratique courante.

- La recherche de *Helicobacter pylori* dans la salive est peu sensible et n'est pas une technique utilisée en pratique courante.

- La recherche de *Helicobacter pylori* dans les selles semble être une technique adaptée chez l'enfant du fait de sa bonne sensibilité et de sa facilité dans le recueil des selles.

Ces tests doivent être effectués à distance de toute prise médicamenteuse susceptible de réduire le nombre de bactéries dans l'estomac (antibiotiques, antisécrétoires) lors des 4 semaines précédant le test.

Enfin, pour vérifier la guérison de l'infection, il est nécessaire d'être à plus de quatre semaines du traitement éradicateur.

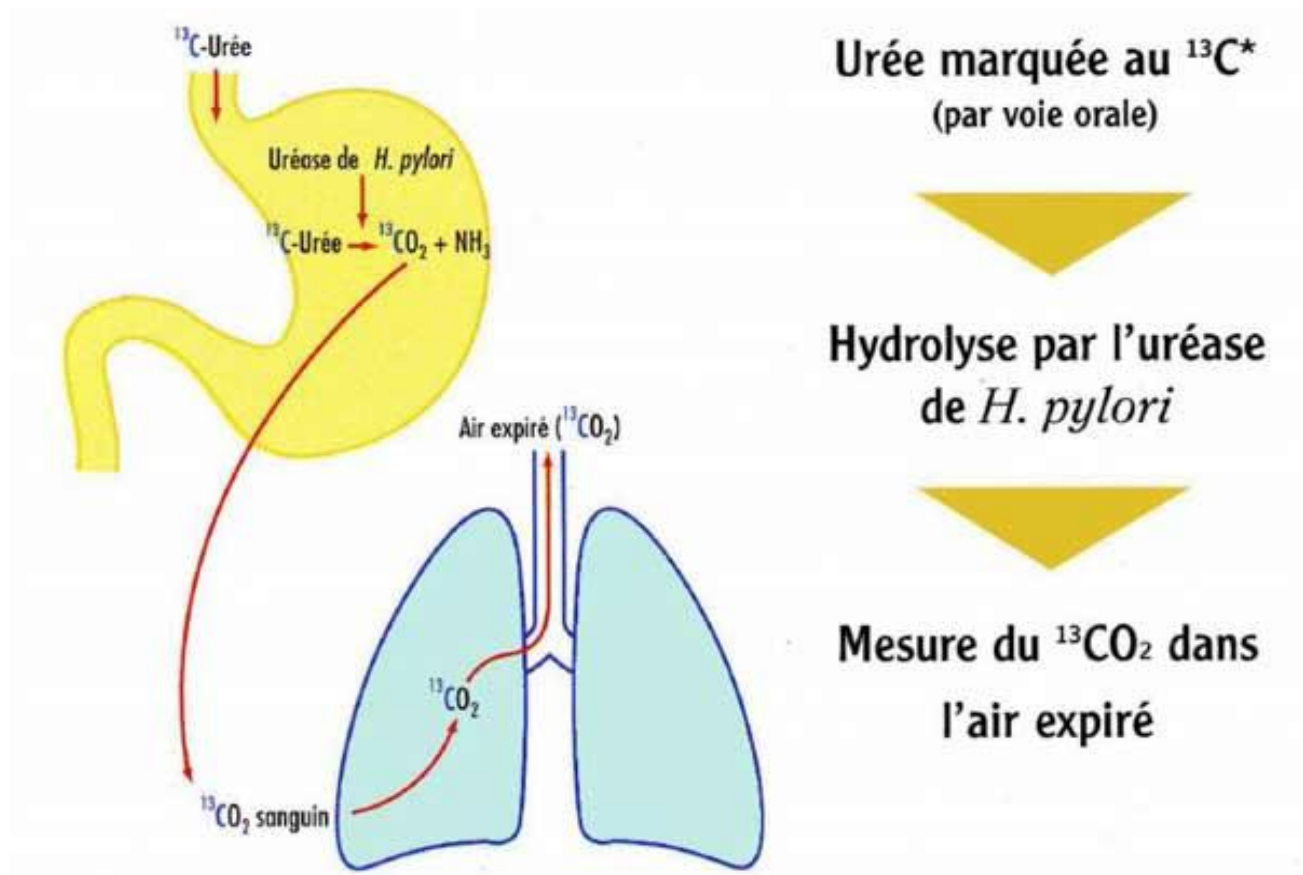


Figure n°10: Diagnostic de *Helicobacter pylori* par le test respiratoire à l'urée marquée au ^{13}C (<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguides/unit1/bacpath/helico.htm>)

II.3.2. Quand faut-il rechercher *Helicobacter pylori* (selon la conférence de consensus en France 1996) ?

Le dépistage systématique dans la population générale n'est pas justifié. En fait, la recherche de *Helicobacter pylori* se pose surtout chez des malades ayant une symptomatologie digestive haute suffisamment importante pour justifier une endoscopie.

Schématiquement (Bigard et Colin, 1997) :

- Devant un estomac et un duodénum macroscopiquement normaux, il n'est pas recommandé d'effectuer systématiquement une recherche de *Helicobacter pylori*,
- Devant une maladie ulcéreuse duodénale confirmée en endoscopie, on peut mettre la bactérie en évidence dans des biopsies antrales (2, à plus de 3 cm du pylore) par des tests à l'uréase et/ou un examen anatomopathologique,
- Devant une maladie ulcéreuse gastrique, outre les biopsies systématiques sur les berges de l'ulcère, il faut rechercher *Helicobacter pylori* dans l'antra et le fundus,
- Devant les autres lésions macroscopiques qui justifient des biopsies, cette recherche est licite, d'autant plus qu'il existe des lésions plus ou moins liées à *Helicobacter pylori* : lymphome de MALT, maladie de Métrier, etc.

III.3.3. Traitements de l'infection à *Helicobacter pylori* :

Les données de la littérature de ces dernières années montrent que l'élimination de la bactérie aide à la cicatrisation des ulcères gastriques et/ou duodénaux et prévient de façon spectaculaire la récurrence ulcéreuse et ses complications. L'éradication des *Helicobacter pylori* fait régresser 60% des lymphomes du MALT (principalement de bas grade mais aussi dans certains cas de haut grade).

Devant le caractère unanime et abondant des résultats thérapeutiques, certains pays (Etats-Unis en 1994 et la France en 1995) ont recommandé de traiter tous les patients porteurs d'ulcère gastrique ou duodénal par une thérapeutique visant à éradiquer *Helicobacter pylori* de la muqueuse gastrique (Nista et al., 2006).

III.3.3.1. Historique du traitement anti-*Helicobacter pylori* :

III.3.3.1.1. Les monothérapies :

Les premiers modèles d'études thérapeutiques utilisaient des monothérapies, testant ainsi les agents antimicrobiens auxquels *Helicobacter pylori* était sensible *in vitro*. Les principales molécules testées sont les suivantes:

- Amoxicilline,
- Tétracycline,
- Nitro-imidazolé,
- Macrolide (clarithromycine avec CMI = 0,06 mg/L),
- sels de bismuth.

En fait, bien que *Helicobacter pylori* soit sensible à de nombreux composés *in vitro* avec des concentrations minimales d'inhibition (CMI) régulièrement inférieures à 1 mg/L, ces différentes monothérapies sont inefficaces *in vivo* en termes d'éradication de *Helicobacter pylori*, ayant obtenu des taux d'éradication de 20 à 40% (Nista et al., 2006). Il est probable que les conditions d'action des molécules en situation clinique soient profondément modifiées par la localisation de cette bactérie au sein de la couche du mucus, entourée par un milieu acide formant ainsi une niche écologique protégée d'accès difficile.

III.3.3.1.2. Les bithérapies :

Confrontés à la difficulté d'éradiquer la bactérie par de simples monothérapies et à la moindre efficacité des antibiotiques en milieu acide, les schémas thérapeutiques se sont orientés vers l'utilisation des combinaisons thérapeutiques de deux médicaments associant antisécrétoire et antibiotique.

Parmi celles-ci, deux ont principalement été testées :

- IPP + amoxicilline
- IPP + clarithromycine.

De ces différentes combinaisons étudiées, le schéma optimal obtenu associait un inhibiteur de la pompe à proton à double dose en une prise unique, et la clarithromycine 500 mg x 2 fois par jour pendant 2 semaines (Nista et al., 2006). Cependant, la fréquence des effets secondaires (40%) ainsi que l'efficacité modeste en ont limité son utilisation (Olson et al., 1995).

A noter également l'association ranitidine-bismuth citrate (RBC) et monoantibiotique qui a permis d'obtenir des taux d'éradication relativement comparables à ceux des bithérapies IPP-antibiotique (Lamouliatte et al., 1997).

Au total, les bithérapies associant un antisécrétoire et un antibiotique ne permettaient d'obtenir que des taux d'éradication maximum autour de 60 % en

intention de traiter et paraissent donc nettement insuffisante pour être utilisées en première intention.

III.3.3.1.3. Les trithérapies :

Enfin, les trithérapies associant un antisécrétoire et deux antibiotiques ont permis d'obtenir des taux d'éradication jusqu'à 80-95 % (Lind *et al.*, 1996).

En France, les recommandations de la conférence de consensus d'octobre 1995 étaient de traiter l'infection à *Helicobacter pylori* par une trithérapie de sept jours comportant un antisécrétoire, de préférence un inhibiteur de pompe à protons (IPP) à double dose, et une double antibiothérapie comportant deux antibiotiques parmi les suivants : amoxicilline (A), clarithromycine (C), métronidazole (M) (Cayla, 1996 ; Deltenre *et al.*, 1996). Cette recommandation est basée essentiellement sur les résultats d'une étude multicentrique, internationale MACH 1 (Lind *et al.*, 1996), qui comparait en double aveugle l'effet de l'oméprazole associé au placebo, et aux différentes combinaisons possibles de deux antibiotiques entre amoxicilline, clarithromycine et métronidazole, et qui a montré une efficacité remarquable de ces trithérapies de 7 jours, notamment sur les associations OAC et OMC (Tableau n°06).

La mise à jour des recommandations de la conférence de consensus a été réalisée en 1999 n'a pas modifié les traitements de première ligne.

Tableau n°06 : Résumé de l'étude MACH 1 (Lind *et al.*, 1996)

Traitement	n	Taux d'éradication %
20 mg x 2 /jour 1000 mg x 2 /jour 500 mg x 2 /jour	110	96
20 mg x 2 /jour I 400 mg x 2 /jour 250 mg x 2 /jour	111	95
20 mg x 2 /jour I 400 mg x 2 /jour 250 mg x 2 /jour	118	90
20 mg x 2 /jour 1000 mg x 2 /jour 250 mg x 2 /jour	111	84
20 mg x 2 /jour 1000 mg x 2 /jour I 400 mg x 2 /jour	119	79

O : oméprazole ; A : amoxicilline ; C : clarithromycine ; M : métronidazole
n : nombre de patients

III.3.3.2. Schémas thérapeutiques :

III.3.3.2.1. Les trithérapies IPP-Amoxicilline-Clarithromycine (IPP-AC) :

En France, l'association oméprazole (20 mg), amoxicilline (1g), clarithromycine (500mg) deux fois par jour pendant sept jours est la plus largement prescrite, compte tenu des taux de résistance primaire au métronidazole présumés

élevés en France. Elle s'appuie sur les résultats de l'étude MACH 1, qui a montré un taux d'éradication de 96% avec l'association :

O 20 mg + A 1000 mg + C 500 mg deux fois par jour (**Lind et al., 1996**).

Or, comme l'a souligné **Delchier (1999)**, les études réalisées ultérieurement ont montré des taux d'éradication plus faibles, notamment en France, allant de 56 à 84%, avec en moyenne des taux d'éradication inférieurs à 80% en France (Tableau n°7).

Tableau n°7 : Trithérapie IPP double dose, amoxicilline 1 g x 2 / jour, clarithromycine 500 mg x 2 / jour, pendant 7 jours : résultats des principales études avant 2000 (Delchier, 1999).

	IPP	Type de l'étude	n	Taux d'éradication %
Etudes internationales				
Lind et al. 1996 (MACH 1)	O	DA, UD	110	96
Lind et al. 1999 (MACH 2)	O	DA, UD	127	94
Rock et al. (Asie du sud-Est)	O	UD	83	87
Etudes nouvelles (pays étrangers)				
Wisiewicz et al. 1997 (Royaume-Uni / Irlande)	L	A, UD DNU	121	66
Wabouter et al. 1999 (Belgique)	O	DNU, UGD	159	76
Wibenz et al. 1997 (Allemagne)	P	UD	60	82
Wouw et al. 1998 (Afrique du Sud)	P	SA, UD	33	88
Wine et al. 1997 (Etats Unis)	O	DNU	50	66
Wine et al. 1996 (Etats Unis)	O	DNU	61	82
Witalano et al. 1998 (Italie)	O	UD	65	77
Wozniak et al. 1998 (Italie)	O L	SA, UGD	170 166	62 72
Wright et al. 1999 (Royaume-Uni)	O	Hp+	110	87
Wright et al. 1999 (Italie)	O	DNU	150	59
Etudes nationales (France)				
Wright et al. 1999	O	DNU	70	75
Wyszynski et al. 1997	O	UD	172	70
Wyszynski et al. 1996	L	DNU	33	56
Wyszynski et al. 1997	P	DA, DNU	96	80
Wyszynski et al. 1998	L	DA, UD	104	84
Wyszynski et al. 1999	O	DNU	78	72

O : oméprazole ; L : lansoprazole ; P : pantoprazole ; DA : double aveugle ; SA : simple aveugle ; UGD : ulcère gastroduodénal ; DNU : dyspepsie non ulcéreuse ; ITT : en intention de traiter ; Hp+ : malade sélectionné sur la base d'une sérologie positive; UD: ulcère-duodéal.

L'éradication de *Helicobacter pylori* est indispensable lors de sa mise en évidence pour notamment éviter les risques de cancer de l'estomac. Cette éradication par le traitement classique (trithérapie antibiotique) n'est pas toujours suffisante.

L'adjonction d'un traitement naturel limitera les risques de récurrence. Différentes plantes ont montré une action nette sur *Helicobacter pylori* et en limite les risques (**Mahady et al., 2005**).

Chapitre IV : Présentation de *Pistacia lentiscus L* et l'aromathérapie

IV.1. Introduction :

Pendant des millénaires, l'utilisation des plantes médicinales fut le principal recours pour guérir l'homme. Cette utilisation est généralement adaptée aux pathologies légères, en visant un traitement symptomatique.

Il y'a environ 500.000 plantes sur terre, 100.000 d'entre elles, environ, possèdent des propriétés médicinales attribuées à leur principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie: elles présentent en effet des avantages dont les médicaments conventionnels sont souvent dépourvus (**Gilles, 1976; Iserin, 2001**).

Le *Pistacia lentiscus L*, Darou en arabe, Chios mastic tree (Anglais), Mastixbau (Allemand), Arbre au mastic; Lentisque (Français), Derw (Afrique du nord) et Lentisco (Espagnol) (**Torkelson, 1996; Feidemann, 2005**).

En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus L*, *Pistacia terebinthus L*, *Pistacia vera L* et *Pistacia atlantica* (**More et White, 2005**).

IV.2. Classification systématique et description botanique :

IV.2.1. Classification taxonomique :

Le *Pistacia lentiscus L* est une espèce appartenant à la famille des Anacardiaceae (syn. Pistaciaceae). Les espèces les plus importantes dans le monde du genre *Pistacia* sont :

- *Pistacia atlantica*
- *Pistacia chinensis*
- *Pistacia lentiscus L*. — pistachier lentisque
- *Pistacia terebinthus L*. — pistachier térébinthe
- *Pistacia vera L*. — pistachier vrai (qui donne la pistache)
- *Pistacia integerrima*
- *Pistacia palestina*
- *Pistacia khinjuk*

Parmi les espèces du genre *Pistacia*, le *Pistacia lentiscus L* est un arbrisseau très commun en Algérie (**Mitcheh, 1986; Baudière et al., 2002**), sa taxonomie est comme suite :

ègne	<i>lantae</i>
mbranchement	<i>racheobionta</i>
uper-division	<i>ermatophyta</i>
ivision	<i>lagnoliophyta</i>
lasse	<i>lagnoliopsida</i>
ous-classe	<i>osidae</i>
rdre	<i>xpindales</i>
amille	<i>nacardiaceae</i>
enre	<i>istacia L</i>
spèce	<i>istacia lentiscus L</i>

IV.2.2. Description botanique :

Arbrisseau dioïque thermophile de 1 à 3 mètres de hauteur, à odeur résineuse forte et à écorce lisse et grise; les feuilles persistantes, composées, alternes pourvues d'un pétiole ailé, paripennées de 4 à 10 petites folioles elliptiques-obtuses, coriaces, luisantes en dessus, mates et pâles en dessous.

Les fleurs en grappes spiciformes denses, naissant 1 ou 2 à l'aisselle d'une feuille et égalant au plus la longueur d'une foliole. Le fruit petit, subglobuleux, apiculé, rouge, puis noir à la maturité (Figure n°11) (Yahya, 1992; Iserin, 2001; More et White, 2005).

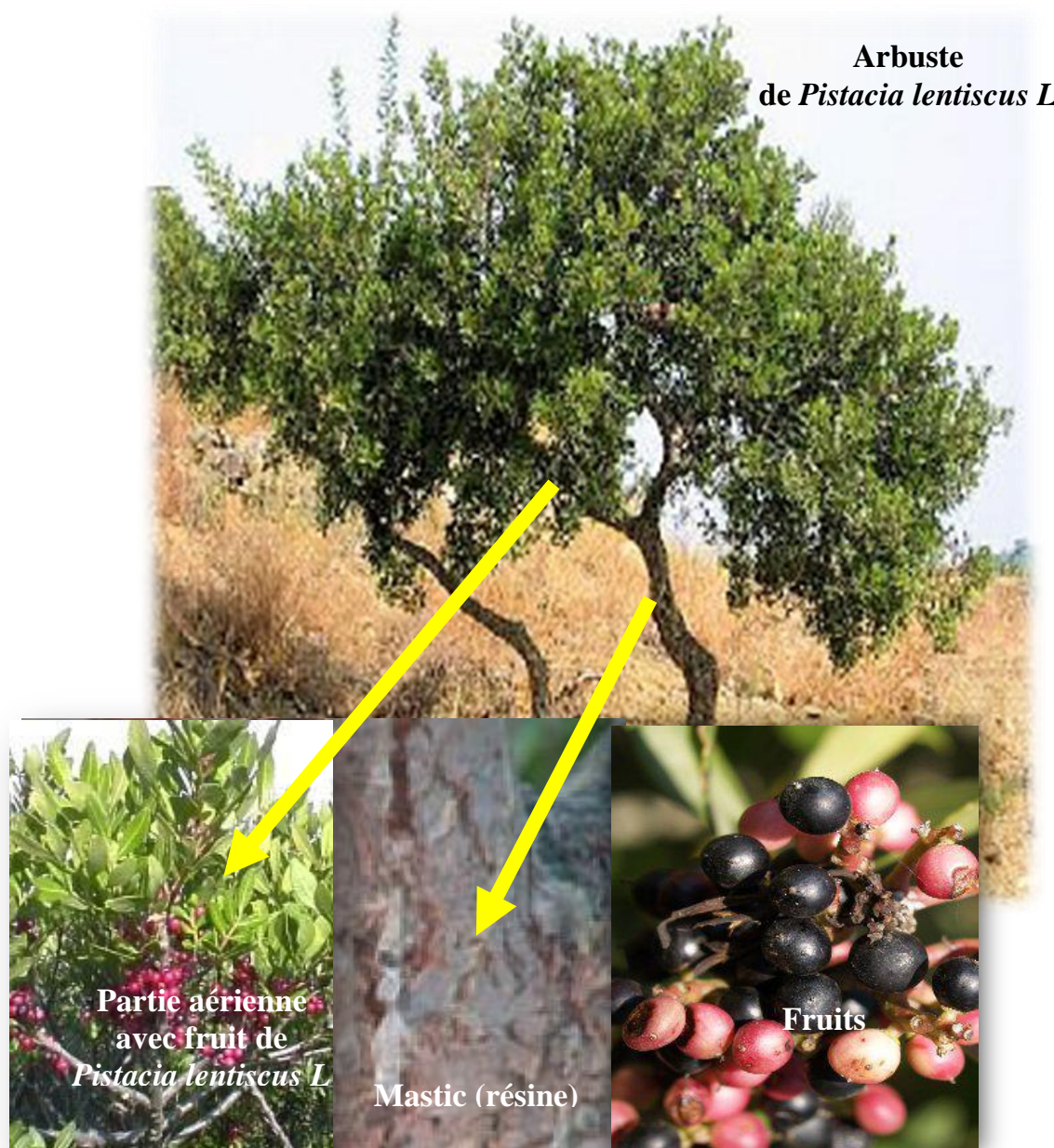


Figure n°11: Description botanique de *Pistacia lentiscus* L (Yahya, 1992; Iserin, 2001; More et White, 2005)

Le pistachier lentisque est très commun dans le bassin méditerranéen (Figure n°12), il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tous types de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux.

En Algérie, le lentisque se trouve dans les zones forestières sur le long du nord algérien (**More et White, 2005**).



Figure n°12: Aire de répartition de *Pistacia lentiscus L.* autour du bassin Méditerranéen (**Seigue, 1985**)

Une étude portant sur la variabilité naturelle de *Pistacia lentiscus L.* du bassin méditerranéen utilisant une analyse par RAPD (random amplified polymorphic DNA), combinée à des examens chimiques et morphologiques, conclue à l'existence d'une grande variabilité génotypique de cette espèce (**Barazani et al., 2003**).

IV.2.3. Produits et dérivés à base de *Pistacia lentiscus L.* :

D'après **Seigue (1985)**, les principaux produits dérivés du *Pistacia lentiscus L.* et leur utilisation sont décrites :

- **Bois** : pour sa robustesse et la finesse de sa texture, le bois de cette espèce est très apprécié en ébénisterie.
- **Résine** : Les branches et le tronc exsudent naturellement ou par incision une résine jaune claire fortement aromatique qui durcit au contact de l'air qui est appelée mastic ou gomme mastic d'où son nom commun d'arbre à mastic, généralement la production est d'environ 4 à 5 kg par arbuste. Cette résine est produite à grande échelle dans des vastes plantations dans la région d'Emporio et Mesta, qui est d'ailleurs appelée "mastihohoria" qui se traduit par villages à mastic, d'où le nom commercial répandu de « Mastic de Chio ». Ce dernier entrait dans la confection d'eau-de-vie et de liqueurs, aromatisées certaines confitures, confectionner des pâtes ou des gommes à mâcher. Aujourd'hui encore le mastic est employé dans l'industrie agro-alimentaire

évidemment comme agent masticatoire, dans l'industrie photographique et dans les soins dentaires (dans les amalgames).

Depuis la plus haute antiquité le Mastic de Chio était réputé dans toute la méditerranée orientale pour traiter les affections pulmonaires (**Van den Berg et al., 1998**).

- **Essence de Mastic**: après distillation du mastic est récupérée une essence qui entre dans la confection de parfums, produits cosmétologiques et pharmaceutiques, de vernis de grande qualité recherché par les peintres œuvrant à la peinture à l'huile et aussi dans l'industrie photographique (**Romani et al., 2002**).

- **Huile de lentisque** : du fruit comestible est extraite une huile qui autrefois était couramment utilisée pour l'alimentation, l'éclairage et elle entrait aussi dans la confection de savons (**Luigia et al., 2007**).

L'huile est produite à l'Est de l'Algérie, dans les zones notamment côtière (El Milia, Skikda), où l'espèce abonde. Un procédé traditionnel est utilisé à cet effet. Les baies prennent alors une coloration noire au lieu du rouge. Les baies sont récoltées à la main, macérées dans de l'eau chaude et puis écrasés à l'aide d'une presse. Des baies s'exultent un liquide épais de couleur jaune verte. L'huile est récupérée par décantation.

- **Essence des feuilles et rameaux** : de ces parties est extraite une huile essentielle qui est utilisée en aromathérapie et phytothérapie pour ses propriétés décongestionnantes, prescrite aussi pour traiter les problèmes veineux dont les hémorroïdes (**Romani et al., 2002**).

IV.2.4. Etude chimique de l'espèce *Pistacia lentiscus L*:

- Le mastic de *Pistacia lentiscus L* :

Des analyses chimiques réalisées sur le mastic de *Pistacia lentiscus L* (**Van den Berg et al., 1998**) ont montré la présence d'un polymère le cis-1,4-poly-β-myrcène. Le mastic contient également une petite fraction (environ 2%) des huiles essentielles (**Papageorgiou et al., 1981; Papageorgiou et al., 1997; Koller et al., 1997**). Un certain nombre de constituants de triterpénoïde de gomme mastic ont été identifiés (**Papageorgiou et al., 1997; Koller et al., 1997**).

Les triterpénoïdes présents dans la mastic sous forme de deux types de squelettes: squelette de tétracyclique euphane et dammarane et le squelette de pentacyclique oleanane et lupane (**Van den Berg et al., 1998**).

- Le fruit de *Pistacia lentiscus L* :

Une étude phytochimique réalisée sur les baies de *Pistacia lentiscus L* a permis d'identifier trois anthocyanes appelés cyanidine 3-O-glucoside, Delphinidine 3-O-glucoside et cyanidine 3-O-arabinoside qui ont été déterminées par HPLC-DAD-MS (**Charef et al., 2008**).

- Les feuilles *Pistacia lentiscus L* :

La séparation des polyphénols a été effectuée sur les feuilles de *Pistacia lentiscus L* par l'utilisation des méthodes HPLC semi-préparatives, HPLC avec détecteur photomètre UVVIS à barrette de diodes (PDA) ainsi que par analyse HPLC-SM et RMN (**Romani et al., 2002**).

Trois grandes classes de métabolites secondaires ont été détectées :

- Acide gallique et dérivés galloyls;
- Anthocyanes, à savoir delphinidine 3-O-glucoside et cyanidine 3-O-glucoside;
- glycosides de flavonol comme les glucosides de quercétine et de myricétine.

IV.3. Les Huiles essentielles :

IV.3.1. Définition :

Ce 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 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 (**Cimanga, 2002**).

Au point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les huiles essentielles sont constituées de différents composants terpènes, esters, cétones et d'autres éléments. Les huiles essentielles doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et hydrophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stables dans les solvants des lipides (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) à l'inverse des glycérides, dans l'alcool (**Zeng et He, 2006**).

IV.3.2. Répartition systématique :

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent (**Guenther, 1984**).

IV.3.3. Localisation des huiles essentielles dans les tissus :

Les huiles essentielles peuvent s'accumuler dans des cellules isolées qui se distinguent des cellules banales par leur teinte plus jaune et leurs parois épaisses, légèrement lubrifiées. C'est le cas chez les lauracées ; elles peuvent former de fines gouttelettes parsemant le protoplasme de cellules épidermiques comme l'épiderme supérieur des pétales de rose. Mais généralement les épidermes des pétales de fleurs odorantes ne contiennent pas de grosses réserves d'essences. Les essences sont vaporisées de façon continue au cours de leur formation (**Zeng et He, 2006**).

IV.3.4. Méthodes et équipement d'extraction :

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques (**Peyron et Richard en 1992**).

Les huiles essentielles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation et une méthode d'expression à froid :

- L'entraînement à la vapeur de l'eau,
- L'hydrodistillation,
- L'expression à froid (cas particulier des agrumes),

Les quelles peuvent être mises en œuvre sur les systèmes discontinus ou continus, à la pression ambiante, en surpression ou en dépression (**Romdhane et Tizaoui, 2005 ; Starmans et Nijhuis, 1996; Richard, 1992**). La durée de la distillation peut être ramenée de quelques minutes jusqu'à 30 heures, avantage, suivant les paramètres intervenant au cours du procédé.

Avant d'aborder chacune des méthodes, il est intéressant de procéder à l'étude des paramètres régissant les mécanismes d'extraction des huiles essentielles.

D'une façon générale, la production des huiles essentielles peut être assimilée à une combinaison de trois processus :

- L'extraction proprement dite, appelée hydrodiffusion conduisant au relargage des composés volatils dans le milieu aqueux sous l'action physique qu'exerce le gonflement de la matière végétale (phénomènes d'absorption d'eau ou osmotiques) via la pression interne, et de l'action chimique exercée par l'eau (**Romdhane et Tizaoui, 2005; Kubátová et al., 2002; Perineau et al., 1992**).

- La co-distillation eau/composés odorants (**Rodriguez et al., 2002; Perineau et al., 1992**).

- La séparation de l'huile essentielle des condensats impliquant la coalescence et la décantation (**Sankarikutty et Narayanan, 1993; Toulgoat, 1996**).

IV.3.4.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Dans ce système d'extraction (Figure n°13), le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic (**Peyron et Richard, 1992**).

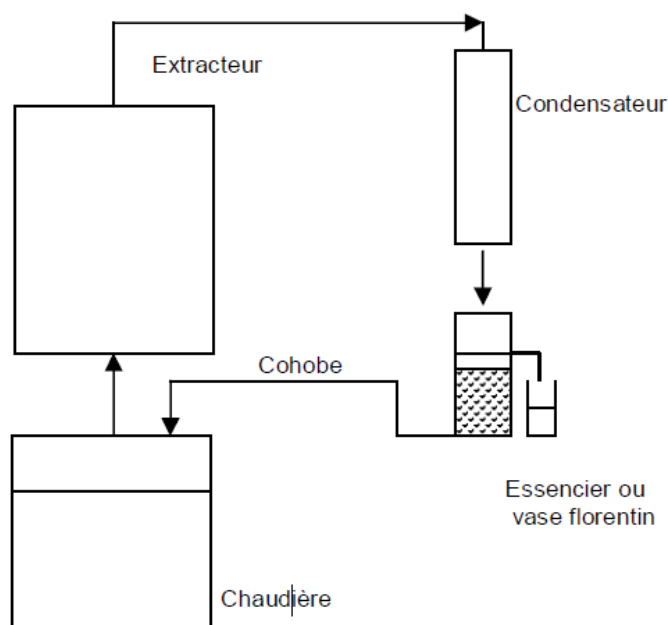


Figure n°13 : Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau (**Peyron et Richard, 1992**).

IV.3.4.2. Extraction par hydrodistillation :

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition (Figure n°14). Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors la décantation (**Tournaire, 1980**).

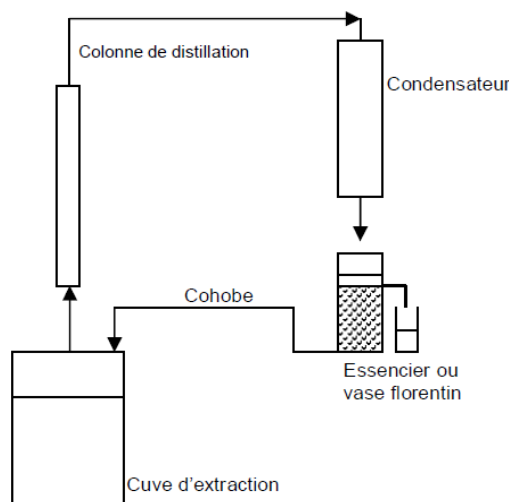


Figure n°14 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation (Tournaire, 1980).

IV.3.4. 3. Hydrodistillation sous pression :

C'est une technique de choix pour les essences difficilement distillables (Bocchio, 1985). On traite ainsi certaines matières premières dont les constituants ne peuvent être entraînés par la vapeur à la pression atmosphérique du fait de leur masse moléculaire élevée, par exemple le santal, le girofle, les rhizomes de vétiver, de gingembre ou encore d'iris (Wang et Weller, 2006). Bien que le procédé sous pression conduise à une amélioration du rapport d'entraînement, donc à des économies d'énergie, l'influence d'une température élevée (supérieure à 100°C) sur la qualité de l'huile essentielle donne lieu à certains artéfacts. De plus, les prix et les contraintes des équipements nécessaires contribuent à freiner l'utilisation du procédé (Tournaire, 1980).

IV.3.4.4. Le système de thermopompage :

Le séparateur Tournaire consiste à pomper la chaleur du condenseur et à l'utiliser pour la production de vapeur de telle sorte que l'on se retrouve en présence d'un cohobage en phase gazeuse. Les économies d'énergie calorifique et d'eau de refroidissement se situeraient entre 60 et 90% (Vinatoru, 2001).

IV.3.4.5. Turbodistillation :

C'est une hydrodistillation accélérée en discontinu. Son objectif est de limiter les inconvénients d'une longue durée d'extraction ou d'une surpression (Figure n°15). Pour activer la distillation à la pression atmosphérique, l'alambic est équipé d'une turbine qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part une agitation turbulente, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation. Le procédé permet en outre la récupération des fractions les plus volatiles grâce à un système de condensation secondaire. La présence d'une colonne à plateaux contribue à l'enrichissement des vapeurs en huile essentielle, d'où une amélioration du rapport d'entraînement. Un système de cohobage recycle les eaux aromatiques en tête de colonne afin de favoriser l'entraînement des composés non décantés (Ganou, 1993).

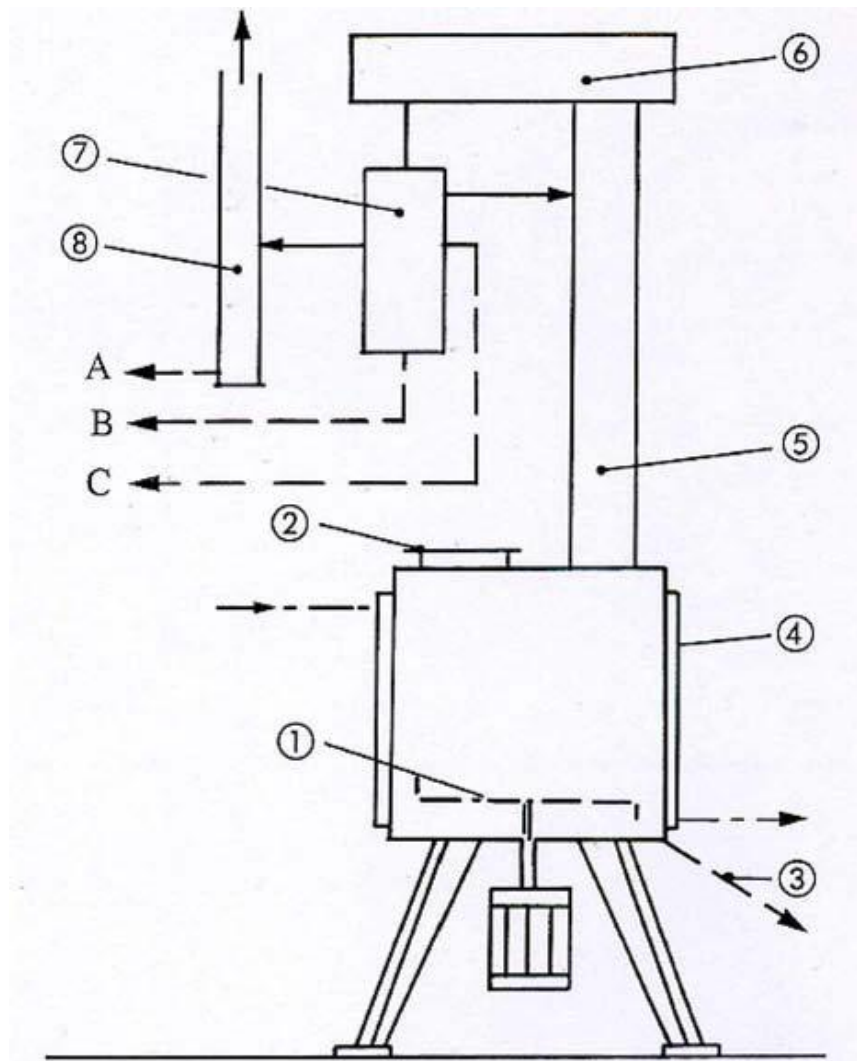


Figure n°15 : Principe schématisé de l'appareillage de Turbodistillation.

1) broyeur humide à turbine ; 2) ouverture de chargement ; 3) vidange du broyat ; 4) chauffage/double enveloppe ; 5) colonne de distillation ; 6) condensation et reflux ; 7) système de décantation ; 8) piégeage des têtes. Recette : A. Eaux aromatique ou terpènes ; B. Huiles lourdes ; C. Huiles légères (Martini et Seiller, 1999).

IV.3.4.6. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes :

Il existe divers exemples d'applications de cette technique à l'extraction de certains organes végétaux: épices de *Cuminum cyminum L.* et *Zanthoxylum bungeanum L.* par Wang et coll (2006), fruits de *Xilopiapar Stashenko et coll (2004)*, hysope, sariette, marjolaine, sauge (*Salvia officinalis*) et thym par Collin (1991), feuilles de *Lippiasidoïdes* par Craveiro et coll (1989), menthe poivrée et persil commun par Pare et coll (1989). L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et incrémente le rendement d'extrait. Toutefois, aucun développement industriel n'a été réalisé à ce jour. Il semble que les problèmes technologiques concernent la mise en œuvre d'un générateur de rayonnement haute fréquence susceptible d'irradier un volume important. Nombre

d'expérimentations stipulent l'intervention conjointe d'un solvant organique (tétrachlorure de carbone, dichlorométhane, hexane, éthanol) sans en préciser la mise en œuvre (Figure n°16).

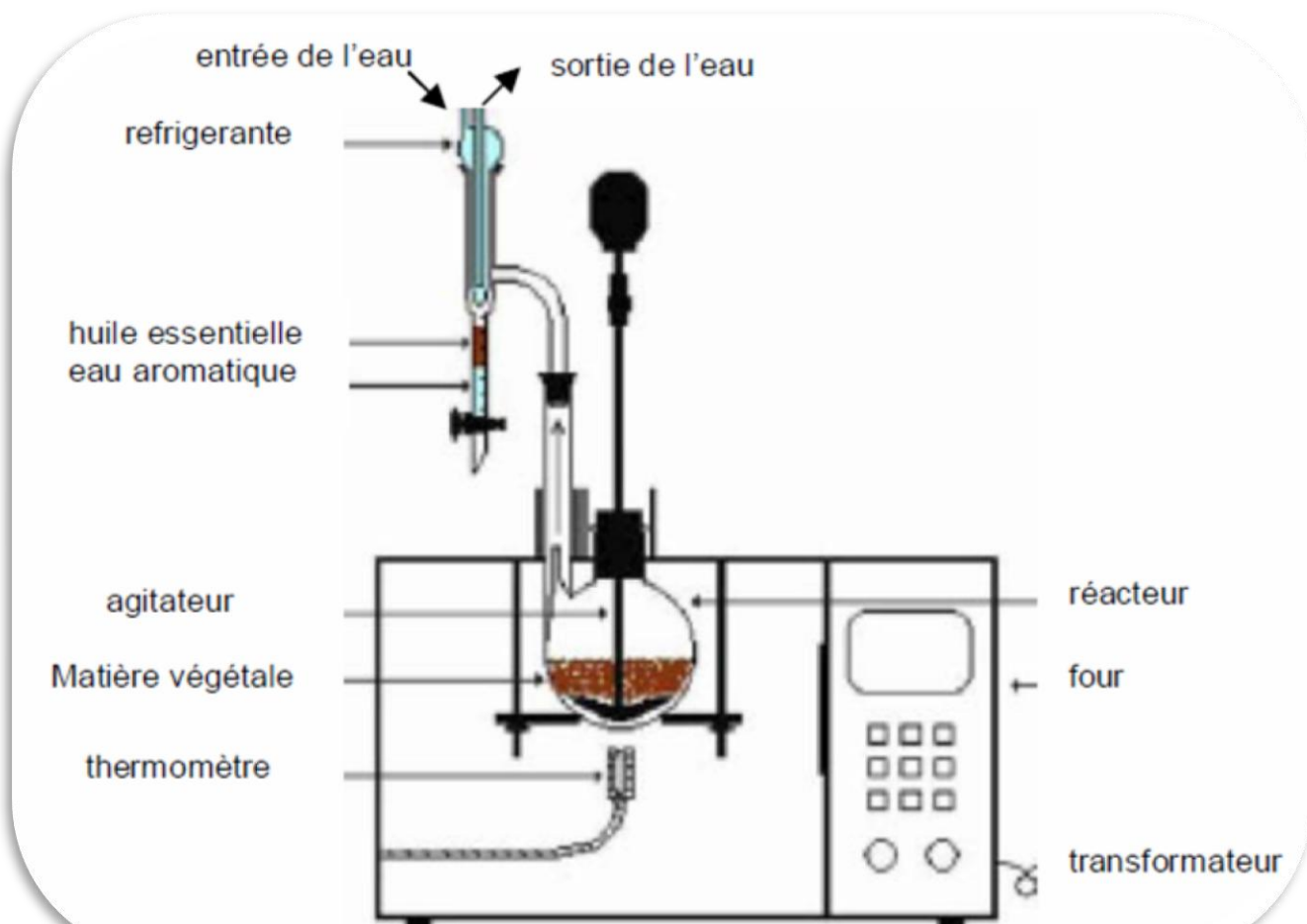


Figure n°16 : Principe schématisé de l'appareillage de système de l'hydrodistillation sous micro-ondes (Wang et al., 2006).

D'autres recherches sont menées sur l'extraction des métabolites secondaires dans l'optique de développement de technologies innovantes : étude de l'extraction par micro-ondes sans solvant de (*Cuminum cyminum L*) et (*Zanthoxylum bungeanum*) où le rapport matière sèche par poudre de carbonyle de fer (matière inerte à l'huile et absorbante de rayonnement) a été 1/6 (Wang et al., 2006).

IV.3.4.7. L'hydrodistillation assistée par ultrasons :

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement « pré » ou « post » opératoire. En effet, les microcavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines cellulosesiques.

Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation des constituants des huiles essentielles. Dans certains cas, les rendements en huile essentielle sont augmentés et les cinétiques accélérées.

L'utilisation des ultrasons pendant l'hydrodistillation est vaine. Une unité d'hydrodistillation équipée d'une fontaine d'ultrasons peut produire plus vite des

points d'ébullition, mais ne dégonflent pas les bulles (**Vinatoru, 2001**). Par conséquent, les ultrasons ne sont pas une bonne option pour les procédés par ébullition. Cependant, l'extraction assistée par les ultrasons est une technique de choix pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. De nombreux travaux d'extraction assistée par ultrasons sont décrits, pour des cas récents comme l'extraction des graines de carvi par **Chemat et coll (2004)**, de fenouil (*Foeniculu mvulgare*), houblon (*Humulus lupulus*), consoude (*Calendula officinale*), Rue de Syrie (*Peganum harmala*), menthe (*Menthapiperita*), tilleul (*Tiliacordata*), et inule aulnée (*Inula helenium*) par **Toma et coll (2001)**, de menthe, camomille (*Camomilla commune*), arnica (*Arnica montana*), sauge (*Salvia officinalis*), coriandre (*Coriandrum sativum*), aneth (*Anethum graveolens*) et fenouil (*Foeniculum vulgare*) par **Vinatoru et coll (1997)**. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de permettre à faciliter l'extraction de molécules thermosensibles.

IV.3.4.8. L'expression à froid :

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridés. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle (**Ganou, 1993**) (Figure n°17).

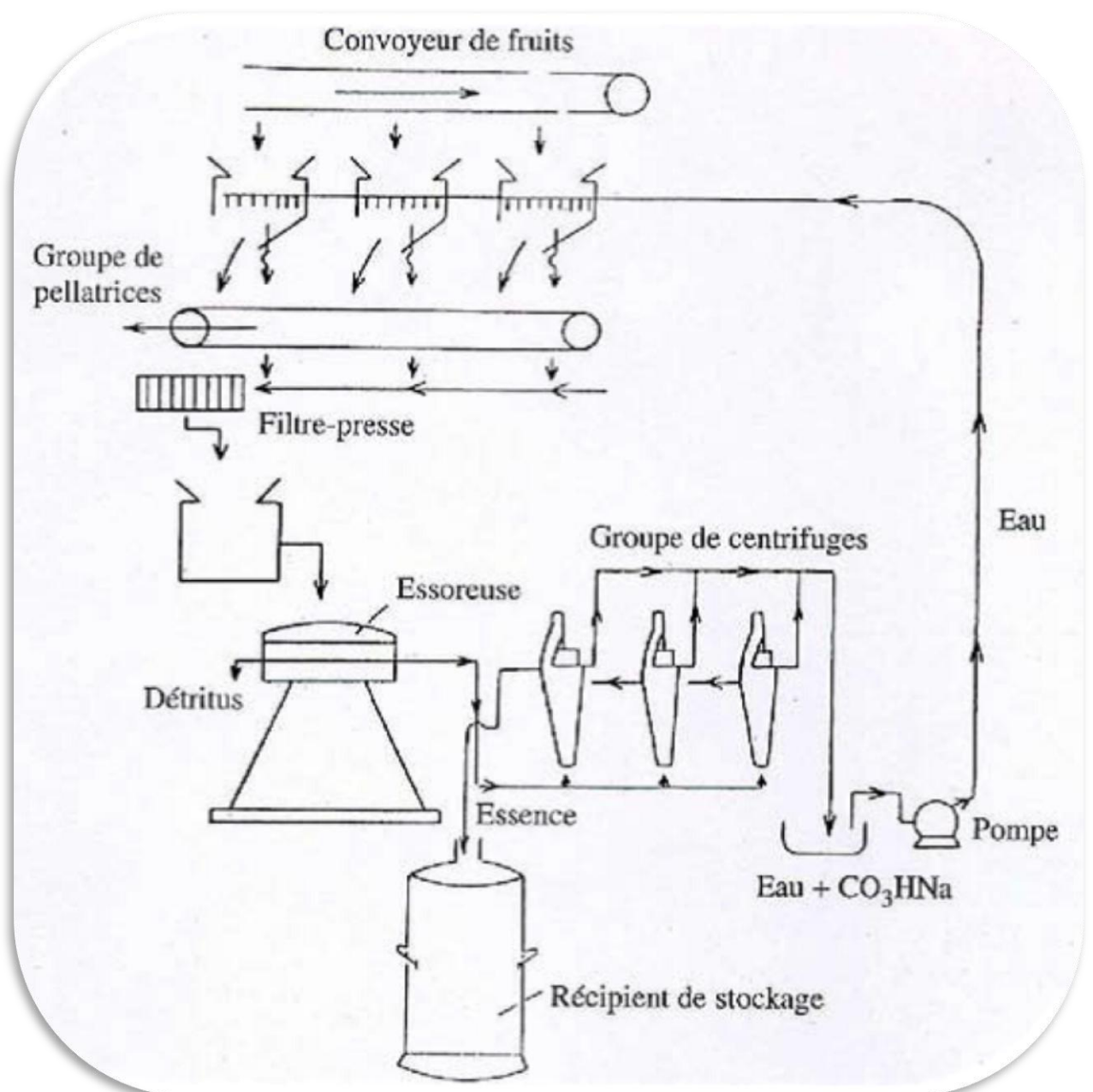


Figure n°17 : Schéma du procédé de récupération de l'huile essentielle de citron et autres agrumes (Martini et Seiller, 1999).

IV.3.4.9. Autres extractions et méthodes :

- **Extraction par solvant organique :**

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée (Figure n°18). Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (Kim et Lee, 2002; Legrand, 1993).

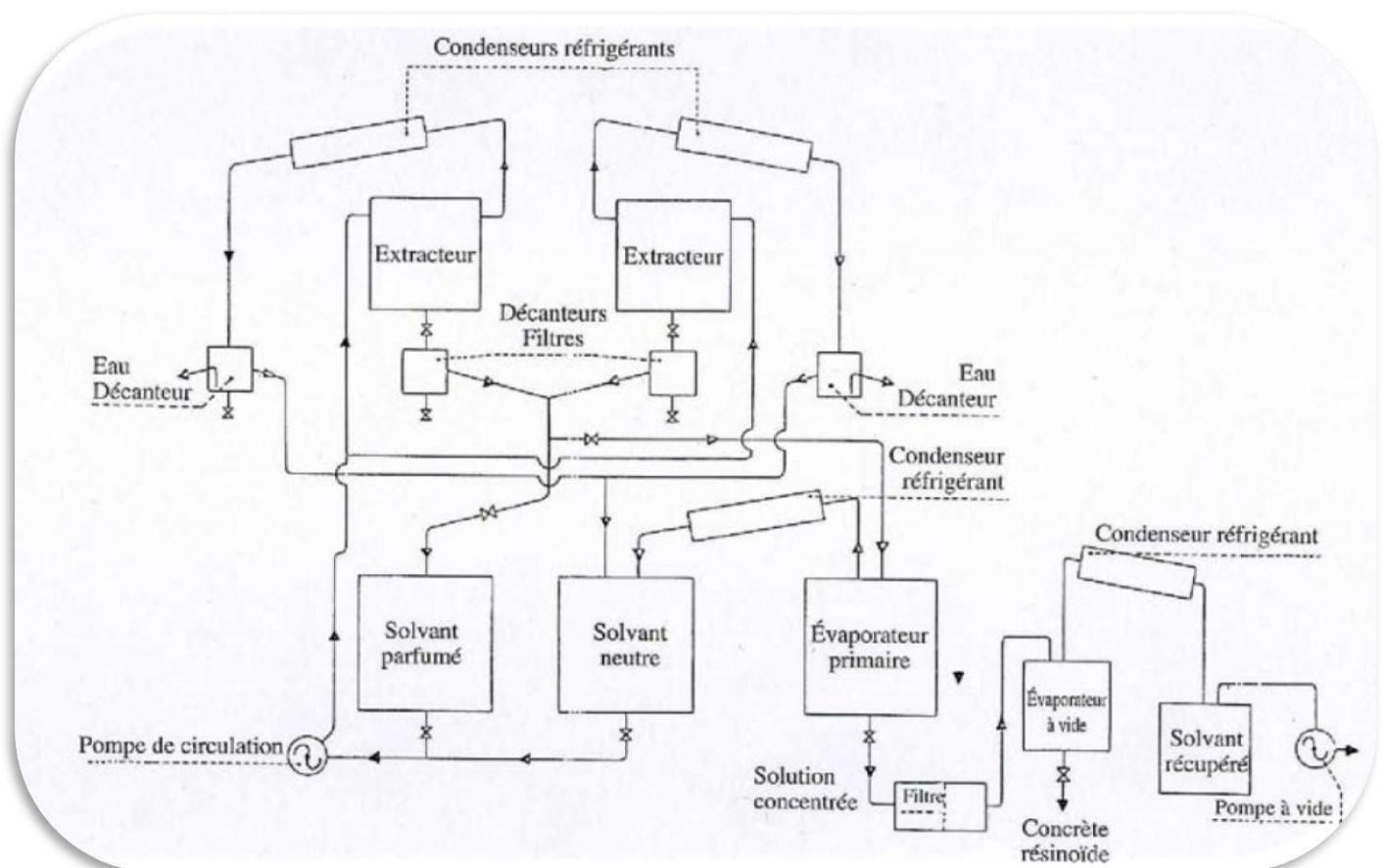


Figure n°18: Schéma d'une batterie d'extraction par solvant pour végétaux bruts (Martini et Seiller, 1999).

En fonction de la technique et du solvant utilisé on obtient :

- Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau,
- Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué,
- Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau,
- De résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés,
- Des oléorésines et des concrètes qui sont respectivement des extraits à froid et à chaud au moyen de solvants divers.

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.

- **Extraction par fluide à l'état supercritique :**

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone (Braga et al., 2005; Carvalho et al., 2005; Moura et al., 2005; Khajeh et al., 2004; Aghel et al., 2004; Baysal et Starmans, 1999). D'autres travaux de recherches de Deng et coll (2005); Ozel et coll (2003); Gámiz-Gracia et Luque de Castro (2000); Luque de Castro et Jiménez Carmona (1998) montrent l'utilisation de l'eau dans son état supercritique. Dans ce système le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un

compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité de CO₂. En outre, en fonction des conditions de pression et de température, on modifie le pouvoir solvant. Il est donc possible dans certaines limites d'orienter la composition de l'extrait, d'autant qu'il est envisageable d'utiliser un agent de co-extraction pour réguler la polarité. Le frein du développement de cette technologie est le coût élevé des appareillages lié à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars (Figure n°19).

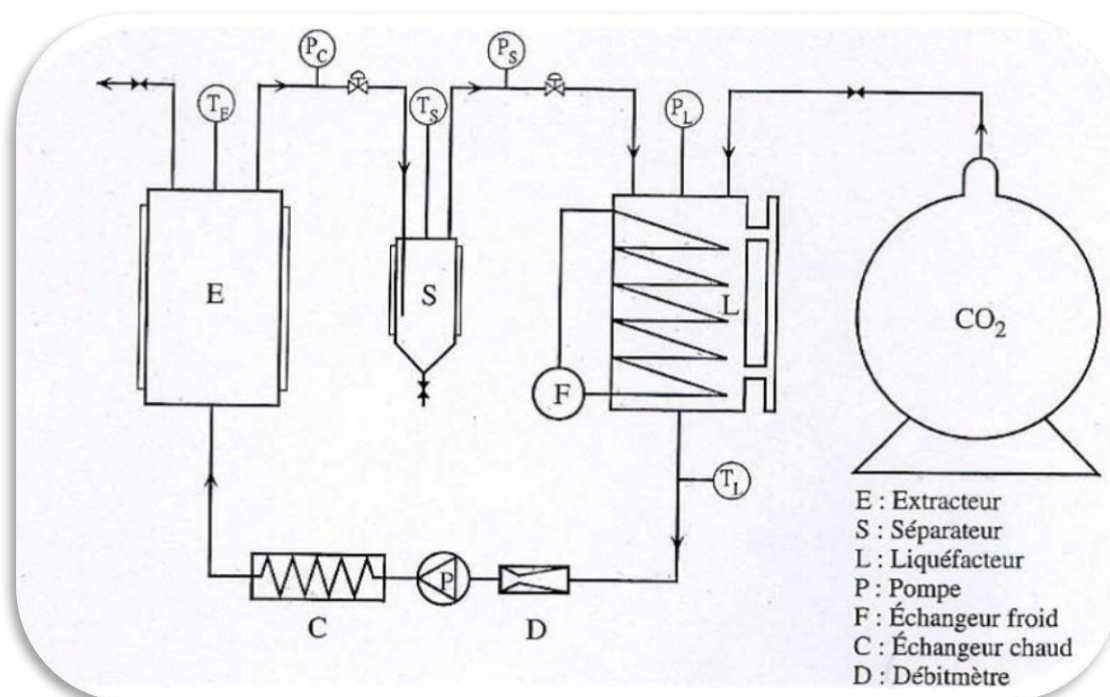


Figure n°19 : Schéma du système d'extraction CO₂ des solides (Martini et Seiller, 1999).

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation ou par l'expression à froid (Peyron et Richard, 1992). L'hydrodistillation des huiles essentielles est contrôlée par l'hydrodiffusion (diffusivité capillaire et moléculaire), la co-distillation (due principalement à la différence de volatilité entre les divers constituants) et la séparation de l'huile essentielle du condensât (en fonction du degré de solubilité dans l'eau).

Les facteurs déterminant de la qualité des huiles essentielles peuvent avoir deux types d'origines : naturel et technologique. Donc, il est possible de contrôler les fluctuations induites par les conditions technologiques en contrôlant des paramètres du procédé et en choisissant l'appareillage adapté.

IV.3.5. Composition des huiles essentielles :

IV.3.5.1. Les composés volatils des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Sell, 2006). Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont

rencontrés soit les monoterpènes (myrcène, pinène, etc.) et les sesquiterpènes (P-caryophyllène, etc.). Plusieurs milliers de composés appartenant à la famille des terpènes ont à ce jour été identifiés dans les huiles essentielles (**Modzelewska et al., 2005**).

La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol), des cétones (menthone), des aldéhydes (citronellal), des esters (acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc (**Kurkin, 2003**).

Une autre classe, de composés aromatiques dérivés du phénylpropane, comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragol et bien d'autres. Ils sont d'avantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc (**Bruneton, 1999**).

IV.3.5.2. Les chimotypes :

Certaines huiles essentielles peuvent contenir des chimotypes. Il est important de noter que des huiles essentielles à chimotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables. Ainsi la méconnaissance des chimotypes peut parfois être à l'origine d'accidents graves (**Bruneton, 1999**).

IV.3.6. Propriétés d'utilisation des huiles essentielles :

La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique la pratiquait déjà, à sa manière l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes (**Robert, 2000**). Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes sont développés, notamment par des civilisations arabe et égyptienne, qui leurs se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles.

En guise d'exemple, à l'époque des grandes épidémies dans la Grèce Antique, les principes odorants de certaines plantes aromatiques étaient répandus par fumigation dans les vus des villes pour combattre la propagation des maladies infectieuses (**Buchbauer et al., 1993**). Plus tard en France, il a été remarqué que les ouvriers parfumeurs et tanneurs, qui étaient en contact quotidiennement avec des huiles essentielles, résistaient de manière quasi absolue aux épidémies de toutes sortes (**Vanier, 1994**). De nos jours, le domaine qui utilise les huiles essentielles pour traiter une maladie s'appelle l'aromathérapie. Il est donc important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des huiles essentielles car leur usage peut comporter des avantages ou des inconvénients. Outre ces propriétés principales, elles ont toute une vertu (**Baratta et al., 1998**) :

- Antibactérienne,
- Antivirale,
- Antifongique,
- Antiparasitaire,
- Antiseptique,
- Anti-brûlure et cicatrisant,

- Analgésique, antalgique et anesthésique,
- Propriétés cardiovasculaires et endocrinorégulatrices,
- Propriétés digestives,
- Propriétés immunorégulatrices et anti-inflammatoires,
- Activité insecticide.

IV.3.7. Mode d'action des huiles essentielles :

L'activité d'une huile essentielle dépend de la composition des molécules aromatiques. Les huiles essentielles qui agissent sur le système nerveux central sont des huiles à action sédatrice ou à action stimulante. Celles qui agissent sur le système neurovégétatif sont des huiles à action sympathomimétique (stimulent le système sympathique), à action parasympathomimétique (freine le système sympathique), ou sont des huiles essentielles régulatrices du système nerveux périphérique. D'autres agissent sur les systèmes endocriniens. Elles peuvent avoir une action de freinage de la thyroïde, une action de la stimulation de la thyroïde, peuvent stimuler les surrénales ou les inhiber et d'autres ont une action hypoglycémiant. Aussi les huiles essentielles peuvent agir sur le système hormonal : huiles essentielles oestrogène-stimulantes, anti-oestrogènes ou stimulantes des hormones mâles. Enfin on constate une action sur le système cardio-vasculaire qui sont des huiles essentielles resserrant la paroi des veines, dilatant la paroi des artères, fluidifiant le sang, augmentant ou diminuant la pression artérielle. Donc les molécules aromatiques agissent à différents niveaux et de manières directes ou indirectes (**Balz, 1986**).

IV.3.8. Les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* :

L'étude bibliographique sur *Pistacia lentiscus L* a montré la richesse en mono terpènes et les sesquiterpènes.

L'étude réalisée par **Barazani et ces collaborateurs (2003)** sur l'extrait T-butyl méthyl éther d'huile de feuilles de *Pistacia lentiscus L* à montré la présence de 12 mono terpènes, 7 sesquiterpènes et un seul mono terpène linéaire. Les α -pinène, Sabinène, limonène, caryophyllène et Germacrène D. Ces constituants majoritaires sont identifiés par la méthode GC-MS.

Une étude phytochimique réalisé par **Kivçak et Akay (2005)** sur l'huile des feuilles de *Pistacia lentiscus L* a permis d'identifier quantitativement l' α -tocophérol par l'utilisation de la méthode TLC-DC

Le travail de **Castola et coll (2000)** effectué sur 105 échantillons d'huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus L* de Corse, révèle la présence des constituants majoritaires comme Myrcène, Limonène, Terpinène-4-ol, α -pinène, α -phellandrène, ont été détectés par C^{13} NMR et GC.

L'étude physico-chimique (GC et GC-MS) réalisée par **Duru et coll (2003)** indique que la présence de α -pinène, β -pinène, limonène, terpinène-4-ol et α -terpinéol comme constituants majoritaires des huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus L*, *Pistacia atherbintus* et de *Pistacia vera L*.

Daferara et ces collaborateurs (2003) ont identifié les composés α -pinène et myrcène dans les huiles essentielles de mastic. Les deux constituants ont été isolés par FT-spectroscopie Raman.

Gardeli et coll (2008) ont déterminé la variation saisonnière de la composition chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* (Tableau n°08 et Figure n°20) obtenue par GC-MS (Appareillage : HP G1800B; Gamme de Masse : 10-450 uma;

Colonne : HP5, 30 m-0,25 mm-0,25 μ m; Injection splitless : 1 μ l, dilution cyclohexane;
Gaz vecteur : Hélium, 1 ml/min; Four : 40-250 °C, 10°C/min) comme suite:

Tableau n°08 : la variation saisonnière de la composition chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* obtenue par GC-MS (**Gardeli et al., 2008**).

Corposant	%		
	évrier	Mai	Août
ricyclène	0.2	0.2	0.2
Thujène	2.0	1.3	0.2
Pinène	17.1	24.9	9.4
amphène	1.1	1.1	0,8
huj α -2,4(10)-diène	0.1	0.1	tr
abinène	1.0	4.6	6.7
Pinène	2.0	6.9	2.9
Myrcène	0.4	0.3	1.7
Phellandrène	1.2	1.2	0.9
Terpinène	2.8	2.2	1.6
Cymène	7.5	3.5	0.5
imonene	13.9	17.8	9.0
1)- β -Ocimène	tr	nd	nd
3)- β -Ocimène	tr	nd	nd
Terpinène	3.6	3.3	3.1
Terpinolène	1.3	0.9	0.8
Methylbutyl 2-methylbutanoate	0.1	tr	0.1
Methylbutyl 3-methylbutanoate	0.3	0.1	0.1
Methylbutyl 3-methylbutanoate	0.1	0.1	0.1
s-Menth-2-en-1-ol	0.2	0.2	0.2
Campholenal	0.2	0.2	0.1
ans-Pinocarveol	0.2	0.2	0.1
s- β -Terpineol	0.3	0.2	0.2
orneol	0.1	0.1	0.1
Menth α -1,5-dien-8-ol	0.4	0.1	0.1
erpinen-4-ol	10.6	6.8	10.0
Terpineol	3.1	2.5	4.0
terpineol	0.4	nd	nd
erbenone	0.2	0.1	tr
ans-Carveol	0.1	nd	nd
inalylacetate	tr	tr	tr

ornyl acetate	0.2	0.1	0.2
Undecanone	0.8	tr	tr
Cubebène	tr	0.1	0.2
Terpenyl acetate	0.6	nd	nd
opaène	0.4	0.2	0.7
Cubebène	tr	0.1	0.3
Elemène	0.3	0.2	0.4
ans-Caryophyllène	2.1	2.0	4.1
Humulène	0.8	0.5	1.6
ans-Cadina-1(6),4-diene	0.3	0.1	0.2
Murolène	0.9	0.4	1.1
ermacrène D	2.7	3.3	13.5
Selinène	0.3	nd	nd
Murolene	0.6	0.3	0.9
Bisabolène	0.2	nd	nd
Cadinène	0.4	0.5	1.5
Cadinène	2.5	1.4	3.4
ans-Cadina-1(2)-4-diene	0.1	0.1	0.2
pathulenol	0.3	0.3	0.3
aryophyllene oxide	1.6	1.2	0.5
umulene epoxide II	0.4	0.2	0.2
nknown 1	0.6	nd	nd
Epi-cubenol	0.4	0.3	1.0
pi- α -cadinol	0.9	0.8	2.6
adinol isomer	0.5	0.2	0.7
Cadinol	1.1	1.6	3.8
Ionoterpen			
Hydrocarbons	54.2	68.3	45
Oxygenated	18.6	13.3	23.1
sesquiterpene			
Hydrocarbons	11.6	9.2	28.1
Oxygenated	1.6	1.2	0.5
ldehydes	0.2	0.2	0.1
etones	1.6	0.1	tr
sters	0.7	0.3	0.5
endement	0.30	0.30	0.28

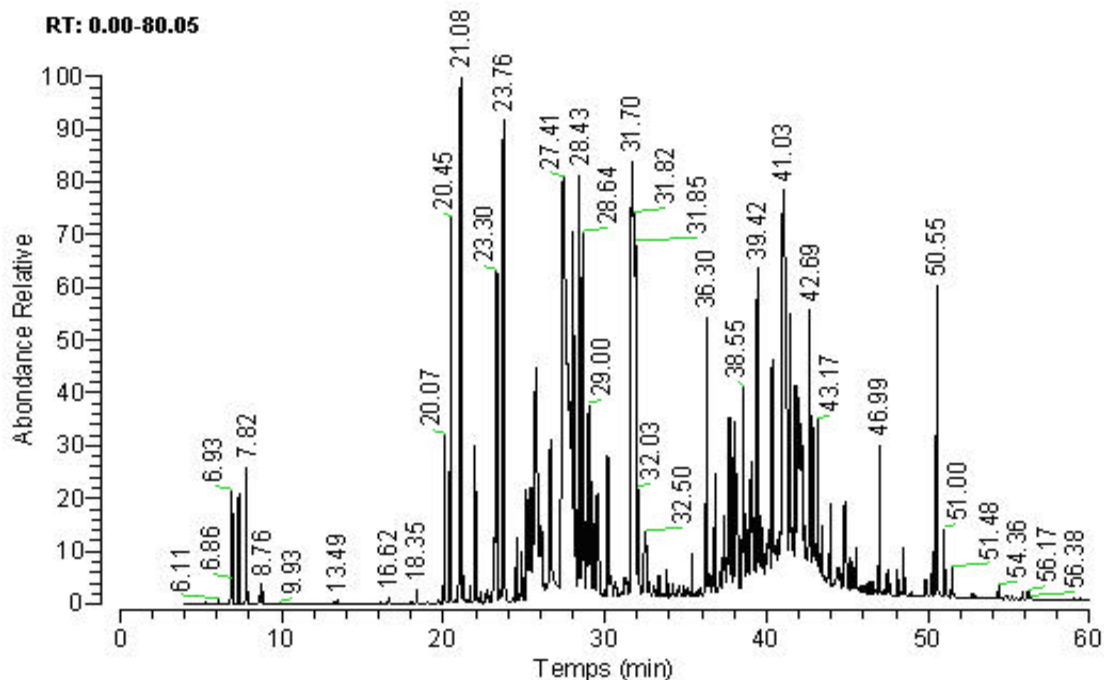


Figure n°20 : Chromatogramme des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* (Gardeli et al., 2008).

En Algérie, une étude phytochimique (Dob et al., 2006) effectuée sur les huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de *Pistacia lentiscus L* de régions d’Alger, Tizi-Ouzou et d’Oran) par l’utilisation de méthodes GC et GC/MS. Les résultats indiquent la présence de Longifolène comme un composé majoritaire dans les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* d’Alger (12,8%) et de Tizi-Ouzou (16,4%), tandis que α -pinène (19,0%) constitue le principal constituant des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* d’Oran. Les autres composés étaient présents en quantités importantes (Tableau n°09) dans les différentes huiles essentielles.

Tableau n°09 : les proportions des différents composés des huiles essentielles de trois régions (Dob et al., 2006).

Composés	Région		
	Alger	Tizi-Ouzou	Oran
α -Cadinène	6,2%	/	/
α -Santalène	5,0%	15,6%	13,1%
α -Terpinène	/	/	/
β -Pinène	/	7,0%	/
γ -Terpinène	/	5,7%	/
Longifolène	/	/	12,6%
δ -Cadinène	/	/	6,5%

L’étude de l’effet de la variation saisonnière (Gardeli et al., 2008) de l’extrait méthanolique de l’huile essentielle de la partie aérienne de *Pistacia lentiscus L*, les résultats de GC-MS montrent que cinquante-sept constituants représentent environ 89,6%, 92,8% et 97,5% du total des huiles essentielles pour le mois de février, mai et août respectivement.

Les principaux composés (Figure n°21) sont α -pinène (9,4-24,9%) et limonène (9,0-17,8%), tandis que germacrène D (2,7-13,5%), terpinène-4-ol (6,8-10,6%), p-cymène (0,5-7,5%), β -pinène (2,0-6,9%), sabinène (1,0-6,7%), γ -terpinène (3,1-3,6%) et de l' α -terpinéol (2,5-4,0%) sont également présents à des pourcentages relativement élevés (**Gardeli et al., 2008**).

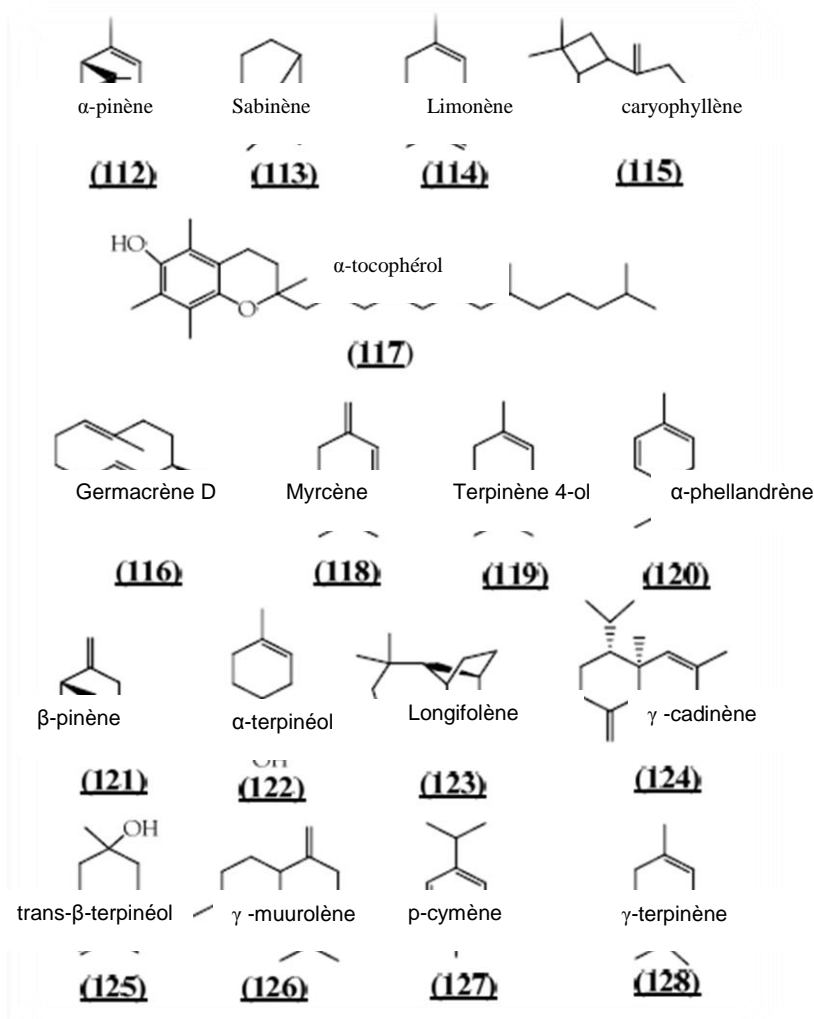


Figure n°21: Constituants chimiques des huiles essentielles des différentes parties de *Pistacia lentiscus L* (**Gardeli et al., 2008**)

IV.3.8.1. Aspects pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus L* :

Les médecines traditionnelles pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuées au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, des plaies et brûlures légères.

La médecine traditionnelle algérienne utilise surtout l'huile grasse obtenue par pression des fruits de lentisque dans le traitement des petites blessures, brûlures légères et érythèmes.

L'huile est aussi employée par voie orale contre les problèmes respiratoires d'origine allergique et les ulcères de l'estomac. Ces usages sont surtout répandus à l'Est du pays (région d'El-Milia, Skikda, Guelma). L'huile est également très utilisée pour les mêmes indications en Tunisie (**Yahya, 1992**).

Pistacia lentiscus L est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. La décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (**Palevitch et Yaniv, 2000**).

La partie aérienne de *Pistacia lentiscus L.* est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques (**Scherrer et al., 2005**).

Les feuilles sont pourvue d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépatoprotective, expectorante et stimulante (**Kordali et al., 2003**).

Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires (**Said et al., 2002**).

La résine obtenue de *Pistacia lentiscus L* est connue par son effet analgésique, antibactérien, antifongique, antioxydant, antithérogénique, expectorant, stimulant, diurétique et spasmolytique (**Abdel Rahman et Soad, 1975**). Par conséquent, cliniquement, le mastic est souvent cité comme un remède efficace contre certaines maladies telles que l'asthme, diarrhée, infections bactériennes, ulcères gastro-duodénaux et comme un agent antiseptique du système respiratoire (**Marone et al., 2001**).

La résine de *Pistacia lentiscus L* a été traditionnellement considérée comme un agent anticancéreux, en particulier contre les tumeurs du sein, du foie, de l'estomac, de la rate, et de l'utérus (**Assimopoulou et Papageorgiou, 2005**). Ces croyances traditionnelles sont en accord avec de récentes études montrant que le mastic de Chios induit l'apoptose (**Balan et al., 2005**) et dispose d'action anti-prolifératrice contre les cellules cancéreuses du côlon (**Balan et al., 2007**).

L'huile essentielle de lentisque est connue pour ses vertus thérapeutiques en ce qui concerne les problèmes lymphatiques et circulatoires.

Des travaux précédents sur les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* révèlent la présence de certaines activités analgésique, antioxydante, anti-inflammatoire, et antimicrobienne (**Giner-Larza et al., 2000**).

Les études expérimentales effectuées sur cette plante ont mis en évidence différentes activités biologiques et pharmacologiques.

Une activité anti-ulcéreuse du *Pistacia lentiscus L* a été signalée par plusieurs auteurs (**Al-Said et al., 1986**) tels que l'effet antifongique (**Ali-Shtayeh et Abou Ghdeib, 1999**), antibactérien (**Iauk et al., 1996**), anti-ulcéreux duodénal (**Al-Said et al., 1986**) et hépatoprotecteur (**Janakat et Al-Merie, 2002**).

En médecine traditionnelle, on utilise la résine de pistachier lentisque afin de combattre les ulcères d'estomac. Son efficacité contre la bactérie *Helicobacter pylori* a en effet été confirmée. Cette méthode consiste à éliminer la bactérie *Helicobacter pylori* par mastication de résine du pistachier lentisque, comme une gomme à odeur prononcée.

L'huile de lentisque est souvent utilisée en médecine comme astringent, expectorant, et cicatrisant (**Seigue, 1985**).

Les huiles essentielles de lentisque sont utilisées pour leurs effets pharmacologiques entant que décongestionnant veineux-lymphatique et antispasmodique (**Baudoux, 2003**).

IV.3.8.2. Données toxicologiques de *Pistacia lentiscus L* :

Les données toxicologiques de la gomme mastic ont été rapportées concernant la toxicité aiguë, irritation de la peau et la phototoxicité chez les animaux et les humains (**Ford et al., 1992**).

Chapitre V : Matériel et méthodes

V.1. Objectif du travail :

Les huiles essentielles du mastic de *Pistacia lentiscus L* sont connues pour leur pouvoir inhibiteur contre les bactéries pathogènes (Tassou, et Nychas, 1995). C'est dans ce contexte que nous nous sommes penchés sur l'efficacité de la plante en exploitant les huiles essentielles de ses feuilles et rameaux.

Notre étude consiste à :

- Mettre en évidence l'existence de *Helicobacter pylori* dans la muqueuse gastrique et son identification,
- Culture et confirmation de l'identification de *E.coli*,
- Mettre en évidence l'inhibition des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* vis-à-vis des deux bactéries.

V.2. Bactéries de choix :

La pathogénicité est le critère primordial qui nous a incités à choisir la plus pathogène comme *Helicobacter pylori*, *E.coli* était la bactérie test représentant la flore digestive.

V.3. Origine des souches :

Nous avons reçu la souche de *Helicobacter pylori* isolée en milieu gélosé additionné de 10% de sang de cheval, du service d'entérologie de l'Institut Pasteur d'Alger sous la référence R-1/08/11, vue la difficulté rencontrée lors de son prélèvement biopsique en raison du manque de moyens appropriés pour ce travail.

- La souche *E.coli* nous a été fournie par le service de coproculture du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital de AinTedeles (Wilaya de Mostaganem).

V.4. Culture et identification de *Helicobacter pylori* :

V.4.1. Subculture de *Helicobacter pylori* :

La primoculture a été réalisée dans l'Institut Pasteur d'Alger, d'où la biopsie dilacérée estensemencée sur gélose Columbia additionnées de 10% de sang de cheval et du mélange de Dent et Mc Nulty à la cefsulodine (voir annexes) pour inhiber la croissance des contaminants occasionnels (flore buccale surtout). Et les boîtes de la primo-culture sont incubées en microaérophilie et à 37°C pendant 12 jours et examinées chaque jour à partir du 3^{ème} (Bigard et Colin, 1997).

La subculture est l'étape suivante, effectuée au cours de notre expérimentation.

V. 4.1.1. Milieux de culture :

Helicobacter pylori est une bactérie exigeante sur le plan métabolique. Les milieux de culture sont constitués d'une base gélosée (milieu *Brucella*, Cœur-cerveille, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton) additionnée de 10% de sang de cheval, mouton ou humain. Certains auteurs ont proposé de remplacer le sang par du sérum (de veau, de cheval ou humain). D'autres suppléments de croissance ou de détoxification ont été proposés (β -cyclodextrine, charbon, amidon etc.). Les bases Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton additionnées de 10% de sang de mouton conviennent à la plupart des souches (Megraude, 1996).

Des mélanges sélectifs peuvent être utilisés pour inhiber la croissance des contaminants occasionnels (Bigard et Colin, 1997).

Une subculture en milieu liquide est possible dans un milieu à 10% de sérum additionné de 1% de β -cyclodextrine. La culture en milieu diphasique avec une phase gélosée et une phase liquide supplémentées en sérum donne de bons résultats notamment pour mettre en évidence la mobilité, pour obtenir une masse bactérienne importante ou des produits bactériens relargués dans le milieu (toxine vacuolisante) (Glupczynski, 1997).

Dans notre travail la subculture est faite en utilisant un milieu sélectif à base de la gélose Columbia additionné de 10% de sang de cheval et d'un mélange spécifique d'antibiotiques (mélange de Dent et Mc Nulty à la cefsulodine) destinés à inhiber la croissance d'éventuels contaminants (Figure n°22).

V. 4.1.2. Conditions de culture :

- **L'atmosphère :**

Helicobacter pylori est une bactérie fragile et microaérophile. La composition gazeuse idéale pour sa croissance est de 5% d'O₂, 10% de CO₂ et 85% de N₂ (**Donelli, 1998**).

L'atmosphère d'incubation doit être appauvrie en oxygène par rapport à l'air. En pratique, une concentration de 5% d'oxygène convient à la plupart des souches. Cette tension réduite en oxygène peut être obtenue dans des enceintes closes (Jarres) avec des générateurs de CO₂ ou de CO₂ et d'hydrogène (GENbag microae) (voir annexes). En subculture, beaucoup de souches peuvent croître en atmosphère simplement enrichie en CO₂ à 10%. L'atmosphère doit être humidifiée. Il est donc essentiel d'utiliser un générateur d'atmosphère microaérophile placé dans des sachets d'anaérobiose (**Azevedo et al., 2004**).

- Dans notre présent travail, le milieu de culture utilisé est celui du Columbia additionné de 10% de sang de cheval et de supplément sélectif. L'atmosphère microaérophile est obtenue en utilisant le système GENbag (Figure n°23) (**www.biomerieux.com**).

- **La température optimale :**

La température optimale de culture est de 37°C. En primoculture, les colonies apparaissent en 3 à 12 jours sur gélose au sang. En subculture, la croissance est plus rapide (2 à 4 jours). Les primo-cultures doivent donc être incubées 12 jours et examinées chaque jour à partir du 3^{ème}. Certaines cultures dégénèrent rapidement. Il convient donc de démarrer les subcultures dès que les colonies sont visibles (**Azevedo et al., 2004**). Dans le cas de cultures pauvres, une subculture peut être tentée sur une petite surface de gélose (culture "en spot"). On peut également "réétaler les colonies" dans une autre zone du même milieu (à condition qu'il ne contienne aucun contaminant). Ces procédés favorisent la culture des souches difficiles (**Degnan et al., 2003**). Cette technique de subculture a été adoptée au cours de notre travail de recherche, suivi d'une identification de la souche bactérienne.

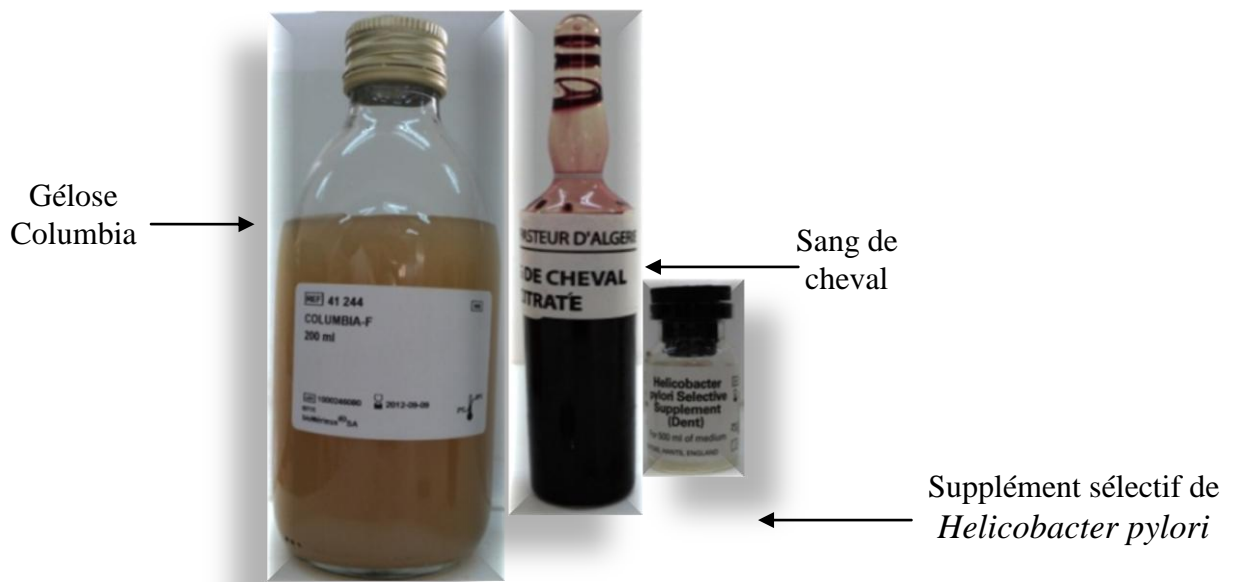


Figure n°22 : Milieu de culture et additifs nécessaires de sélectivité



Figure n°23: Système GENbag microaéroophile

V.4.2. Identification de *Helicobacter pylori* :

V.4.2.1. Examen macroscopique :

Le milieuensemencé et mis à l'étuve à 37°C en atmosphère microaéroophile, est observé tous les deux jours pour détecter une éventuelle croissance de colonies suspectes : petites (environ 1mm de diamètre) et translucides (**Drugeon, 1991**).

Concernant notre subculture, la lecture des boites a été faite dès le deuxième jour d'incubation.

V.4.2.2. Observation microscopique a l'état frais :

- Sur une lame dégraissée, on dépose une goutte de bouillon cœur-cervelle (*BHIB*), dans laquelle on dilue une colonie de *Helicobacter pylori*.

- Recouvrir d'une lamelle, et on observe au microscope optique à l'immersion.

L'observation d'un petit bacille incurvé avec une mobilité caractéristique très importante, indique la présence de *Helicobacter pylori* (**Glupczynski, 1997**).

V.4.2.3. Examen microscopique :

• Préparation du frotti bactérien :

- Déposer une goutte d'eau distillée stérile sur une lame propre, à l'aide d'une pipette Pasteur.

- Une colonie est déposé dans la goutte d'eau et l'étalée en effectuant des mouvements circulaires, à l'aide d'une pipette Pasteur (**Mégraud, 1997**).

- Laisser sécher la lame à température ambiante,

▪ Coloration de Gram:

- Recouvrir le frottis de Violet de Gentiane. Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau.

- Verser le lugol. Laisser agir 30 secondes deux fois. Rincer.

- Verser l'alcool (70°) goutte à goutte sur la lame jusqu'à recouvrir tout le frottis, puis rincer.

- Recouvrir la lame de Fuchsine. Laisser agir 1 minute. Rincer puis sécher (**Mégraud, 1997**).

▪ Observation au microscope optique :

- Observer la lame préparée aux objectifs 10X et 40X,

- Déposer une goutte d'huile à immersion sur la lame et observer à l'objectif 100X.

L'observation d'un bacille de forme hélicoïdale, coloré en rose (Gram-), spiralé ou arqué ou en forme de U ou de O indique la présence de *Helicobacter pylori*. Dans les cultures âgées des formes coccoïdes non subcultivables apparaissent (**Megraud, 1996**).

V.4.2.4. Tests biochimiques :

L'étude des caractères biochimiques est basée essentiellement sur la recherche de l'oxydase, de la catalase, la résistance à l'acide nalidixique et de l'uréase. Cette dernière enzyme peut être recherchée en milieu urée-indole de Ferguson d'une pointe de pipette de colonies dans quelques gouttes de milieu fait virer le milieu au rouge en quelques minutes (**Lin et al., 2005**).

Le test de la catalase s'effectue sur une lame porte-objet à partir des colonies suspectes apparues sur les milieux en utilisant l'eau oxygénée à 10Vol, et celui de l'oxydase est réalisé directement à partir des colonies suspectes sur une plaque de l'oxydase (BD BBL™ DrySlide Oxydase). La lecture des résultats se fait immédiatement (**Megraud, 1996**).

V.4.3. Conservation :

À partir d'une culture de 24 h, à l'aide d'un écouvillon, on prépare une suspension bactérienne très dense de *Helicobacter pylori* dans 5ml de milieu BHIB additionné de 5% de Glycérol, le contenu est reparti ensuite dans de cryotubes ou des eppendorfs à raison de 1ml. Ces derniers ainsi préparés sont conservés dans des boîtes à congélation dans le congélateur à -80°C (**Azevedo et al., 2006**).

Dans notre expérimentation les deux souches de *Helicobacter pylori* ainsi identifiées sont conservées au niveau du laboratoire de biotechnologie de l'université des sciences technologiques d'Oran (USTO).

V.4.4. Antibiogramme :

La sensibilité des souches de *Helicobacter pylori* isolées aux antibiotiques habituellement utilisés dans la thérapie à été testée par méthode de disques sur gélose de Mueller-Hinton supplémentée de 10% de sang de cheval. En utilisant les antibiotiques suivants : (Metronidazole (MTR), Ofloxacine (OF⁵), Clarithromycine (CH), Erythromycine (E), Amoxiciline (AX) et Acide Nalidixique (AN)) *Helicobacter pylori* présentant une résistance naturelle à l'acide nalidixique (nous avons testé cet antibiotique pour confirmer l'identification) (**Koivisto et al., 2005**).

L'inoculum est préparé à partir de colonies viables fraîchement isolées dans un bouillon Cœur-cervelle (BHIB). La suspension préalablement préparée est homogénéisée à l'aide d'un vortex et la turbidité est ajustée dans un densimètre (Figure n°24) à 3 McFarland (soit 1 McFarland est équivalent à 10^7 - 10^8 UFC/ml) (**Marmonier, 1990**).

Ensuite, le milieu de Mueller-Hinton additionné de 10% de sang de cheval estensemencé par écouvillonnage selon la technique CNNLS (Clinical and Laboratory Standards Institut), sur lequel sont déposés les disques des antibiotiques à tester.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 72h en microaérobiose.

La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) (Tepe et al., 2004).



Figure n°24 : Densimètre pour l'ajustement de la turbidité en McFarland (Institut Pasteur d'Alger)

V.5. Culture et confirmation de l'identification de *E.coli* :

L'ensemencement est effectué sur gélose BCP (gélose au pourpre de bromocrésol), qui permet de vérifier l'identité par virage au jaune du milieu (Schmausser et al., 2004).

V.5.1. Examen macroscopique :

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies ont un diamètre de 2 à 3 mm à contour régulier faisant virer le milieu au jaune par acidification [car ils sont fréquemment lactose (+)] (Yan et Polk, 2004).

V.5.2. Examen microscopique :

Il permet de connaître à l'état frais la mobilité bactérienne. Après coloration de Gram la présence de bacilles à Gram négatif est révélée. La lecture se fera au grossissement X100 avec une goutte d'huile à immersion. Les bacilles sont colorés en rose (Mégraud, 1997).

V.5.3. Tests biochimiques :

A partir d'une culture repiquée sur gélose nutritive, une anse est ensemencée sur milieu Hajna-Kligler (gélose KIA) permettant de mettre en évidence les bactéries qui fermentent le glucose et le lactose après 24 heures d'incubation à 37°C. Une colonie Glucose (+), Lactose (+) et gaz (+) est alors reprise et mise en suspension dans 3 ml d'eau physiologique stérile. Cette suspension sert à ensemencer une galerie API 20E (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

Les caractères révélés par ce type de galerie sont: fermentation du glucose, réduction des nitrates, recherche d'une β galactosidase (ONPG), recherche d'une uréase, d'une phényl-alanine désaminase, utilisation du citrate, hydrolyse de l'esculine, formation d'indole, présence d'H₂S, réaction au rouge de méthyle (RM), réaction de Voges-Proskauer (VP), utilisation du malonate et recherche d'une lysine décarboxylase (LDC). Cette galerie,ensemencée, est incubée pendant 24 heures à 37°C puis révélée à l'aide des réactifs spécifiques fournis avec les galeries (**Holt et al., 1994**).

Pour renforcer le résultat élaboré par les tests biochimiques, nous avons réalisé un sérotypage à l'aide d'un sérum test trivalent 4 ; O142,O114,O124 (Figure n° 25).



Figure n° 25: Sérum test trivalent 4

Enfin, à partir de la suspension précédente, une gélose nutritive estensemencée puis incubée pour permettre d'avoir un nombre suffisant de colonies afin d'effectuer l'antibiogramme (**Megraud, 1996**).

V.5.4. Antibiogramme :

Il est réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé et permet la détermination de la sensibilité aux antibiotiques.

A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures, préparer une suspension bactérienne. Ajuster l'opacité équivalente à 0,08-0,1 Mac Farland (**Opdyke et al., 2004**).

L'ensemencement des boîtes de pétri contenant le milieu de Muller Hinton par écouvillonnage ou par inondation puis laisser sécher 10 à 15 min à la température ambiante (**Dosso et al., 2000**).

Appliquer les disques d'antibiotiques correspondants : (Metronidazole (MTR), Ofloxacin (OF⁵), Clarithromycine (CH), Erythromycine (E), Amoxicycline (AX) et Acide Nalidixique (AN)) à l'aide d'un distributeur ou à la pince en appuyant légèrement et incubé à 37°C pendant 24 heures.

La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques (**Tepe et al., 2004**).

V.6. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* vis-à-vis de *Helicobacter pylori* et de *E.coli* :

V.6.1. Matériel végétal :

Dans notre travail nous avons choisis la plante : *Pistacia lentiscus L*. La récolte de cette plante a été réalisée entre le mois de Février et le mois de Mai de la région de Hassi Mameche à 9 Km de la ville de Mostaganem.

V.6.2. Extraction des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L*:

Pratiquement, 500 grammes de feuilles et rameaux frais de *Pistacia lentiscus L* ont été introduits dans un ballon, accompagnés de 4 litres d'eau distillée, puis chauffés pendant 3 heures après l'obtention de la première goutte d'huile essentielle. Grâce au système de cohobation (Figure n°26) (Duru et al., 2003).

Les huiles essentielles obtenues sont séparées de l'eau par simple aspiration à l'aide d'une micropipette. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole.

Les huiles essentielles sont au préalable placées sur desséchant de type sulfate de magnésium ($MgSO_4$), afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau, puis sont pesées afin de calculer le rendement de l'extraction (le rendement en huiles essentielles est évalué à partir de trois extractions) par rapport à la masse de matériel végétal frais. Les huiles essentielles sont conservées au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à une température de 4°C (Mengal et Mompon, 1994).

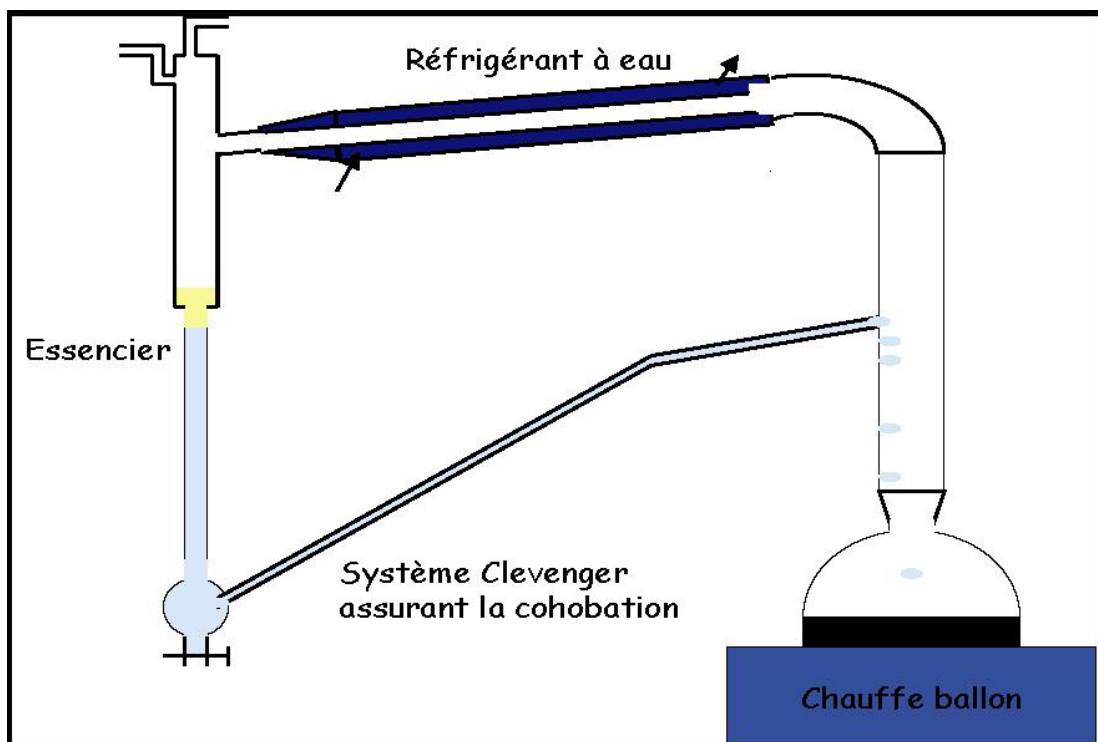


Figure n°26 : Schéma du montage d'hydrodistillation (Clevenger) (Mengal et, Mompon, 1994).

V.6.3. L'effet des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* sur les deux germes testés :

Pour connaître l'effet inhibiteur des huiles essentielles, on applique soit la méthode de disques qui est une technique de diffusion sur milieu gélosé, soit la

méthode de dilution en milieu liquide, ces deux méthodes consistent à mettre sur des milieux de cultures spécifiques des germes en contact avec des substances naturelles ou chimiques dans le but de connaître leur effet antimicrobien (Tepe et al., 2004).

A partir d'une culture jeune de *Helicobacter pylori* de 48 heures à 37°C sur gélose Columbia additionnée de 10% de sang de cheval, une suspension bactérienne dense dans un tube de BHIB et dont la turbidité était ajusté au densimètre indiquant le chiffre 3 McFarland, étalée par écouvillonnage sur des boîtes de pétri contenant le milieu gélosé de Mueller Hinton additionnée de 10% de sang de cheval.

Concernant l'inoculum de *E.coli*, c'est le bouillon nutritif qu'était utilisé, sa turbidité étant ajustée à 0,08-0,1McFarland.

On dépose à la surface de chaque boîte des disques stériles imprégnés dans les différentes dilutions des huiles essentielles de la plante étudiée (*Pistacia lentiscus L*) (Duru et al., 2003).

V.6.4. Détermination de la CMI et la CMB des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* sur les deux germes testés :

La méthode de référence pour mesurer l'activité d'un agent antimicrobien, vis-à-vis d'une souche bactérienne donnée, consiste à déterminer, dans des conditions bien standardisées (de milieu et d'inoculum), la concentration minimale d'un antimicrobien capable d'inhiber la croissance bactérienne. Pour le faire on réalise une gamme de dilutions pour ce dernier, soit en milieu liquide, soit en milieu solide (Dosso et al., 2000).

V.6.4.1. Préparation des dilutions des huiles essentielles :

On connaît bien que les huiles essentielles sont une phase non miscible dans le milieu de culture qui est une phase aqueuse. Pour résoudre ce problème, les chercheurs ont essayé plusieurs substances qui leur a donné une bonne miscibilité. Parmi ces substances, il y a la lécithine, le miel, l'agar-agar, Tween 80, et le propylène glycol.

- On procède ensuite à une dilution successive par progression géométrique de raison de 2 des huiles essentielles dans la solution d'émulsion de façon à obtenir successivement les dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 et 1/256 (Oussou et al., 2004).

- Emulsion mère: 50% d'huiles essentielles + 50% de la solution d'émulsion (1ml d'huiles essentielles + 1ml de la solution d'émulsion). Cette dernière est préparée par l'eau distillée stérile ajoutée de substance émulsifiante soit l'agar-agar (0,2%) (Iauk et al., 1996).

V.6.4.2. Méthode de diffusion de disques en milieu solide :

L'aromatogramme est une méthode qui permet de déterminer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huiles essentielles. Une suspension de *E.coli* est préparée en bouillon nutritif stérile à partir d'une culture jeune de 18 heures, dont la turbidité est ajustée à l'aide d'un densitomètre à raison de 0,08-0,1McFarland (Langezaal et al., 1992).

Pour *Helicobacter pylori* l'inoculum a été préparé dans un milieu liquide (BHIB), la valeur donnée par le densimètre est de 3 McFarland. Sur des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre contenant le milieu de Mueller-Hintonensemencées par écouvillonnage, des disques de papier Wattman stérile de 6 mm de diamètre sont imprégnés dans les différentes dilutions des huiles essentielles, déposés à la surface du milieu. Le milieu de Mueller-Hinton a été additionné de 10 % de sang de cheval, vue la fragilité *Helicobacter pylori* par rapport à *E.coli*.

Les disques s'humidifient progressivement et les huiles essentielles diffusent radialement du disque dans la gélose en formant un gradient de concentration. Après 24 à 48 heures d'incubation, un halo clair sera présent autour du disque si l'inhibition est constatée. Plus la zone entourant le disque est grande, plus le germe est sensible (**Prescott et al., 1995**).

Pour le test de l'aromatogramme, on fait une culture séparée des deux bactéries sur les milieux correspondants. Ces cultures sont utilisées comme témoins (**Iauk et al., 1996**).

La lecture des résultats se fait par mesure de diamètre de la zone d'inhibition.

V.6.4.3. Méthode en milieu liquide :

A partir de la valeur pour laquelle la bactérie (*E.coli* seulement) n'a pas poussée, on réalise une série de dilutions d'huiles essentielles émulsionnées dans des tubes contenant chacun 5 ml de bouillon nutritif ensemencé par 0,5 ml de l'inoculum.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, on détermine la CMI correspondante par mesure de la turbidité à l'œil nu c'est-à-dire la plus faible concentration des huiles essentielles à laquelle on n'observe pas de croissance.

Pour *Helicobacter pylori*, la détermination de la CMI en milieu liquide n'était pas adoptée dans notre recherche vue l'indisponibilité du bouillon spécifique pour sa culture en milieu liquide (bouillon Brucella) (**Schmausser et al., 2004**).

L'absence de croissance de *E.coli* dans les tubes déjà ensemencés pour la détermination de la CMI nous a incité à chercher la valeur de la CMB des huiles essentielles, et cela par réensemencement de ces tubes considérés comme négatifs, à l'aide d'une anse par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller-Hinton puis incubée à 37°C pendant 24 heures (**Oussou et al, 2004**).

L'analyse des résultats permet de calculer la CMB (Concentration minimale bactéricide) qui est la plus faible concentration des huiles essentielles qui tue au moins 99,99% de bactéries en culture (**Prescott et al., 1995**).

Chapitre VI : Résultats et discussion

VI.1. Culture et identification de *Helicobacter pylori*:

VI.1.1. Examen macroscopique :

La culture a été effectuée après 4 jours d'incubation à 37°C dans une atmosphère microaérophile.

Les colonies obtenues sur gélose Columbia additionnée de 10% de sang de cheval étant de 1 mm de diamètre, transparentes, luisantes, discrètement bombées, rondes et à contour régulier (Figure n° 27). Ces mêmes caractéristiques ont été constatées chez *Helicobacter pylori* par **Chalmers et autre (2004)**.

VI.1.2. Etat frais :

Les bactéries examinées à l'état frais apparaissent très mobiles par des mouvements spiralés et de rotation (Figure n° 28). La combinaison de sa forme incurvée et flagelles unipolaires permet à des *Helicobacter pylori* de se déplacer facilement sur la couche épaisse du mucus de l'estomac humain (**Salyers et Whitt, 2002**).

VI.1.3. Examen microscopique :

La coloration de Gram, réalisée à partir des colonies distinctes, montre la présence des bacilles à Gram négatif (Figure n° 29), sous forme incurvée, en virgule, en forme spiralée, ou coccoïde. Cette dernière peut retourner à la forme en spirale originale (**Curry et Jones, 1990**).

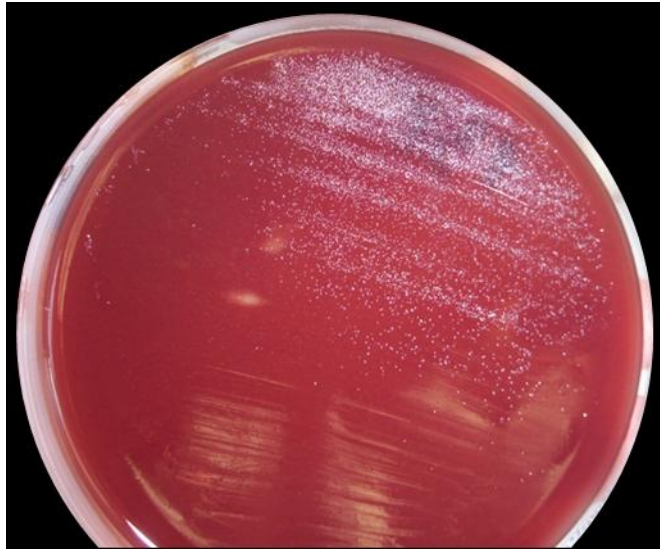


Figure n° 27 : Aspect macroscopique de *Helicobacter pylori* sur milieu Columbia additionnée de 10% de sang de cheval

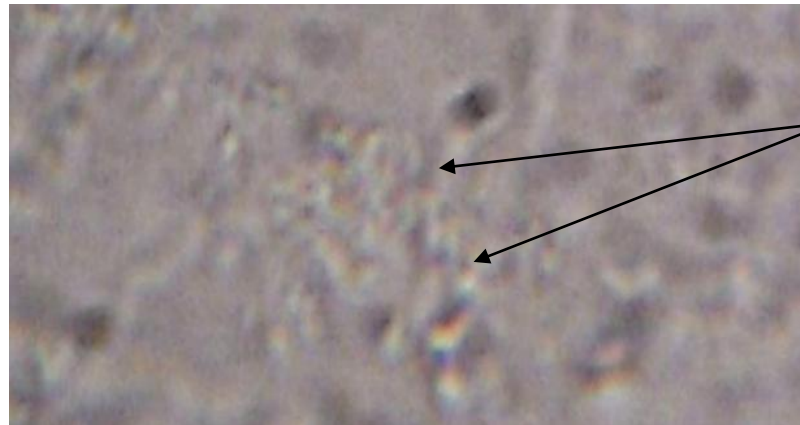


Figure n° 28 : Aspect microscopique à l'état frais de *Helicobacter pylori* au grossissement X100

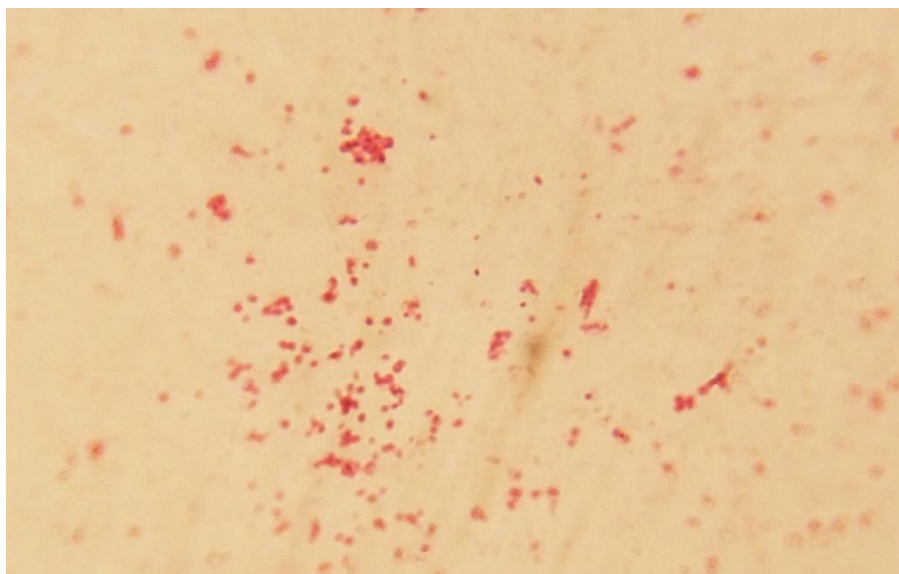


Figure n° 29 : Coloration de Gram de *Helicobacter pylori* (grossissement X100)

VI.1.4. Tests biochimiques :

Les observations réalisées, étaient complétées par la recherche des caractères biochimiques ; oxydase, catalase et uréase. Ces tests étaient fortement positifs pour la souche de *Helicobacter pylori* (Figures n° 30, 31 et 32). Les résultats sont indiqués dans le tableau n°10.

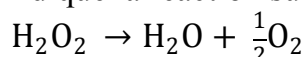
Tableau n° 10 : Résultats des tests biochimiques d'identification de *Helicobacter pylori*.

Souche bactérienne	Test biochimique		
	Catalase	Oxydase	Uréase
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	++

+ : positif

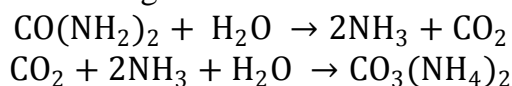
++ : Fortement positif

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La présence d'une catalase active chez *Helicobacter pylori* 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**) :



Le test de l'oxydase positif, met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. Ce test met en évidence la présence de cytochrome c dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Megraud, 1996**). La réaction est schématiquement la suivante : cytochrome oxydase + réactif réduit → réactif coloré.

L'urée contenue dans le milieu urée-indole est hydrolysée sous l'action d'une uréase très active de *Helicobacter pylori*, conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone, qui se traduit par le virage de la couleur du milieu en coloration rouge violacée ou orange foncée selon la réaction :



Le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, qui permet par conséquent à *Helicobacter pylori* de s'adapter au suc gastrique (**Fukase, 2008**).

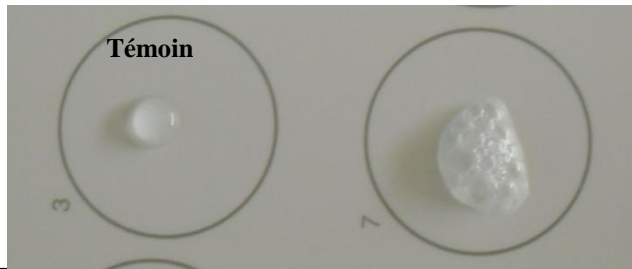


Figure n° 30: Test de la catalase de *Helicobacter pylori*



Figure n° 31 : Test de l'oxydase de *Helicobacter pylori*

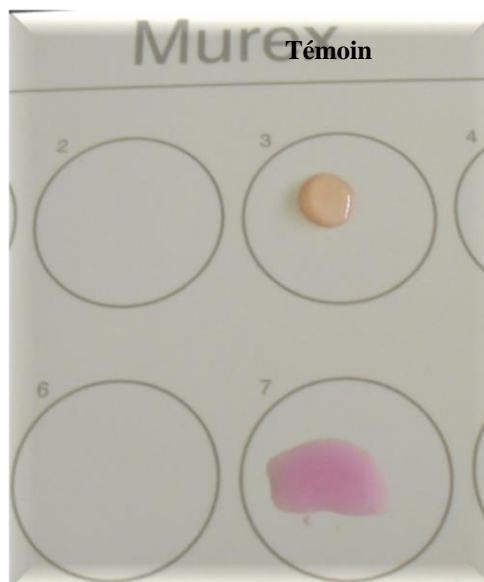


Figure n° 32 : Test de l'uréase de *Helicobacter pylori*

VI.1.5. Antibiogramme :

La turbidité voulue de l'inoculum est obtenue par le densimètre à raison de 3 McFarland comme indiqué dans la figure n°33.



Figure n° 33: Ajustement de la turbidité à 3 McFarland à l'aide du densimètre

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques habituellement utilisés dans la thérapie de la souche de *Helicobacter pylori* isolée à été testée par la méthode des disques et illustrées dans les figures n° 34 et 35.

L'observation des boîtes après incubation à 37°C pendant 48 heures nous a donné les résultats indiqués dans le tableau n° 11.

Tableau n°11 : Sensibilité de la souche de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques testés

Antibiotiques	Abréviations	Charge du disque	Zone d'inhibition en mm	
			Diamètre	Résultat
Acide nalidixique	AN	30µg	7	R
Amoxicilline	AMX	25µg	40	S
Clarithromycine	CH	15µg	18	R
Erythromycine	E	15µg	7	R
Métronidazole	MZ	4µg	17	R
Ofloxacine	OF ⁵	5µg	32	S

R : résistant

S : Sensible

Les résultats indiqués dans le tableau n° 10 montrent que la souche de *Helicobacter pylori* a donné une zone d'inhibition de 40 mm pour l'amoxicilline et 32 mm pour l'ofloxacine, elle est donc sensible à ces deux antibiotiques. Pour l'acide nalidixique, la zone d'inhibition est de 18 mm pour la clarithromycine, 17 mm pour le métronidazole, 7 mm pour l'erythromycine et l'acide nalidixique, elle est donc srésistante à ces 4 antibiotiques testés. Ceci à été aussi mentionné par **Cayla (1996)**.

La résistance de la souche de *Helicobacter pylori* à plusieurs antibiotiques est peut être liée à l'utilisation fréquente de ces derniers notamment par la population algérienne après les études de l'influence de la résistance de *Helicobacter pylori* aux ATB sur l'efficacité thérapeutique qui sont faites par un groupe de chercheurs de laboratoire Algérien de recherche sur *Helicobacter* (**Touchène et al, 2010**).

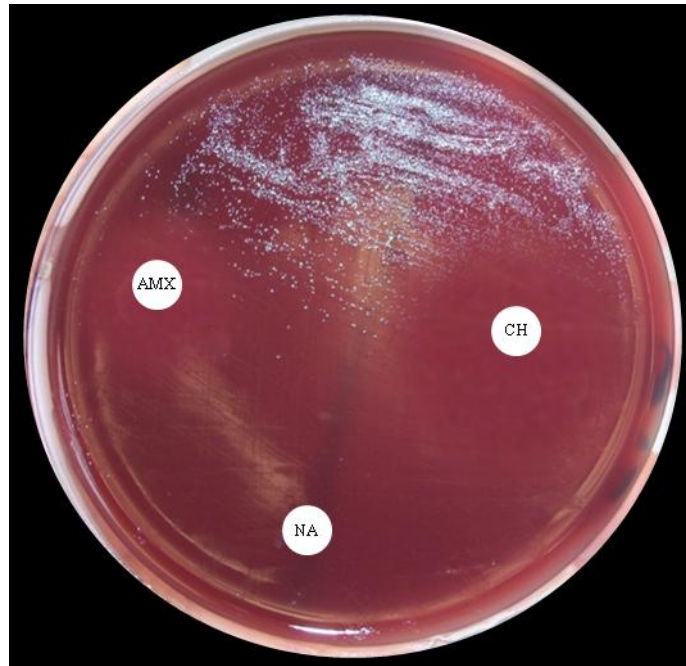


Figure n° 34: Antibiogramme de *Helicobacter pylori*

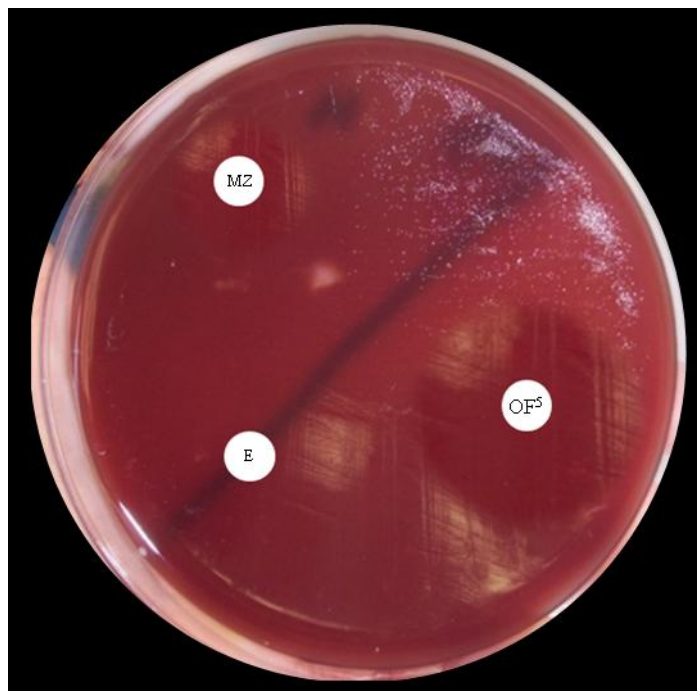


Figure n° 35: Antibiogramme de *Helicobacter pylori*

AMX : Amoxicilline, NA : Acide nalidixique, CH : Clarithromycine, MZ : Métronidazole, E : Erythromycine, OF⁵ : Ofloxacine

VI.2. Culture et confirmation de l'identification de *E.coli*:

VI.2.1. Examen macroscopique :

L'observation macroscopique montre des colonies de 2 mm de diamètre à contour régulier, plus au moins plates, de couleur jaune (Figure n° 36), due à l'acidité du milieu BCP.

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 Ray-gueniot, 1997**).

VI.2.2. Examen microscopique :

Après coloration de Gram et sous microscope optique au grossissement X100, les bactéries apparues sont roses donc à Gram négatif et de forme bacillaire (Figure n° 37).

VI.2.3. Tests biochimiques :

Sur milieu KIA, le virage du culot au jaune indique la fermentation du lactose celui de la pente nous révèle celle du glucose avec présence de gaz dans le tube (Figure n° 38). Le virage au jaune du rouge de phénol se traduit par acidification du milieu (**Yan et DB Polk 2004**).

La galerie API 20E (Figure n° 39) comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (**Hurst et al., 2001**). Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Tableau n° 12).

- La coloration jaune issue de l'hydrolyse de l'orthonitrophényl-galactopyranoside (ONPG) sous l'action d'une β -galactosidase présente chez *E.coli*, donne par la suite l'orthonitrophénol (**Leclerc et al 1995**).
- Les réactions enzymatiques positives de l'ornithine décarboxylase (ODC), la lysine décarboxylase (LDC) et l'arginine dihydrolase (ADH) sont manifestées par le virage de couleur. Ces enzymes, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés. Cette alcalinisation du milieu provoque le virage au rouge du rouge de phénol.
- La croissance sur le milieu au citrate de Simmons s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage au bleu. Présence d'une coloration verte dans milieu signifie une réaction négative, c'est à dire que *E.coli* est incapable d'utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie.
- L'absence du H₂S se traduit par l'absence du dépôt noir dans le milieu TSI ainsi que dans la cupule qui le met en évidence dans le système API 20E (**Hurst et al., 2001**).
- Le carbonate d'ammonium est le produit final de la réaction d'hydrolyse de l'urée qui alcalinise le milieu sous l'action de l'uréase présente chez *E.coli* qui se manifeste par la coloration rouge violacée du milieu (**Leclerc et al 1995**).
- Apparition d'une coloration jaune est exprimée par l'absence d'une tryptophane désaminase. Car en présence de perchlorure de fer et en milieu acide, l'acide indole-pyruvique donne un composé de couleur brune foncée (presque noire).
- La recherche de l'indol chez *E.coli* à donné une réaction négative avec absence de la coloration rouge lors de l'addition du réactif de Kovacs.
- Les réactions de Voges-Proskauer (VP) permettent l'étude des dérivés de l'acide pyruvique. La présence d'acétoïne (bactérie VP positive) se traduit par une

coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu (**Vernozy-rozand et Ray-gueniot, 1997**).

- L'absence de l'hydrolyse de la gélatine se traduit par la non diffusion des particules de charbon dans le milieu.
- L'étude de l'acidification des glucides et dérivés est exprimée par le virage au jaune du bleu de bromothymol qui indique l'utilisation du substrat carboné (la fermentation commence dans la partie inférieure du tube, l'oxydation débute dans la partie supérieure du tube) (**Leclerc et al 1995**).

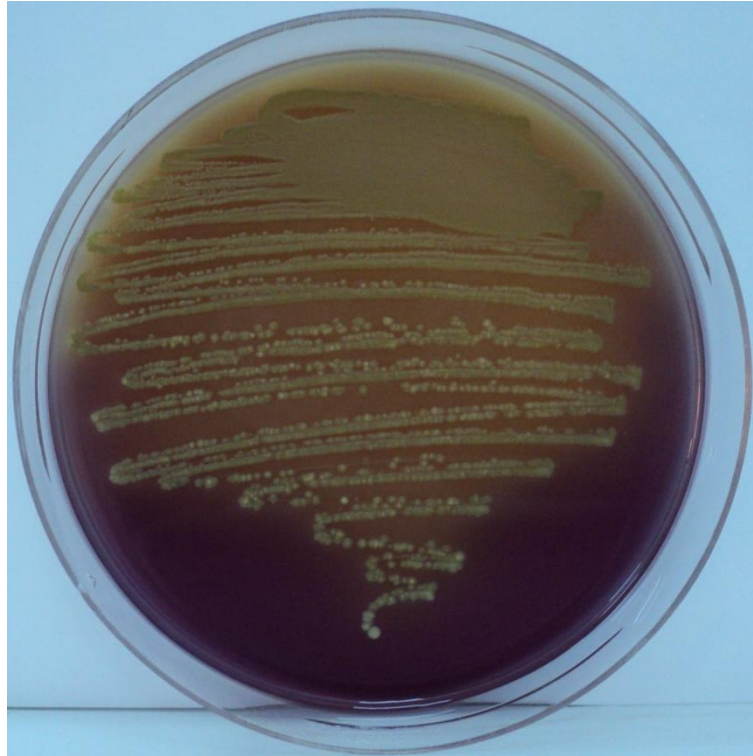


Figure n° 36 : Aspect macroscopique de *E.coli* sur gélose BCP

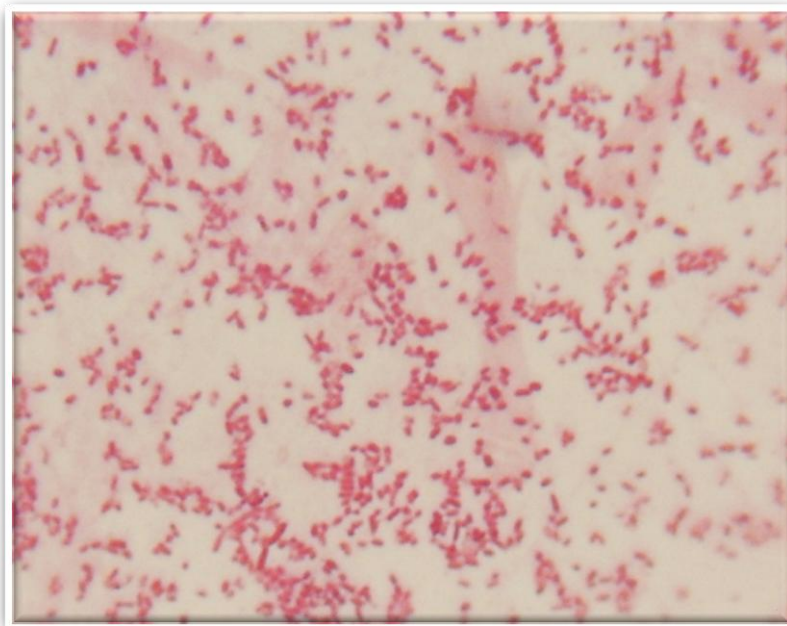


Figure n° 37 : Coloration de Gram de *E.coli* (grossissement X100)

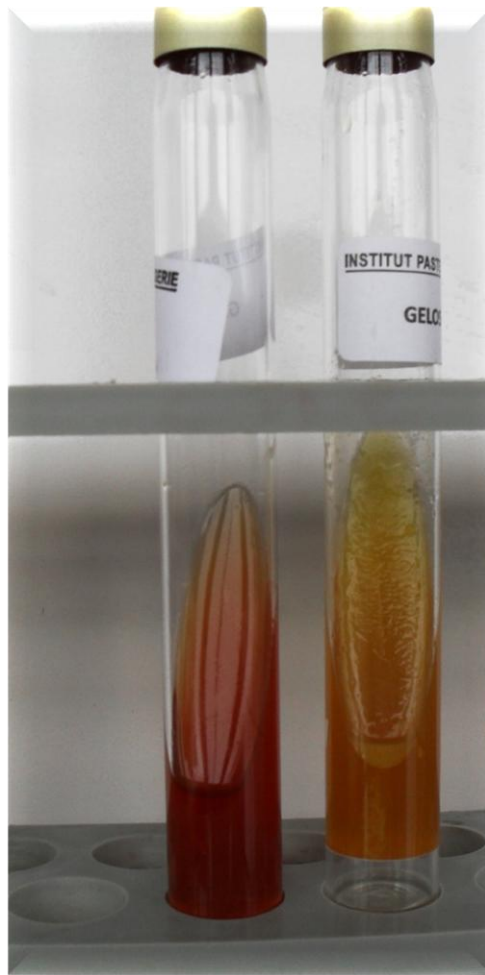


Figure n° 38 : *E.coli* en milieu KIA

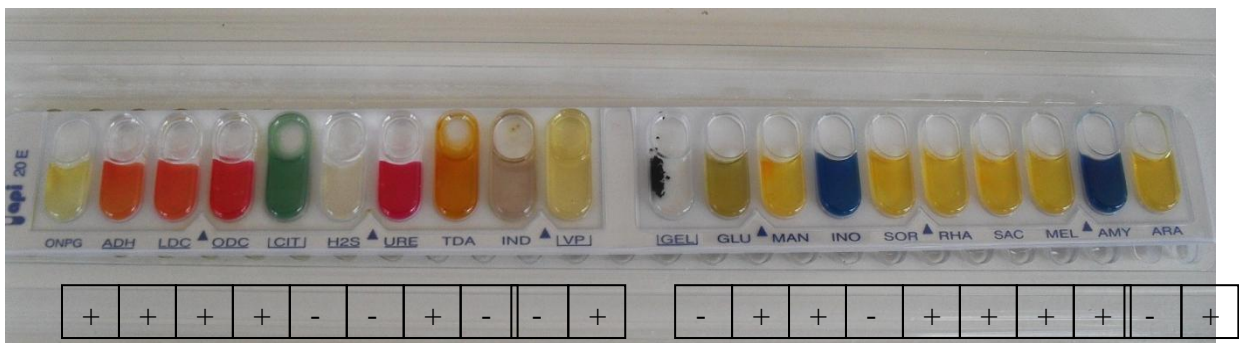


Figure n° 39 : Résultats de l'API 20E de *E.coli*

Tableau n° 12: Lecture des résultats d'une galerie biochimique API 20 E de *E.coli*.

Tests	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactifs	Lecture		Résultats de <i>E.coli</i>
				Négatif	Positif	
ONPG	Béta-galactosidase	2-nitrophényl-béta-D-galactopyranoside	Non	Incolore	Jaune	+
ADH	Arginine dihydrolase	L-arginine	Non	Jaune	Orange ou rouge	+
LDC	Lysine décarboxylase	L-lysine	Non	Jaune	Orange ou rouge	+
ODC	Ornithine décarboxylase	L-ornithine	Non	Jaune	Orange ou rouge	+
CIT	Assimilation du citrate	Citrate trisodique	Non	Vert pâle ou jaune	Bleu-vert ou bleu	-
H2S	Thiosulfate réductase	Thiosulfate de sodium	Non	Incolore ou grisâtre	Dépôt noir	-
URE	Uréase	Urée	Non	Jaune	Orange ou rouge violacé	+
TDA	Tryptophane désaminase	L-tryptophane	TDA	Jaune	marron ou brun foncé	-
IND	Production d'indole	L-tryptophane	James	Incolore ou jaune	Rose ou rouge	-
VP	Production d'acétoïne	Pyruvate de sodium	VP1 VP2	Incolore	Rose ou rouge	+
GEL	Gélatinase	Gélatine de boeuf	Non	Non diffusion du charbon	Diffusion du charbon	-
GLU	Glucose	D-glucose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	+
MAN	Mannitol	D-mannitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	+
INO	Inositol	Inositol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	-
SOR	Sorbitol	D-sorbitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	+
RHA	Rhamnose	L-rhamnose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	+
SAC	Saccharose	D-saccharose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	+
MEL	Mélibiose	D-mélibiose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	+
AMY	Amygdaline	Amygdaline	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	-
ARA	Arabinose	L-arabinose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune	+

- **Calcul du profil numérique :**

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois (chaque groupe de trois tests est séparé du groupe voisin par un trait vertical).

Chaque test donnant une réaction négative prend la valeur 0 (voir annexes).

Lorsqu'un test est positif, il prend la valeur ; 1, 2 ou 4 selon sa position au sein d'un groupe de trois : si le premier test d'un groupe de trois est positif il est noté 1, si le deuxième test est positif il est noté 2 et si le dernier test d'un groupe de trois est positif il est noté 4.

Pour chaque groupe de trois, additionner les chiffres correspondants. On obtient un nombre à sept chiffres qui constitue le profil numérique de la souche étudiée (**Leclerc et al 1995**). Donc notre profil numérique de la souche de *E.coli* ainsi identifié est le suivant : **ATCC 7117574**

VI.2.4. Le sérotypage de *E.coli* :

Le renforcement de l'identification de *E.coli* a été fait par sérotypage à l'aide d'un sérum test trivalent 4, celui-ci nous a révélé que notre souche était *E.coli* gastroentérique infantile de syrotype ; O142, O114, O124 par présence d'agglutination visible sur lame (Figure n° 40).



Figure n° 40: Tests de sérotypages d'*E.coli* vis-à-vis du sérum test trivalent 4

L'agglutination est le résultat d'une action spécifique entre le sérum test trivalent 4 et l'antigène somatique (Antigène O) porté par *E.coli*. C'est cet antigène qui permet de faire une classification sérologique de *E.coli* et qui joue un rôle de marqueur épidémiologique (**Jerse et al., 1990**).

VI.2.5. Le test d'antibiogramme :

Pour chacun des disques d'antibiotiques utilisés, le diamètre mesuré de la zone d'inhibition est mentionné dans le tableau n°.

Les résultats de l'antibiogramme nous ont donné des réponses différentes vis-à-vis des antibiotiques testés (Figures n° 41 et 42).

La bactérie a résisté à deux antibiotiques différents l'amoxicilline et l'érythromycine. Par contre elle était sensible aux quatre autres antibiotiques ; clarithromycine, ofloxacine, acide nalidixique et métronidazole, cette sensibilité à donné des zones d'inhibition de diamètres différents. (Tableau n° 13).

Tableau n° 13 : Sensibilité de la souche de *E.coli* aux antibiotiques testés

Antibiotiques	Abréviations	Charge du disque	Zone d'inhibition en mm	
			Diamètre	Résultat
Acide nalidixique	AN	30µg	22	S
Amoxicilline	AMX	25µg	-	R
Clarithromycine	CH	15µg	18	S
Erythromycine	E	15µg	-	R
Métronidazole	MZ	4µg	8	S
Ofloxacine	OF ⁵	5µg	35	S

R : résistant
S : Sensible

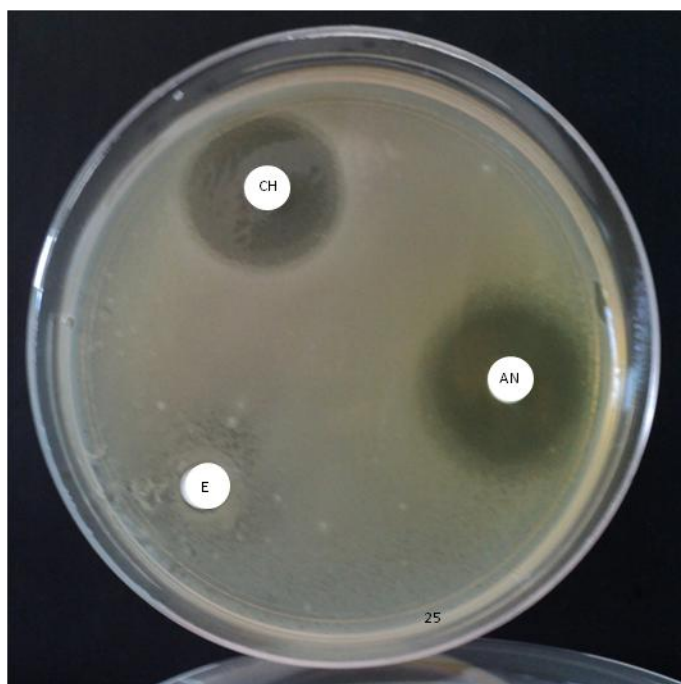


Figure n° 41: Antibiogramme de *E. coli*

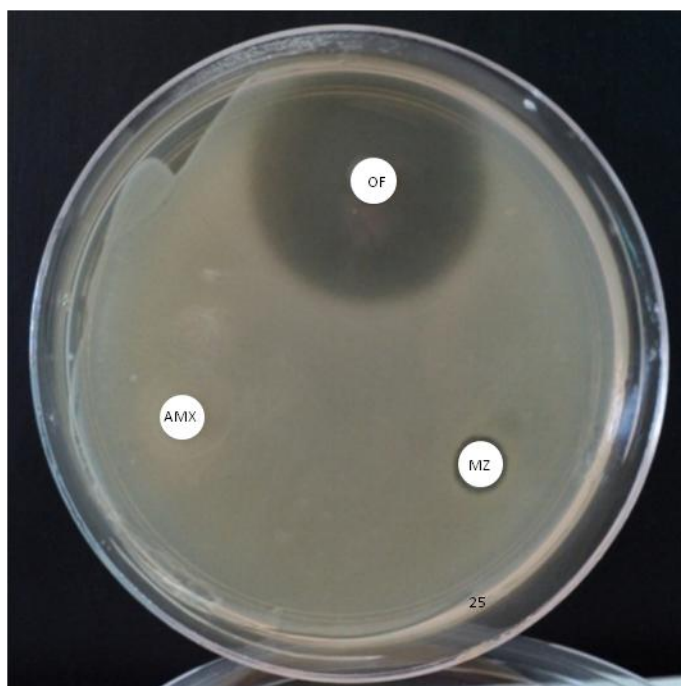


Figure n° 42: Antibiogramme de *E. coli*

AMX : Amoxicilline, NA : Acide nalidixique, CH : Clarithromycine, MZ : Métrónidazole, E : Erythromycine, OF⁵ : Ofloxacine

VI.3. Effet antibactérien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* :

VI.3.1. Extraction des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* :

Après une durée de 3 heures d'hydrodistillation (Figure n° 43) de 500 g de matière végétale, on a obtenu des quantités d'huiles essentielles illustrés dans le tableau n° 14 et cela nous a permis de calculer le rendement (R) de l'extraction selon la formule suivante (Vagi et al., 2005) :

$$R = \frac{\text{Masse d'huile essentielle (g)}}{\text{Masse du matériel végétal utilisé (g)}} \times 100$$

Tableau n° 14 : Quantités des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation

Essais N°	Masse du matériel végétal utilisée en g	Volume d'eau distillée utilisée en L	Masse des huiles essentielles extraites en g
01	400	4	0,5
02	500	4	0,55
03	500	4	0,5

$$R1 = \left[\frac{1g}{400g} \times 100 \right] = 0,25\%$$

$$R2 = \left[\frac{1,2g}{500g} \times 100 \right] = 0,24\%$$

$$R3 = \left[\frac{1g}{500g} \times 100 \right] = 0,2\%$$

$$R = \frac{R1+R2+R3}{3} = \frac{0,25+0,24+0,2}{3} = \frac{0,69}{3} = 0,23\%$$

$$R = 0,23\%$$

Comparativement aux travaux de Mengal et Mompon (1994) et afin de mettre en place un protocole applicable à la plante choisie et d'optimiser le rendement de l'extraction tout en conservant la qualité de l'huile essentielle, plusieurs expériences préliminaires ont été menées sur le *Pistacia lentiscus L*. La masse de matière végétale traitée, la durée de l'hydrodistillation, ainsi que la quantité d'eau à utiliser sont les paramètres qui ont été modifiés au fil des expériences dans le but de trouver le meilleur compromis entre chacun d'eux.

La quantité d'eau au sein du ballon était quasiment la même tout au long de la distillation.

La valeur du rendement obtenu pendant notre expérimentation était de 0,23%, tandis que celle relatée dans la littérature avait une valeur allant de 0,28% à 0,30%. Les résultats ont montré un écart de 0,07%, ceci est peut être dû d'après Zrira et coll (2003), à différents facteurs ; géographiques (latitude et longitude), climatiques (température, humidité), la durée diurne, la fertilité du sol ayant un rôle important dans la production de ces huiles essentielles.

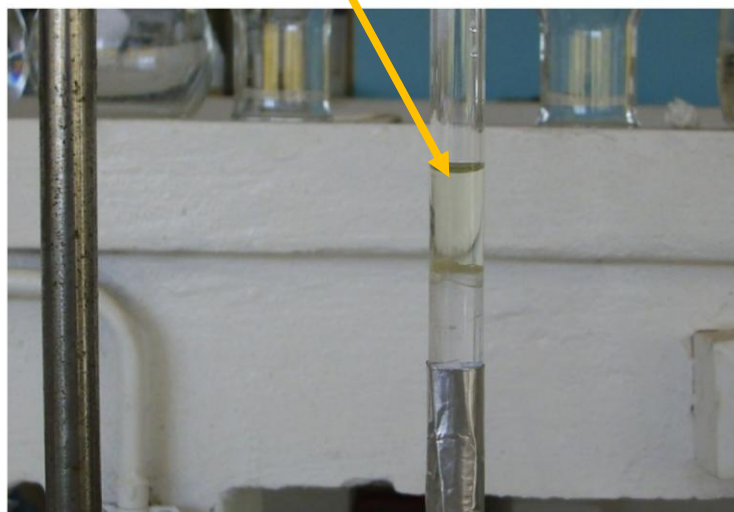


Figure n° 43 : Procédé d'extraction des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* par hydrodistillation

V.3.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* vis-à-vis *Helicobacter pylori* et *E.coli* :

Le tableau n° 15 et les figures n° 44 et 45 montrent les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L*. On note qu'elles ont exercés une forte activité antibactérienne contre *Helicobacter pylori* par rapport à *E.coli*.

Tableau n° 15 : Effet inhibiteur des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L vis-à-vis *Helicobacter pylori* et *E.coli*.

Concentration d'huiles essentielles en %	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	
	<i>E.coli</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
50	14	90
25	9	90
12.5	8,5	40
6.25	7,5	36
3.12	-	26
1.56	-	22
0.78	-	-
0.39	-	-

- : absence d'inhibition

A propos de *Helicobacter pylori* ; l'effet des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L pour les valeurs ; 50% et 25% il y a eu absence totale de culture donc un effet de sensibilité, alors qu'il était très significatif pour 12,5% avec un diamètre de 40 mm, 6,25% avec un diamètre de 36 mm, 3,12% avec un diamètre de 26 mm et 1,56% avec un diamètre de 22 mm. Le diamètre des deux zones d'inhibition était de 40 mm, pour les valeurs 0,78% et 0,39% aucune zone d'inhibition n'a été détectée. Donc ce germe est résistant pour ces deux valeurs de pourcentage (Figure n° 43).

Concernant *E.coli* les diamètres des zones d'inhibition étaient successivement ; 14 mm, 9 mm, 8,5 mm et 7,5 mm pour les concentrations ; 50%, 25%, 12,5%, 6,25%. L'absence de toute zone correspondait aux valeurs des concentrations ; 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39% (Figure n° 44).

V.3.2.3. Détermination de la CMI et la CMB des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L vis-à-vis *E.coli* :

La lecture à l'œil nu des tubes expérimentaux après incubation de 24 heures à 37°C, nous a donné la valeur de la CMI qui est de 0,015µl/ml (1,56%) (Figure n° 46).

La concentration minimale bactéricide (CMB), est la concentration de l'antimicrobien qui laisse au plus 0.01% de germes survivants (référence). Pour sa détermination, le tube témoin a été dilué jusqu'à 10⁻⁴. Cette dilution a représenté 0,01% de survie. Elle est repiquée par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Le nombre de germes obtenus sur la strie de la dilution 10⁻⁴ est comparé à celui de chaque tube expérimental également repiqué par strie de 5cm. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de germes présent au niveau de la strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10⁻⁴ correspondra à la CMB. La figure n° 46 représente d'une part le repiquage sur gélose du tube témoin de croissance et ses dilutions au 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ et 10⁻⁴ et d'autre part, les repiquages de certains tubes expérimentaux par stries sur gélose. Ces repiquages sur gélose Mueller Hinton sans huiles essentielles, nous ont permis

d'observer que le nombre de germes portés par les stries des différents tubes correspondants aux concentrations ; 12,5%, 6,25%, 3,12% et 1,56% de la souche étudiée est inférieur ou égal au nombre de germes portés par la strie de la dilution 10^{-4} du tube témoin de croissance (0,01% de survie). Cette concentration étant 0,12 μ l/ml (12,5%) représente alors la CMB de *E.coli*.

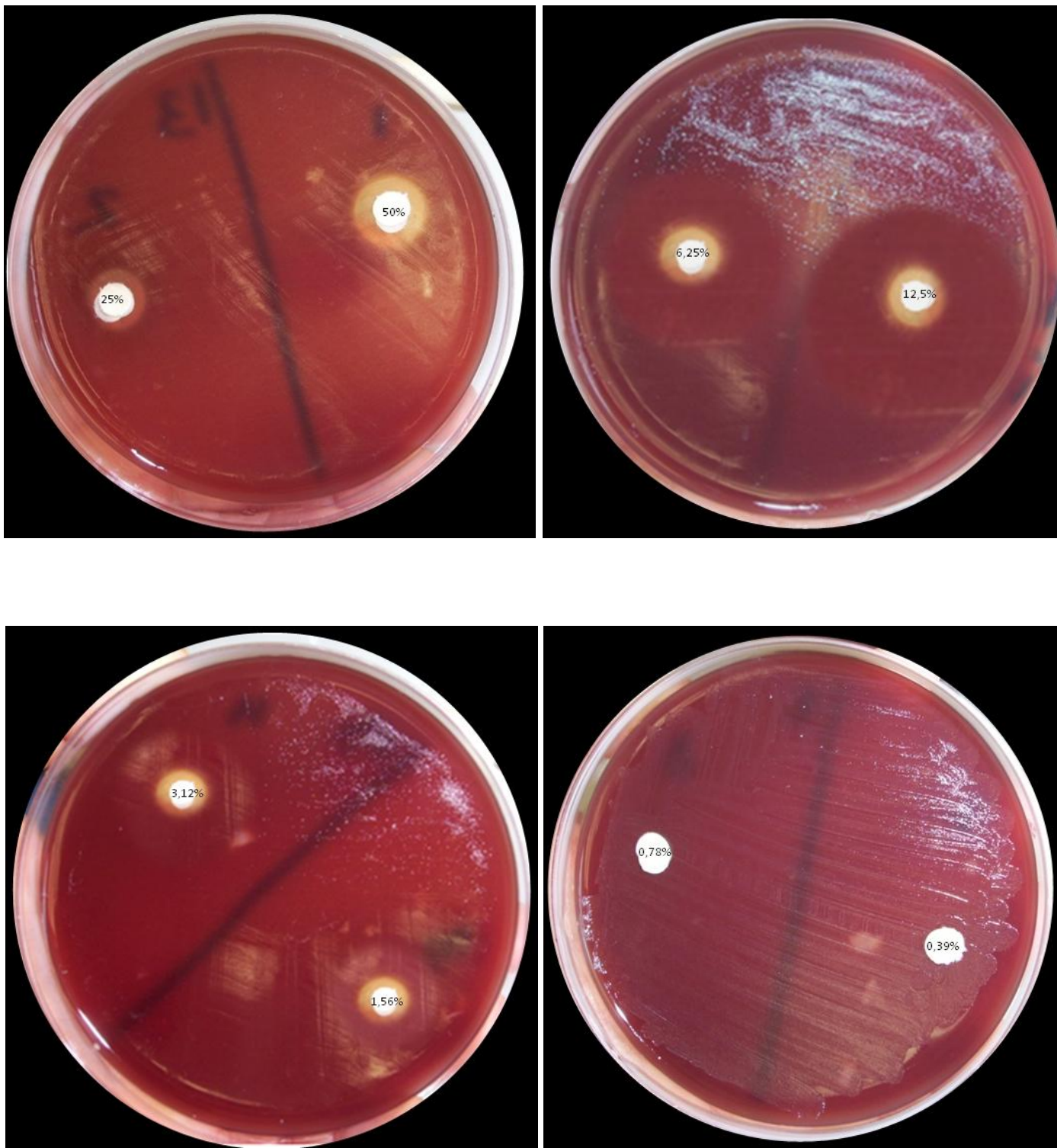


Figure n° 44 : Aromatogramme de *Helicobacter pylori*

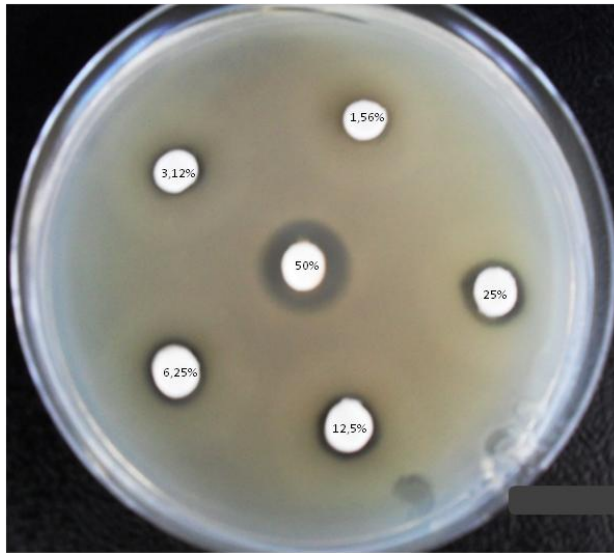


Figure n° 45 : Aromatogramme de *E.coli*

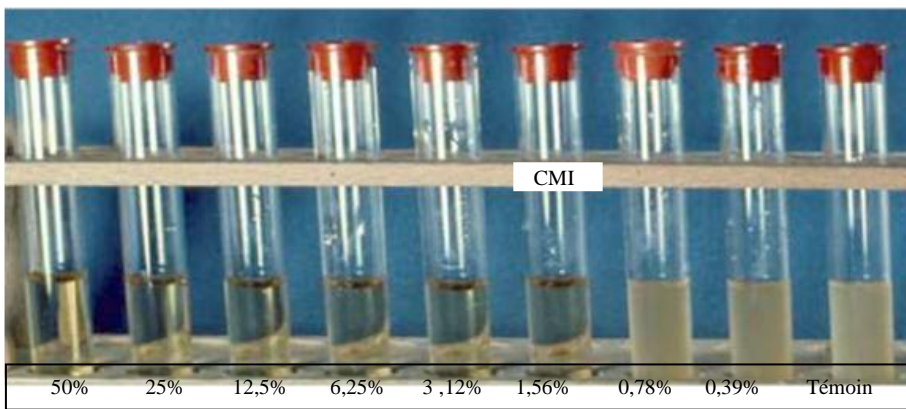


Figure n° 46 : Détermination de la CMI d'huiles essentielles sur *E.coli*

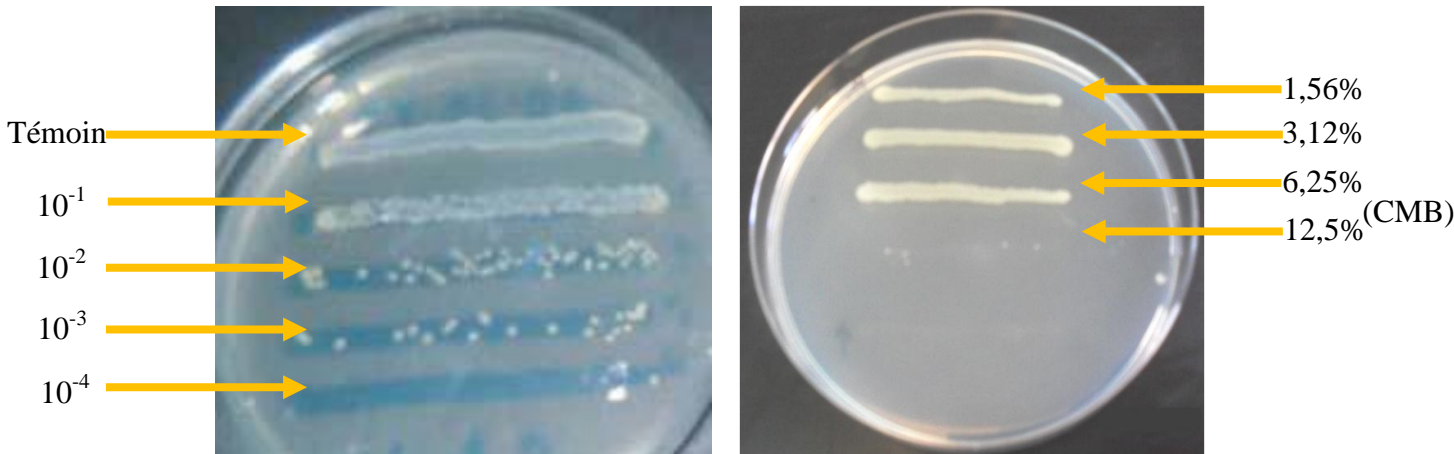
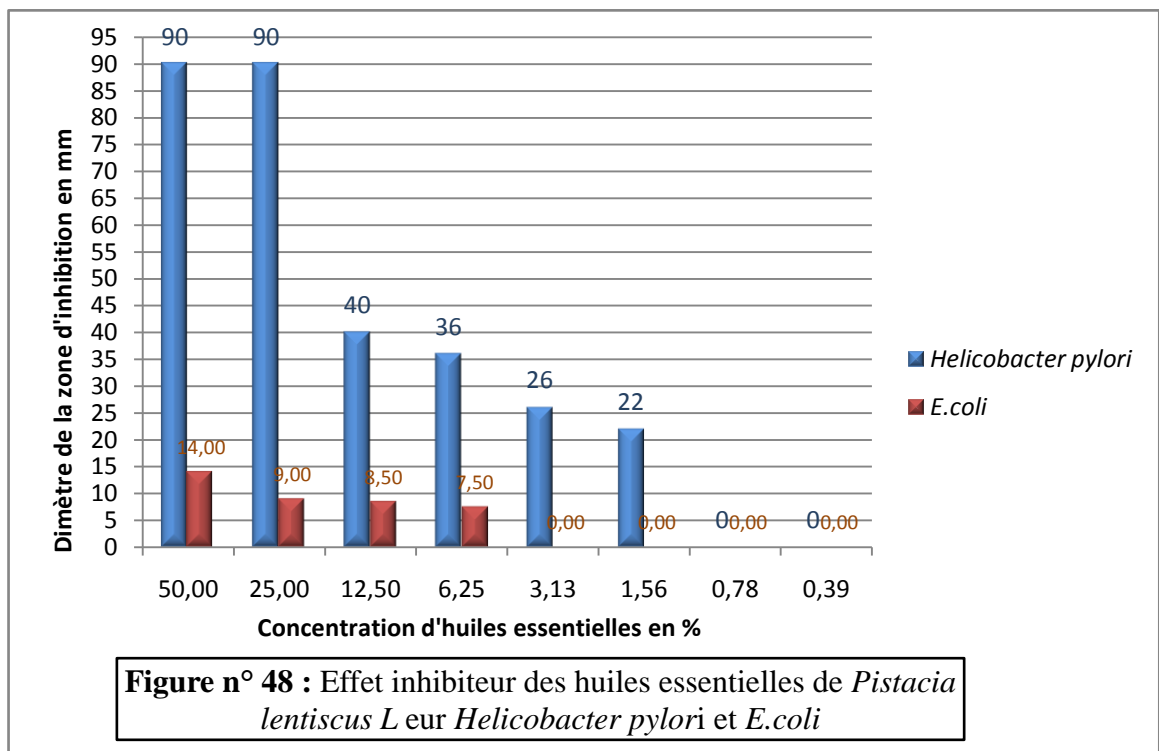


Figure n° 47 : Détermination de la CMB d'huiles essentielles sur *E.coli*



Les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* ont une activité antibactérienne importante vis-à-vis de *E. coli*, et de *Helicobacter pylori* (Figure n° 48), bien que le diamètre de la zone d'inhibition de *E. coli* était considérablement inférieur à celui de *Helicobacter pylori*.

Ceci n'exclut pas l'efficacité du pouvoir inhibiteur des huiles essentielles vis-à-vis de *E. coli*, car en comparaison avec les travaux de Elhoucine et ses collaborateurs (2010), on remarque pour la même plante *Pistacia lentiscus L* la zone d'inhibition constatée pour *E. coli* allant de 7 à 38 mm, deux valeurs considérées par l'auteur comme ayant un grand effet contre *E. coli* et autres entérobactéries.

Seulement les concentrations d'huiles essentielles utilisées étant les mêmes pour *Helicobacter pylori* que pour *E. coli*, mais en comparant l'histogramme de l'effet inhibiteur des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* sur *Helicobacter pylori* et *E. coli* on remarque une nette différence entre les deux germes vis-à-vis de l'écart existant au niveau des diamètres des zones d'inhibition pour la concentration de 50% l'écart est de 76 mm, de 81 mm pour la concentration de 25%, de 31,5 mm pour 12,5% et de 28,5 mm pour la concentration 6,25%. Donc on peut conclure que *E. coli* étant le germe dont la densité est la plus élevée parmi les enterobactéries de la flore intestinale et du fait que les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* n'avaient pas d'effet inhibiteur considérable par rapport à celui sur *Helicobacter pylori*; on peut utiliser ces derniers comme agents antibactériens vis-à-vis de *Helicobacter pylori*, sans avoir le soucis d'inhiber la bactérie *E. coli* considérée comme bénéfique pour l'organisme de l'hôte, à l'exception où cette dernière acquiert une virulence chez les enfant de bas âge.

Conclusion

Helicobacter pylori est l'agent étiologique de pathologies gastro-duodénales telles les gastrites chroniques et ulcères. Il joue un rôle important dans la genèse des cancers gastriques. Ceci a conduit non seulement à réviser le traitement des ulcères, mais aussi à chercher à éradiquer cette bactérie qui infecte plus de 50% de la population mondiale, du fait que celui-ci étant incurable, et le germe incriminé très résistant aux antibiotiques prescrits (**Huwez et Thirlwell, 1998**), de même que ceux-ci présentent de multiples effets indésirables. Les traitements antibiothérapeutiques restent cependant impuissants devant une telle circonstance.

La méthode traditionnelle de l'utilisation de plantes médicinales reste une issue pour traiter les pathologies d'origine microbienne.

Pistacia lentiscus L est notre plante de choix, nos ancêtres l'utilisaient pour guérir les maux d'estomac en mâchant le mastic excrété par cet arbre au niveau du tronc. En effet ce dernier contient des huiles essentielles susceptibles de donner un effet thérapeutique satisfaisant (**Baudoux, 2003**).

Le *Pistacia lentiscus L* est une espèce appartenant à la famille des *Anacardiaceae* (**Ford et al., 1992**). Nous nous sommes intéressés d'exploiter les autres parties de la plante en extraire les huiles essentielles des feuilles et des rameaux par l'hydrodistillation, dont le rendement en huiles essentielles était de 0,23%, dans l'intention d'éradiquer les germes incriminés dans quelques maladies gastro-entériques.

En premier lieu, la récupération de la bactérie *Helicobacter pylori* à partir d'une biopsie gastrique d'un patient souffrant d'une gastrite chronique a été faite au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger ; elle nous a été présentée sur boîte de Pétri en milieu Columbia au sang de cheval.

Notre travail consistait à faire une subculture au sein du laboratoire de recherche de microbiologie (Université Abdelhamid Ibn Badis) à Mostaganem avec une confirmation de l'identification de la souche bactérienne.

Les résultats des tests biochimiques ont montré que c'était bien *Helicobacter pylori*.

Une deuxième souche bactérienne *E.coli* nous a été confiée par le service de coproculture du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital de Ain Tedeles à Mostaganem.

La confirmation de son identification par les tests biochimiques a été renforcée par le sérotypage au sérum test trivalent 4, après agglutination, nous avons constaté que c'était *E.coli*, à gasro-entrite infantile.

Les antibiotiques testés dans l'antibiogramme pour *Helicobacter pylori* et *E.coli* étant comme suit : Métronidazole (MTR), Ofloxacine (OF⁵), Clarithromycine (CH), Erythromycine (E), Amoxiciline (AX) et Acide Nalidixique (AN) dont les diamètres des zones d'inhibition pour *Helicobacter pylori* étaient les suivants : 17mm, 32mm, 18mm, 7mm, 40mm et 7mm et pour *E.coli* : 8mm, 35mm, 18mm, R, R et 22mm.

L'aromatogramme des huiles essentielles utilisées vis-à-vis de *E.coli* a donné des zones d'inhibition de diamètres respectifs : 14mm, 9mm, 8,5mm et 7,5mm avec les concentrations : 50%, 25%, 12,5% et 6,25%. Les valeurs de la CMI et de la CMB sont 1,56µl/ml et 12,5µl/ml ont montré que la souche testée de *E.coli* était faiblement sensible aux huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L*. par rapport à *Helicobacter*

pylori dont les diamètres des zones d'inhibition étaient : 90mm, 90mm, 40mm, 36mm et 22 mm pour les concentrations : 50%, 25%, 12,5% et 6,25%.

Perspectives :

- Détermination de la composition chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* par analyse chromatographique en phase gazeuse couplée d'une spectroscopie de masse dont le but d'évaluer le pouvoir toxique ou thérapeutique de ces composants chimiques vis-à-vis de l'Homme.
- Les résultats ont justifié l'utilisation thérapeutique de *Pistacia lentiscus L* dans le traitement des maladies gastriques, l'approfondissement de l'étude par la mise au point de l'effet antimicrobien d'une large gamme de microorganismes pathogènes afin d'évaluer le spectre d'activité antimicrobienne de *Pistacia lentiscus L*. Ceci constituerait une valorisation des ressources végétales locales.

Références bibliographiques

- ✚ Abdel-Rahman, A.H.Y., Soad, A.M.Y., (1975): Mastic as antioxidant. Journal of the American Oil Chemists Society 52, 423.
- ✚ Aghel, N., Yamini, Y., Hadjiakhoondi A., Mahdi Pourmortasavi, S., (2004): Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium L.* Essential oil. Talanta. 62: 407-411.
- ✚ Akamatsu, T., Tabata, K., Hironga, M., Kawakami, H., Uyeda, M., (1996): Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiber optic endoscopy. Am. J. Infect. Control. 24:396-401.
- ✚ Albertson, N., Wenngren, I., Sjöström, J.E., (1998): Growth and survival of *Helicobacter pylori* in defined medium and susceptibility to Brij 78. Journal of Clinical Microbiology. 36: 1232–1235.
- ✚ Ali-Shtayeh, M.S., Abu Ghdeib, S.I., (1999): Antifungal Activity of Plant Extracts Against Dermatophytes, Mycoses; 42(11-12):665-72. Pub Med PMID: 10680445.
- ✚ Alm, B., Erdes, L., Möllborg, P., (2008): Neonatal antibiotic treatment is a risk factor for early wheezing. Pediatrics. 121 : 697-702.
- ✚ Al-Said, M.S., Ageel, A.M., Parmar, N.S., Tariq, M., (1986): Evaluation of mastic, a Crude Drug obtained from *Pistacia lentiscus* for Gastric and Duodenal Anti-ulcer Activity, Ethnopharmacol. PubMed PMID: 3724207. analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass and Agriculture 77(1): 140-146. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures. 15(3):271-8.
- ✚ Andersen, A.P. (1997): Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media. Journal of Clinical Microbiology. 35: 2918-2922.
- ✚ Assimipoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., (2005): GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* .var. Chia. Biomedical Chromatography. 19, 285-311.
- ✚ Azevedo, N. F., Pacheco, A. P., Keevil, C. W., Vieira, M. J., (2004): Nutrient Shock and Incubation Atmosphere Influence Recovery of Culturable *Helicobacter pylori* from Water. Appl. Environ. Microbiol. 70: 490-493.
- ✚ Azevedo, N. F., Pinto, A. R., Reis, N. M., Vieira, M. J., Keevil, C. W., (2006): Shear Stress, Temperature, and Inoculation Concentration Influence the Adhesion of Water-Stressed *Helicobacter pylori* to Stainless Steel 304 and Polypropylene. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2936-2941.
- ✚ Bach, J.F. (2002): The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med. 347:911-20.
- ✚ Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, B.T., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, F.C., Gordon, J.I., (2004) : Le microbiote intestinal est un facteur environnemental qui régule le stockage des graisses Proc Natl Acad Sci Etats-Unis 101: 15718-15723.

- ✚ Broutet, N. (2000): Prévalence actuelle de l'infection à *Helicobacter pylori* et tendances évolutives en Europe. La lettre d'Hépatogastroentérologie, 3, vol. III: 136-7.
- ✚ Bruneton, J. (1999) : pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème} édition. Technique et documentation Lavoisier. Paris.915.
- ✚ Buchbauer, G., Jäger, W., Jirovetz, L., Ilmberger, J., Dietrich, H., (1993): Therapeutic properties of essential oils and fragrances. In: Bioactive Volatile compounds from plants. ACS Symposium Series 525 Washington DC: American Chemical Society.159-165.
- ✚ Bufford, J.D., Gern, J.E., (2005): The hygiene hypothesis revisited. Immunol Allergy Clin North Am.25:247-62.
- ✚ Canani, R.B., Cirillo, P., Roggero, P., (2006): Therapy with gastric acidity inhibitors increases the risk of acute gastroenteritis and community-acquired pneumonia in children. Pediatrics; 117:817-20.
- ✚ Castola, V., Bighelli, A., Casanova, J., (2000): Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. Biochemical Systematics and Ecology. 28, 79-88.
- ✚ Cayla, R. (1996) : Comment éradiquer *Helicobacter pylori* ? Conférence de consensus : texte du groupe de travail bibliographique. Gastro enterol. Clin. Biol. 20: S119-S130.
- ✚ Cebra, J.J. (1999) : Influences du microbiote intestinal sur le système immunitaire le développement Am J Clin Nutr 69: 1046S-1051S.
- ✚ Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P., (2004): Microbiology of Waterborne Diseases Elsevier Academic Press, San Diego. 91-115.
- ✚ Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., Stocker, P., (2008): Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria, Springerlink.
- ✚ Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P.V., Chema, F., (2004) : Comparison chemical composition. The Journal of Supercritical Fluids. 34: 149-156.
- ✚ Cimanga, K., (2002): Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J. Ethno pharmacology. 79, 213-220.
- ✚ Collin, J.J. (1991) : Isolation and production. Parfums. Cosmet. Arômes. Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida*. 97: 105.
- ✚ Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., (1989) : Extraction des huiles essentielles. Editions Tec & Doc, Editions. 4: 43.
- ✚ Cummings, J.H. (1997): The large intestine in Nutrition and Disease. Danone Chair Monograph n°3 – Institut Danone Bruxelles.
- ✚ Curry, A., Jones, D.M., (1990): The Genesis of Coccal forms of *Helicobacter pylori*. InDitschuneit, H., Malfertheiner, P. Eds. *Helicobacter pylori*, Gastritis and Peptic Ulcer. Springer-Verlag, New York. p. 29-37.
- ✚ Daferara, D., Pappas, C., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., (2003): Quantitative analysis of -pinene and α -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. Fito terapia. 74, 170-176.

- ✚ Darnton, N.C., Turner, L., Rojevsky, S., Berg, S.C., (2006) : "Le couple et de tumbling en natation *Escherichia coli*" . J Bacteriol. **189** (5).
- ✚ Degnan, A. J., Sonzogni, W. C., Standridge, J. H., (2003): Development of a Plating Medium for Selection of *Helicobacter pylori* from Water Samples. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2914-2918.
- ✚ Delchier, J.C. (1999): Comment éradiquer *Helicobacter pylori* ? Conférence de consensus *Helicobacter pylori* - Révision 1999 - Texte des experts - Question 2. Gastroenterol. Clin. Biol. 23, C20-C33.
- ✚ Deltenre, M., De Koster, E., Caucheteur, Otero, J., Jonas, C., (1996): Comment éradiquer *Helicobacter pylori* en 1995? Revue critique des traitements disponibles. Conférence de consensus : texte des experts. Gastroenterol. Clin. Biol. 20, S44-S52.
- ✚ Deng, C., Yao, N., Wang, A., Zhang, X., (2005): Determination of essential oil in atraditional Chinese medicine, *Fructusamomi* by pressurized hot water extraction followed by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. AnalyticaChimicaActa. Toulouse different extraction and headspace methods and gas chromatography. 536:237-244.
- ✚ Dob, T., Dahmane, D., Chelghoum, C., (2006): Chemical Composition of the Essential Oils of *Pistacia lentiscus L.* from Algeria. Journal of Essential Oil Research. 17, 642-644.
- ✚ Donelli, G. (1998): The effect of oxygen on the growth and cell morphology of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiology Letters. 168: 9–15.
- ✚ Dosso, M., Faye-kette, H., (2000) : « Contrôle de qualité de l'antibiogramme en pratique courante: Expérience du laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Le bactériologiste internationale, n° spécial: 53.
- ✚ Drugeon, H., Legallou, F., Caillon, J., (1991) : Méthodes d'étude de l'activité bactéricide. Bactéricidie. Aspcts théorique et thérapeutiques. Edité par : Courvalin, P., Drugeon, H., Flandrois, J.P., Goldstein, F., Maloine Paris.113-126.
- ✚ Dubois, A., N. Fiala, Heman-Ackah, L. M., Drazek, E. S., Tarnawski, A., Fishbein, W. N., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., (1994): Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. Gastroenterology.106:1405–1417.
- ✚ Ducluzeau, R., Raibaud, P., (1979) : Écologie microbienne du tube digestif - Actualités Scientifiques de l'INRA. Masson Ed. Paris.
- ✚ Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmadar, M., Izumi, S., Hirata, T., (2003): Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia species*. Fitoterapia. 74, 170-176.
- ✚ Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmadar, M., Izumi, S., Hirata, T., (2003): Chemical.effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction.essential oil from dried *Cuminum cyminum L.* and *Zanthoxylum*.
- ✚ Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., (2005) : Diversité du monde microbien intestinal humain. flore Sciences 308: 1635-1638. Effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. Ultrasonics Sonochemistry 8:137-142.

- ✚ Escherich, T. (1885): Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. Fortschr Med 3:515,522, 547-554.
- ✚ Espoir, M.E., Tenez, G.L., Kain, R., El-Omar, E.M., (2005) : sporadiques du cancer colorectal - rôle du microbiote commensal *FEMS Microbiol Lett.* 244: 1-7.
- ✚ Euzéby, J. P. (2007): posting date. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [Online].
- ✚ Evans, D.J., Evans, D.G., (1983): « Classification of pathogenic *Escherichia coli* according to serotype and the production of virulence factors, with special référence to colonization-factor antigens », Rev.Infect. Dis. 5, S692-S701.
- ✚ Evans, J.r., Doyle, J., Dolores, G., (2007) : "*Escherichia Coli*" Microbiologie médicale, 4^{ème} édition. L'Université du Texas Medical Branch à Galveston.
- ✚ Faith, N. G., Shere, J. A., R. Brosch, K. W. Arnold, S. E. Ansay, M. S. Lee, J. B. Luchansky, and C. W. Kaspar., (1996): Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol.* 62:1519-1525.
- ✚ Fan, X.G. (1998): Survival of *Helicobacter pylori* in milk and tap water. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.*13: 1096-1098.
- ✚ Fauchere, J.L. (1994): Infections gastriques à *Helicobacter pylori*. *GastroenteroL Clin. BioL.*18: 212-216.
- ✚ Fauchère, J.L. (1996): Evaluation of the anti-*Helicobacter pylori* serum antibody response. In: *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basic resaearch.* A. Lee and F. Mégraud ed. W.B. Saunders Company. pp. 50 – 73.
- ✚ Feidemann, J.(2005):*World Spices Plants: Economic Usage, Botany, Taxonomy* Springer Verlag, Berlin Heidelberg, European Union, p 196.fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract.
- ✚ Feng, P., Weagant, S., Grant, M., (2002): "Dénombrement des *Escherichia coli* et les bactéries coliformes» . *Bactériologiques Analytical Manual* (8e éd.). FDA.Center for Food Safety&Applied Nutrition.
- ✚ Ford, R.A., Api, A.M., Letizia, C.S., (1992): Monographs on fragrance raw materials. *Food Chem. Toxicol.* 30 (Suppl), from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food.*1S–138S.
- ✚ Fotadar, U., Zaveloff, P., Terracio, L., (2005). «La croissance de *Escherichia coli* à des températures élevées". *J.Microbiol base.* 45 (5): 403-4.
- ✚ Fukase, K., Kato, M., Kikuchi, S., et alsfor the Japan Gast Study Goup, (2008): Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopie resection of early gastric cancer: an open-label, randomized controlled trial, *Lancet.* 372:392-397.
- ✚ Gámiz-Gracia, L., Luque de Castro, M.D., (2000): Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta.* 51:1179-1185.
- ✚ Ganou, L. (1993) : Thèse de doctorat n° 689, Institut National Polytechnique.
- ✚ Gardeli, C., Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Theodosis, K., Komaitis, M., (2008): *Food Chemistry.* 107-1120–1130.

- ✚ Giacomo, A. (1994) : Transmission de l'infection à *Helicobacter pylori* chez l'enfant. Lettre de l'infectiologue, 4 Suppl: 8-10.
- ✚ Gilles, W. (1976) : L'Encyclopédie des Médecines Naturelles et des Secrets de Santé, Elina, Lavoisier, Paris.212-222.
- ✚ Giner-Larza, E.M., Manez, S., Giner-Pons, R.M., Recio, M.C., Rios, J.L., (2000): On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A2 activity of extracts from lanostane-rich species. Journal of Ethnopharmacology.73, 61-69.
- ✚ Glupczynski, Y. (1994) : Epidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* et méthodes diagnostiques. Anal Méd. Nancy-Est.33 : 89-93.
- ✚ Glupczynski, Y. (1997) : Sensibilité des *Helicobacter pylori* aux agents antimicrobiens. In : *Helicobacter pylori*: volume 2, Clinique, Traitement. F. Mégraudet H. Lamouliatteed. Collection Option Bio, Paris. 317 - 340.
- ✚ Glupczynski, Y., Burette, A., Deprez, C., Goossens, H., Van Den Boore, C., Butzler, J.P., (1992): Histological severity of gastritis in *Helicobacter pylori* infected people lacking a systemic antibody response. Isr. J. Med. Sci. 161 (suppl 10), 2819.
- ✚ Goodwin, C.S. (1989): *Campylobacter pylori*: detection and culture. In: Rathbone BJ, Heatly RV, eds. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 60–62.
- ✚ Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., (1990): Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). European Journal of Clinical Microbiology. 9: 1–13.
- ✚ Grimont, P. A. D. (1987) : Taxonomie des *Escherichia*. Méd Mal Infect:6-10.
- ✚ Gronlund, M.M., Lehtonen, O.P., Eerola, E., Kero, P., (1999) : de la microflore fécale dans les nourrissons en bonne santé nés par des méthodes différentes de prestation: permanente changements dans la flore intestinale après une césarienne. J Pediatr Gastro enterol Nutr. 28: 19-25.
- ✚ Gross, R.J., Rowe, B., (1985): « *Escherichia coli* dian-hoeae », J. Hyg. Camb.95, 531-550.
- ✚ Guenther, E. (1984): The essential oil. Oil of peppermint, Vol .III, Robert E. Krieger publishing Co. Int., New York.
- ✚ *Helicobacter* Foundation. (1994): *Helicobacter pylori*. 10th World Congress of Gastroenterology; Los Angeles, California. 2-7.
- ✚ *Helicobacter* Foundation. (2006): General. From http://www.helico.com/h_general. *Helicobacter pylori* positive peptic ulcer disease: systematic review and economic analysis, Am J Gastroenterol.
- ✚ Hildebrand, H., Malmberg, P., Askling, J., Ekbohm, A., Montgomery, S.M.,(2008): Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. Scand J Gastroenterol.13:1-6.
- ✚ Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stale, J.T., Williams, S.T., (1994): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9e ed. - Baltimore: Williams and Wilkins. 179-234.
- ✚ Hopkins, M.J., Sharp, R., Macfarlane, G.T., (2001) : Âge et de la maladie changements liés dans les populations bactériennes intestinales évaluée par culture cellulaire, 16S l'abondance, et la communauté des profils d'acides gras cellulaires *Gut* 48: 198-205.

- ✚ <http://info.fujita-hu.ac.jp/~tsutsumi/profile.htm>. Huiles Essentielles de Digne Les Bain, 99-109.
- ✚ <http://nobelprize.org/medicine/laureates/2005/index.html>.
- ✚ <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguide/unit1/bacpath/helico.htm>.
- ✚ Hurst, C.J., Knudsen, G.R., Mcinerney, M.J., Stetzenbach, L., Crawford, R.L., (2001): Manuel of Environmental Microbiology. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- ✚ Husson, M.O. (1991): Anti *Helicobacter pylori* IgG levels in abattoir workers. Gastroenterol Clin. Biol. 15: 723-726.
- ✚ Huwez, F.U, Thirlwell, D., (1998): Mastic Gum Kills *Helicobacter pylori*, New-England Journal of Medicine, 339.
- ✚ Iauk, L., Ragusa, S., Rapisarda, A., Franco, S., Nicolosi, V.M., (1996): In vitro Antimicrobial Activity of *Pistacia lentiscus* L. Extracts: Preliminary Report, Chemother ; PubMed PMID: 8808717. Internationals. 8(3):207-9.
- ✚ Iserin, P. (2001): Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soins 2^{ième} édition Ed Larousse/VUEF. 13-16, 250, 291-296.
- ✚ Jallat, C., Aubel, D., Darfeuille-Michaud, A., Joly, B., (1991): Toxines et adhérence du colibacille dans les diarrhées, Med. Mal. Infect. 21, 556-561.
- ✚ Janakat, S., Al-Merie, H., (2002): Evaluation of Hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*, Ethnopharmacol. 83(1-2):135-8. PubMed PMID: 12413719. Journal of Chromatography A. 1025: 105–113.
- ✚ Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., Kaper, J.B., (1990): A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proceedings of the national Academy of sciences of the United States of America. 87:7839-7843.
- ✚ Jiang, X., Doyle, M.P., (1998): Effect of environmental and substrate factors on survival and growth of *Helicobacter pylori*. Journal of Food Protection, 61: 929–933.
- ✚ Jijon, H., Backer, J., Diaz, H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C., De Simone, C., Madsen, K., (2004): d'ADN de bactéries probiotiques modulent murins et humaine fonction épithéliales et immunitaires gastroentérologie. 126: 1358-1373.
- ✚ Johnson, J.R. (1991): « Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection », Clin. Microbiol. Rev. 4, 80-128.
- ✚ Kamada, N., Inoue, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Matsuoka, K., Sato, T., Chinen, H., Hong, K.S., (2005): "Souche non pathogène de *Escherichia coli* Nissle1917 empêche murin de colite aiguë et chronique" Bowel Dis Inflamm. 11 (5): 455-463.
- ✚ Kaper, J. B., J. P. Nataro, and Mobley, H. L., (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2:123-140.
- ✚ Kelly, D., Campbell, J.I., Roi, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., Pettersson, S., Conway, S., (2004): Commensal bactéries intestinales anaérobies atténuent l'inflammation en régulant la navette nucléo-cytoplasmique de PPAR- γ et de RelANat Immunol. 5: 104-112.

- ✚ Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., Bahramifar, N., (2004): Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation. methods. Food Chemistry. 86: 587-591.
- ✚ Kim, N.S., Lee, D.S., (2002): Comparison of different extraction methods for the Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity.
- ✚ Kivçak, B., Akay, S., (2005): Quantitative determination of α -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* .var. chia, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry, Fitoterapia.76, 62-66.
- ✚ Koivisto, T.T., Rautelin, H.I., Voutilainen, M.E., Heikkinen, M.T., Koskenpato, J.P., FÄrkkilä, M.A., (2005): first-line eradication therapy for *Helicobacter pylori* in primary health care based on antibiotic resistance: results of three eradication regimens. Alim. Pharmacol & Therap. Mar. 21: 773-8.
- ✚ Koller, J., Baumer, U., Grosser, D., Schmid, E., (1997): Mastic' in Baroque and Rococo Lacquers, ed. K. Walch and J. Koller, Arbeitshefte des Bayerischen Landesamtesfür Denkmalpflege. Vol. 81, Karl M. LippVerlag, München. 347-358.
- ✚ Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H., Duru, M.E., (2003): Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia species* grown in turkey. Fitoterapia. 74, 164-167.
- ✚ Kubátová, A., Jansen, B., Vaudoisot, J.F., Hawthorne, S.B., (2002): Thermodynamic and kinetic model for the extraction of essential oil from savory and polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with hot (subcritical) water and supercritical CO₂. Journal of Chromatography A. 975: 175-188.
- ✚ Kurkin, V.A. (2003): phenylpropanoids from medicinal plants. Distribution, classification, structural analysis and biological activity. Chem. Nat. Compd.39, 123-153.
- ✚ Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Van den Brouke-Grauls, C.M.J.E., (1996): The morphological conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms is not an active process. In: Abstracts of the 36thInterscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC, American Society for Microbiology, 25.
- ✚ Lamouliatte, H., De Mascarel, A., Megraud, F., Samoyeau, R., (1997): Double-blind study comparing once daily versus twice daily dosage of PPI with amoxicillin-clarithromycin for *Helicobacter pylori* cure. Aliment. Pharmacol. Ther.41 (suppl 1): A93.
- ✚ Langezaal, C.R., Chandra, A.S., Cheffer, J.J.C. (1992): Antimicrobial screening of essential oils extracts of some *Humulus lupulus* 1. cultivars.KPharma. Week1. 14,353-356.
- ✚ Laurent, J., Megraud, F, F., Flejou, J.F., Caekaert, A., Barthelemy, P., Le CREGG et le group d'étude AZIMUT., (1999): Comparaison de quatre trithérapies associant l'oméprazole et deux antibiotiques pour l'éradication de *Helicobacter pylori* , intérêt de la bacampicilline et de l'azithromycine. Gastroenterolod. Clin. Biol.23:A116.
- ✚ Leclerc, H, Gaillard, J.L., Simonet, M., (1995): Microbiology générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris. Hurst, C.J., Knudsen, M., Mcinerny, J.,Stetzenbach, L., Crawford, R.R.,eds.2001. Manuel of Environmental.

- ✚ Legrand, G. (1993) : Manuel de préparateur en Pharmacie. Masson, Paris. limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*. 19:188.
- ✚ Levine, M. M. (1987) : *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis*. 155:377-389.
- ✚ Ley, R.E., Backhed, F. P., Turnbaugh, Lozupone, C.A., chevalier, R.D., Gordon, J.I., (2005) : L'obésité modifie l'écologie microbienne intestinale *Proc Natl Acad Sci Etats-Unis* 102: 11070-11075.
- ✚ Lin, Y. T., Kwon, Y. I., Labbe, R. G., Shetty, K., (2005): Inhibition of *Helicobacter pylori* and Associated Urease by Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Appl. Environ. Microbiol*. 71: 8558-8564.
- ✚ Lind, T., Veldhuyzen Van Zanten, S., Unge, P., Spiller, R., Bayerdorffer, E., O'Morain, C., (1996): Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH 1 study. *Helicobacter*; 1: 138-44.
- ✚ Longstreth, G.F., Thompson, W.G, Chey, W.D., Houghton, L.A., Mearin, F., Spiller, R.C., (2006): Functional bowel disorders. *Gastroenterology*.130:1480-1491.
- ✚ Luigia, L., Anna, S., Giuseppe, V., (2007): Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus L*, *Phillyrea latifolia L* and *Rubia peregrina L*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8, 360-364.
- ✚ Luque de Castro, M.D., Jiménez-Carmona, M.M., (1998): Conventional techniques for the isolation of valuable essential oils. *Trends Anal.Chem*. 17: 441.
- ✚ Madigan, M.T., Martinko, J.M., (2006): *Brock biologie des micro-organismes* (11e éd.). Pearson. ISBN 0-13-196893-9.
- ✚ Mahady, G.B., Pendland, S.L., Stoia, A., Hamill, F.A., Fabricant, D., Dietz, B.M., Ghdwich, L.R., (2005): In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytother Res*.19 (11):988-91.
- ✚ Marmonier, A. A. (1990) : Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. *Bactériologie Médicale, technique usuelles*. 227-236.
- ✚ Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E., Perversi, L., (2001): Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *Journal of Chemotherapy*.13, 611-614.
- ✚ Martini, M.C., Seiller, M., (1999) : Actifs et additifs en cosmétologie. *Procédés médicales internationales*.563.methods. *Food Chemistry*. 91: 639-644.
- ✚ Megraud, F. (1996): Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.*, 31 suppl. 215, 57-62.
- ✚ Mégraud, F. (1997) : Diagnostic bactériologique standard de l'infection à *Helicobacter pylori*. In : *Helicobacter pylori*: volume 1, Epidémiologie, Pathogénie, Diagnostic. F. Mégraud et H. Lamouliatte éd. Collection Option Bio, Paris. 249 - 266.
- ✚ Mengal, P., Mompon, B., (1994) : Brevet international, WO 94/26853, Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes.
- ✚ Meyers, M.A., (2007): *Happy Accidents*. Arcade Publishing, New York.101-113.

- ✚ Mitcheh, A., (1986) : Tous les Arbres de nos Forêts, édition Bordas. 319.
- ✚ Mobley, H.L.T. (1996): Defining *Helicobacter pylori* as a Pathogen: Strain heterogeneity and virulence. Am J Med. 100:S2-S11.
- ✚ Modzelewska, A., Sur, S., Kumar, K.S., Khan, S.R., (2005): Ses quiterpenes: Naturel products that decease cancer growth. Curr. Med.Chem. Anti-cancer Agents. 5, 477-499.
- ✚ More, D., White, J., (2005) : Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion.18, 797.
- ✚ Mountzouris, K.C., McCartney, A.L., Gibson, G.R., (2002) : de la microflore intestinale nourrissons humains et les tendances actuelles de sa modulation nutritionnelle. Br J Nutr. 87: 405-420.
- ✚ Moura, L.S., Carvalho, J.R.N., Stefanini, M.B., Ming, L.C., Meireles, M.A.A., (2005): Supercritical fluid extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*): global yield, composition and kinetic data. The Journal of Supercritical Fluids. Article in press.obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and kinetic data. The Journal of Supercritical Fluids. Article in press.
- ✚ Nataro, J. P., Kaper, J. B., (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11:1-142-201.
- ✚ Nilius, M. (1993): Coccoid like forms (clf) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. International Journal of Medical Microbiology, Virology, Parasitology and Infectious Diseases. 280: 259-272.
- ✚ Nista, E.C., Candelli, M., Zocco, M.A., Cremonini, F., Ojetti, V., finizio, R., Spada, C., Cammarota, G., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A., (2006): levofloxacibased triple therapy in firstline treatment for *Helicobacter pylori* eradication. The American journal of gastroenterology.101: 1985-90.
- ✚ Olson, C., De Bartolo, M., Hippensteel, R., Craft, J.C., (1995): The safety of dual therapy with clarithromycin and omeprazole in the treatment of patients with duodenal disease associated with *Helicobacter pylori* infection. 37 (suppl 37) : 43.
- ✚ Opdyke, J.A., Kang, J.G., Storz, G., (2004): GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 186: 6698-6705.
- ✚ Orskov, I., Orskov, F., (1985): « *Escherichia coli* extra-intestinal infections », J. Hyg. Camb.95, 551-575.
- ✚ Oussou, K.R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Koukoua, G., Dosso, M., N'guessan, Y.T., Figueredo, G., Chalchat, J.C., (2004) : « Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Cote d'Ivoire», C.R. Chimie 7.1081-1086.
- ✚ Ozel, M.Z., Gogus, F., Lewis, A.C., (2003): Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. Food Chemistry. 82: 381-386.
- ✚ Palevitch, D., Yaniv, Z., (2000): Medicinal plants of the Holy Land. Modan Publishing House, Tel Aviv,Israel.
- ✚ Papageorgiou, V.P., Bakola, Christianopoulou, N.M., Apazidou, K.K., E.E., (1997): Gaschromatographymass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. Journal of Chromatography A. 729, 263-273.

- ✚ Papageorgiou, V.P., Sageredos, A.N., Moser, R., (1981): GLC-MS computer analysis of the essential oil of *mastic gum*. *Chimica Chronika*, new series 10, 119-124.
- ✚ Pare, J.R., Belanger, J.M.R., Gigouin, M., (1989) : Actes 8^{èmes} Journées.
- ✚ Perineau, F., Ganou, L., Vilarem, G., (1992) : Studying Production of Lovage Essential Oils in a Hydrodistillation Pilot Unit Equipped with a Cohobation System. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 53: 165-171.
- ✚ Peyron, L., Richard, H., (1992) : L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits. *Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris.*
- ✚ Prescott, Harley, Klein (1995): *Microbiologie. De Boek-Wesmael S.A., 1014.*
- ✚ Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R., (2004): La reconnaissance de la microflore commensale by Toll-like récepteurs est nécessaire pour l'homéostasie cellulaire intestinale. *118: 229-241.*
- ✚ Rautava, S., Arvilommi, H., Isolauri, E., (2006): Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatr Res.*60:221-4.
- ✚ Remot, P. (1994): Infection gastrique à *Helicobacter pylori* : argument en faveur d'une transmission interhumaine du micro-organisme. *Anal. Méd. Nancy-Est.*33: 27.
- ✚ Reynolds, D.J., Penn, C.W., (1994): Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology.* 140: 2649-2656.
- ✚ Richard, H. (1992): *Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris.*
- ✚ Robert, G. (2000) : *Les sens du parfum. Osman Eroylls Multimedia. Paris.*224.
- ✚ Rodríguez, I., Gerbaud, V., Joulia, X., (2002): Feasibility of heterogeneous Batch Distillation Processes. *AIChE Journal.* 48(6): 1168-1178.
- ✚ Romani, A; Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., (2002) : Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus L.* *Phytochemical Analysis.* 13, 79-86.
- ✚ Romdhane, M., Tizaoui, C., (2005): The kinetic modeling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinellaanisum*) essential oil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 80: 759-766.
- ✚ Said, O., Khalil, K., Fluder, S., Azaizeh, H., (2002): Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology.* 83, 251-265.
- ✚ Salyers. A.A., Whitt, D.D., (2002): *Bacterial Pathogenesis A Molecular approach second edition. ASM Press, Washington D.C.*339-349.
- ✚ Sankarikutty, B., Narayanan, C.S., (1993): Isolation and Production. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press.* 2185-2189.
- ✚ Sansonetti, P.J. (1985) : « *Escherichia coli* entéropathogènes, données récentes sur la virulence », *Bull. Inst. Pasteur.* 83, 5-18.
- ✚ Scherrer, A.M., Motti, R., Weckerie, C.S., (2005): Traditional plant use in the areas of montevesole and ascea, cilento national park (compagnia, southern Italy).

Journal of Ethnopharmacology. secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatic* (Lamarck). 97, 129-143.

✚ Schmausser, B., Andrusis, M., Endrich, S., Lee, S.K., Josenhans, C., Muller-Hermelink, H.K., Schmausser, B., Andrusis, M., Endrich, S., Lee, S.K., Josenhans, C., Muller-Hermelink, H.K., Eck, M., (2004) : Expression and subcellular distribution of Toll-like. Expression et la distribution subcellulaire des Toll-likerecepteurs TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter* récepteurs TLR4, et TLR9 TLR5 sur l'épithélium gastrique à *Helicobacter pylori* infection. Clin Exp Immunol. 136: 521-526. Clin Exppylori Immunol. 136: 521-526.

✚ Seigue, A. (1985) : La Forêt Circumméditerranéenne et ses Problèmes, Maisonneuve & Larose, 22- 27, 137-139. spectrometry. Journal of Chromatography A. 982: 31-47.

✚ Sell, C.S. (2006): The Chemistry of Fragrance. From perfumer to consumer. 2nd edition. The royal society of chemistry. Cambridge. 329.

✚ Shanahan, F. (2002) : L'interface hôte-microbe dans l'intestin. Meill. Rés Pract Clin Gastroenterol. 16: 915-931.

✚ Sharma, Hoffmann, Darfeuille, Reignier, Findei, Sittka, Chabas, Reiche, Hackermüller, Reinhardt, Stadler & Vogel, (1984): The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*, - Nature -

✚ Sobala, G. M., Crabtree, J. E., Dixon, M. F., Schorah, C. J., Taylor, J. D., Rathbone, B. J., Heatley, R. V., and Axon, A. T., (1991): Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. Gut 32:1415–1418.

✚ Starmans, D.A.J., Nijhuis. (1996): Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. Trend in Food Science & Technology. 7:191-197.

✚ Stashenko, E.E, Jaramillo, B.E, Martiñez, J.R., (2004) : Analysis of volatile Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): The Journal of Supercritical Fluids. Article in press.

✚ Strockbine, N.A., Wells, J.G., Bopp, C.A., Barrett, T.J., (1998): Overview of detection and subtyping methods. Dans: Kaper JB, O'Brien AD, ed. Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains. Washington, DC: ASM Press: 331-356. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): The Journal of Supercritical Fluids. Article in press.

✚ Tassou, C.C., Nychas, G.J.E., (1995): Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacialentiscus* var. chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. Int. Biodeterior Biodegrad. 36, 411-420.

✚ Tepe, B., Donney, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Unlu, G.V., Polissiou, M., Sokmen, A., (2004): Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S.cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth) *S. multicaulis* (Vahl). Food Chem. 84, 519-525.

✚ Toma, M., Vinatoru M., Paniwnyk, L., Mason, T.J., (2001) : Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. Ultrasonics Sonochemistry 8:137-142

- ✚ Tomb, J., White, O., Kerlavage, A.R., (1997): The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 388: 539-547.
- ✚ Torkelson, A. R. (1996): *The Cross Name Index to Medicinal Plants*, CRC Press. 1160.
- ✚ Touchène, B., Matougui, N., Boudjella, M.L., (2010): Traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* en Algérie en 2010: impact de la bactérie aux antibiotiques 12^{ème} JFMC Alger.
- ✚ Toulgoat, K. (1996): Thèse de doctorat n°378, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- ✚ Tournaire, G. (1980): *Parfums Cosmét. Arômes*. 35: 43.
- ✚ Tytgat, G. N. (1995): Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 (Suppl. 2):105–10.
- ✚ Vagi, Simandi, E.B., Suhajda, A., Hethelyi, E., (2005): Food research international, Essential oil composition and antimicrobial activity of *origanum marorana L* Extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide.38, 51-57.
- ✚ Van Den Berg, K.J., Vander Horst, J., Boon, J.J., Sudmeijer, O., (1998): Cis-1, 4-poly-b-myrcene; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus L.*) elucidated. *Tetrahedron Letters*. 39, 2645-2648.
- ✚ Vanier, P. (1994): Les huiles essentielles et la thérapie par les huiles essentielles. *Guide Resources*. 9, 69-73.
- ✚ Vernozy-Rozand, C., Ray-Guentiot, S., (1997) : *Escherichia coli* O157-H7 et *Escherichia coli* vérotoxique : particularités physiologiques, biochimiques, méthodes d'isolement et détection dans le salimants. *Rev.Med.Vet.*148, 3, 169-178.
- ✚ Vinatoru, M. (2001) : An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonic Sonochemistry*. 8: 303-313.
- ✚ Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.O., Lazurca, D., Mason, T.J., (1997) : The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*. 4:135-139.
- ✚ Vincent, P. (1993) : Épidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* : quand et comment risque ton de s'infecter? *Lettre de l'infectiologue*. Vol. 8. 5 : 184-189.
- ✚ Vincent, P. (1994) : Quels sont les modes de contamination possibles de l'infection à *Helicobacter pylori* ? *Gastrographies*. 16.
- ✚ Wang, L., Weller, C., (2006): Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 1-13.
- ✚ Wang, Z., Ding, L., Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H., Liu, L., Li, Y., Liu, Z., Wang, H., Zeng, H., He, H.,(2006) : Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum L.* and *Zanthoxylum bungeannum* .*Maxim. Journal of Chromatography A*. 1102: 11-17.
- ✚ Warren, R. (1997): *Discovery and Pathology of Helicobacter pylori*. Xth International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter pylori*; Lisboa, Portugal.12-14.

- ✚ West, A.P., Miller, M.R., (1992): Tompkins DS. Effect of physical environment on survival of *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Pathology. 45: 228-231.
- ✚ www.biomerieux.com
- ✚ Yahia, M. (1992) : La Thérapeutique par les Plantes Communes en Algérie, Ain Taya.59.
- ✚ Yan, F., Polk, D.B., (2002) : bactérie probiotique empêche induite par les cytokines l'apoptose dans les cellules épithéliales intestinales J BiolChem. 277: 50959-50965.
- ✚ Yan, F., Polk, D.B., (2004) : Les bactéries commensales de l'intestin: l'apprentissage qui sont nos friends are. Curr Opin Gastroenterol. 20: 565–571.
- ✚ Zeng, H., He, H.H., (2006) : Improved solvent-free microwave extraction of Huiles Essentielles de Digne Les Bain. 99-109.
- ✚ Zrira, S., Elamrani, A., Benjilali, B, B., (2003) : Chemical composition of the essential oil of Pistacia Lentiscus L from Morocco. Aseasonal variation. Flavour and Fragrance journal, 18, 475-480.

Réactif NIT 2 5 ml	N,N-diméthyl-1-naphtylamine Acide acétique H ₂ O	0,6 g 30 g 70 ml
	CORROSIF	
	R34 : Provoque des brûlures. S2 : Conserver hors de portée des enfants. S23 : Ne pas respirer les vapeurs. S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.	
Réactif OX 5 ml	Tétraméthyl-p-phénylènediamine Alcool isoamylique	1 g 100 ml
	NOCIF	
	R10 : Inflammable. R20 : Nocif par inhalation. S24/25 : Eviter le contact avec la peau et les yeux.	
Réactif Zn 10 g	Zinc en poudre	
	INFLAMMABLE	
	R15 : Au contact de l'eau dégage des gaz très inflammables. R17 : Spontanément inflammable à l'air. S7/8 : Conserver le récipient bien fermé et à l'abri de l'humidité. S43 : En cas d'incendie utiliser de la poudre contre incendie provoqué par les métaux. "Ne jamais utiliser d'eau".	

CONSERVATION DES GALERIES

Les galeries sont présentes dans une poche en aluminium avec sachets déshydratants.

Après ouverture de celle-ci, conserver les galeries restantes avec les déshydratants en refermant la poche à l'aide de la barrette de fermeture (présente dans le coffret) : placer l'extrémité de la poche entre les deux pièces de la barrette et les clamer soigneusement, à fond, sur toute leur longueur. Les galeries peuvent ainsi être conservées **10 mois après ouverture de la poche**, à 2-8°C (ou jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage, si celle-ci est antérieure).

CONSERVATION DES REACTIFS

Les réactifs doivent être conservés à l'obscurité à 2-8°C (sauf TDA, VP 1 et NIT 1 qui peuvent être conservés à 2-30°C et Zn à 8-30°C) jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

Après ouverture des ampoules (et transfert des réactifs dans les flacons compte-gouttes), les réactifs peuvent être conservés 1 mois (ou jusqu'à la date limite d'utilisation si celle-ci est antérieure) : noter la date d'ouverture sur l'étiquette des flacons ou des ampoules. Les réactifs OX et JAMES sont très sensibles à la lumière : entourer les flacons d'une feuille d'aluminium et ne sortir les réactifs du réfrigérateur que le temps nécessaire à leur utilisation. Veiller à ne pas les laisser longtemps sur la paillasse.

UTILISATION DES REACTIFS

Laisser les réactifs revenir à la température ambiante (20-30°C) avant emploi.

1. Kit API 20 E réactifs :

- Ouvrir les ampoules de réactifs par une forte pression du pouce appliquée à la base de la partie inclinée du bouchon blanc.
- Tenir l'ampoule en exerçant une légère pression latérale sur le bouchon.
- Renverser complètement l'ampoule et la maintenir en position verticale.
- Accentuer la pression latérale pour laisser échapper une goutte de réactif.

NOTE : le fait d'appuyer sur le bouchon avant de renverser l'ampoule permet d'aspirer tout excès de réactif et évite de le répandre à l'extérieur du bouchon.

2. Réactifs TDA, VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2, OX :

- Ouvrir les ampoules de réactifs comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoule avec bouchon compte-gouttes).
- Délivrer une goutte de réactif.
- Bien refermer le flacon après usage et le conserver comme indiqué au paragraphe "Conservation des réactifs".

3. Réactif JAMES :

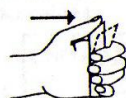
- Ouvrir l'ampoule de solvant associée au réactif JAMES comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoule sans bouchon compte-gouttes).
- Prélever le contenu de l'ampoule à l'aide d'une pipette très sèche et transférer ce solvant dans le flacon compte-gouttes (contient le principe actif desséché).
- Adapter l'embout compte-gouttes.
- Bien refermer le flacon.
- Agiter.
- Attendre 5-10 minutes pour une dissolution complète du principe actif.
- Utiliser le réactif ainsi reconstitué et bien refermer le flacon après usage et le conserver comme indiqué au paragraphe "Conservation des réactifs".

4. Réactif Zn :

- Ouvrir le flacon.
- Prélever un aliquot de poudre (de l'ordre de 2 à 3 mg) à l'aide de la spatule du bouchon et déposer cette quantité dans la cupule réactionnelle.
- Bien refermer le flacon après usage et le conserver comme indiqué au paragraphe "Conservation des réactifs".

PRECAUTIONS

- Destiné au diagnostic *in vitro* seulement.
- Un personnel de laboratoire qualifié doit utiliser les techniques aseptiques et les précautions habituelles contre les agents infectieux.
- Ne pas pipeter à la bouche les prélèvements et les réactifs.
- Ne pas employer les réactifs après la date d'expiration.
- Après la sortie du réfrigérateur, laisser les réactifs revenir à la température ambiante (20-30°C) avant emploi.
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
 - Tenir l'ampoule verticalement dans une main (bouchon blanc à la partie supérieure).
 - Bien enfoncer le bouchon.
 - Recouvrir la partie inclinée du bouchon avec la première phalange du pouce.
 - Appuyer avec le pouce sur la partie inclinée du bouchon avec un mouvement vers l'extérieur afin de casser l'extrémité de l'ampoule à l'intérieur du bouchon.
 - * Ampoule sans bouchon compte-gouttes :
 - Enlever délicatement le bouchon.
 - * Ampoule avec bouchon compte-gouttes :
 - Renverser l'ampoule et la maintenir en position verticale.
 - Appliquer une pression latérale sur le bouchon pour transférer la totalité du réactif dans le flacon compte-gouttes.
- Tous les produits inoculés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés de façon appropriée.
- Tous les prélèvements et cultures microbiennes doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés en suivant les précautions universelles (NCCLS M29-T2 : CDC manual Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1993).
- A la fin du test, après lecture et interprétation, tous les prélèvements, souillures et produits inoculés doivent être autoclavés, incinérés ou immergés dans un désinfectant germicide avant élimination.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite par un microbiologiste compétent qui prendra en considération le contexte clinique, l'origine du prélèvement, les aspects macro et microscopiques et éventuellement les résultats d'autres tests, en particulier l'antibiogramme.



MODE OPERATOIRE

Les prélèvements et cultures bactériennes doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée par un personnel compétent et averti.

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 "Universal Precautions (NCCLS M29-T2, *Protection of Laboratory Workers from Infectious Diseases Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue* - 2nd Edition; Tentative Guidelines)".

Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)," ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Déposer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Parallèlement, réaliser le test oxydase sur une colonie identique à celle qui sera étudiée comme suit :
 - déposer un morceau de papier filtre sur une lame de verre ;
 - humidifier avec une goutte d'eau ;
 - étaler la colonie choisie avec un applicateur de verre ou de bois ;
 - ajouter une goutte de réactif OX ;
 - une coloration violette apparaissant en 1-2 minutes, indique une réaction positive.

Cette réaction doit être notée sur la fiche de résultats car elle constitue le 21° test de l'identification.

NOTE : API 20 E doit être utilisé avec des bacilles à Gram négatif non fastidieux. Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 E. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule de NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule de Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoule sans bouchon compte-gouttes) ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- Prélèver à l'aide d'une pipette, une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

NOTE : la plupart des espèces de *Vibrio* sont halophiles. En cas de suspicion d'un *Vibrio*, réaliser la suspension bactérienne dans NaCl 0,85 % Medium.

api 20 E

Pour diagnostic *in vitro*

Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif

API 20 E est un système pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, utilisant 23 tests biochimiques standardisés et 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 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. 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.

REACTIFS

Composition du coffret réf. 20 100 (25 tests) :

- 25 galeries API 20 E
- 25 boîtes d'incubation
- 25 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice technique

Composition du coffret réf. 20 160 (100 tests) :

- 100 galeries API 20 E
- 100 boîtes d'incubation
- 100 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice technique

Produits complémentaires non fournis :

- NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (réf. 20 230) ou Suspension Medium, 5 ml (réf. 20 150)
- Kit réactifs (réf. 20 120) [TDA, IND, VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2, OX] ou réactifs individuels : TDA (réf. 70 400) JAMES (réf. 70 540) VP 1 (réf. 70 420) VP 2 (réf. 70 430) NIT 1 (réf. 70 440) NIT 2 (réf. 70 450) OX (réf. 70 460)
- Réactif Zn (réf. 70 380)
- Huile de paraffine (réf. 70 100)
- Pipettes ou PSipettes (réf. 70 250)
- Catalogue Analytique API 20 E (réf. 20 190) ou logiciel d'identification (consulter bioMérieux)
- Portoir pour ampoules (réf. 70 200)

Plus éventuellement :

- API OF Medium (réf. 50 110) : Test pour la détermination du métabolisme fermentatif et oxydatif du glucose.
- API M Medium (réf. 50 120) : Test pour la détermination de la mobilité des bactéries aéro-anaérobies.

Matériel de laboratoire nécessaire :

- Etuve (35-37°C)
- Réfrigérateur
- Bec Bunsen
- Crayon marqueur

COMPOSITION DES MILIEUX ET REACTIFS

NaCl 0,85 % Medium 5 ml	Chlorure de sodium Eau déminéralisée	8,5 g 1000 ml
ou		
Suspension Medium 5 ml	Eau déminéralisée	
Réactif TDA 5 ml	Perchlorure de fer H ₂ O	3,4 g qsp 100 ml
Réactif JAMES 5 ml	Composant J 2183 (confidentiel) HCl 1N	0,5 g qsp 100 ml
	S24/25 : Eviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau au moins pendant 10 minutes. En cas de contact avec la peau, laver avec du savon et beaucoup d'eau.	
Réactif IND 5 ml	Paradiméthylaminobenzaldéhyde Acide chlorhydrique H ₂ O Alcool isoamylique	5 g 9,25 g 15,75 ml 75 ml
	NOCIF R10 : Inflammable. R20 : Nocif par inhalation. S24/25 : Eviter le contact avec la peau et les yeux.	
Réactif VP 1 5 ml	Hydroxyde de potassium H ₂ O	40 g 100 ml
	CORROSIF R35 : Provoque de graves brûlures. S2 : Conserver hors de portée des enfants. S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. S27 : Enlever immédiatement tout vêtement souillé ou éclaboussé. S37/39 : Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage.	
Réactif VP 2 5 ml	α-naphtol Ethanol	6 g 100 ml
	FACILEMENT INFLAMMABLE S7 : Conserver le récipient bien fermé. S16 : Conserver à l'écart de toute source d'ignition - Ne pas fumer.	
Réactif NIT 1 5 ml	Acide sulfanilique Acide acétique H ₂ O	0,4 g 30 g 70 ml
	CORROSIF R34 : Provoque des brûlures. S2 : Conserver hors de portée des enfants. S23 : Ne pas respirer les vapeurs. S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.	

Inoculation de la galerie

- Remplir tubes et cupules des tests [CIT], [VP] et [GEL] avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24 heures.
- **Incubation pendant le week-end** : La lecture des réactions biochimiques de la galerie API 20 E doit se faire après 18-24 heures d'incubation. En cas d'impossibilité de lecture au bout de 24 heures d'incubation à 35-37°C (ex. incubation pendant le week-end), il est fortement recommandé de retirer les galeries de l'étuve et de les conserver à 2-8°C (réfrigérateur) jusqu'au moment où les réactions peuvent être lues.

Lecture de la galerie

- Après 18-24 h à 35-37°C, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
 - Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées.
 - Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positifs, révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron foncé** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
 - Test IND :
 - ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats ou
 - ajouter 1 goutte de réactif IND. Un anneau **rouge** obtenu en 2 minutes indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
 - Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant en 10 à 12 minutes doit être considérée **négative**.
 - Test NO₂ : ajouter 1 goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 3 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive**. Une réaction **négative** (coloration jaune) peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) : ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté **jaune** indique une réaction (N₂) **positive** à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est **rose-rouge**, la réaction est **négative**, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc.
- Cette réaction est intéressante pour les bacilles à Gram négatif oxydase positive.

NOTE : Les tests de réduction des nitrates et de la production d'indole doivent être réalisés en dernier, car ces réactions libèrent des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout de ces réactifs.

- Si le glucose est négatif et le nombre de tests positifs inférieur ou égal à 2, ne pas ajouter les réactifs :
 - Inoculer 2 ampoules d'API OF Medium pour vérifier le métabolisme du glucose.
 - Ensemencer un milieu de MacConkey.
 - Vérifier la mobilité : inoculer 1 ampoule d'API M Medium ou observer entre lame et lamelle au microscope.
 - Incuber la galerie 24 heures de plus.
 - Ajouter les réactifs comme indiqué plus haut.
 - Noter les réactions de la galerie et les résultats des tests complémentaires sur la fiche de résultats en se référant au Tableau de Lecture.

Identification

L'identification peut être obtenue :

- avec le Catalogue Analytique : Coder l'ensemble des réactions obtenues en un **profil numérique** : sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^e test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.
- avec le logiciel d'identification en entrant manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

Par ailleurs dans certains cas, le profil à 7 chiffres étant insuffisamment discriminant, les tests complémentaires suivants sont nécessaires :

- Réduction des nitrates en nitrites (NO₂)
- Réduction des nitrates en azote (N₂)
- Mobilité (MOB)
- Culture sur gélose de MacConkey (McC)
- Oxydation du glucose (OF-O)
- Fermentation du glucose (OF-F)

Ces tests complémentaires, mentionnés dans le Catalogue Analytique, peuvent être utilisés pour constituer un profil à 9 chiffres, identifiable avec le logiciel d'identification.



5 315 173 (57) *Enterobacter gergoviae*



Helicobacter pylori Selective Supplement (Dent) SR0147E

IVD

2-8°C



0 x	Vancomycin Trimethoprim	5.0 mg 2.5 mg	Cefsulodin Amphotericin B	2.5 mg 2.5 mg
------------	----------------------------	------------------	------------------------------	------------------

Precautions: Use sterile techniques at all times. Do not use beyond stated expiry date.
Precauciones: Manipular asepticamente durante todo el procedimiento. No utilizar una vez caducado.
Vorsichtsmassnahmen: Nur unter aseptischen Bedingungen arbeiten. Nicht nach Ablauf des Verfallsdatum verwenden.
Précaution: Travailler à chaque fois de manière stérile. Ne pas utiliser après la date d'expiration.
Precauzioni: Operare sempre in condizioni di sterilità. Non utilizzare dopo la data di scadenza.
Advarselsregel: Anvend steril teknik til hver en tid. Må ikke anvendes ud over den angivne udløbsdato.
Vorsiktighet: Använd alltid sterila tekniker. Använd inte produkterna efter deras utgångsdatum.
Precauções: Utilizar sempre a técnica estéril. Não utilizar depois de ter caducado o prazo de validade indicado.
Προφυλάξεις: Να χρησιμοποιείτε πάντοτε άσηπτη τεχνική. Μην χρησιμοποιείτε το προϊόν μετά την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.
注意: 常に滅菌処理を行ってください。記載されている使用期限を過ぎたものは、絶対に使用しないでください。

2 ml



Sterile distilled water	Sterilt destilleret vand
Agua destilada	Sterilt destillerat vatten
Steriles Aqua dest	Água Destilada Esterilizada
D'eau distillée stérile	Στείρο αποσταγμένο νερό
Acqua distillata sterile	滅菌蒸留水

Mix gently
Agitar suavemente
Vorsichtig mischen
Mélanger doucement
Agitare delicatamente

Homogeneizar com delicadeza
Bland försigtig
Blanda försiktigt
Αναμίξτε ελαφρά
そっと攪拌します。

Sterile medium	Sterilt medie
Del medio estéril	Sterilt medium
Steriles Medium	Meio estéril
Milieu stérile	Στείρο μέσο
Di coltura sterile	滅菌した培地

500 ml 50°C



Columbia Blood Agar Base (CM0331)
+ 35 ml Laked Horse Blood (SR0048)

Mix well
Mezclar bien
Gut mischen
Bien mélanger
Mescolare con cura

Bland godt
Blanda ordentligt
Misturar bëm
Αναμείξτε καλά
良く混和します

Dispense into sterile containers
Dispensar en envases estériles
In sterile Behältnisse abfüllen
Distribuire in contenitori sterili
Répartir de façon stérile

Dispensér i sterile beholdere
Dispensera i sterila behållare
Dispensar em recipientes estéreis
Μεταφέρετε σε στείρους περιέκτες
滅菌済みの容器に分注してください

ELIMINATION DU MATERIEL UTILISE LIMITATIONS

Après utilisation, ampoules, boîtes, pipettes et galeries doivent être incinérées ou décontaminées par autoclavage ou immersion dans un désinfectant avant d'être jetées.

- Le système API 20 E est destiné à l'identification des bacilles à Gram négatif non fastidieux présents dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice) et à eux seuls. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Des discordances par rapport aux techniques conventionnelles peuvent être observées dues aux différences de principe des réactions utilisées en technique API.
- Dans le cas d'identification à *Salmonella* spp., *Shigella* spp., ..., une identification sérologique doit être effectuée pour confirmer l'identification bactérienne.

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 au laboratoire avec les souches suivantes :

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO ₂	N ₂
1.	+	-	V	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	-	-	-	+	V	+	+	+	-	-	V	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+
4.	+	-	+	-	+	-	V	-	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5.	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-

- | | | | | | |
|--|------|-------|---|------|-------|
| 1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | ATCC | 51331 | 4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> | ATCC | 35657 |
| 2. <i>Enterobacter cloacae</i> | ATCC | 13047 | 5. <i>Escherichia coli</i> | ATCC | 25922 |
| 3. <i>Proteus mirabilis</i> | ATCC | 35659 | | | |

ATCC : American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA.

- Profil obtenu après 24-48 heures d'incubation pour la souche ATCC 51331, à partir de cultures obtenues sur gelose Trypcase Soja + sang
- Profils obtenus après 18-24 heures d'incubation pour les autres souches, à partir de cultures obtenues sur gelose Trypcase Soja + sang
- Suspension bactérienne préparée en NaCl 0.85 % Medium

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / IDENTIFIKATIONSTABELLE / TABELLA DE IDENTIFICAZIONE / TABELLA DE IDENTIFICAZIONE
 % de reacciones positivas après 24-48h à 35-37°C / % of positive reactions after 24-48 hrs at 35-37°C / % der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 35-37°C /
 % de las reacciones positivas después de 24-48 h a 35-37°C / % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 35-37°C

API 20 E	V.4.0	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	MOB	McC	O/F10	O/F6	
<i>Butyrivibrio fermentans</i>		100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0	100	0	100	100	100	100	
<i>Citrobacter amarae</i>		99	89	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0	99	0	100	0	87	100	100
<i>Citrobacter braconii</i>		50	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	100	0	95	100	100	100	100
<i>Citrobacter freundii</i>		90	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	99	82	40	99	0	98	0	95	100	100	100	100
<i>Citrobacter koseri/amaroblasticus</i>		99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0	100	0	95	100	100	100	100
<i>Citrobacter koseri/farmari</i>		99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0	100	0	95	100	100	100	100
<i>Citrobacter youngiae</i>		100	50	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100	0	85	0	95	100	100	100	100
<i>Edwardsiella ictaluri</i>		0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0	100	0	98	100	100	100	100
<i>Edwardsiella ictaluri</i>		0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0	100	0	98	100	100	100	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>		99	0	99	99	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	92	100	100	100	100
<i>Enterobacter amargonus 1</i>		99	25	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0	100	0	92	100	100	100	100
<i>Enterobacter amargonus 2</i>		99	80	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0	100	0	100	100	100	100	100
<i>Enterobacter asburiae</i>		100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	99	25	100	0	99	0	100	100	100	0	100	0	95	100	100	100	100
<i>Enterobacter caecogenus</i>		100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0	100	0	99	100	100	100	100
<i>Enterobacter cloacae</i>		99	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0	100	0	95	100	100	100	100
<i>Enterobacter gergoviae</i>		99	0	32	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0	100	0	90	100	100	100	100
<i>Enterobacter intermedius</i>		99	0	0	99	1	0	0	0	-2	2	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99	0	100	0	92	100	100	100	100
<i>Enterobacter sakazakii</i>		100	96	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100	100	100	100
<i>Escherichia coli 1</i>		90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99	0	100	0	95	100	100	100	100
<i>Escherichia coli 2</i>		26	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0	98	0	5	100	100	100	100
<i>Escherichia ferusonii</i>		96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0	100	0	93	100	100	100	100
<i>Escherichia hermannii</i>		100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	100	0	99	100	100	100	100
<i>Escherichia vulnere</i>		100	30	60	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	55	7	55	55	99	0	100	0	100	100	100	100	100
<i>Ewingella americana</i>		98	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	0	1	0	1	50	1	0	100	0	60	100	100	100	100
<i>Hafnia alvei 1</i>		75	0	99	98	50	0	10	0	0	50	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0	100	0	85	100	100	100	100
<i>Hafnia alvei 2</i>		50	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	0	0	0	1	0	100	0	0	100	100	100	100
<i>Klebsiella ornitholytica</i>		100	0	99	99	99	0	85	0	100	65	0	100	99	99	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100	100	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>		99	0	80	0	89	0	78	0	99	80	0	100	99	100	99	99	99	100	100	100	0	100	0	100	100	100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae</i>		94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	96	57	66	58	20	80	97	65	0	92	0	0	100	100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae</i>		99	0	73	0	86	0	75	0	0	90	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	0	100	100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae ssp. rhinoscleromatis</i>		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90	75	75	1	99	10	0	100	0	0	100	100	100	100
<i>Klebsiella terrigena</i>		100	0	99	6	52	0	0	0	0	75	0	99	99	99	99	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100	100
<i>Kluyvera spp.</i>		95	0	25	99	60	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	33	25	99	99	99	0	35	0	84	100	100	100	100
<i>Lecteria adecarboxylata</i>		99	0	0	0	0	0	1	0	99	0	1	100	99	0	2	100	66	99	99	100	0	100	0	100	100	100	100	100
<i>Moraxella wisconsinensis</i>		97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0	90	0	0	100	100	100	100
<i>Morganella morganii</i>		1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	0	1	0	0	0	90	0	0	95	100	100	100
<i>Pantoea spp 1</i>		85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	99	99	1	26	1	58	26	39	11	0	85	0	85	100	100	100	100
<i>Pantoea spp 2</i>		99	1	0	0	99	0	1	0	53	62	4	100	99	36	82	90	58	31	99	99	0	85	0	85	100	100	100	100
<i>Pantoea spp 3</i>		99	1	0	0	21	0	1	0	1	85	15	100	99	34	1	97	93	23	33	37	0	85	0	85	100	100	100	100
<i>Pantoea spp 4</i>		86	1	0	0	28	0	1	0	99	1	1	99	100	10	32	99	72	39	99	99	0	85	0	85	100	100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i>		1	0	0	99	99	75	99	96	9	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	1	0	99	0	95	100	100	100	100
<i>Proteus penneri</i>		1	0	0	0	11	20	100	99	0	50	99	0	1	0	0	0	100	0	1	0	0	99	0	85	100	100	100	100
<i>Proteus vulgaris</i>		1	0	0	0	12	33	99	99	97	0	74	99	1	0	0	1	89	0	86	1	0	100	0	94	100	100	100	100
<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>		0	0	0	0	80	0	0	100	99	0	0	99	1	1	0	0	1	0	0	1	0	100	0	96	100	100	100	100
<i>Providencia rattigeri</i>		1	1	0	0	74	0	99	99	0	0	0	98	82	78	1	50	25	0	40	1	0	98	0	94	100	100	100	100
<i>Providencia stuartii</i>		1	0	0	0	85	0	90	96	0	0	0	98	3	80	0	0	15	0	0	0	0	100	0	85	100	100	100	100
<i>Rahnella aquatilis</i>		100	0	0	0	50	0	0	1	0	99	0	100	100	0	98	99	100	97	100	98	0	100	0	8	100	100	100	100
<i>Salmonella anatum</i>		98	75	97	98	75	99	0	0	1	0	0	100	99	0	99	99	1	78	0	99	0	100	0	99	100	100	100	100
<i>Salmonella choleraesuis</i>																													