



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Hafidha MEDDOUR, Amel MENAI

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème

Effet inhibiteur de certaines huiles essentielles
sur *Escherichia coli* BLSE responsable
d'infections urinaires d'origine hospitalière

Jury :

Mlle.	Hanane ACHOUR	MAB	Université de Biskra	Président
Mme.	Imene MARZOUGUI	MCB	Université de Biskra	Examineur
M.	Fethi BENBLAID	MCB	Université de Biskra	Rapporteur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciement

On remercie ALLAH, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de mener à terme ce travail.

Notre remerciement s'adresse également à notre encadreur **Dr. BENBELAID Fethi**, pour avoir accepté de diriger ce travail, ainsi que son soutien, ses conseils, son encouragement et ses compétences.

Nos vifs remerciements pour les membres du jury.

Nous tenons également à remercier **Dr. KHALIL** Chef du laboratoire de Bactériologie d'hôpital Elhakim Saadan pour nous avoir accueillis au sein de leur laboratoire.

Nous remercierons tous les techniciens et les ingénieurs de laboratoire de département SNV de Biskra, qui sans eux ce travail ne sera réalisé, en particulier Mr Oualid et Mme Alima.

Enfin nous remercierons chacune des personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie humblement ce modeste travail

A mes très chers **Parents**

Qui ont toujours été là pour moi, m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance et qu'ils sont très fiers de ce que je suis aujourd'hui.

Qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.

A mon fiancé **Younes** qui m'a incarné de son soutien et son intérêt, sans oublier ses efforts qu'il a fournis pour moi.

À mes très chères sœurs: **Fatima zahra, Aziza, Hana et Wafa.**

À mes très chères frères : **Rafik, Fiycel et Mohamed-lamin.**

Pour mes grands frères : **Yousef** et son épouse **Sana** et son petit belle fille **Ranim. Lazhar** et son garçon **Anis, Adel** et sa femme **Rima** et leurs petite ange **Asil.**

A mon très chère grand-mère **Khadija.**

Aux grandes familles: **Menai et Ariayne.**

A mes amis intimes : **Selma et Sabah.**

A ma chère binôme : **Hafidha.**

A mes chères amies : **Khadija, Samira, Ahlem, Iman, Fatima, Hana, Belkis, Meriem, Sara, Manal et Anwar.**

Au souvenir des moments qu'on a passé ensemble.

Je vous souhaite beaucoup de succès, de réussite et de bonheur.

A tout mes collègues de promotion 2019.

À tout, qui ont partagé de près ou de loin mes années d'études

MENAI Amel

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère **Hadda**. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A mon cher père **Belkacem** qui m'a soutenu, veillé tout au long de ma vie à m'encourager.

Puisse dieu te garder et te procurer santé et longue vie.

A mes chères sœurs **Noura, Amira et Hanane** et son mari **Thabet** pour toute l'affection qu'elles m'ont donnée et pour leurs précieux encouragement.

A mes chers frères **Kamel, Nadhir, Nabil, Med El Amine et Nacer**

A mes chers oncles **Amar et Rachid**

Pour mes très chères amies Salima, Saida, Rima, Rabiaa, Meriem.

A mon fiancé **Rafik**.

A mon amie, binôme, collègue, partenaire dans tout **MENAI Amel** Je te souhaite tout ce que tu veux avec une vie pleine de la joie et de succès.

A toutes les personnes m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire.

MEDDOUR Hafidha

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Table des matières	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction.....	1

Première partie :PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: LES INFECTIONS URINAIRES

1.1. Généralités	3
1.2. Infections urinaires communautaires et nosocomiales.....	3
1.2.1. Infections urinaires communautaires	3
1.2.2. Infections urinaires nosocomiales	4
1.3. Microbiologie des infections urinaires	4
1.4. <i>Escherichia coli</i>	4
1.4.1. Généralités.....	4
1.4.2. Facteurs de virulence	5
1.4.2.1. Diversités génétiques et virulence (Les antigène somatiques)	5
1.4.2.2. Facteurs de virulence associés aux infections extra- intestinales	5
a) Les adhésines	5
b) Les invasines.....	6
c) Les toxines	6
d) Les systèmes de capture du fer	6
e) Facteurs de protection contre le système immunitaire « protectines ».....	6
1.4.3. Physiopathologie de l'infection à <i>Escherichia coli</i>	6
1.4.4. Résistance envers les Antibiotiques.....	8
1.4.4.1. Mode d'action du β -lactamines.....	8
1.4.4.2. Mécanisme de résistance	8
a) Mécanismes non enzymatiques.....	9
b) Mécanismes enzymatiques	9

Chapitre 2 : LES HUILES ESSENTIELLES

2.1. Généralités	10
2.2. Activité antimicrobienne	10
2.3. Activité anti-biofilm.....	11
2.4. Mode d'action	11

Deuxième Partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3 : MATERIEL ET METHODES

3.1. Huiles essentielles	12
3.1.1. Source du matériel végétal	12
3.1.2. Obtention des huiles essentielles	13
3.1.3. Conservation.....	14
3.2. Souches d' <i>Escherichia coli</i>	14
3.2.1. Souche de référence	14
3.2.2. Souches cliniques	15
3.2.2.1. Prélèvements	15
3.2.2.2. Etiquetage	15
3.2.2.3. Examen à la bandelette urinaire	15
3.2.2.4. Examen macroscopique des urines	16
3.2.2.5. Examen cytobactériologique des urines	16
a) Examen cytologique	16
b) Examen bactériologique	17
3.2.3. Identification	17
3.2.4. Antibiogramme	17
3.2.5. Sélection des souches cliniques.....	18
3.3. Activités antimicrobiennes des Huiles essentielles vis-à-vis les souches d' <i>E. coli</i>	18
3.3.1. Aromatogramme	18
3.3.2. Détermination des CMI de la croissance	19
3.3.3. Détermination des CMI de la formation de biofilms	19

Chapitre 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Rendements en huiles essentielles	21
4.2. Prélèvement	22
4.2.1. Description de la population étudiée	22
4.2.2. Examens macroscopiques des urines	22

4.3. Résultats primaires	24
4.3.1. Résultats de la bandelette urinaire	24
4.3.2. Résultats de l'examen cytologique quantitatif	24
4.3.3. Examen cytologique qualitatif.....	25
4.4. Résultats bactériologiques	26
4.4.1. Résultats de la culture bactérienne	26
4.4.1.1. Répartition des germes identifiés	26
4.4.1.2. Fréquences des urines infectées en fonction du sexe	27
4.4.1.3. Fréquences des urines infectées en fonction de l'âge.....	28
4.4.1.4. Répartition des urines infectées et non infectées en fonction du lieu de prélèvement.....	29
4.5. Étude de la sensibilité des souches <i>E.coli</i> envers les antibiotiques	29
4.6. Effets des huiles essentielles envers <i>E. coli</i>	31
4.6.1. Diamètres des zones d'inhibition	31
4.6. 2. CMI de croissance	32
4.6.3. CMI des biofilm.....	33
Conclusion	36
Références Bibliographique.....	38
Annexe	
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 1. Données sur les espèces végétales retenues et leurs utilisations.....	13
Tableau 2. Rendements en huiles essentielles rapportés dans la littérature.	21
Tableau 3. Comparaison des rendements en huiles essentielles des plantes étudiées avec d'autres travaux.	22
Tableau 4 . Répartition selon l'aspect macroscopique des urines prélevées à partir des patients hospitalisés.	23
Tableau 5. Résultats de la chimie des urines analysées.....	24
Tableau 6. Résultats de la culture bactérienne.	26
Tableau 7. Répartition des germes identifiés.	27
Tableau 8. Fréquences des urines infectées en fonction du sexe	28
Tableau 9. Fréquences des urines infectées en fonction des tranches d'âge	28
Tableau 10. Répartition des urines infectées et non infectées en fonction du lieu de prélèvement.....	29
Tableau 11. Résultats des antibiogrammes réalisés des souches <i>E. coli</i>	30
Tableau 12. Les résultats de méthode des disques	31
Tableau 13. Résultats des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles (%)	32
Tableau 14. Effet d'inhibiteur des huiles essentielles étudiées vis-à-vis des souches <i>d'E. coli</i> en état du biofilm.....	34

Liste des figures

Figure 1. Physiopathologie de l'IU (Bidet <i>et al.</i> , 2012).	8
Figure 2. L'appareil utilisé pour l'extraction des huiles essentielles par hydro distillation. ...	14
Figure 3. Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'ECBU. (Le REMIC, 1998).....	16
Figure 4. L'aspect macroscopique des urines :(A) claires (B) troublées.....	23
Figure 5. L'aspect de certains cristaux sous microscope optique	25
Figure 6. Résultat d'une coloration de Gram (Bacilles à Gram négatif) (G. x100).	25
Figure 7. Résultat des concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle (A) <i>Artemisia herba-</i> , (B) <i>Ammoides pusilla</i>	33
Figure 8. Les résultats de l'activité antimicrobienne des CMIBs des HEs.....	34

Liste des abréviations

AHA : Artemisia herba-alba Asso.

AP : Ammoides pusilla (Brot.) Breist.

ATB : Antibiotique.

ATCC : American Type Culture Collection.

BHIB: Brain Heart Infusion Broth.

BLSE : bêta-lactamases à spectre étendu.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

CMIB : concentration minimale inhibitrice du biofilm.

E. coli: Escherichia coli.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

GN : gélose nutritif.

HE : huile essentielle.

IU : Infection urinaire.

IUN : Infection urinaire nosocomial.

MH : Muller Hinton.

OG : Origanum vulgare subsp. glandulosum (Desf.) Ietsw.

PLP : protéines liant les pénicillines.

TLR4 : toll-like receptor 4.

REMIC : Référentiel en microbiologie médicale.

Introduction

Introduction

L'infection urinaire demeure à nos jours un problème majeur de santé publique tant qu'en milieu communautaire qu'en milieu hospitalier. L'intérêt porté ces dernières années aux infections urinaires et leur prise en charge en thérapeutique anti-infectieuse restent encore d'actualité. En effet, ces infections constituent un véritable problème de santé publique non seulement par leur fréquence, mais également par leur difficulté de traitement.

Microbiologiquement parlant, les germes les plus fréquemment isolés sont les entérobactéries avec un taux de 81 % (69,4 % *Escherichia coli*, 5,2 % *Proteus mirabilis*, groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* 5,3 %, 1,3 % *Citrobacter freundii*)...puis des cocci à gram positif 12,9 % (2,2 % *Staphylococcus aureus*, 0,7 % *Staphylococcus epidermidis*, 0,6 % *Staphylococcus saprophyticus*, 1,9 % *Streptococcus agalactiae*, 7,4 % *Enterococcus spp*) (De Mouy et Cavallo, 1999).

En médecine humaine, le traitement des infections bactériennes est généralement basé sur l'utilisation des antibiotiques. Toutefois la fréquence élevée des résistances aux antibiotiques constatées chez les bactéries pathogènes complique la conduite thérapeutique des pathologies infectieuses en justifiant d'une part, l'évaluation de l'efficacité de ces médicaments et d'autre part la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes.

Actuellement, les chercheurs à travers les cinq continents ont confirmé que les plantes se présentent comme une source prometteuse de molécules bioactives (Lamassiaude-Peyramaure, 2008). En effet, 80% de la population mondiale ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, non seulement par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une efficacité thérapeutique indéniable (Didier *et al.*, 2011). Malheureusement, le savoir des tradipraticiens dans le traitement par les plantes dites médicinales est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela, l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives pour préciser leurs propriétés ainsi que pour valider les usages (Van Pelt *et al.*, 2001).

Dans le même axe de recherche de molécules bioactives issues des plantes aromatiques et médicinales, nous nous sommes intéressé à l'étudier l'effet inhibiteur de trois huiles essentielles à savoir *Artemisia herba-alba* Asso. (الشيح), *Ammoides pusilla* (Brot.) Breist. (نونخة) et *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietsw. (مردقوش) sur des biofilms d'*Escherichia coli* (BLSE) responsables d'infections urinaires d'origine hospitalière.

Le manuscrit est structuré de la façon suivante :

- ❖ La première partie est une synthèse bibliographique sur les infections urinaires et les huiles essentielles.
- ❖ La deuxième partie consiste à la présentation du matériel et les méthodes utilisés dans ce travail.
- ❖ Et enfin, la troisième partie, sera consacrée à la présentation des résultats et leurs discussions.

Partie
Bibliographique

Chapitre 1.

Les infections urinaires

1.1. Généralités

On parle d'infection urinaire (IU) en présence d'un germe pathogène dans l'urine et en présence d'une symptomatologie compatible ; fièvre, pollakiurie, impériosité, brûlure mictionnelle (Pourcine, 2010; Schmiemann *et al.*, 2010). Biologiquement, elle est définie par la présence des micro-organismes dans l'urine, qui peuvent générer une réponse inflammatoire, (au moins à 10^5 germes par ml d'urine accompagnée d'une leucocyturie pathologique $>10^4$ par ml d'urine) (Prakash et Ramasubramanian, 2016).

On peut classer les IU selon deux paramètres :

Selon la localisation

L'infection urinaire peut être localisée dans les voies urinaires basses (cystite, urétrite, épiddymite), ou hautes (pyélonéphrite) (Chekroud et Fathi, 2017).

Selon la complication

*Infections urinaires simples : sont des infections survenant chez des patients ne présentant pas de facteur de risque de complication. Les IUs simples comprennent les cystites aiguës simples et les pyélonéphrites aiguës simples (Chekroud et Fathi, 2017).

* Infections urinaires à risque de complications : ce sont des IUs survenant chez des patients ayant au moins un facteur de risque de complication ;

- les anomalies organiques ou fonctionnelles de l'arbre urinaire, quelle que soient : résidu vésical, reflux, lithiase, tumeur, acte récente.

- certaines situations pathologiques : diabète, insuffisance rénale,...).

- certains terrains physiologiques (, sujet âgé avec une comorbidité, grossesse...).

* Cystite récidivante sont qualifiées de récidivantes les cystites qui se répètent avec une fréquence particulièrement élevée (la survenue de 4 épisodes durant une période de 12 mois consécutifs)(Chekroud et Fathi, 2017).

1.2. Infections urinaires communautaire et nosocomiale

1.2.1. Infections urinaires communautaires

Il s'agit d'une infection urinaire survenant en dehors d'une structure de soins (Marrich, 2008). Elle est provoquée par la propre flore du malade à partir des germes cutanés (*staphylocoques* à coagulase négative, *corynébactéries*), ou muqueuses du périnée, de la peau

de l'abdomen ou digestifs d'origine intestinale (*entérobactéries, streptocoques, anaérobies*) (Lentilhac, 2002).

1.2.2. Infections urinaires nosocomiales

Une infection nosocomiale ou une infection liée au soin est une contagion en étant contractée au cours d'un séjour dans un hôpital ou d'un autre type d'institution de soins (Prescott *et al.*, 2010). Les symptômes cliniques apparaissent qu'après la 48^{ème} heure d'hospitalisation. Une infection urinaire nosocomiale est acquise dans une structure de soin (sans exclusive) ou d'une manière plus générale reliée à la prise en charge du patient .Elle peut concerner les personnes séjournant, visitant ou travaillant à l'hôpital (Ellenberg, 2005).

Les facteurs de risque d'acquisition de ce type d'infections sont donnés par le sondage urinaire (80% des infections), les instrumentations (endoscopie et chirurgie dans 5 à 10% des cas) et manœuvre diagnostique (Karaterki, 2009).

1.3. Microbiologie des infections urinaires

La plupart des germes responsables d'infections de l'appareil urinaire sont des entérobactéries, des bactéries appartenant à la flore commensale habituelle du tube digestif, dominées par *Escherichia coli*, responsable de 85% des infections communautaires et 50% des infections hospitalières. D'autres germes peuvent être isolés, notamment dans les infections en ville: des entérobactéries à Gram- (*Proteus, Klebsiella*) et des bactéries à Gram+ (*Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus saprophyticus*). Concernant les infections nosocomiales, ce sont le plus souvent causés par *Enterococcus faecalis* mais aussi à *Klebsiella* ; *Enterobacter* ; *Citrobacter* ; *Serratia* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Providencia* et *Staphylococcus epidermidis* (Mahi, 2016).

1.4. *Escherichia coli*

1.4.1. Généralités

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, appartenant à la classe des protéobactéries. *Escherichia* sont des bactéries bacilles à Gram négatifs, aérobie-anaérobies facultatifs. *E. coli* est une bactérie mobile, parfois immobile, avec une structure flagellaire péritriches et non-sporulée. *E. coli* est une bactérie non exigeante avec une température optimale de croissance de 37°C. Elle est capable de croître sur des milieux ordinaires en donnant des colonies lisses, brillantes et homogènes (Lobry, 1991). Cette espèce bactérienne possède l'enzyme de catalase mais est dépourvu d'oxydase (Gueye, 2007). Elle fermente le glucose et le lactose avec la production de gaz. Elle est dépourvue d'uréase,

produite de l'indole, n'utilise pas le citrate de Simmons comme source de carbone, et ne produit pas d'hydrogène sulfuré (King *et al.*, 2014).

E. coli constitue une espèce bactérienne sous-dominante du microbiote aérobie-anaérobie facultatif intestinale de l'homme et des animaux. Sachant que cette bactérie représente 80 à 90 % des coliformes thermo tolérants ou coliformes fécaux (capables de fermenter le lactose à 44,5°C) qui constituent un sous-groupe des coliformes totaux.

Enfin, l'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (Tenaillon *et al.*, 2010).

1.4.2. Facteurs de virulence

1.4.2.1. Diversités génétiques et virulence (Les antigènes somatiques)

Comme toutes les autres entérobactéries, *E. coli* possède trois antigènes majeurs à savoir l'antigène somatique O qui forme avec des endotoxines le lipopolysaccharide (LPS) ; l'antigène capsulaire K et l'antigène flagellaire H.

1.4.2.2. Facteurs de virulence associés aux infections extra- intestinales

On peut classer ces facteurs en cinq catégories : les adhésines qui permettent les cellules d'adhérer aux épithéliums humains, les invasines et les toxines qui favoriseraient la traversée des barrières digestive ou urinaire vers la circulation sanguine puis du sang vers le LCR (barrière hémato- méningée), les systèmes de capture du fer et enfin, les facteurs de protection contre le système immunitaire (complément, phagocytose) (Bidet *et al.*, 2012).

a) Les adhésines

Les adhésines sont des protéines de la surface du corps bactérien dont leur structure stéréochimique leur permet de reconnaître des récepteurs présents à la surface des cellules hôtes. Les adhésines d'*E.coli*, impliquées dans les pathologies extra- intestinales, se présentent sous la forme de pili :

Pili de type 1 : les pili de type 1 ont un rôle important dans l'infection urinaire basse (cystite). Son adhésine, FimH, accrochée au sommet des pili, se lie spécifiquement aux résidus D- mannose fixés à la surface de glycoprotéines membranaires des cellules vaginales, les cellules périnéales, les cellules vésicales et les entérocytes.

Pili de type P : Les fimbriae P sont morphologiquement très proches des fimbriae de type 1. Ils sont constitués d'un empilement hélicoïdal d'une protéine majeure et d'une

adhésine située à l'extrémité du fimbriae. Cette dernière est responsable de l'agglutination des hématies du groupe P (glycosphingolipides membranaires) et reconnaît le disaccharide α -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal de ce groupe sanguin (Bidet *et al.*, 2012).

b) Les invasines

On appelle invasines les structures permettant à la bactérie d'être internalisée dans la cellule afin de traverser une barrière épithéliale et/ou endothéliale par transcytose (Bidet *et al.*, 2012).

c) Les toxines

Différents types de protéines capables de provoquer des altérations de la forme ou bien de la fonction des cellules de l'hôte. Dans les infections extra- intestinales, les toxines sont supposées jouer un rôle dans la fragilisation des barrières épithélio- endothéliales facilitant le passage de *E. coli* des urines dans le sang (uro-sepsis), puis du sang dans le LCR (méningite). (L'hémolysine α ; La toxine Sat, Facteur cytotoxique et nécrosant 1) (Bidet *et al.*, 2012).

d) Les systèmes de capture du fer

Certaines bactéries sont des sidérophores, acquérant le fer de l'hôte au bénéfice de leur croissance et de leur développement. Elles codent pour des systèmes de chélation du fer tels que l'aérobactine. Ce dernier est codé chez *E. coli* par les gènes responsables de la résistance aux antibiotiques (Ait Miloud, 2011).

e) Facteurs de protection contre le système immunitaire « protectines »

Le terme de protectines regroupe facteurs permettant à la bactérie de se protéger contre les deux armes majeures du système immunitaire de l'hôte : le complément sérique et la phagocytose/lyse par les cellules de la lignée macrophagique et les polynucléaires neutrophiles (Bidet *et al.*, 2012).

1.4.3. Physiopathologie de l'infection à *Escherichia coli*

A cause de la présence de facteurs de virulence, l'infection urinaire par *E. coli* débute par la colonisation du tube digestif par cette souche uropathogène qui colonise l'aire périurétrale et migre le long de l'urètre vers la vessie, puis le long de l'uretère vers le rein (Figure 1). La migration d'*E. coli* en dépit du flux urinaire requiert son attachement à la surface des cellules épithéliales par l'intermédiaire des différentes adhésines. Parmi les nombreuses adhésines, deux jouent un rôle majeur: les pili de type 1 pour la colonisation de la vessie et les pili de type P pour l'invasion du parenchyme rénal. L'interaction de l'adhésine FimH des pili de type 1 avec les récepteurs mono- mannose à la surface des cellules vésicales facilite l'internalisation de la bactérie et conduit à la formation de communautés bactériennes

intracellulaires dans une matrice de biofilm. Elles sont ensuite relarguées dans la lumière vésicale ou restent quiescentes faisant le lit de la récurrence de l'infection urinaire. Cette internalisation et cette persistance d'*E. coli* dans les voies urinaires basses seraient renforcées en présence de la toxine CNF1 (facteur cytotoxique nérosant 1). Face à l'infection de la vessie, seule l'immunité innée peut entrer en action. Durant les deux premières heures, elle est essentiellement liée à l'action des défensines. Par la suite, l'adhésion *via* les pili de type 1 et les pili de type P va être à l'origine de la réponse inflammatoire. En l'absence de CD14 libre dans les urines, cette adhésion sert de cofacteur lors de la reconnaissance du complexe LPS (lipopolysaccharide binding protein) par les TLR4 (toll-like receptor 4) des cellules vésicales. L'activation des TLR4 induit la sécrétion de cytokines chimiotactiques aboutissant à un afflux de polynucléaires neutrophiles. Les bactériuries asymptomatiques sont reliées soit à une déficience de l'hôte en TLR4, soit à un phénomène de dépilation des *E. coli* intra vésicaux. L'expression continue de fimbriae de type 1 confine l'infection à la vessie. Les souches d'*E. coli* responsables de pyélonéphrites aiguës bloquent leur synthèse de fimbriae de type 1 en invalidant le promoteur en position « off », et peuvent ainsi migrer le long des uretères en dépit du flux urinaire. La migration est favorisée par l'expression des fimbriae de type P. Le passage de la bactérie dans la circulation sanguine serait facilité par la déstabilisation de l'épithélium rénal par des cytotoxines comme l'hémolysine α ou la toxine Sat. Une fois dans la circulation sanguine, la bactérie se protège du système immunitaire par les différentes structures (capsule, LPS) et par les protéines de surfaces permettant notamment d'échapper à l'activité bactéricide du complément et à la phagocytose. Tout au long de sa progression, aussi bien dans les urines que dans le sang, *E. coli* va devoir trouver les éléments nécessaires à sa croissance et notamment le fer en utilisant les nombreux systèmes de capture (Bidet *et al.*, 2012; Zenati, 2016).

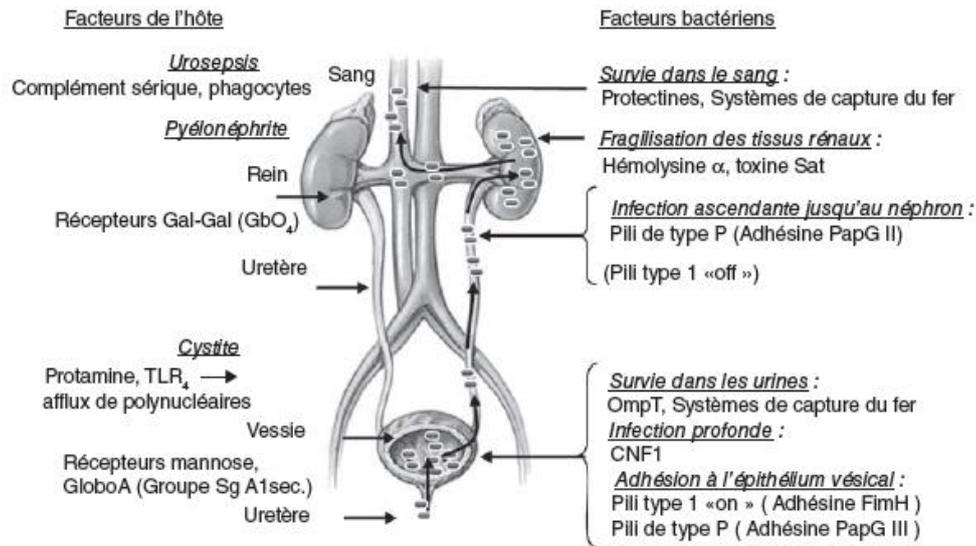


Figure 1. Physiopathologie de l'IU (Bidet *et al.*, 2012).

1.4.4. Résistance envers les Antibiotiques

E. coli est naturellement résistante à la pénicilline G, l'oxacilline, les macrolides, les kétolides, les lincosamides, les streptogramines, l'acide fusidique, les glycopeptides, les oxazolidinones, les lipopeptides et sensible à l'ensemble des β -lactamines, (Courvalin et Leclercq, 2012). *E. coli* est naturellement sensible à l'ensemble des pénicillines (exceptée les pénicillines G et M), des céphalosporines, des carbapénèmes, des quinolones, des aminosides, à la fosfomycine et à la nitrofurantoïne (Galperine *et al.*, 2014).

1.4.4.1. Mode d'action du β -lactamines

Le mode d'action des β -lactamines repose sur l'inhibition de la synthèse de la paroi des bactéries en phase de croissance, par blocage de la synthèse du peptidoglycane. Pour exercer leur mode d'action chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamines doivent passer à travers la membrane externe via la voie des porines. Une fois cette barrière franchie, elles diffusent facilement à travers le peptidoglycane pour atteindre l'espace périplasmique. A ce niveau, les β -lactamines doivent échapper à l'action des β -lactamases produites par plusieurs bactéries à Gram négatif pour pouvoir atteindre la membrane cytoplasmique où se trouvent leurs cibles, les transpeptidases (encore appelées PLP « protéines liant les pénicillines ») (Cavallo *et al.*, 2004).

1.4.4.2. Mécanisme de résistance

La résistance aux β -lactamines implique des mécanismes non enzymatiques comme l'imperméabilité de la membrane externe, l'hyper expression de systèmes d'efflux actif et la

modification des PLP, ou enzymatiques, par production d'enzymes inactivant les β -lactamines, appelées β -lactamases (Cavallo *et al.*, 2004).

a) Mécanismes non enzymatiques

L'imperméabilité de la membrane externe empêche la pénétration de l'antibiotique ou limite sa concentration dans l'espace périplasmique. Chez *E. coli*, elle est liée à des mutations altérant la structure ou le nombre des porines (Pagés et Garnotel, 2003).

b) Mécanismes enzymatiques

La résistance enzymatique aux β -lactamines par production d'enzymes inactivatrices ou β -lactamases constitue de loin le mécanisme le plus répandu chez *E. coli* (Pitout, 2012).

La gravité des infections urinaires nosocomiales est liée au développement de résistance des bactéries à de nombreux antibiotiques. Cette résistance est le plus souvent due à des plasmides transférables d'une bactérie à une autre. Il peut aussi s'agir de sélection de mutants résistants (Léone *et al.*, 2000).

Chapitre 2.

Les huiles essentielles

2.1. Généralités

La définition des huiles essentielles (HEs) indique clairement leurs origines et leurs modalités d'obtention. Une huile essentielle est définie ainsi « c'est une substance odorante, généralement de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Elle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ». (Bourrain, 2013). Cette définition est restrictive : elle exclut d'une part les produits odorants d'origine animale, et d'autre part les essences obtenues selon d'autres procédés d'extraction (Hamoudi, 2008).

Le mode d'extraction des huiles essentielles isole la partie volatile odorante des plantes. Il s'agit d'un mélange de substances chimiques s'oxydant facilement ce qui implique la nécessité de conditions strictes de stockage, car cette oxydation augmente le pouvoir allergénique d'un certain nombre de molécules présentes (Hagvall *et al.*, 2008). Leur composition est variable en fonction de la partie concernée de la plante, mais aussi selon l'origine géographique des végétaux utilisés.

Les composants des huiles essentielles peuvent être partagés en trois grands groupes :

- ❖ Les terpènes: monoterpènes et sesquiterpènes dont les formes oxydées et hydrocarbonés.
- ❖ Les composés aromatiques, ex : alcool cinnamique, coumarine...
- ❖ D'autres composés très divers (acides, alcools, aldéhydes, esters...) (Bourrain, 2013).

2.2. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement en fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs (Yakhlef, 2010).

Les huiles essentielles sont très utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires (Benbelaid, 2015) ou la microflore vaginale (Arnal-Schnebel *et al.*, 2004), et d'origine fongique, comme les dermatophytes (Hamoudi, 2008). Les moisissures allergisantes (Chaumont et Leger, 1989), ou les champignons opportunistes (Chaumont et Léger, 1992). Elles présentent également des propriétés cytotoxiques (Sivropoulou *et al.*, 1996) qui les rapprochent donc des antiseptiques et les désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Toutefois, il existe une disparité dans l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, car elle est plus dirigée envers les champignons que les bactéries et beaucoup plus actives contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif (Burt, 2004).

2.3. Activité anti-biofilm

Il est connu que les biofilms microbiens sont difficiles à éradiquer par les agents antimicrobiens standards, tels que les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques. Par contre, à travers des recherches effectuées récemment, les huiles essentielles sont avérées très efficaces vis-à-vis des biofilms microbiennes. D'après (Niu et Gilbert, 2004), les huiles essentielles à faible concentration inhibent la formation des biofilms bactériens par plusieurs mécanismes. Notamment, l'activation des gènes de réponse contre stress qui à leur tour diminuent la production des polysaccharides extracellulaires. En plus, les huiles essentielles peuvent interagir avec les protéines des surfaces bactériennes ce qui inhibe leur fixation et du coup, la formation du biofilm (Benbelaid, 2015).

En outre, les huiles essentielles ont la particularité d'agir directement sur des biofilms déjà formés. D'après (Niu et Gilbert, 2004), les huiles essentielles ont la possibilité d'éradiquer les biofilms microbiennes par solubilisation de leur matrice extracellulaire.

2.4. Mode d'action

Les mécanismes par lesquels les huiles essentielles exercent leur activité antibactérienne sont incomplètement compris, mais il y a un certain nombre de mécanismes proposés (Holley et Patel, 2005). L'action des huiles essentielles sur le développement des micro-organismes peut être expliquée par l'altération de la perméabilité membranaire des germes en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie (Sikkema *et al.*, 1995). Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. Par exemple : l'action antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origan* est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique d'*E. coli* suivie d'une rupture de celle-ci, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique, (apparition de fuite d'ions potassium K⁺ des cellules microbiennes), et donc la mort de la bactérie (Rasooli *et al.*, 2006).

Partie expérimentale

Chapitre 3.

Matériel et méthodes

3.1. Huiles essentielles

3.1.1. Source du matériel végétal

Les espèces de plantes médicinales utilisées dans ce travail ont été récoltées dans deux régions (Tlemcen et Biskra). Il s'agit des espèces suivantes :

Ammoides pusilla (Brot.) Breistr. (نونخة), *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietsw. (مردقوش) et *Artemisia herba-alba* Asso. (الشيح) (Tab.1).

Le matériel végétal récolté en pleine inflorescence est constitué de la partie aérienne de la plante dont les feuilles, tiges, fleurs, grains. Les plantes collectées ont été séchées à l'air libre, à la température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le choix des espèces était basé sur :

- ❖ Les trois espèces sont très utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter les infections urinaires.
- ❖ La disponibilité du matériel végétal.
- ❖ La non toxicité des plantes, vu qu'elles sont utilisées dans les préparations culinaires et dans les tisanes.
- ❖ Leurs richesses en substances aromatique.

Tableau 1. Données sur les espèces végétales retenues et leurs utilisations.

Espèce	Utilisations	Parties utilisées	Stations	Date de récolte
<i>Ammoides pusilla</i>	asthme et de troubles intestinaux, vomissements, troubles du tractus urinaire, (Boskabady et Shaikhi, 2000). Fièvre et Infections rénales (Felidj <i>et al.</i> , 2010).	Feuilles et fleurs	Tlemcen	Juin 2018
<i>Artemisia herba-alba</i>	trouble digestif, parasitose intestinal, antidiabétique, neurotoxique et infection urinaire (Makhlofi, 2018).	Partie aérienne	Drooh, Biskra	May 2019
<i>Origanum vulgare subsp glandulosum</i>	Trouble digestif, affection bronchique, affection dermatologique (Bruneton, 2009), et infection urinaire ou gynécologique.	Feuilles et fleurs	Attar, Tlemcen	Mars 2019

3.1.2. Obtention des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par d'hydro distillation qui est la méthode recommandée pour l'obtention des huiles essentielles (Européenne, 2008) à l'aide d'un montage de type Clevenger. Dans cette technique, la matière végétale sèche est mélangée avec de l'eau distillée dans un ballon en pyrex, puis le tout est déposé sur un chauffe-ballon. Le ballon est branché avec un système fermé en verre constitué d'une colonne pour mener les vapeurs d'eau chargées de l'huile essentielle, vers un réfrigérant pour la condensation des vapeurs, une burette pour la collecte des condensats dans la quelle le volume de l'huile essentielle récupérée est lu directement, puis un retour de la phase aqueuse vers le ballon pour prévenir sa déshydratation. L'extraction est déroulée jusqu'à l'obtention d'un volume constant de l'huile essentielle avec une durée allant de 3h jusqu'à 5h au maximum.



Figure 2. L'appareil utilisé pour l'extraction des huiles essentielles par hydro distillation.

3.1.3. Conservation

Après l'extraction de la totalité de l'huile essentielle, la partie huileuse flottante est récupérée puis déshydratée sur le sulfate de magnésium ($MgSO_4$). Les huiles essentielles récupérées ont été conservées à 4 °C à l'abri de la lumière (Zenati, 2016).

3.2. Souches d'*Escherichia coli*

3.2.1. Souche de référence

Une souche de référence ATCC (American Type Culture Collection) a été utilisée dans cette étude à savoir *Escherichia coli* ATCC25922 obtenue de la part de laboratoire LAMAABE, université de Tlemcen.

➤ Revivification

La souche de référence a été revivifiée par enrichissement en utilisant un tube à visse stérile contenant 5ml de bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) (Conda Pronadisa™, Espagne). Une goutte de suspension conservée de la souche de référence est inoculée à l'aide d'une anse de platine puis incubée à 37°C pendant 24h.

➤ Purification

Une purification par méthode d'épuisement a été effectuée pour s'assurer que la souche de référence est pure. Sur une boîte de pétrie préalablement remplie par la gélose sélective Macconkey (Conda Pronadisa™, Espagne), des ensemencements sont réalisées avec réduction de la charge cellulaire afin d'obtenir des colonies séparées et bien isolées après incubation à 37°C durant 24h.

➤ Conservation

Après incubation, une seule colonie est prise par anse de platine puis inoculée par stries sur une gélose nutritive inclinée (Conda Pronadisa™, Espagne). Les tubes sont ensuite incubés pendant 24h à 37°C, alors conservée à +4°C.

3.2.2. Souches cliniques

Les souches cliniques utilisées dans notre étude ont été obtenues auprès de laboratoire de l'hôpital Elhakime Saadane Biskra à partir des patients hospitalisés souffrant des infections urinaires. Les prélèvements ont été effectués durant le mois de Février 2019 ainsi :

3.2.2.1. Prélèvements

Les prélèvements urinaires doivent être précédés par un lavage des mains, puis un nettoyage soigneux du méat urétral au savon. Des urines du matin de préférence, ou ayant séjournées au moins 4 heures dans la vessie sont recueillies dans des flacons stériles après élimination du premier jet. Les prélèvements sont rapidement transportés au laboratoire (pour éviter la pullulation microbienne de l'inévitable minime contamination par la flore périnéale ; ce qui rendrait des résultats faussement positifs). Les urines ne devraient jamais être conservées plus de 2h à température ambiante ou plus de 24h à 4°C (Pilly, 2018).

3.2.2.2. Etiquetage

Au laboratoire, les échantillons reçus des différents services (cardiologie, pédiatrie, médecine interne femmes...) sont soigneusement étiquetés. Chaque étiquette doit contenir le nom et le prénom du patient, le numéro d'ordre, la date et l'âge. (Voir annexe 1 : Enquête sur les infections urinaires).

3.2.2.3. Examen à la bandelette urinaire

La première approche est l'examen des urines par la bandelette urinaire en recherchant: pH, nitrite, protéines, glucose, hématies et leucocytes.

Dans le cadre du dépistage d'une infection urinaire, seuls deux paramètres sont retenus :

La leucocyturie : la plage leucocyte mesure l'activité estérasique des polynucléaires neutrophiles présents dans l'urine et s'ils sont intacts ou lysés. Son seuil de détection, de l'ordre de 10 leucocytes/ μ l, permet en deux minutes de mettre en évidence une leucocyturie significative.

Le nitriturie : ce test repose sur la conversion des nitrates en nitrites sous l'action des bactéries à Gram négatif produisant une enzyme : la nitrate réductase. (Cariou *et al.*, 2016)

3.2.2.4. Examen macroscopique des urines

Il permet d'étudier les caractères physiques des urines observés à l'œil nu : l'aspect ; la couleur et la présence ou l'absence de pus ou de sang. (Bertholom, 2016; Twizeyimana, 2016).

3.2.2.5. Examen cyto bactériologique des urines

C'est l'examen le plus utilisé pour détecter une infection urinaire. Après le prélèvement, l'échantillon est examiné au microscope optique à l'objectif x40. L'urine est ensuite mise en culture pour la numération des germes et l'identification bactérienne. L'examen cyto bactériologique des urines ECBU (doit être pratiqué avant toute antibiothérapie). Il est réalisé en présence de symptômes urinaires, pour confirmer ou infirmer le diagnostic d'infection urinaire. La réalisation de l'ECBU comprend les différentes étapes indiquées dans le schéma ci-dessous.

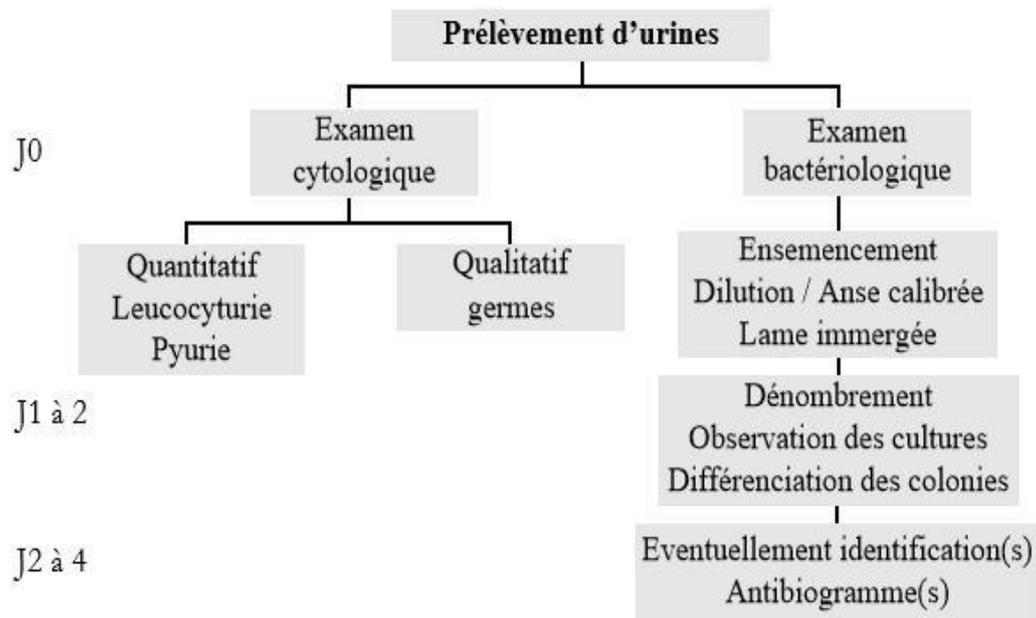


Figure 3. Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'ECBU. (Le REMIC, 1998)

a) Examen cyto bactériologique

Examen cyto bactériologique quantitatif

L'examen par le microscope optique est la meilleure méthode pour la détection des éléments urinaires étrangers tels que les hématies, les polynucléaires les cristaux, les levures, les cylindres et aussi la présence de germes. Le dénombrement des microorganismes est réalisé en déposant un 100 µl d'urine dans une cellule Mallasses , ensuite la lame est examinée à l'état frais sous microscope à l'objectif x40. Le nombre des éléments présents est rapporté au ml (Lacheheb et Bendagha, 2016).

Examen cytologique qualitatif

La coloration de Gram réalisée à partir d'un culot de centrifugation permet d'observer les microorganismes éventuellement présents en orientant le choix des milieux de culture selon leurs morphologies et leurs affinités aux colorants. L'observation se fait au microscope optique à l'objectif (x100) avec l'utilisation de l'huile à immersion (Lacheheb et Bendagha, 2016).

b) Examen bactériologique

La mise en culture répond à un double objectif : isolement et numération des microorganismes. C'est la seule méthode qui permet une identification exacte des microorganismes qui colonisent l'urine. Une très grande majorité des bactéries responsables d'infection urinaire ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur gélose ordinaire, gélose nutritive (Lacheheb et Bendagha, 2016).

Ensemencement des urines

A l'aide d'une anse calibrée, une goutte d'urine est ensemencée sur une gélose nutritive pour avoir des colonies bien isolées : une strie centrale est ensemencée puis perpendiculairement réaliser un isolement de haut en bas de la boîte en desserrant légèrement les dernières stries. Les géloses ensemencées sont alors incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

3.2.3. Identification

L'identification consiste à effectuer des tests biochimiques spécifiques à chaque famille de microorganisme.

➤ La galerie biochimique classique

La galerie biochimique permet l'étude du métabolisme biochimique des bactéries, essentiellement utile pour la différenciation des Entérobactéries.

➤ La galerie API 20E (Appareillage et Procédé d'Identification)

Cette galerie a été utilisée, en cas d'avoir des difficultés en identifiant la souche par la galerie classique.

3.2.4. Antibiogramme

Lorsqu'une souche bactérienne est isolée à partir d'un prélèvement urinaire; sa sensibilité aux antibiotiques doit être étudiée. Ce test est important, il permet de choisir un

antibiotique adéquat pour donner un traitement convenable au patient.(Pinganaud et Rainfray, 2004).

Les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations de l'EUCAST(Guillard *et al.*, 2019) Des boîtes de pétrie préalablement remplies par la gélose Müller-Hinton (Conda Pronadisa™, Espagne) sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension bactérienne à 0.5 Mac Farland (équivalent d'une densité optique comprise entre 0.08-0.13 à 625 nm). Ensuite, des disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose à savoir : Ampicilline (10 µg), l'amoxicilline / acide clavulanique (30 µg), ticarcilline (75 µg) ,Triméthoprim-sulfaméthoxazole(25µg), céfotaxime (30 µg), l'imipénème (10 µg), la céfoxitine (30 µg), la gentamicine (10 µg), l'amikacine (30 µg) l'acide nalidixique (30µg), la ciprofloxacine (5 µg), chloramphénicol (30 µg), nirofuranes(300 g),colistine.Après incubation à 37°C pendant 24h, les zones d'inhibition sont mesurées en mm à l'aide d'un pied à coulisse. L'interprétation des résultats est réalisée selon l'EUCAST.

3.2.5. Sélection des souches cliniques

À partir des boîtes d'antibiogramme réalisées pour les souches d'*Escherichia coli*, juste les souches qui ont présenté un profile bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) ont été sélectionnées pour notre étude. Ainsi, les cultures sont raclées à l'aide d'une anse de platine puis inoculées dans des tubes a visse remplir par 5 ml de BHIB. Une fois que les cultures ont poussé après une incubation de 24h à 37°C, les tubes ont été transportés le jour même vers le laboratoire de département dans une glacière.

Dans le laboratoire de département, la pureté des souches a été vérifiée par des ensemencements d'épuisement sur Macconkey. Les souches pures ont été conservées dans des tubes contenant la gélose nutritive inclinée à +4°C suite à une incubation de 24h à 37°C.

3.3. Activités antimicrobiennes des Huiles essentielles vis-à-vis les souches d'*E. coli*

3.3.1. Aromatogramme

La méthode de diffusion sur gélose (méthode de Kirby-Bauer) a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles (Carson et Riley, 1995). Des disques en papier filtre de 6 mm de diamètre sont imprègnes de 5 µl d'huile essentielle, puis déposés sur la surface la gélose Müller-Hinton pré-ensemencée par écouvillonnage avec de la suspension microbienne standardisée à 10⁸ UFC/mL. Ensuite, les boîtes de pétrie sont incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, les résultats sont lus par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm) à l'aide d'un pied à coulisse.

3.3.2. Détermination des CMI de la croissance

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées à l'aide des plaques pour microtitration à 96 puits (Wiegand *et al.*, 2008). Les inocula standardisés à 10^8 UFC/ml sont dilués au 1/1000 par le même milieu de culture (bouillon Müller-Hinton) pour avoir une densité cellulaire équivalente à 10^5 UFC/ml. Chaque huile essentielle est testée sur cinq souches microbiennes (une souche de référence et quatre souches cliniques) dans chaque plaque. Les puits de la première rangée verticale sont remplis par 100 μ l d'un mélange contenant du Tween 80 dilué à 0,1 % dans la suspension microbienne standardisée à 10^5 UFC/ml afin de vérifier l'effet du Tween 80 sur les souches testées. Ce puits est considéré comme un témoin positif. Les puits de la deuxième rangée sont remplis par 100 μ l du milieu de culture stérile (bouillon Müller-Hinton) pour vérifier les conditions d'asepsie ainsi sont définies comme des témoins négatifs.

Le reste des dix rangées est rempli par les inocula mélangés avec 10 μ l quantité de chaque huile essentielle pour l'obtention d'une fourchette de concentrations allant de 4% jusqu'à 0.007%. Pour cela, une série de dilutions au 1/2 sont préparées à partir d'une solution mère contenant 400 μ l d'huile essentielle et 10 μ L de Tween 80 dilués ensemble dans 590 mL bouillon MH. Les autres solutions filles contiennent déjà un mélange de Tween 80 dilués à 1 % dans le bouillon MH, dans un volume total égale à la moitié du volume total de la solution mère, pour garder la concentration de Tween 80 constante à 1 %. Les dix puits dans chaque rangée horizontale sont remplis par 90 μ l de suspension bactérienne avec 10 μ l de la concentration correspondante allant de la plus faible vers la plus concentrée. La concentration finale du Tween 80 est gradé constante à 0,1 % dans chaque puits.

Les résultats sont révélés après une incubation de 24h à 37 °C. Les CMI de la croissance sont déterminées en tant que la plus faible concentration de l'huile essentielle pour laquelle la croissance microbienne n'est pas observée à l'œil nu selon CLSI (Wikler, 2006).

3.3.3. Détermination des CMI de la formation de biofilms

Les CMI de la formation de biofilm ont été déterminées selon la méthode de (Labrecque *et al.*, 2006). Après lecture des résultats des CMI, les microplaques sont ré-incubées le jour même durant 24 h dans les mêmes conditions, soit un temps totale d'incubation de 48h. Après incubation, les puits de la microplaque sont vidés par aspiration à l'aide d'une seringue. Les puits sont ensuite rincés trois fois à l'eau distillée pour éliminer les cellules faiblement adhérentes. Au delà, un volume de 100 μ l de cristal violet à 0,4 % est ajouté dans chaque puits pendant 15 min pour colorer les biofilms. Les puits sont ensuite rincés quatre fois à l'eau

distillée pour éliminer le cristal violet non lié, puis les microplaques sont séchées à 37 °C pendant 2 h dans une étuve. Ensuite, un volume de 100 µl d'éthanol à 95 % est ajouté dans chaque puits, alors la plaque est agitée pendant 10 min afin de libérer la coloration à partir des biofilms. Les CMI de la formation de biofilms sont déterminées en tant que la plus faible concentration du produit à tester (l'huile essentielle) pour laquelle la coloration n'est pas observée à l'œil nu (Beckloff *et al.*, 2007).

Chapitre 4.

Résultats et discussion

4.1. Rendements en huiles essentielles

Les rendements en huiles essentielles en pourcentage (%) volume/poids (v/p) calculés par rapport au poids frais (classes par ordre décroissant) et la durée d'extraction faite pour chaque espèce végétale sont récapitulés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Rendements en huiles essentielles rapportés dans la littérature.

Espèces	Teneur %	Durée (h)
<i>Origanum vulgare</i> <i>subsp. Glandulosum</i>	2.2	3
<i>Artemisia herba-</i> <i>alba</i>	2.1	3
<i>Ammoides pusilla</i>	1.6	3

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que les rendements en huiles essentielles des plantes étudiées varient de 1.6% à 2.2 %. Les deux espèces *Origanum vulgare subsp. glandulosum* et *Artemisia herba-alba* ont donné un excellent rendement d'huile selon les moyennes rapportés en bibliographie (Européenne, 2008). Tandis que l'espèce *Ammoides pusilla* a produit la plus faible quantité de huiles essentielles mais ça reste quand-même une bonne teneur en huiles essentielles.

D'après la bibliographie, nous avons trouvé des études ayant rapporté les rendements en huiles essentielles des mêmes espèces étudiées (Tab.3) selon lesquelles on constate une légère différence du rendement à cause de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques notamment, la période de récolte, la localisation géographique, l'hygrométrie, le type de sol est d'autres (Schmiemann *et al.*, 2010).

Lors qu'on compare nos résultats d'extraction avec ceux de la littérature on constate que l'espèce *Artemisia herba-alba* a donné un rendement en huile essentielle (2.1%) très proche de celui obtenu par Bendahou (2007) est supérieur de celui obtenu par Merzoug (2018). Alors que la teneur en huile essentielle obtenue par *Ammoides pusilla* (1,6%) est égale de celle obtenue par Souhail *et al.* (2017) et inférieur de celle obtenue par Tefiani *et al.* (2015). L'espèce *Origanum vulgare subsp. glandulosum* a donné un rendement en huile essentielle (2.2%) égale de celui obtenu par Semra *et al.* (2013) et Bouhaddouda (2016).

Tableau 3. Comparaison des rendements en huiles essentielles des plantes étudiées avec d'autres travaux.

Espèces	Rendement %	Références
	2.1	Nous-mêmes
<i>Artemisia herba-alba</i>	2.2	(Bendahou, 2007)
	0.88	(Merzoug, 2018)
	1.6	Nous –mêmes
<i>Ammoides pusilla</i>	1.6	(Souhail et al., 2017) (Tefiani et al., 2015)
	2.9	
	2.2	Nous-mêmes
<i>Origanum vulgare</i> <i>subsp. glandulosum</i>	2.2	(Semra et al., 2013)
	2.52	(Bouhaddouda, 2016)

4.2. Prélèvement

4.2.1. Description de la population étudiée

Durant notre séjour de un mois dans le service d'analyse de l'hôpital Elhakime Saadane, nous avons récupéré un total de 660 prélèvements urinaires à partir des patients venus de l'externe (545) et ayant résidé (115) dans les différents services de l'hôpital. Des données supplémentaires sont présentées dans les annexes.

4.2.2. Examens macroscopiques des urines

Les résultats de l'examen macroscopique des urines prélevées à l'hôpital Elhakime Saadane sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 . Répartition selon l'aspect macroscopique des urines prélevées à partir des patients hospitalisés.

Aspect	Effectif	Pourcentage (%)
Troublé	41	35.65
Clair	74	64.34
Total	115	100



Figure 4. L'aspect macroscopique des urines :(A) claires (B) troublées.

D'après les données collectées nous avons constaté que 64.34 % des urines avaient un aspect clair tandis que 35.65 % d'aspect troublé. En comparant nos résultats avec des études antérieures on a trouvé que ces données sont plus proches à celles obtenues par Ya Bi (2006) qui ont trouvé que 70,23 % des urines prélevées étaient d'aspect limpide et 29,77 % étaient d'aspect troublé. Egalement, Rahmani et Youbi (2018) ont constaté que sur un total de 433 urines prélevées d'origine hospitalière, 60 % étaient d'aspect limpide et 40 % étaient d'aspect troublé.

4.3. Résultats primaires

4.3.1. Résultats de la bandelette urinaire

Les résultats de la bandelette urinaire sont enregistrés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5. Résultats de la chimie des urines analysées.

Aspects	Présences	Absence	Total
Leucocytes > 10⁴ U/ml	36	79	115
Nitrites	29	86	115

D'après le Tableau 5, on remarque la présence de leucocytes dans 36 urines sur 115 analysées et des nitrites dans 29 urines sur 115 analysées. Cette présence importante de leucocytes et de nitrites dans les urines des patients nous avertit de suspecter l'existence des germes responsables d'une infection urinaire. Des auteurs tels que (Maaroufi (2009)) affirme que la négativité des deux paramètres leucocytes - nitrites à une excellente valeur prédictive négative (97,5%) qui veut dire absence d'infection/inflammation urinaire. Par contre, lors qu'une urine est infectée, on observe, dans près de 90% des cas, la positivité d'au moins un des deux paramètres cités précédemment. D'autre part, il est à mentionner que la positivité d'un de ces deux paramètres n'affirme pas l'infection urinaire (la valeur prédictive positive du test est médiocre : 39,7%), ainsi un test d'ECBU doit être réalisé.

4.3.2. Résultats de l'examen cytologique quantitatif

D'après l'étude réalisée sur la cytologie des urines, on note que la présence des leucocytes, des hématies ainsi que des germes (formes cocci ou bacilles) sont des signes concrets d'une infection urinaire. Par contre la mise en évidence des cristaux de différentes formes dans les urines n'est pas en relation avec une infection et pourrait être liée à la prise de certains médicaments ou due à l'alimentation (Figure 5).

Egalement, la présence des cellules épithéliales dans les urines est un signe normal car ces cellules tapissant et protégeant la paroi interne de la vessie pourraient être évacuées par la miction. Tandis que la détection des cellules épithéliales d'origine vaginale signifie une contamination et entraîne le rejet de l'examen selon Causse *et al.* (1998).

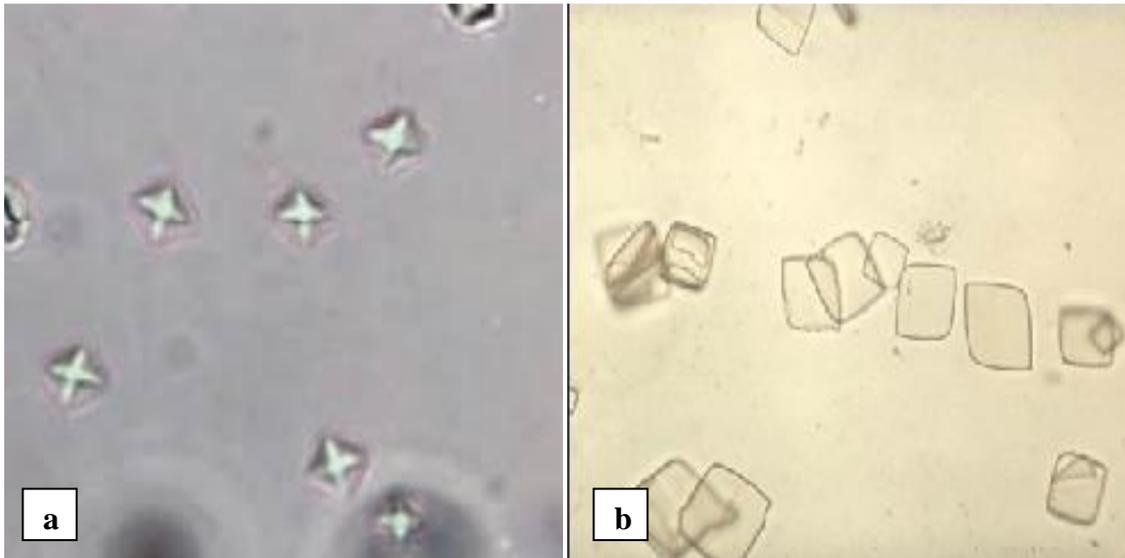


Figure 5. L'aspect de certains cristaux sous microscope optique ($\times 400$) (a) Oxalate de calcium, (b) Cristaux d'acide urique.

4.3.3. Examen cytologique qualitatif

La technique de Gram réalisée sur des urines permet d'étudier la morphologie des microorganismes y présents, leur mode de regroupement, ainsi que de déterminer leur Gram. D'après nos résultats sur l'examen cytologique par coloration de Gram, nous avons trouvé différentes formes des bactéries, la plus fréquente était l'aspect bacille suivi par des cocci en diplocoques. Le Gram le plus fréquemment déterminé était le Gram négatif chez les bacilles (Figure 6) et le Gram positif chez les cocci.

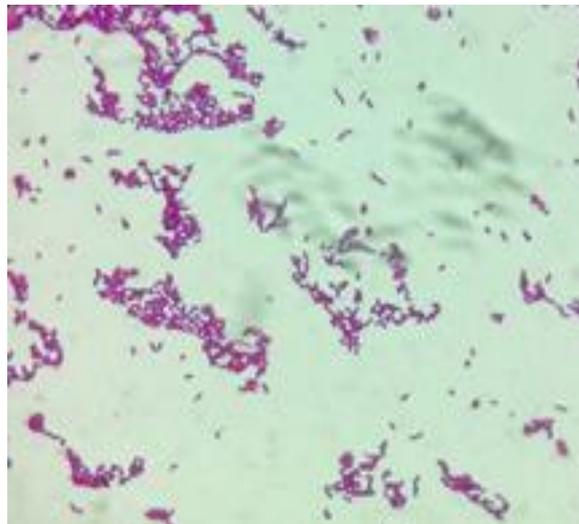


Figure 6. Résultat d'une coloration de Gram (Bacilles à Gram négatif) (G. X100).

4.4. Résultats bactériologiques

4.4.1. Résultats de la culture bactérienne

Les résultats de la culture bactérienne des urines sont présentés dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6. Résultats de la culture bactérienne.

Résultats	Nombre	Pourcentage (%)
Infecté	24	20.86
Non infecté	86	74.78
Poly microbienne	5	4.27
Total	115	100

D'après les résultats obtenus on constate que des cultures positives ont été détectées chez 24 patients soit 20.86%. En comparant ces taux avec ceux de la littérature on trouve que Hassaine *et al.* (2002) ont rapporté des taux très proches des nôtres (20,7%) dans l'hôpital de l'ouest algérien (Maghnia). Tandis que Maiga (2006) a trouvé des taux d'infections urinaires inférieures de l'ordre de (15.75%) à l'hôpital national du Bamako Mali.

➤ Flore poly microbienne

Selon (Janvier *et al.*, 2008) c'est en relation avec les conditions de recueil (délai de 3h) et de transport (quand la bactériurie est $\geq 10^5$), que l'on isole plus d'une bactérie, et surtout s'il n'y a pas de leucocyturie associée, il faut considérer que le recueil et/ou le transport de l'urine ont été défectueux et refaire l'ECBU.

4.4.1.1. Répartition des germes identifiés

La culture bactérienne nous a permis d'identifier 24 germes. Leur répartition est représentée dans le Tableau 7.

Tableau 7. Répartition des germes identifiés.

Germes	Effectif	Pourcentage (%)
<i>Escherichia coli</i>	15	62.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	16.66
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4.16
Streptococcus spp	1	4.16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	12.5
Total	24	100

Le profil épidémiologique des germes isolés montre une nette prédominance d'*E. coli* Représentant 62,5% des isolats, suivie par l'espèce *Klebsiella pneumoniae* (16.66%) puis *Pseudomonas aeruginosa* (12.5%). Les autres espèces bactériennes ont été identifiées en faible proportion notamment *Staphylococcus aureus* (4.16%) et les Streptocoques (4.16%).

La dominance remarquable des Entérobactéries dans les prélèvements positifs peut être expliquée par la physiopathologie ascendante des infections urinaires ainsi que la forte colonisation du périnée par les bactéries d'origine digestive (sachant que la flore intestinale est constituée principalement par les Entérobactéries) (Ait Miloud, 2011).

Nos résultats sont très proches à celles d'autres auteurs à savoir Smaoui *et al.* (2015) qui trouve *E. coli* était majoritaire dans les infections urinaires avec un taux de 58,9%, puis *K. pneumoniae* (14,5%), et aussi Zenati (2016) qui confirme que *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée (63%), suivie de *Klebsiella pneumoniae* (13%).

4.4.1.2. Fréquences des urines infectées en fonction du sexe

Les résultats des fréquences des urines infectées en fonction du sexe sont consignés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Fréquences des urines infectées en fonction du sexe

Sexe	infectées	Non infectées	Fréquence (%)
Femmes (F)	18	59	30.50
Hommes (H)	11	27	28.94

D'après nos résultats, on remarque clairement que la majorité des patients ayant présentés une infection urinaire sont du sexe féminin. Cette prédominance féminine est confirmée par d'autres auteurs tels que Misraï *et al.* (2013) dont l'explication est :

*Les caractéristiques anatomiques de l'urètre féminin qui est court, large, droit et proche de la région péri-anale.

*La fréquence des rapports sexuels qui favorisent l'ouverture du méat urétral favorisant ainsi l'accès des germes à la vessie (François *et al.*, 2013).

4.4.1.3. Fréquences des urines infectées en fonction de l'âge

Les résultats des fréquences des urines infectées en fonction d'âge sont montrés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Fréquences des urines infectées en fonction des tranches d'âge

Ages	≤19	20-39	40-59	≥ 60
Infectées	18	4	3	4
Non infectées	46	16	9	15
Fréquence (%)	28.12	20	25	21.05

D'après ces résultats, les fréquences d'infection urinaire les plus élevées sont constatées chez la tranche d'âge des moins de 19 ans (Pédiatrie et enfant) qui représente 28.12%. Par contre Chekroud et Fathi (2017) trouvent que l'effectif le plus élevé des patients se rencontre dans la tranche des plus de 60 ans soit 48%.

Zenati (2016) a trouvé que les patients qui ont un âge compris entre 20 et 39 ans montrent une incidence d'infection urinaire importante (33.89%).

4.4.1.4. Répartition des urines infectées et non infectées en fonction du lieu de prélèvement

Les résultats des fréquences des urines infectées en fonction du lieu de prélèvement sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Répartition des urines infectées et non infectées en fonction du lieu de prélèvement.

Service	Urine Infectée	Urine non infectée	Pourcentage (%)
Médecine interne	9	36	31.06
Pédiatrie	18	42	62.06
Cardiologie	1	6	3.44
Pneumo physiologie	1	2	3.44
Total	29	86	100,0

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que les urines les plus contaminées ont été collectées du service de la Pédiatrie (62.06%), suivi du service de la médecine interne (31.06%). Tandis que les fréquences des urines infectées étaient faibles dans les restes services.

Par contre Zenati (2016) trouve que les urines les plus infectées provenaient du service de la médecine interne (33%) suivi des services de maternité et d'urologie (28% par service).

4.5. Étude de la sensibilité des souches *E.coli* envers les antibiotiques

Les résultats des antibiogrammes sont résumés dans le Tableau 11.

Tableau 11. Résultats des antibiogrammes réalisés des souches *E. coli*.

Antibiotiques	Souches									
	<i>E.c</i> SR		<i>E.c</i> 8333		<i>E.c</i> 8724		<i>E.c</i> 1514		<i>E.c</i> 3135	
	D (mm)	INT	D (mm)	INT	D (mm)	INT	D (mm)	INT	D (mm)	INT
Ampicilline	18	S	6	R	6	R	6	R	6	R
Amoxicilline / acide clavulanique	21	S	6	R	6	R	6	R	9	R
Ticarcilline	27	S	6	R	6	R	6	R	6	R
Nitrofurane	20	S	20	S	23	S				
Céfotaxime	28	S	6	R	6	R	32	S	6	R
Triméthopri- me-sulfaméthoxazole	26	S	6	R	19	S	6	R		
Colistine	19	S	11	S	19	S	14	S	19	S
Imipénème	29	S	32	S	28	S	35	S	34	S
Ciprofloxacine	33	S	11	R	33	S	20	I	9	R
Céfoxitine	26	S	19	S	6	R			25	S
Gentamicine	22	S	6	R	6	R	20	S	6	R
Amikacine	22	S	20	S	18	S	20	S	18	S
Acide nalidixique	25	S	6	R	19	S	6	R	6	R
Chloramphénicol	24	S	6	R						

E. c : *E. coli* ; **S :** Sensible ; **R :** Résistance ; **I :** Intermédiaire ; **D :** Diamètre (mm) ; **INT :** Interprétation.

D'après les résultats de l'antibiogramme, on constate des résistances diffusées pour certains antibiotiques dont l'Ampicilline, le Chloramphénicol, Amoxicilline / acide clavulanique, la Ticarcilline. Puis des résistances modérés ont été constatés vis-à-vis le Nitrofurane; le Céfotaxime, le Triméthopri-*me-sulfaméthoxazole*, l'Acide nalidixique, l'Acide nalidixique et la Gentamicine. Alors qu'une légère résistance a été détectée envers la Ciprofloxacine et le Céfoxitine. Le reste des antibiotiques s'est avéré inactif envers les souches d'*E. coli*.

En revenant à la littérature, on note que Benabdelkrim et Bouazza Abid (2017) ont trouvé que la résistance d'*E. coli* d'origine urinaire était élevé envers l'Acide nalidique,

l'Ampécilline et le Triméthoprime-sulfaméthoxazole. Ils ont rencontré également des sensibilité aux autres antibiotiques à savoir, Amoxicilline / acide clavulanique, céfazoline, céfépime, céfotaxime, céfoxitine, céftazidime, céprofolaxacine, gentamicine, imipenème, et nitrofurantoïne. D'autre part, les résultats obtenus par Smaoui *et al.* (2015) ont montré que la résistance d'*E.coli* vis-à-vis de la majorité des ATB testés a augmenté d'une façon progressive. Cette intensification de la résistance était plus constatée envers le Céfotaxime et l'Acide nalidixique.

4.6. Effets des huiles essentielles envers *E. coli*

Pour les tests d'activité antimicrobienne des huiles essentielles, seulement quatre souches d'*E.coli* cliniques (BLSE) ont été sélectionnées à cause de leurs multi résistances. En plus, une souche de référence *E. coli* ATCC25922 a été utilisé pour la comparaison.

4.6.1. Diamètres des zones d'inhibition

Le tableau 12 présente les résultats de l'effet inhibiteur des extraits de trois plantes différentes sur *E. coli*.

Tableau 12. Les résultats de méthode des disques

HE	Diamètre en (mm)		
	AHA	AP	OG
Souches BLSE			
E. coli SR (sensible)	15	31	38
E. coli 8333	18	34	41
E. coli 1514	17	35	42
E. coli 8724	15	33	39
E. coli 3135	12	38	43
Moyenne(D) <i>E.coli</i> BLSE	15.5	35	41.25

HE : Huile essentielle. **AHA**: *Artemisia herba-alba*. **AP**: *Ammoides pusilla*. **OG**: *Origanum vulgare subsp. glandulosum*.

D'après les résultats ci-dessus on remarque que l'huile la plus active contre les souches *E.coli* BLSE est celle d'*Origanum vulgare subsp. Glandulosum* avec une moyenne des zones d'inhibition de (41.25 mm), suivie par l'huile d' d'*Ammoides pusilla* (35mm), tandis que l'huile d'*Artemisia herba-alba* a une effet moins faible avec une moyenne des zones d'inhibition de (15.5mm) .En comparant nos résultats avec ceux trouvés par d'autres auteurs, on remarque que les résultats d'activité d'*Origanum vulgare subsp* envers *E. coli* trouvé par Tayeb-Cherif et Menacer (2016) étaient nettement inférieures des nôtres avec des zones d'inhibition de 9.64 mm.

Durant l'étude effectuée par Abdelouahid et Bekhechi (2004), ces auteurs ont trouvés des résultats semblables aux nôtres concernant l'effet des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* envers *E.coli* ATCC25922 avec des zones claires dépassant 30mm et allant jusqu'à 36,7mm.

4.6. 2. CMI de croissance

Les résultats d'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées envers les souches d'*E. coli* sont rédigés dans le Tableau 13 ci-après.

Tableau 13. Résultats des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles (%)

HE	CMI de croissances		
	AHA	AP	OG
Souche BLSE			
E. coli SR	0.125	0.125	0.062
E. coli 8333	0.062	0.031	0.062
E. coli 1514	0.125	0.125	0.062
E. coli 8724	0.062	0.062	0.062
E. coli 3135	0.250	0.031	0.031
Moyenne (CMI) <i>E.coli</i> BLSE	0.125	0.062	0.054

HE : Huile essentielle. AHA: *Artemisia herba-alba*. AP: *Ammoides pusilla*. OG: *Origanum vulgare subsp. glandulosum*.



Figure 7. Résultat des concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle (A) *Artemisia herba-*, (B) *Ammoides pusilla*.

D'après les résultats ci-dessus on constate que les CMI étaient très faibles pour les huiles essentielles des plantes *Origanum vulgare subsp.glandulosum* et *Ammoides pusilla*, comparées aux CMI d'HE *Artemisia herba-alba*. L'HE d'O. *glandulosum* a montré l'activité la plus forte avec des CMI = 0.054%.

Lors qu'on compare les résultats des CMI obtenus avec ceux des zones d'inhibitions (aromatogramme) on constate une concordance concernant l'huile la plus active.

Biblio-graphiquement, Boutchiche (2017) trouve que la moyenne des CMI de l'huile d'*Ammoides verticillata* sur des souches d'*E.coli* était de 0,5 %. Alors que Merzougui et Tadj (2012) montre que la souche de référence d'*E.coli* ATCC 25922, était sensible à l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* à des dilutions inférieures à 0,05%.

4.6.3. CMI des biofilm

Les résultats de l'activité antimicrobienne huiles essentielles étudiées envers les souches d'*E. coli* à l'état biofilm sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14. Effet d'inhibiteur des huiles essentielles étudiées vis-à-vis des souches *d'E. coli* en état du biofilm.

HE	CMI de biofilm		
	AHA	AV	OG
Souches BLSE			
E. coli SR	0.062	0.125	0.031
E. coli 8333	0.015	0.500	0.031
E. coli 1514	0.007	0.062	0.062
E. coli 8724	0.062	0.031	0.015
E. coli 3135	0.125	0.062	0.031
Moyenne(CMIB)			
<i>E.coli</i> BLSE	0.052	0.163	0.034

HE : Huile essentielle. AHA: *Artemisia herba-alba*. AP: *Ammoides pusilla*. OG: *Origanum vulgare subsp. glandulosum*.

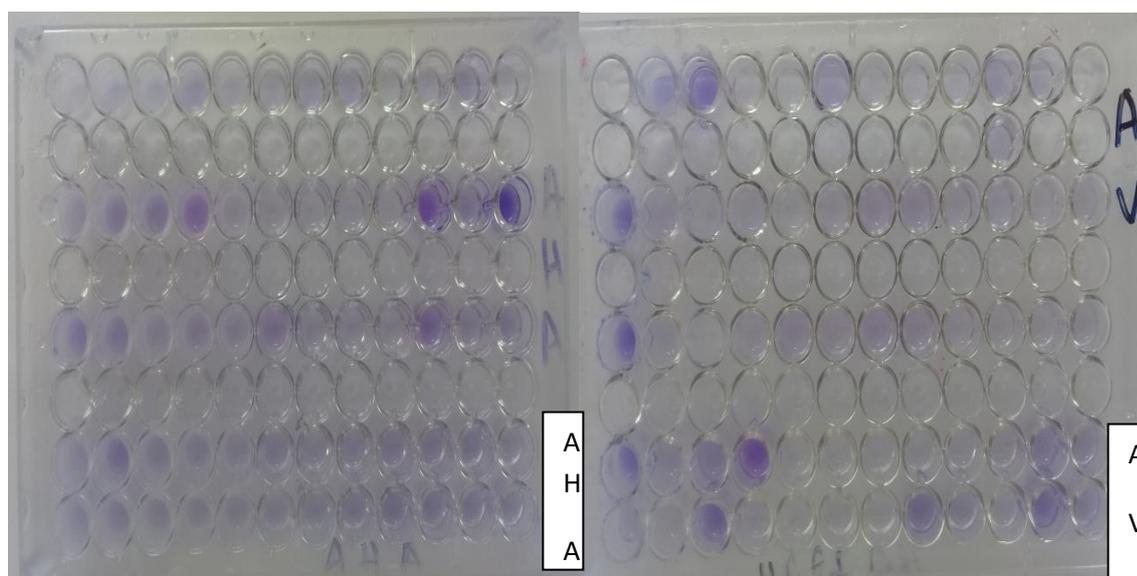


Figure 8. Les résultats de l'activité antimicrobienne des CMIBs des HEs

D'après les résultats ci-dessous, on remarque bien que les CMIBs (concentration minimale inhibitrice du biofilm) sont plus ou moins grandes par rapport à celles des CMI. Comme à l'état planctonique, l'huile d'*Origanum vulgare subsp.glandulosum* est la plus active vis-à-vis des souches responsables d'infection urinaire en biofilm. Cette huile essentielle peut inhiber la croissance de ces microorganismes sous forme de biofilms avec moyenne de concentration intéressante (0.034%). Pour *Ammoides pusilla* et *Artemisia herba-alba* leurs huiles essentielles sont également actives mais avec des taux supérieurs.

En comparant nos résultats de l'effet d'inhibiteur des huiles essentielles étudiées vis-à-vis des souches en état de biofilm avec des autres travaux qui étudient l'effets des huiles essentielles déférent Zenati (2016) trouve que l'huile de *Cinnamomum cassia* est la plus active vis-à-vis des souches d'*E.coli* en biofilms avec une concentration de 4.53 mg/ml. Pour *Coriandrum sativum et, Ziziphora hispanica* leurs huiles essentielles sont également actives mais avec des taux supérieurs (37.5 mg/ml, 24.37 mg/ml).

Conclusion

Conclusion

L'objectif assigné de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur des huiles essentielles de trois plantes aromatiques *Ammoides pusilla*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* et *Artemisia herba-alba* sur des souches d'*Escherichia coli* (BLSE) responsables d'infections urinaires d'origine hospitalière.

D'après les résultats de l'étude rétrospective, 24 patients ayant des infections urinaires ont été recensés durant la période du mois de février. La fréquence de ces infections urinaires était élevée chez les femmes (30,50 %) par rapport aux hommes (28.94 %), et beaucoup plus signalée chez les enfants de 1 mois jusqu'à 19 ans (28.12 %) que les autres tranches d'âges. Alors que les services les plus touchés étaient ceux de la pédiatrie (62.06 %) suivi par le service de la médecine interne (31.06 %).

Concernant les germes isolés, *E. coli* était l'espèce dominante avec des fréquences de 62.5 %. L'antibiogramme réalisé selon les recommandations de l'EUCAST nous a montré que les souches d'*E. coli* prélevées sont totalement résistantes envers l'Ampicilline, le Chloramphénicol, Amoxicilline / acide clavulanique et la Ticarcilline (100 %). Alors que des taux de résistance équivalents à 75% ont été constaté vis-à-vis le Nitrofurane, le Céfoxime, le Triméthoprime-sulfaméthoxazole, l'Acide nalidixique, l'Acide nalidixique et la Gentamicine. Puis, contre la Ciprofloxacine et le Céfoxitine on a noté une résistance importante (50 %). Tandis que le reste des antibiotiques s'est avéré inactif envers les souches d'*E. coli* cliniques.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des trois huiles essentielles étudiées envers les souches d'*E. coli*, cliniques BLSE et de référence, a montré que l'huile d'*Origanum glandulosum* est la plus active contre ces souches testées à l'état planctonique et biofilm. A l'état sessile, l'huile a donné un diamètre d'inhibition de 41.25 mm, une CMI moyenne = 0.054 %. A l'état de biofilm, elle a donné une CMIB moyenne = 0.034% et une. Par contre les huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et *Artemisia herba-alba* sont moins effectives.

Les résultats obtenus affirment bien le pouvoir antimicrobien et antibiofilm des huiles essentielles étudiées, notamment l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*, ayant prouvé une forte activité *in vitro* contre les souches *E. coli* BLSE d'origine hospitalière.

L'utilisation des trois plantes médicinales étudiées comme une lotion des voies urogénitale constitue un bon moyen pour prévenir et de traiter les infections urinaires, surtout celles liées aux soins. Egalement, les huiles essentielles obtenues à partir des ces plantes

représentent un excellent alternatif aux antibiotiques pour lutter contre la flore pathogène tout en préservant la flore résidente.

Cependant, il serait très intéressant d'évaluer les plantes étudiées ainsi que d'autres plantes aromatiques locales dans des études *in vivo* et d'élargir l'étude sur d'autres souches microbiennes notamment à Gram positif. Il serait rentable également d'élaborer des produits pharmaceutiques à base des huiles essentielles pour valoriser la flore locale contre les diverses infections avec une application externe.

Références Bibliographiques

Abdelouahid D., Bekhechi C. (2004). "Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*." *Biologie et Santé* 4(2): 1-10.

Ait Miloud K. (2011). L'infection urinaire: expérience du laboratoire de microbiologie de l'hôpital des spécialités de Rabat, Université de Rabat. Maroc.

Arnal-Schnebelen B., Hadji-Minaglou F., Peroteau J., Ribeyre F., De Billerbeck V. (2004). "Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases." *International Journal of Aromatherapy* 14(4): 192-197.

Beckloff N., Laube D., Castro T., Furgang D., Park S., Perlin D., Clements D., Tang H., Scott R. W., Tew G. N. (2007). "Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(11): 4125-4132.

Benabdelkrim K., Bouazza Abid L. (2017). Contribution à l'étude de quelques bactéries responsables d'infection urinaire (Application de l'extrait de *Terfezia claveryi*), Université de Tlemcen. Algeria.

Benbelaid F. (2015). Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur *Enterococcus faecalis* responsable d'infections d'origine dentaire, Université de Tlemcen. Algeria.

Bendahou M. (2007). Composition chimique et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatique et médicinales de l'ouest algérien, Université de Tlemcen. Algeria.

Bertholom C. (2016). "Prise en charge de l'examen cyto bactériologique des urines au laboratoire (ECBU)." *Option de biologie* 27(26): 541-542.

Bidet P., Bonarcorsi S., Bingen E. (2012). "Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra-intestinaux." *Archives de pédiatrie* 19: 80-92.

Boskabady M., Shaikhi J. (2000). "Inhibitory effect of *Carum copticum* on histamine (H1) receptors of isolated guinea-pig tracheal chains." *Journal of ethnopharmacology* 69(3): 217-227.

Bouhaddouda N. (2016). Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*. , Baji Mokhtar d'Anaba. Algeria.

Bourrain J. (2013). "Allergies aux huiles essentielles: aspects pratiques." *Revue Française d'Allergologie* 53: 30-32.

Boutchiche A. (2017). Etude comparative de quelques méthodes d'évaluation de la concentration minimale inhibitrice des extraits de plantes, Université de Tlemcen. Algeria.

Bruneton J. (2009). pharmacogonie Phytochimie Plantes Médicinales Lavoisier, Paris, France, 640.

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

Cariou G., El Basri M., Cohen J., Cortesse A. (2016). "Can the urine dipstick be used in the diagnosis of urinary bacterial colonizations in a preoperative urological assessment?" Progres en urologie: journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie 26(5): 276-280.

Carson C., Riley T. (1995). "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*." Journal of applied bacteriology 78(3): 264-269.

Causse R., Chouaid C., Callaert S., Le Paih M., Cohen R., Thebault A. (1998). "Impact d'une approche pluridisciplinaire pour la maîtrise de la prescription des antibiotiques dans un établissement hospitalier." La Presse médicale 27(27): 1371-1375.

Cavallo J., Fabre R., JEHL F., RAPP C. (2004). "Bêta-lactamines." EMC-Maladies Infectieuses 1(3): 129-202.

Chaumont J., Leger D. (1989). "Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins. Relations structure-activité." Plantes médicinales et phytothérapie 23: 124-128.

Chaumont J., Léger D. (1992). Lutte contre les moisissures allergisantes des habitations. Propriétés inhibitrices de l'huile essentielle de *Géranium Bourbon*, du citronellol, du géranol et du citral. Annales pharmaceutiques françaises, Masson.

Chekroud R., Fathi R. (2017). Étude du profil bactériologique et de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries responsables des infections urinaires, Frères Mentouri de Constantine. Algeria.

Courvalin P., Leclercq R. (2012). AntibioGramme, Editions Eska, Paris, France.

De Mouy, D., J. Cavallo (1999). Infections urinaires en pratique de ville: étiologies et sensibilité aux antibiotiques en fonction des antécédents. La Presse médicale 28(30): 1624-1628.

Didier, D. S. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. Journal of Applied Biosciences 37: 2496-2507.

Ellenberg E. (2005). Analyse terminologique des définitions données à l'infection nosocomiale et proposition d'une définition. La Revue de médecine interne 26(7): 572-577.

- Européenne P. (2008). Huiles essentielles, Council of Europe, Strasbourg, France.
- Felidj M., Bouazza M., Ferouani T. (2010). "Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila* (verticillata) dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale)." *International journal of tropical geology, geography and ecology* 34: 147-154.
- François A., Brandstätter H., Bréchet A., A H. (2013). Infections urinaires, hopitaux universitaires Genève. Genève, Suisse.
- Galperine F., Etienne M., Merens A., Flateau C. (2014). Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaire, Agent Française de sécurité sanitaire des produits de santé. France.
- Gueye O. (2007). Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. 22
- Guillard F., Merens A., Dortet L., Janvier F., Lebrun C., Yin N., Grillon A., Amara M., Jaureguy F., Héry-Arnaud M. (2019). "Évaluation de la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries isolées de prélèvements urinaires dans les services d'urgence de France." *Médecine et Maladies Infectieuses* 49(4): 111-112.
- Hagvall L., Sköld M., Bråred-Christensson J., Börje A., Karlberg A. T. (2008). "Lavender oil lacks natural protection against autoxidation, forming strong contact allergens on air exposure." *Contact Dermatitis* 59(3): 143-150.
- Hamoudi R. (2008). Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plantes *Teuriumpolium geryrii* provenant de la région Tamanrasset, Magister, université Kasdi-Merbah, Ouargla. Algeria.
- Hassaine H., Larbi M., Maamar H. (2002). Essai de dépistage des infections urinaires d'origine hospitalières dans deux centres hospitaliers en Algérie: Hôpital d'Ain-Témouchent et Maghnia. Algeria, Université de Tlemcen.
- Holley R. A., Patel D. (2005). "Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials." *Food microbiology* 22(4): 273-292.
- Janvier F., Mbongo-Kama E., Mérens A., Cavallo J.-D. (2008). "Les difficultés d'interprétation de l'examen cyto-bactériologique des urines." *Revue Francophone des laboratoires* 2008(406): 51-59.
- Karaterki I. (2009). Infections urinaires nosocomiales : enquête prospective, Université de Tlemcen. Algeria.
- King L. A., Loukiadis E., Mariani-Kurkdjian P., Haeghebaert S., Weill F. X., Baliere C., Ganet S., Gouali M., Vaillant V., Pihier N. (2014). "Foodborne transmission of

sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011." *Clinical Microbiology and Infection* 20(12): 1136-1144.

Labrecque J., Bodet C., Chandad F., Grenier D. (2006). "Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(2): 439-443.

Lacheheb L., Bendagha Y. (2016). Les infections urinaires Université de Tlemcen. Algeria.

Lamassiaude-Peyramaure, S. (2008). Nouvelles thérapeutiques à l'officine. *Actualités pharmaceutiques* 475(47): 27-28.

Lentilhac J. (2002). "Responsabilités médicales et infections nosocomiales." *Hygiène* 6: 471-478.

Léone M., Arnaud S., Boisson C., Blanc-Bimar M. C., Martin C. (2000). "Infections urinaires nosocomiales sur sonde en réanimation: physiopathologie, épidémiologie et prophylaxie." *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* 19(1): 23-34.

Lobry J. R. (1991). Ré-évaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance, Université Claude Bernard-Lyon I. France.

Maaroufi A. (2009). L'infection urinaire chez le diabétique: épidémiologie et profil de sensibilité des bactéries isolées aux antibiotiques, Université du Rabat. Maroc.

Mahi E. A. (2016). L'effet de deux plantes médicinales (*Nigella sativa* L. et *Salvia Officinale* L) sur les bactéries responsables des infections urinaires, Université de Mostaganem. Algeria.

Maiga D. K. A. (2006). Infections Urinaires A Bamako: Aspects Epidémiologiques, Bactériologiques Et Cliniques. . Pharmacie, Université de Bamako. Mali.

Makhlofi H. (2018). Effets des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* récolté dans la région de Tlemcen sur des bactéries multi-résistantes isolées cliniquement, Université de Batna Algeria.

Marrich M. B. (2008). Les antibiotiques utilisés dans les infections urinaires Thèse doctorat d'état en pharmacie, Université de Dakar. Sénégal.

Merzoug A. (2018). La conservation de lait de vache par l'utilisation des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et *Artemisia herba alba*. . master., Université Mohamed Khider de Biskra. Algeria.

Merzougui I., Tadj H. (2012). Merzougui, I. Tadj, H. Etude de l'effet antibactérien et antioxydant d'*Ammoides verticillata* De la région de Tlemcen. , Université de Tlemcen. Algeria.

- Misraï V., Rouprêt M., Guillotreau J., Bordier B., Bruyère F. (2013). "Traitement de l'hyperplasie bénigne de prostate par photovaporisation au laser Greenlight®: analyse de la littérature." *Progrès en urologie* 23(2): 77-87.
- Niu C., Gilbert E. (2004). "Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure." *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12): 6951-6956.
- Pagés J.-M., Garnotel E. (2003). "Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à gram négatif." *Revue Française des laboratoires* 2003(352): 57-63.
- Pilly E. (2018). *Maladies infectieuses et tropicales*, ALINEA Plus, NCBI Paris, France.
- Pinganaud G., Rainfray M. (2004). "Les infections urinaires chez les personnes âgées." *NPG Neurologie-Psychiatrie-Gériatrie* 4(24): 15-21.
- Pitout J. (2012). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance." *Frontiers in microbiology* 3: 9.
- Pourcine F. (2010). *Néphrologie*, Elsevier, Paris, France
- Prakash K., Ramasubramanian V. (2016). *Urinary Tract Infection. Manual of Nephrology*. Kumar P. J. , Vijay K. Haryana, India, Jaypee Brothers Medical Publishers: 226-236.
- Prescott L. M., Harley J. P., Donald K., Woolverton C. (2010). *l'épidémiologie des maladies infectieuses. Microbiologie*. Prescott L. M., Harley J. P., Donald K. , Woolverton C. Paris, France, The Boeck: 903.
- Rahmani A., Youbi H. (2018). *Les infections urinaires chez des patients externes et hospitalisés*, Frères Mentouri Constantine. Algeria.
- Rasooli I., Rezaei M. B., Allameh A. (2006). "Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*." *Food Control* 17(5): 359-364.
- Schmiemann G., Kniehl E., Gebhardt K., Matejczyk M. M., Hummers-Pradier E. (2010). "The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review." *Deutsches Ärzteblatt International* 107(21): 361.
- Semra I., Benmerache A., Chibani S., Kabouche A., Abuhamdah S., Kabouche Z. (2013). "Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Origanum glandulosum* Desf. from Algeria." *Der Pharmacia Lettre* 5(3): 381-385.

Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B. (1995). "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 59(2): 201-222.

Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1996). "Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils." *Journal of agricultural and Food Chemistry* 44(5): 1202-1205.

Smaoui S., Abdelhedi K., Marouane C., Kammoun S., Messadi-Akrout F. (2015). "Résistance aux antibiotiques des entérobactéries responsables d'infections urinaires communautaires à Sfax (Tunisie)." *Médecine et Maladies Infectieuses* 8(45): 335-337.

Souhail N., Sifaoui I., Hassine D. B., Bleton J., Bonose M., Moussa F., Pinero J. E., Lorenzo-Morales J., Abderrabba M. (2017). "*Ammoides pusilla* (Apiaceae) essential oil: Activity against *Acanthamoeba castellanii* Neff." *Experimental parasitology* 183: 99-103.

Tayeb-Cherif Y., Menacer I. (2016). L'activité antibactérienne des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* et de *Origanum vulgare* sur la bactérie *E.coli*. , Université Des Frères Mentouri Constantine. Algeria.

Tefiani C., Riazi A., Youcefi F., Aazza S., Gago C., Faleiro M., Pedro L., Barroso J., Figueiredo A., Megías C. (2015). "*Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities." *Journal of Essential Oil Research* 27(2): 131-139.

Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. (2010). "The population genetics of commensal *Escherichia coli*." *Nature Reviews Microbiology* 8(3): 207.

Twizeyimana E. (2016). "Automates et uroculture: la cytologie urinaire." *Revue Francophone des Laboratoires* 2016(482): 25-33.

Van Pelt S. (2001). Food, fuel, and freeways: An Iowa perspective on how far food travels, fuel usage, and greenhouse gas emissions.

Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. E. (2008). "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances." *Nature protocols* 3(2): 163-172.

Wikler M. A. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard, CLSI (NCCLS), USA, M7-A7.

Ya Bi F. (2006). Profil antibiotique des bactéries responsables d'infection urinaire communautaire. Thèse De Doctorat Université De Bamako. Mali.

Yakhlef G. (2010). Etudes de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. . Mémoire de magister, Université de Batna. Algeria.

Zenati F. (2016). Effet inhibiteur des huiles essentielles de trois plantes aromatiques sur *Escherichia coli* (BLSE) responsables d'infections urinaires d'origine hospitalière Université de Tlemcen. Algeria.

Annexe

Annexe 1. Plantes étudiées

1. *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*

Position systématique

Règne: *Plantae*

Embranchement: *Spermaphytes*

Sous embranchement: *Angiospermes*

Classe: *Eudicots*

Ordre: *Lamiales*

Famille: *Lamiaceae*

Genre : *Origanum*

Espèce: *Origanum vulgare*

Sous espèce: *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum*

Noms vernaculaires : *Zaâtar lehmir, Zaâtar Lbarhouche.*

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et polyphénols.



Origanum glandulosum

2. *Artemisia herba alba* Asso.

Position systématique

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Spermaphyta*

Sous embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Eudicots*

Sous classe : *Astéridées*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteracées*

Genre : *Artemisia*

Espèce : *herba alba*

Noms vernaculaires : Arabe: Chih, White wormwood et Armoise blanche.

Composition chimique : Riche en huiles essentielles et polyphénols. Comme les flavonoïdes, les tanins, la lignine, les coumarines.



***Artemisia herba alba* Asso**

3. *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr.

Position systématique

Embranchement : *Tracheophyte*

Sous Embranchement : *Spermatophyte*

Classe : *Magnoliopside*

Sous classe : *Asteridées*

Ordre : *Apiales*

Famille : *Apiaceae* Lindl.

Genre : *Ammoides* Adans.

Espèce : *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr

Noms vernaculaires : Nounkha, Nûnkha

Composition chimique: Riche en huiles essentielles et en polyphénols.



Ammoides pusilla (Brot.) Breistr

Annexe 2

1. Enquête sur les infections urinaires

Numéro de malade

L'âge

Sexe

Rançonnement cliniques

Services

Chimie des urines

Observation (macro et microscopique)

Résultat

2. Données sur les patients infectés par *E coli*

Code	Service	Date de Prélèvement	Sexe	Age
3135	Pédiatrie	08-02-2019	femme	7 m
1514	Pédiatrie	11-02-2019	femme	2 ans
8724	Pédiatrie	25-02-2019	homme	2 m
8333	Médecine Interne	23-02-2019	femme	34

Annexe

Annexe 3. Les milieux de culture

Pour 1 litre de milieu

Gélose nutritif

Tryptone.....	5,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Agar agar bactériologique.....	12,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.	

Muller Hinton

Hydrolysât acide de caséine	17,5 g
Infusion de viande.....	2,0 g
Amidon soluble	1,5 g
Agar agar bactériologique.....	17,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.	

Bouillon coeur-cervelle

Extrait coeur-cervelle.....	17,5 g
Peptone pancréatique de gélatine	10,0 g
Chlorure de sodium.....	05,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Glucose.....	2,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.	

Gélose de MacConkey

Peptone pancréatique de gélatine	17,0 g
Tryptone.....	1,5 g
Peptone pepsique de viande	1,5 g
Lactose	10,0 g
Sels biliaires.....	1,5 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Rouge neutre	30,0 mg
Cristal violet	1,0 mg
Agar agar bactériologique.....	13,5 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.	

Résumés

الملخص

عدوى المسالك البولية هي واحدة من أكثر الأمراض المرتبطة بالصحة شيوعاً في جميع أنحاء العالم. ترتبط هذه الالتهابات ارتباطاً وثيقاً بمقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية والتي تعد السبب الرئيسي لزيادة معدلات الوفيات والمراضية في المستشفيات وكان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير المثبط لثلاثة زيوت أساسية *Origanum vulgare subsp glandulosum*, *Artemisia herba-alba*, *Ammoides pusilla* على سلالات *E. coli* BLSE المسؤولة عن التهابات المسالك البولية المعزولة في مستشفى الحكيم سعدان بسكرة. في هذا السياق، يُظهر فحص البكتيريا الخلوية للبول (ECBU) غلبة *E. coli* (62.5%) وارتفاع وتيرة في جناح الأطفال (62.06%). هذه السلالات المعرضة لتأثير الزيوت الأساسية الثلاثة، أظهرت حساسية عالية للزيوت العطرية من *Origanum vulgare* في حالة الهائمة والبيوفيلمية، أعطت في المتوسط على التوالي، منطقة تثبيط تساوي 41.25 مم، $\text{CMI} = 0.054\%$ ، $\text{CMIB} = 0.034\%$ ، في حين أن اثنين آخرين أقل نشاطاً.

الكلمات المفتاحية: التهابات المسالك البولية. *E. coli* BLSE، مقاومة المضادات الحيوية، زيوت أساسية، نشاط مضاد للجراثيم، نشاط المضادات الحيوية.

Résumé

L'infection urinaire compte parmi les maladies liées aux soins les plus commun à l'échèle mondiale. Ces infections sont en forte relation avec la résistance des germes aux antibiotiques qui est la cause principale de l'augmentation des taux de mortalité et de morbidité dans les hôpitaux. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de trois huiles essentielles *Origanum vulgare subsp. glandulosum*, *Artemisia herba-alba*, *Ammoides pusilla* sur des souches *E. coli* BLSE responsables d'infections urinaires isolées à l'hôpital Elhakime Saadane Biskra. Dans ce contexte, l'examen Cytobactériologique des Urines (ECBU) montre une prédominance d'*E. coli* (62.5%) avec une fréquence importante au service de la pédiatrie (62.06%). Ces souches soumises à l'effet des trois huiles essentielles, ont montré une grande sensibilité à l'huile essentielle de *Origanum vulgare* à l'état planctonique et biofilm. Cette huile essentielle a donné en moyenne des bon résultats à savoir des zones d'inhibition=41.25mm, des $\text{CMI}=0.054\%$, et des $\text{CMIB}=0.034\%$. Alors que les deux autres huiles sont s'avérées moins actives

Mots clés : Infections urinaires ; *E. coli* BLSE; Résistance aux antibiotiques; Huiles essentielles ; Activité antibactérienne ; Activité antibiofilm.

Abstract

Urinary tract infection is one of the most common health-related diseases worldwide. These infections are strongly related to the resistance of germs to antibiotics which is the main cause of the increase in mortality and morbidity rates in hospitals. The objective of this study was to evaluate the inhibitory effect of three essential oils *Origanum vulgare subsp. glandulosum*, *Artemisia herba-alba*, *Ammoides pusilla* on *E. coli* ESBL strains responsible for isolated urinary tract infections at Elhakime Saadane Biskra Hospital. In this context the Cytobacteriological Examination of Urines (ECBU) shows a predominance of *E. coli* (62.5%) and high frequency in the pediatric ward (62.06%). These strains subjected to the effect of the three essential oils, showed a high sensitivity to the essential oil of *Origanum vulgare* in the planktonic state and biofilm, It gave on average respectively, a zone of inhibition = 41.25mm, a $\text{MIC} = 0.054\%$, $\text{MBIC} = 0.034\%$. While the other two oils are less active.

Keywords: Urinary tract infections; *E. coli* ESBL; Antibiotic resistance; Essential oils ; Antibacterial activity; Antibiotic activity.

