

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la

Recherche Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'étude

En vue d'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Microbiologie

Filière : Biologie

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Thème :

**Activité anti biofilm des extraits des huiles essentielles de trois plantes :
Nigella sativa, Aloe vera et l'Artemisia et recherche d'une synergie
antimicrobienne.**

Réalisé par :

M^{lle}: NEDJADI Meriem

Mr: MAHDJOUB Djasser

Soutenu le : 13/07/2023 devant le jury composé de :

M^{me}. HAMAIDI.CHERGUI F Professeur Président Université de Blida 1

M^{me}. MOHMMED MAHMOUD. F M.C.A Examineur Université de Blida 1

M^{me}. AIT SAAD.BENOUSSAID. N M.C.A Promoteur Université de Blida 1

M^r. SMAIL. H Généticien Co promoteur SAIDAL-CRD

Année universitaire 2022 – 2023

Remerciements

*Avant tout, nous tenons à remercier **D**ieu le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la santé, le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères **R**emerciements à notre agréable*

***P**romotrice **M**me **A**it **S**aadi. **N**, maitre **D**e conférences **A** à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Science Biologiques, de l'Université Saad Dahleb Blida, **p**our son encadrement, Sa patience, Sa confiance, et Ses conseils judicieux, Son suivi et Ses directives qui nous ont énormément servi pour la concrétisation de ce travail.*

*Votre expertise et votre disponibilité ont été essentiels pour nous aider à donner le meilleur de nous-mêmes et à atteindre nos objectifs, **m**erci d'avoir été là pour nous.*

*Nous remercions également à notre Co promoteur Mr **S**mail. **H**, chercheur en biotechnologie Santé, industrie Pharmaceutique qui nous a dirigés Durant ce travail avec une grande rigueur scientifique, merci pour tous.*

Nous remercions chaleureusement tous les membres de notre jury d'évaluation,

***P**rofesseur **H**AMAIDI-**C**HERGI .**F**, notre chef d'option et présidente du jury, **V**otre sérieux, votre compétence et votre sens du **D**evoir nous a énormément marqués. **V**euillez trouver ici l'expression de Notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes Vos qualités scientifiques et humaines A Mme **M**ohammed **M**ahmoud. **F** notre examinatrice de mémoire, pour avoir accepté de consacrer son temps et son expertise à l'évaluation de notre mémoire.*

*Un grand merci à Mr **T**emmam **M**. ex Directeur du site de production à Saidal, Mme **O**usenna **S** Directrice du CRD Saidal qui nous ont donnés la chance de vivre une bonne expérience professionnel et à toutes personnes ayant participé de près comme de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apporté leur soutien et leurs encouragements durant la Réalisation de ce travail.*

Dédicace

*Aux plus chères de ma vie mes **p**arents «Djilali et Souad », les trésors de ma vie, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant mes études.*

*Trouvez ici, Chère **m**ère et **p**ère, dans ce modeste travail, le fruit de tant de dévouements et de sacrifices ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour.*

Puisse Dieu leur accorde santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un jour combler de joie leurs vieux jours et Que ma réussite soit le couronnement de leurs efforts.

*A ma grande mère, **Kheira**, la personne la plus idéale dans ce monde, pour leur prières et amour inconditionnel. Merci du fond du cœur pour tout et ta présence dans ma vie est un cadeau précieux, que Dieu te donne bonne santé et longue vie parmi nous.*

***Mes** chères tantes **Nacera** et **Yamina**, Je tenais à prendre un moment pour vous exprimer ma gratitude et vous remercier du fond du cœur pour l'amour que vous m'avez donné et tout ce que vous avez fait pour moi.*

*Ainsi mon oncle **Mustapha** et **Djaafar**, mon frère **Hakim** et mon chère **Amir**, à mes chères cousines **Nour**, **Soumia**, **Rania**, **Aya**, **Soulef** et à toute ma famille, à qui je souhaite une longue vie et que dieu ait leur âme pour ceux qui sont mort.*

*A Mes chères copines **Sihem**, **Ferial**, **Chahinez**, **Rony**, **Nachoua**, mon binôme **Djasser**, mon ami **Khalil**, toute la promo, tous nos professeurs particulièrement **Mme Ait Saadi** Ainsi que **Mme Henniche**, **Mr Zerouki**, **Mr Abdouni**, **Lynda**, **Meriem**, **Chourouk**, **Soumia**, le grand frère **Rafik** et toutes les équipes des laboratoires du **CRAPC** et **Microbiologie du CRD SAIDAL** et de l'Hôpital Central de l'Armé.*

Mille mercis du fond du cœur pour ceux qui m'ont encouragé à la réalisation de ce mémoire de fin d'études. Votre soutien, votre confiance et vos encouragements ont été d'une valeur inestimable, et je suis honoré d'avoir eu la chance de vous avoir dans ma vie.

Meriem.

Dédicaces

*Aux plus chères de ma vie mes **p**arents « **L**yezda et **L**oulou », les trésors de ma vie, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant mes études.*

***T**rouvez ici, Chère **m**ère et **p**ère, dans ce modeste travail, le fruit de tant de dévouements et de sacrifices ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour.*

***P**uisse Dieu leur accorde santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un jour combler de joie leurs vieux jours et Que ma réussite soit le couronnement de leurs efforts.*

*A mon chère petit frère **M**alikou, mon bras droit, tu as été une source constante de soutien, de force et de courage, je suis extrêmement reconnaissant de t'avoir dans ma vie.*

*A ma grande mère, **F**atiha « mamy », la personne la plus idéale dans ce monde, pour son attentions particulières, leur prières et amour inconditionnel. Merci du fond du cœur pour tout et ta présence dans ma vie est un cadeau précieux, que Dieu te donne bonne santé et longue vie parmi nous.*

***M**a chère **P**outi, Je tenais à prendre un moment pour vous exprimer ma gratitude et vous remercier du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait pour moi. Au fil des années, vous êtes devenue bien plus qu'une tante, vous êtes devenue ma confidente, mon modèle et ma meilleure amie.*

*Ainsi ma tante **N**ounousa, mon oncle **M**ême et sa femme **f**ati, le petit **M**omo, à ma sœur **D**orsav et à toute la famille **MAHDJOUR**, à qui je souhaite une longue vie et que dieu ait leur âme pour ceux qui sont mort.*

*A Mes chère copains et mon binôme **M**imich et sa maman **S**ousou, Mille merci du fond du cœur pour ceux qui m'ont encouragé à la réalisation de ce mémoire de fin d'études. Votre soutien, votre confiance et vos encouragements ont été d'une valeur inestimable, et je suis honoré d'avoir eu la chance de vous avoir dans ma vie.*

***D**jasser.*

Résumé :

L'objectif assigné à la présente étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne et antibiofilm d'extraits méthanoliques des huiles et la synergie de trois plantes médicinales : *Nigella sativa* (L.) *Aloe vera* et *Artemisia herba alba*. Pour cela nous avons développé une problématique de recherche basée sur la sélection de souches fortement formatrices de biofilms, sur 592 prélèvements d'origine variables (pus, hémoculture, cathéters, implants...etc.), collectés à l'hôpital militaire (HCA) d'Alger. Nous avons focalisé notre étude sur la capacité du genre *Staphylocoque* à développer un biofilm. Il en ressort que 20 % seulement des échantillons appartiennent à ce genre.

Pour le screening phytochimique, nous avons montré la présence des polyphénols et flavonoïdes excepté pour l'*Aloe vera* qui est dépourvue de polyphénols. L'analyse par GC-MS a pu identifier dans l'huile essentielle (HE_A) d'*Artemisia herba alba* (L.), 46 composés. La détermination de l'activité antimicrobienne, a montré aucune activité pour les deux extraits méthanoliques (EM_N et EM_{AV}) analysés et une activité importante pour les huiles (HV_N et HE_A) vis-à-vis des six souches du genre *Staphylocoque* sélectionnées formatrices de biofilm (soit les souches S1, S2, S3, S4, S5 et la souche de référence ATCC 25923. La détermination de leur CMI et CMB a été faite par la technique de microdilution en milieu solide sur les souches plus résistantes S5 et S6. Les valeurs des CMI de l'huile végétal HV_N, sont de 0.25% et 0.125% pour les souches S5 et S6 respectivement, et les CMB qui sont de 1% et 0.5 pour ces deux souches résistantes S5 et S6 respectivement. Pour l'huile essentielle HE_A, la CMI est de 0.06% pour les deux souches S5 et S6 tandis-que leur CMB est de 0.25% et 0.125% pour les souches S5 et S6 respectivement. La CMI de la synergie (HV_N et HE_A), est de 0.5% avec une CMB supérieure à 1% contre les deux souches S5 et S6 analysées. Nos résultats sur L'évaluation de potentiel actif antibiofilm sur les souches sélectionnés en utilisant la technique de culture sur plaque (TCA) ont montré un effet inhibiteur sur la formation de biofilm et dose dépendant pour les trois souches S1, S5 et S6 analysées.

Pour l'huile HE_A d'*Artemisia*, nous notons un taux de réduction du biofilm très élevé et dose dépendant avec les valeurs de (4%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25% et 0.125%) aux doses de (50%, 47%, 42%, 42% et 22%) respectivement. Pour les souches S4 et S6, les valeurs des taux de réduction pour les concentrations de 4% et 2%, sont de 40%, 22% et 10%, 11% respectivement. Pour le mélange HV_N + HE_A par contre, nous n'observons aucun effet inhibiteur sur la formation du biofilm.

Mots clés : Activité antimicrobienne, antibiofilm, huile essentielle, huile végétal, extrais méthanoïque, *Artemisia herba alba*, *Nigella sativa*, *Aloe vera*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract:

The objective assigned to this study is to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of methanolic oil extracts and the synergy of three medicinal plants: *Nigella sativa* (L.) *Aloe vera* and *Artemisia herba alba*. For this we have developed a research problem based on the search and selection of highly biofilm-forming strains, on 592 samples of variable origin (pus, blood culture, catheters, implants, etc.), collected at the military hospital (HCA) from Algiers. We focused our study on the ability of the *Staphylococcus* genus to develop a biofilm. It appears that only 20% of the samples belong to this genus

phytochemical screening, we showed the presence of polyphenols and flavonoids except for *Aloe vera* which is devoid of polyphenols. GC-MS analysis was able to identify 46 compounds in the essential oil (HE_A) of *Artemisia herba alba* (L). The determination of the antimicrobial activity showed no activity for the two methanolic extracts (EM_N and EM_{AV}) analyzed and significant activity for the oils (HV_N and HE_A) against the six strains of the genus *Staphylococcus* selected biofilm-forming strains (i.e. strains S1, S2, S3, S4, S5 and the reference strain ATCC 25923). The determination of their CMI and CMB was made by the technique of microdilution in solid medium on the more resistant strains S5 and S6. The MIC values of the HV_N vegetable oil are 0.25% and 0.125% for the S5 and S6 strains respectively, and the CMB values which are 1% and 0.5 for these two resistant strains S5 and S6 respectively. Essential oil HE_A, the MIC is 0.06% for the two strains S5 and S6 while their CMB is 0.25% and 0.125% for the strains S5 and S6 respectively. The MIC of the synergy (HV_N and HE_A), is 0.5% with a CMB greater than 1% against the two strains S5 and S6 analyzed. Our results on the evaluation of antibiofilm active potential on the selected strains using the technique of culture on plate (TCA) showed an inhibitory effect on the formation of biofilm and dose-dependent for the three strains S1, S5 and S6 analyzed.

Artemisia HE_A oil, we note a very high and dose-dependent biofilm reduction rate with values of (4%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25% and 0.125%) at doses of (50%, 47%, 42%, 42% and 22%) respectively. For the S4 and S6 strains, the values of the reduction rates for the concentrations of 4% and 2% are 40%, 22% and 10%, 11% respectively. For the HV_N + HE_A synergy, on the other hand, we do not observe any inhibitory effect on the formation of the biofilm.

Key words: Antimicrobial activity, antibiofilm, essential oil, vegetable oil, methanolic extract, *Artemisia herba alba*, *Nigella sativa*, *Aloe vera*, *Staphylococcus aureus*

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للميكروبات ومضاد الانسجة الخلوية لمستخلصات الميثانول، الزيوت
ثلاثة نباتات الحبة السوداء الوي فيرا و الشيح. لذلك قمنا بتطوير مشكلة بحثية بناء على البحث واختيار سلالة تتكون وتأزر

الاعشبية الحويبية بصفة عالية، من 592 عينة من أصل مختلف (القيح، زراعة الدم، القسطرة، الغرسات...الخ)، تم جمعها
العسكري بالجزائر العاصمة. ركزنا في دراستنا على قدرة النوع ستافيلوكوك على تطوير غشاء حيوي. في المستشفى
يظهر أن 20% فقط من العينات تنتمي الى هذا النوع

بالنسبة للفحص الكيميائي النباتي، أظهرنا وجود البوليفينول والفالفونويد باستثناء الوي فيرا الخالي من البوليفينول. تمكن
تحليل كروماتوغرافيا الغاز مقرون بمطياف الكتلة من تحديد في الزيت الاساسي للشيح (الارتيميسيا) 46 مركب.

أظهر تحديد النشاط المضاد للميكروبات عدم وجود نشاط لمستخلصي الميثانول الذي تم تحليله ونشاط مهم للزيوت مقابل
السلالات الست من نوع ستافيلوكوك المختارة على حسب صناعتها للأغشية الحويبية-س1 وس2 وس3 و السلالة
المرجعية 25923. تم تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط من خلال تقنية التخفيف الدقيق الصلب والمتوسط على السلالتين
س5 وس6 الاكثر مقاومة. تبلغ قيم التركيز الأدنى المثبط للزيت النباتي 0.25% و 0.125% للسلالتين س5 وس6 على
التوالي، وقيم الحد الأدنى من تركيز مبيد للجراثيم هي 1% و 0.5 لهاتين السلالتين المقاومتين س5 وس6 على التوالي.
بالنسبة للزيت الاساسي، تبلغ نسبة التركيز الأدنى المثبط 0.06% لكل من السلالتين س5 وس6 بينما يبلغ الحد الأدنى من
تركيز مبيد للجراثيم 0.25% و 0.125% لس5 وس6 على التوالي. يبلغ نسبة التركيز الأدنى المثبط للمزيج و 0.5% مع
الحد الأدنى من تركيز مبيد للجراثيم أكبر من 1مقابل السلالتين س5 وس6 اللتين تم تحليلهما. أظهرت نتائجنا حول تقييم
امكانية وجود نشاط مضاد للفيلم على سلالة وعلى تكوين الاغشية الحويبية والجرعة المعتمدة على السلالة المختارة
باستخدام تقنية زراعة الصفائح تأثيرا مثبط على ثلاث سلالات س1 وس5 وس6 التي تم تحليلها

بالنسبة لزيوت الشيح(ارتميسيا). نلاحظ معدل انخفاض كبير جدا في الاغشية الحويبية والجرعة المعتمدة بقيم (4% و 2% و
1% و 0.5% و 0.12%) بجرعات '50% و 47% و 42% و 42% و 22% على التوالي). بالنسبة لسلالات س4 وس6
0.25%) بالنسبة لتأزر ومع ذلك قيم معدل الانخفاض للتركيزات البالغة 4% و 2% هي 40% و 22% و 10% و 11% على
التوالي. بالنسبة لمزيج الزيوت الاساسي والنباتي لا نلاحظ أي تأثير مثبط على تكوين الأغشية الحويبية.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للميكروبات، مضاد حيوي، زيت عطري، زيت نباتي، مستخلص الميثانوليك، الشيحالحبة
السوداء، الالوي فيرا، ستافيلوكوكيساوريوس

Liste des abréviations

ADNe : Acide désoxyribonucléique extracellulaire

ADH : Hormone antidiurétique

Agr : Gène régulateur accessoire.

BHIB : Bouillon cœur-cervelle

Ca²⁺ : Calcium élémentaire

CRAPC : Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico- Chimiques

DO : Densité optique

Dot : Densité é optique témoin

EM : Extrait méthanoïque

Fe³⁺ : Ion ferrique

GC : Le taux de GC ou pourcentage de GC, ou coefficient de Chargaff

HCA : Hôpital centrale de l'armée

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HE : Huile essentiel

HE_A : Huile essentiel d'*Artemisia herba alba*

HV : Huile végétal

HV_N : Huile végétal de *Nigella sativa*

MSCRAMM : Composants microbiens de surface reconnaissant les molécules de la matrice adhésive

MH : Milieu Müller-Hinton

NaCl : Le chlorure de sodium

Na²⁺ : Ion sodium SARM :

N. sativa : *Nigella sativa*

NIT : Potassium nitrate

O₂ : Oxygène

OMS : *Organisation mondiale de la Santé*

PAL : 2-naphtyl phosphate

PLP : Protéine de liaison à la pénicilline

PSM : Modulines solubles dans le phénol

QS : Quorum-sensing

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SARS : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline

VP : Sodium pyruvate

Liste des figures

Figure 1: Forme des cellules Staphylococcique sous microscope électronique à balayage	05
Figure 2: Etapes de formation du biofilm de <i>staphylococcus aureus</i>	08
Figure 3: Fleur, fruit et graine de <i>Nigella sativa</i>	12
Figure 4:Plante d' <i>Artemisia herba alba</i>	14
Figure 5:Plante d' <i>Aloe vera</i>	16
Figure 6: Automate RAL SRAINER pour la coloration de gram.....	20
Figure 7: Etapes de préparation du gel d' <i>Aloe vera</i>	24
Figure 8: Extraction méthanoïques de l' <i>Aloe vera</i>	25
Figure 9: Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.....	26
Figure 10: Extraction d'huile végétale des graines de la <i>N.sativa</i> par l'appareil de la presse à froid.	27
Figure 11: Rota vapeur.....	28
Figure 12: Etape de l'activité antimicrobienne.....	30
Figure 13: Préparation des dilutions des HES	32
Figure 14: Préparation de la microplaque	33
Figure 15: Fréquence des prélèvements.....	36
Figure 16 : <i>S.aureus</i> sur différents milieux de culture.....	37
Figure 17: Observation des souche de <i>S.aureus</i> isolées apres coloration de Gram (GX100)	37
Figure 18:Résultas du test de coagulase	38
Figure 19 : Résultas du test de catalase	38
Figure 20 : Résultat de la galerie Api Staph sur l'automate Phoenix	38
Figure 21 : Taux de résistance et de sensibilité des souches de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	39
Figure 22 : Antibiogramme de la souche <i>S. aureus</i>	40
Figure 23 : Fréquence des prélèvements positifs.....	40
Figure 24 :Production du slime par <i>S.aureus</i> sur milieu Rouge Congo.....	41
Figure 25 : Résultat de la formation du biofilm sur microplaque.....	41
Figure 26 : Résultats de l'activité antimicrobienne par l'aromatogramme.....	45
Figure 27 : Résultats du CMI des HV _N , HE _A et HV _N +HE _A vis-à-vis S 05 et S06	46
Figure 28 : Résultat du CMB des HV _N , HE _A et HV _N +HE _A vis-à-vis S 05 et S06.....	47
Figure 29 : Résultats des activités antibiofilm de l'HE _A , HV _N et HV _N + HE _A vis-à-vis <i>S. aureus</i>	47

Liste des tableaux

Tableau I : Description des infections causées par le biofilm.	9
Tableau II : Répartition des prélèvements selon les services	17
Tableau III : Résultat de la galerie Api Staph par l'automate Phoenix	39
Tableau IV : Rendement (%) des différents extraits des trois plantes	42
Tableau V : Résultats de l'étude phytochimique des graines de <i>N.sativa</i> et gel d' <i>Aloe vera</i>	43
Tableau VI : Résultats de la Concentration minimale inhibitrice (CMI) par micro dilution en milieu gélose.....	45
Tableau VII : Résultats de la concentration minimale bactéricide	46

Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

CHAPITRE01

I. Synthèse bibliographique

I.1 *Staphylococcus aureus*.....03

I.1.1 Généralités.....03

I.1.2 Taxonomie.....03

I.1.3 Caractéristiques.....03

I.1.4 Mécanisme de la pathogénicité.....04

I.2. Formation du biofilm chez les *Staphylococcus aureus*05

I.2.1 Généralités.....05

I.2.2 Facteurs favorisant la formation de biofilm.....06

I.2.3 Etapes de formation de biofilm.....07

I.2.4 Les infections liées au biofilm.....08

I.3. Traitement actuels et nouvelles approches thérapeutiques.....09

I.3.1 *Nigella sativa*.....11

I.3.1.1 Taxonomie.....11

I.3.1.2 Aspect botanique.....11

I.3.1.3 Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques.....12

I.3.2 *Artemisia herba alba*.....13

I.3.2.1 Taxonomie.....13

I.3.2.2 Aspect botanique.....13

I.3.2.3 Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques.....	14
I.3.3 <i>Aloe vera</i>.....	15
I.3.3.1 Taxonomie.....	15
I.3.3.2 Aspect botanique.....	15
I.3.3.3 Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques.....	16
II. Matériel et méthodes	
II.1 Matériel	17
II.2 Méthodes	18
II.2.1 Prélèvement et isolement des souches du <i>Staphylococcus aureus</i>	18
II.2.2 Identification des souches bactériennes isolées	19
II.2.3 Sélection des souches formatrices du biofilm	23
II.2.4. Préparation des extraits et huiles des trois plante.....	24
II.2.5 Etude qualitative et quantitative des compositions chimiques des plantes étudiées.....	28
II.2.6 Activités antimicrobiennes et antibiofilm.....	29

CHAPITRE 03 : RESULTATS ET DISSCUSSION

III.1 Prélèvements et études microbiologiques.....	36
III .2 Isolement et identification des souches.....	36
III. 3. Fréquence des prélèvements positifs.....	40
III .4 L'aptitude des souches à former de biofilms.....	40
III .5 Préparation des extraits et huiles des trois plantes.....	42
III .6 Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne.....	44
III .7 Evaluation de l'activité antibiofilm.....	47
Conclusion.....	55

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus, pathogène redoutable qui est fréquemment identifié comme l'une des principales causes d'infections communautaires et nosocomiales. Il est souvent impliqué dans des infections aiguës et chroniques, principalement en raison de sa capacité à adhérer aux implants médicaux et à former des biofilms (**Lee et al., 2018**). Sa capacité à former un biofilm, lui permet de contourner les défenses de l'organisme humain et de résister aux traitements antibiotiques, ce qui peut expliquer sa résistance aux antibiotiques, sa virulence et sa capacité à survivre sur différentes surfaces (**Derek et Kenneth, 2017**).

La notion de Biofilm est plus récente et peu de travaux scientifiques qui sont réalisés à cet effet pour résoudre la problématique de résistance aux biofilms. Ces derniers constituent une communauté de microorganismes fixée à des surfaces biotiques et abiotiques. La formation de communautés de biofilms sessiles implique des événements très complexes et dynamiques pour y arriver à une forme irréversible et résistante. Il a été démontré que ces structures sont la source de problèmes de bio-contamination dans divers domaines tels que la santé, l'environnement et l'industrie. En milieu hospitalier, parmi toutes les infections microbiennes et chroniques, 65% et 80%, respectivement, sont associées à la formation de biofilms, le plus souvent sur un matériel implanté contaminé et les pathologies chroniques (**Jamal et al., 2018**). Une fois que cette communauté de biofilms s'installe, elle devient très résistante à tout traitement antibiotique et difficile à éliminer, causant ainsi diverses maladies infectieuses

Il est donc crucial de découvrir de nouveaux composés anti-staphylocoque efficaces, dotés d'une activité antibiofilm, afin de faire face à la menace des infections causées par des souches multirésistantes aux antibiotiques (**Von Nussbaum et al., 2006**).

Afin d'apporter une solution à cette problématique d'infections d'origine microbiennes le recours à la voie alternative utilisant les plantes médicinales connues pour leurs vertus thérapeutiques diverses s'impose (**Ducrot et al., 2017**).

L'Algérie, étant très avantagée dans ce domaine de soins par les plantes, de par sa position biogéographique importante et grâce à sa flore qui bénéficie d'une immense diversité écologique et floristique (**Hanifi, 1991**), comprenant environ 4450 espèces et sous-espèces indigènes (**Dobignard et Chatelain, 2010-2013**). Parmi les plantes médicinales les plus utilisées nous citons, *Nigella sativa* et particulièrement ses graines, l'*Artemisia herba alba* ou encore l'armoise blanche désignée en arabe sous le nom de «Chih» et l'*Aloe vera barba densis Miller*, en vertu de leurs importantes propriétés thérapeutiques largement démontrées.

Nigella.sativa est connue depuis l'antiquité pour ses multiples vertus thérapeutiques. Un grand nombre de composés naturels obtenus à partir d'extraits et huiles de cette plante ont

montré un large spectre d'activités biologiques. Ces activités se traduisent par les propriétés antispasmodiques, carminatives, hépato-protectrices, antivirales, anticancéreuses, antibactériennes et antibiofilm (**Tavakkoli et al., 2017 ; Almatroudi et al., 2020**).

La plante *Artemisia herba alba* est largement utilisée dans la médecine traditionnelle en Algérie, en particulier par les populations du Sahara central. Cette plante est à la fois une source de fourrage et une plante aromatique (**Bouzidi, 2016**). Plusieurs études scientifiques ont prouvé l'efficacité de l'*Artemisia herba alba* en tant qu'agent antidiabétique, antibactérien, antioxydant, anti-venin, hypoglycémique et à activité insecticide.

L'*Aloe vera* est souvent surnommée la "plante miracle" ou la "guérisseuse de la nature" est utilisée en thérapeutique depuis des siècles. Cette plante suscite un intérêt particulier et réserve de nombreuses surprises, en raison de sa longue réputation historique en tant qu'agent curatif et de son utilisation répandue dans les thérapies complémentaires connus pour leurs propriétés antioxydants, antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires, antiprolifératives et antibiofilm (**Mehta, 2017 ; Mehrishi et al., 2022**).

L'originalité de ce travail est de sélectionner des souches de *Staphylococcus aureus*, performantes hautement formatrices de biofilms et responsables des pathologies nosocomiales au sein de l'hôpital HCA de l'armée. Le premier chapitre traite l'isolement et la caractérisation des souches bactériennes sur les surfaces hospitalières et différents prélèvements pathologiques, puis de vérifier leur capacité à former des biofilms dans le second chapitre. Enfin la compréhension et l'étude des activités antimicrobienne et antibiofilms de nos extraits, huiles et la synergie des trois plantes étudiées vis-à-vis de cette souche multi résistante *Staphylococcus aureus* ainsi sélectionnée et pouvant constituer une alternative naturelle pour vaincre et traiter la multi résistance due aux biofilms.

CHAPITRE 01
(Synthèse Bibliographique)

I.1. *Staphylococcus aureus*

I.1.1. Généralité

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène majeure provoquant la septicémie mortelle chez l'homme, avec des infections fréquentes dans les contextes communautaires et hospitaliers «maladies nosocomiales». L'apparition d'une nouvelle souche multi résistante, en particulier le SARM, rend inefficace le traitement par les antibiotiques usuels (**Taylor et Unakal, 2022**).

Cette bactérie est à l'origine de plusieurs infections de types aiguës et chroniques chez l'homme (**Manandhar, 2018**), telles que la bactériémie, l'endocardite infectieuse (**Le Moing, 2022**), les infections de la peau et des tissus mous (**Dryden, 2009**), l'ostéomyélite (**Parastan, 2020**), l'arthrite septique (**Schmitt, 2022**), les infections pulmonaires (**Valour et al., 2013**), les infections de prothèses, la gastro-entérite, la méningite, le syndrome de choc toxique et les infections des voies urinaires (**Taylor et Unakal, 2022**).

I.1.2 Taxonomie

D'après la 9ème édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1994), *Staphylococcus aureus* est classé parmi les bactéries à Gram positif à faible teneur en GC, avec un pourcentage compris entre 30 et 39% dans le domaine bactérien (**Touaitia, 2016**).

D'après Parul Parvesh et al., (2022), *S aureus* fait partir du :

Règne : *Bactéria*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèces : *Staphylococcus aureus*

I.1.3. Caractéristiques

Staphylococcus aureus est une bactérie à GRAM positif (**Robert et Timothy, 2018**), se présente sous différentes formes, notamment en petits amas de coques, en diplocoques ou en très courtes chaînettes et mesurant de 0,5 à 1,5µ de diamètre (**Leloir et Gautier, 2010**). C'est l'une des bactéries non productrices de spores, elles sont

immobile et parfois encapsulées visible au microscope optique sauf pour de très rares souches qui sont entourées d'un pseudo capsule (**Le Minor et Veron, 1990**).

S. aureus se cultive facilement sur des milieux courants (gélose nutritive, bouillon nutritif, sur gélose au sang et le milieu sélectif Chapman) à une température de 37°C de 18 à 24h avec un pH optimal de 7,5. Elle est même capable de se développer dans des conditions hostiles comme dans des milieux très salins (jusqu'à 7 % de NaCl) (**Djedidi, 2021**). En bouillon ordinaire, la culture de *S. aureus* forme un trouble uniforme abondant et sur gélose ordinaire les colonies sont lisses, rondes de 1 à 3 mm de diamètre. Elles sont arrondies, bombées, opaques, brillantes et peuvent parfois être colorées en jaune-doré (*aureus*), par contre sur gélose profonde la croissance se manifeste sur toute la hauteur du tube, ce qui indique un caractère aéro-anaérobie facultatif (**Yves et Michel, 2009**).

Chaque souche du genre *Staphylococcus* est capable de produire une catalase et ne possède pas d'oxydase (**Le Minor et Veron, 1990**). Ainsi, les souches de *S. aureus* sont coagulase + (**Tristan et Rasigade, 2019**), indole -, acétone +, uréase +, thermonucléase+, hémolyse+, phosphate alcaline +, beta glycosidase +, beta galactosidase -, produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine, réduisant les nitrates en nitrites, hydrolyse de l'esculine (**Le loir et Gantier, 2010**). Elles ont la capacité de liquéfier la gélatine et de fermenter de nombreux sucres comme le glucose, le saccharose, le lactose et le mannitol (**Clave, 2013**).

I.1.4. Mécanismes de la pathogénicité :

La pathogénie de *S. aureus* est un phénomène complexe, faisant intervenir une multitude de facteurs de virulences. La plupart des constituants de la paroi sont impliqués dans cette virulence y compris le peptidoglycane (**Dyon-Tafani, 2019**), les acides teichoïques et lipoteichoïques responsables de la sécrétion de cytokines par les cellules lymphomonocytaires, lysotypie des staphylocoques (**Oliveira et al., 2018**) et des polysaccharides capsulaires chez la plupart des souches, lui conférant une meilleure résistance aux souches contre l'opsonisation et la phagocytose (**Accarias, 2014 ; Vieu, 2014**).

De plus la bactérie possède un grand nombre de protéines de surface appelées adhésines tel que les protéines MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules) les SERAM (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) (**Morgene, 2018**), qui sont liées ou diffusibles conférant à la

bactérie la capacité de surmonter les défenses de l'hôte et à envahir, coloniser et survivre dans les tissus (Accarias, 2014). D'autres facteurs de virulence comme les toxines sont élaborées par *S. aureus* tel que : les hémolysines (Oliveira et al., 2018), la leucocidine (Fofana, 2018), l'exfoliatine, les entérotoxines et la toxine responsable du choc toxique staphylococcique (tsst-1) (Troillet, 2014) (Figure 1).

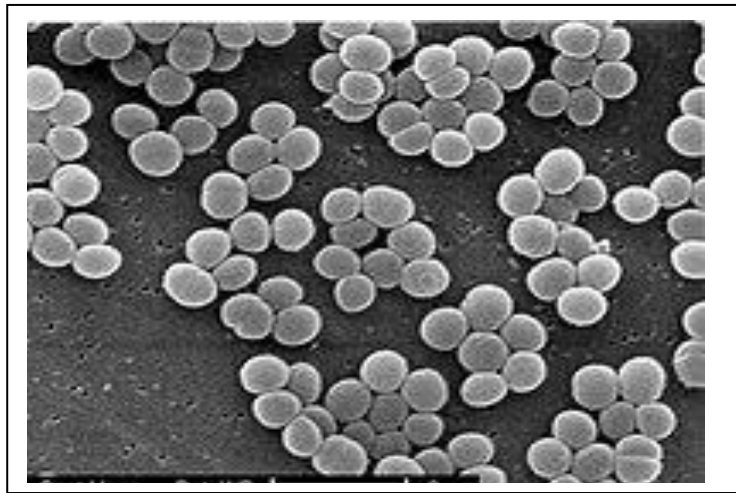


Figure 1: Forme des cellules Staphylococciques sous microscope électronique à balayage (G 10000X) (Matthew, 2001).

Les souches de *Staphylococcus aureus* peuvent se présenter sous deux formes principales : la forme planctonique (individuelle) dispersée et libre dans un environnement liquide, et la forme biofilm (sessiles) qui représente leur mode de croissance le plus fréquent dans la nature (Parastan et al., 2020).

I.2. Formation de biofilm chez les *Staphylococcus aureus*

I.2.1. Généralité

Staphylococcus aureus est l'une des causes majeures des infections communautaires et nosocomiales. Ce germe est responsable des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité à adhérer sur les implants médicaux et à former un biofilm résistant (Verma et Singh, 2015).

L'Organisation mondiale de la santé considère que *S. aureus* est un pathogène extrêmement important pour lequel de nouvelles thérapies doivent être développées, en particulier pour traiter et vaincre la résistance liée aux implants biofilms (Pinto et al., 2019).

La découverte des biofilms remonte aux observations d'Antone Van Leeuwenhoek au XVIIe siècle vers 1689, en prélevant des échantillons de sa propre bouche et grâce à

son microscope, il a pu observer des communautés de microorganismes agrégés dans la croute des dents ainsi que des particules grattées de sa langue. Les observations de Van Leeuwenhoek sont considérées comme l'une des premières descriptions de biofilms **(Dobell, 1960)**.

Le biofilm est très connu comme la forme de développement majoritaire des bactéries dans la nature **(Kara Terki et al., 2020)**. Ce sont des communautés complexes de microorganismes, qui se fixent sur des surfaces et forment une matrice auto-sécrétée de substances polymériques extracellulaires ou EPS **(Kara Terki et al., 2013)**. La matrice extracellulaire est composée de polysaccharides, de protéines et de molécules lipidiques produites par les bactéries du biofilm, ainsi que de l'ADN **(Vestby et al., 2020)**. Les biofilms se forment naturellement dans de nombreux environnements, y compris les rivières, les lacs, les océans, les sols et les surfaces des organismes vivants **(Flemming et Würtz, 2019)**. Ils sont également couramment trouvés sur des surfaces artificielles telles que les prothèses médicales, les implants dentaires **(Arciola et al., 2018)**, les conduites d'eau et les surfaces de contact alimentaire **(Lamache et al., 2020)**. Les biofilms peuvent avoir des effets bénéfiques ou nuisibles sur les organismes avec lesquels ils interagissent, selon le contexte environnemental **(Meneses et Landoni, 2011)**.

Grâce à l'utilisation de la microscopie optique, suivie de la microscopie confocale, il a été démontré que le biofilm est constitué de groupements de microorganismes qui sont séparés par des espaces vides, dépourvus de bactéries, mais traversés par des flux aqueux. Ces flux agissent comme des "canaux" à l'intérieur du biofilm, permettant la circulation des fluides et fournissant ainsi aux bactéries les nutriments nécessaires tout en éliminant leurs produits de dégradation **(Roux et Chigo, 2006)**.

I.2.2. Facteurs favorisant la formation du biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe dépend de plusieurs facteurs **(Rochemonteix et Geneviève, 2009 ; Andrade, 2016 ; Lamache et al., 2020) :**

- Les caractéristiques de la surface (la rugosité, la texture, la présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface, la présence d'aspérités et d'hydrophobicités).
- les conditions du milieu environnant (le pH, la température, la vitesse du flux, le fer, les nutriments, les cations (Ca²⁺, Fe³⁺, Na²⁺,...)).

- La source de carbone disponible, la disponibilité du milieu en oxygène, la présence d'agent antimicrobien et les propriétés spécifiques des bactéries (la production d'exo polysaccharides, la présence de fimbriae et des flagelles et l'hydrophobicité de la surface de la bactérie).

I.2.3 Etapes de la formation du biofilm

La formation d'un biofilm de *S.aureus* est un processus qui se déroule en cinq étapes : Attachement initial, multiplication, exode, maturation et dispersion des cellules bactériennes (**Figure 2**).

Les cellules de *S. aureus* se fixent aux surfaces abiotiques ou biotiques via des interactions hydrophobes (**Liu et al., 2018**) ou des MSCRAMM (Composants microbiens de surface reconnaissant les molécules de la matrice adhésive) et forment un biofilm composé de cellules et d'une matrice protéique. Une sous-population de cellules se libère du biofilm, formant des micros colonies tridimensionnelles. Ces dernières se forment à partir des cellules restées attachées, se multipliant rapidement et formant des agrégats solides. La détection de quorum, régulée par le système Agr (Gène régulateur accessoire), entraîne la modification de la matrice du biofilm et la dispersion des cellules par l'activation de protéases et/ou la production de PSM (Modulines solubles dans le phénol) (**Moormeier et Bayles, 2017**).

Au cours du processus de formation du biofilm, les micro-organismes ont la capacité de communiquer les uns avec les autres grâce à la détection de quorum-sensing (**Preda et Sandulescu, 2019**). En fait, le QS est un mécanisme utilisé par la plupart des bactéries pour répondre à leur condition environnementale en produisant un peptide auto-inducteur (AIP) (**Singh et Bhatia, 2018**).

Chez les bactéries Gram positives, telles que *S. aureus*, ce système provoque une modification de la formation du biofilm (**Rosenthal et al., 2014 ; Khan et al., 2015**). La détection du quorum régule l'activité métabolique des cellules planctoniques et peut induire la formation d'un biofilm microbien et une virulence accrue (**Parastan et al., 2020**).

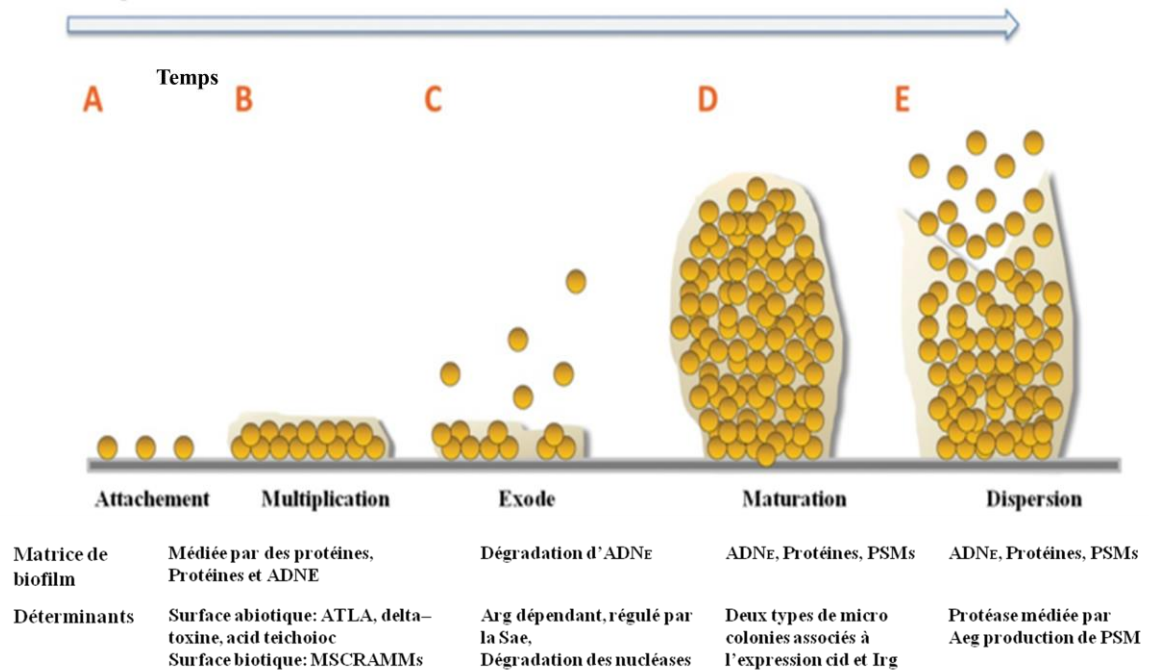


Figure 2 : Etapes de la formation du biofilm de *S. aureus* (Moormeier et Bayles, 2017).

I.2.3 Les infections liées aux biofilms

La formation de *Staphylococcus aureus* le biofilm provoque des infections importantes dans le corps humain (Nasser et al., 2022). Quelles que exemple des maladies causée par les *S. aureus* biofilm (Tableaux I).

Tableaux I : Description des infections causées par le biofilm.

Synthèse bibliographique

La maladie	Description	Référence
Infections liées à un matériel implanté	La première infection se manifeste par une bactériémie à <i>S. aureus</i> d'un patient porteur d'un stimulateur cardiaque, tous les matériaux implantés sont exposés à ce risque (les cathéters vasculaires et urinaires, sondes orotrachéales, stimulateurs cardiaques et valves cardiaques prothétiques, prothèses articulaires ou matériels d'ostéosynthèse, les fils, les broches, les fixateurs externes, les plaques, les vis, les clous et les implants à mini-gros fragments).	(Marrie et al., 1982) (Oliveira et al., 2018) (Lambert et al., 2020)
L'ostéomyélite	C'est une infection de l'os.	(Lew et Waldvogel, 2004) (Parastan et al., 2020)
Les infections buccales telles que la Parodontite	une inflammation et une infection des ligaments et des os qui soutiennent les dents et la péri-implantite	(Archer et al., 2011)
Les infections chroniques de plaies	telles que les ulcères du pied diabétique, les ulcères de stase veineuse et les escarres	(Gjødsbøl et al., 2006) (Idrees et al., 2021)
La rhinosinusite chronique	est une maladie inflammatoire associée à une infection plus grave, chirurgicalement récalcitrante et à une évolution postopératoire défavorable	(Ferguson et Stolz, 2005) (Psaltis et al., 2008)
Endocardite	C'est une infection de la valve cardiaque	(Røder et al., 1999) (Cahill et al., 2017)
Les infections oculaires associées aux biofilms de <i>S. aureus</i>	comprennent la conjonctivite, la kératite et l'endophtalmie	(Murugan et al., 2010) (Bloise, 2017)

I.2.5 Traitements actuels et nouvelles approches thérapeutiques

La multi résistance du genre staphylocoque aux antibiotiques et à d'autres agents antimicrobiens est souvent acquise par le biais de mutations chromosomiques, de transferts génétiques tels que l'échange de plasmides et de transposons (Bagnoli et al., 2017).

La capacité de *S. aureus* à provoquer diverses infections est principalement due à l'acquisition d'une résistance à plusieurs médicaments, à sa gamme diversifiée de facteurs de virulence et à sa capacité à produire un biofilm (**Figueiredo et al., 2017**).

L'apparition d'une nouvelle souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline (SARM) (**Silva et al., 2022**) faisant impliquer divers mécanismes qui incluent l'inactivation enzymatique des antibiotiques, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou la diminution de la pénétration de la molécule (**Quincampoix et Mainardi, 2001**). Cette multi résistance complique encore la situation et limite les traitements usuels utilisant les antibiotiques.

Au fil du temps, de nouvelles approches thérapeutiques ont été développées pour cibler les biofilms de manière plus efficace. Certaines de ces approches incluent :

- L'utilisation d'extraits de plantes comme stratégie prometteuse dans la lutte contre les agents pathogènes (**Kalia, 2013 ; Ribeiro et al., 2021**).
- La thérapie combinée est l'utilisation de combinaisons d'agents antimicrobiens pour cibler différentes couches des biofilms et augmenter l'efficacité de l'élimination (**Hawas et al., 2022**).
- La phagothérapie est également considérée comme l'une des alternatives thérapeutiques les plus prometteuses pour traiter les infections causées par le biofilm chez *S. aureus*, suscitant un vif intérêt (**Kolenda et al., 2019**).
- L'utilisation d'agents antibiofilm spécifiques comme un développement de médicaments spécifiquement conçus pour cibler les mécanismes de formation et de maintien des biofilms, tels que, les enzymes (**Costa, 2020**), les bactérie avec ces exo produits (la protéine altérocine chez *Pseudomonas*) (**Jouault, 2019**) dispersantes de biofilm.
- L'utilisation des nanoparticules telles que des nanoparticules d'argent, de zinc, ou de dioxyde d'étain (**Obeizi et al., 2021**), qui peuvent pénétrer les biofilms et exercer des effets antimicrobiens.
- Inhiber la formation de biofilm par des stratégies préventives ou à désintégrer un biofilm existant (stratégie curative) (**Aumeran et al., 2020**).

I.3. Les plantes médicinales

I.3.1 *Nigella sativa*

I.3.1.1. Taxonomie

Nigella sativa L. est une plante herbacée de la famille des *Ranunculaceae*, également appelée cumin noir (Abdul Hannan et al., 2021). Le nom de genre «*Nigella*» découle du latin «*Niger*» ou «*Nigellus*» qui signifie noirâtre, se référant à la couleur noire de ses graines. Le nom d'espèce «*sativa*», signifie «*semer*» ou «*cultiver*» (Hegi, 1975). Elle est communément connue sous le nom de "Cumin noir" en Français, "black seed ou black caraway" en Anglais, "Habbat el baraka ou encore El habbat sauda dans les pays arabes et "Elsinouj" en Algérie (Beloued, 1998). La plante est originaire de la Méditerranée orientale, de l'Europe centrale et de l'Ouest de l'Asie, l'Afrique du Nord, sous-continent indien et peuvent pousser spontanément et même cultivé dans de nombreux pays dont l'Égypte, l'Iran, la Grèce, la Syrie, l'Albanie, la Turquie, l'Arabie saoudite, l'Inde et Pakistan (Abdul Hannan et al., 2021).

D'après Sabina et al., (2015) l'espèce *Nigella sativa* L est représentée fait partie du :

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermaphytes*

Sous-embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Magnoliphytadicotylédones*

Ordre : *Ranales*

Famille : *Ranunculaceae*

Genre : *Nigella*

Espèce : *Nigella sativa* L

La *N. sativa* possède une grande importance historique, utilisée traditionnellement à des fins culinaires et médicinales puis dans le traitement de la fatigue, de la fièvre, des maux de tête, des maladies de la peau, des plaies, des champignons, des parasites et des morsures d'animaux venimeux (Hwang et al., 2021).

I.3.1.2. Aspect botanique

Nigella sativa L est une plante annuelle herbacée hermaphrodite, de 30 à 60 cm de hauteur avec une végétation bien développée constituée d'une tige dressée, ramifiée, de couleur vert clair à foncé devenant creuse avec l'âge (Ghedira et Le Jeune, 2010).

Elle est constituée de feuilles qui sont pennatiséquées, petites en bas pétaloïdes et longue en haut, divisées en lobes étroits et de couleur verte. Les fleurs sont petites étoilées, dépourvues d'involucre sous la fleur. Elles sont composées de cinq pétales et sépales pétaloïdes et peuvent prendre plusieurs couleurs, bleu claire ou sombre, du rose ou même blanche. Le fruit est constitué d'un follicule (capsule) globuleux de 03 à 06 carpelles, s'ouvrant par une fente interne. Chaque capsule renferme de nombreuses graines insérées les unes sur les autres de couleur foncée. Les graines sont ovoïdes et mesurent de 2 à 3,5 mm, nombreuses de forme pyramidale à base large et d'aspect rugueux, de couleur noire. Lors du broyage, elles dégagent une odeur fortement aromatique (Benazzouz et al., 2023) (figure 03).



Figure 03: Fleur, fruit et graine de *Nigella sativa* (pixabay, 2018).

I.3.1.3. Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques

Les premières recherches sur la composition des graines de *Nigella sativa* sont publiées en 1880 par Greenish qui mentionna la présence de 37% d'huile et 4,1% d'éléments minéraux (Greenish, 1880). Ces différentes études phytochimiques de la graine du *Nigella sativa* L. ont permis de mettre en évidence une grande variété de composés regroupant les lipides, les glucides, les protéines, des fibres alimentaire de vitamines, des sels minéraux, l'eau et des métabolites spécialisés : des dérivés terpéniques, des saponosides, des flavonoïdes, des tanins des alcaloïdes, et des polyphénols...etc (Antwerpen, 2006). L'huile essentielle de *N. sativa* est composée principalement de thymoquinone(TQ) et de p-cymène, trans-anéthole, la carvone, l' α -thujène, la thymoquinone, la thymohydroquinone (THQ), dithymoquinone, carvacrol et β -pinène (Ainane et al., 2014 ; Isik et al.,2017), avec diverses concentrations qui varient selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection) (Herlina et al.,2017 ; Yimer et al., 2019).

Les dernières recherches sur cette plante mettent l'accent sur les activités biologiques liées à la variation de leurs composants particuliers tels qu'anti-

inflammatoire, antioxydant, anti-tumoral, antimutagène, antidiabétique, antimicrobiennes et immun-modulateur (Toregul et al., 2017 ; Chekatt, 2020).

I.3.2. *Artemisia herba alba*

I.3.2.1. Taxonomie

L'*Artemisia herba-alba*, connue sous le nom vernaculaire d'armoise blanche en français et de Chih en arabe, est une plante médicinale utilisée depuis longtemps dans différentes cultures. C'est une plante qui est connue depuis des millénaires. Son existence a été documentée dès le début du IV^e siècle av. J.-C. par l'historien grec Xénophon, alors qu'il explorait les steppes de la Mésopotamie. Cette plante a été répertoriée en 1779 par le botaniste espagnol Ignacio Jordán Claudio de Assoydel Rio (IPNI) (Nabli, 1989; Francis, 2001).

En Algérie, les vastes étendues de steppes d'armoise (*Artemisia herba-alba*) s'étendent sur une superficie de 3 millions d'hectares. Ces steppes se trouvent dans les zones arides et semi-arides fraîches, caractérisées par des précipitations variant de 100 à 300 mm. (Ababsa et Boukaous, 2018).

Le genre *Artemisia* se distingue comme l'un des genres les plus importants et répandus au sein de la famille des *Asteraceae*. Il comprend 522 espèces de petites herbes et d'arbustes (Baykan et al., 2011).

Selon Quezel et Santa, (1963) l'espèce *Artemisia herba-alba* fait partie du :

Embranchement : *Phanérogames*

Sous-embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Artemisia*

Espèce : *Artemisa herba alba*

I.3.2.2. Aspect botanique

L'*Artemisia herba-alba* est une plante herbacée qui présente des tiges ligneuses et ramifiées mesurant entre 30 et 50 cm de hauteur. Elle est caractérisée par une dense couche

de feuilles très feuillées (Figure 4). Les feuilles, de petite taille, sont sessiles, pubescentes et ont une apparence argentée. Les fleurs sont regroupées en grappes et ont des capitules très petits (3/1,5 mm) de forme ovoïde. Au fur et à mesure que les rameaux s'allongent, les fleurs diminuent de taille. Cette réduction de la taille des feuilles permet une considérable réduction de la surface transparente, permettant ainsi à la plante de résister à la sécheresse (Eloukili, 2013; Kahlouche, 2014).



Figure 04 : Plante d'*Artemisia herba alba* (Abou El-Hamdet *al.*, 2010).

I.3.2.3. Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques

Artemisia herba-alba est une plante riche en métabolites secondaires, qui contribuent à ses propriétés médicinales. Parmi eux, nous citons les composés volatils, tels que l'huile essentielle, ainsi que les composés non volatils, tels que les flavonoïdes et les sesquiterpènes lactones (Chaabna, 2014).

En Algérie, l'armoise blanche, également appelée Chih, est une plante très connue et populaire en tant que remède traditionnel, utilisées pour le traitement de tant de maladies telles que le rhume, la toux, les troubles intestinaux, la bronchite, la diarrhée, névralgies hypertension artérielle et/ou diabète (Baba Aissa, 2000 ; Lakehal, 2016).

Les activités biologiques liées à la variation de leurs composants particuliers tels qu'antimicrobien, antioxydant, antidiabétique, activités anti-leishmaniennes, vermifuges et antispasmodiques ont été récemment rapportés (Ouguirti *et al.*, 2021).

I.3.3. *Aloe vera*

I.3.3.1. Taxonomie

"*Aloe vera*" provient de la combinaison de termes arabes et latins. Le mot "aloès" est issu de l'ancien terme arabe "alloeh" qui signifie substance amère qui brille. Il est fait allusion à l'amertume du latex de l'*Aloe vera*. En revanche, le mot "Vera" provient du latin et signifie vérité. Ce nom a été donné à cette plante car elle a été traditionnellement considérée comme plante miracle douée de propriétés thérapeutiques et médicales prouvées. L'*Aloe vera* est largement distribué dans les zones chaudes et sèches d'Afrique du Nord, du Moyen Est de l'Asie, sud de la Méditerranée et îles Canaries (Giannakoudakis et al., 2018 ; Sánchez et al., 2020).

Depuis des milliers d'années l'*Aloe vera* est utilisée dans de nombreuses cultures : en Grèce, en Égypte, en Inde, au Mexique, au Japon et en Chine (Marshall ,1990). La première utilisation de la plante a été retrouvée en Mésopotamie sur des tablettes d'argiles. Les égyptiens l'ont surnommée la « plante de l'immortalité » (Giannakoudakis et al., 2018).

Selon Cavallini, (1987) l'espèce *Aloe vera* fait partie du :

Embranchement : *Spermaphytes*

Sous -embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Monocotylédones*

Ordre : *Liliflorae*

Famille : *Liliaceae*

Genre : *Aloe*

Espèce : *Aloe vera L*

I.3.3.2. Aspect botanique

La plante possède des feuilles triangulaires et succulentes, avec des bords dentelés (Figure5), et elle porte des fleurs tubulaires jaunes et des fruits qui renferment de nombreuses graines. Chaque feuille est composée de trois couches distinctes : premièrement, il y a une substance gélifiée claire contenant 99 % d'eau et composée de glucomannanes, acides aminés, lipides, stérols et vitamines. Deuxièmement, il existe une couche moyenne de sève amère de couleur jaune connue sous le nom de latex qui

contient des anthraquinones et des glycosides. Enfin, il y a une couche externe épaisse appelée croûte, composée de 15-20 cellules, qui a une fonction protectrice et synthétise les glucides et les protéines. Dans la croûte, il y a des faisceaux vasculaires responsables du transport de substances telles que l'eau (xylème) et l'amidon (phloème) (Surjushe et al., 2008).



Figure 5 : Plante d'*Aloe vera* (Aung et al., 2020).

I.3.3.1 Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques

L'*Aloe vera* contient de l'eau jusqu'à 99% et le 1 % restant comprend tous les produits chimiques de la plante (Sahu et al., 2013). La plante représente un trésor authentique et précieux de la nature en contenant plus de 90 substances bioactives tels que les vitamines, les enzymes, les sels minéraux, les sucres, la lignine, les saponines, les anthraquinones et les lipides. La variété de ses éléments constitutifs et leur fusion en un mélange de principes actifs confèrent à la plante une singularité sans pareille (Sanghi et al., 2008).

Cette plante médicinale est employée traditionnellement pour soigner les affections cutanées telles que les brûlures, les plaies et pour ses vertus anti-inflammatoires. En outre, d'autres propriétés thérapeutiques de l'*Aloe vera* ont été démontré d'autres propriétés thérapeutiques incluant les effets antimicrobiens, anticancéreux, antioxydants et antidiabétiques (Sánchez et al., 2020).

CHAPITRE 02
MATERIEL ET METHODE

Notre étude qui porte sur l'étude des activités antimicrobienne, antibiofilm et recherche d'une synergie de trois plantes locales a été réalisé au niveau de plusieurs laboratoire à savoir le laboratoire de projets de fin d'études (PFE) de notre université SAAD DAHLEB Blida 01, laboratoire de Microbiologie du centre de transfusion sanguine de l'Armé (HCA) et au niveau de laboratoire de microbiologie du centre de recherche et de développement SAIDAL pendant une période de quatre 04 mois à partir de 18 février 2023 au 19 juin 2023.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel non biologique

Dans notre travail, nous avons utilisé du matériel non biologique, qui comprend une gamme d'outils divers de laboratoire (les appareillages, les réactifs, milieux de cultures et les disques d'antibiotiques) (Annexe 01).

II.1.2. Matériel biologique

- **Prélèvements**

Durant notre étude, 592 prélèvements ont été effectués de différents services et réceptionnés à l'unité de Bactériologie du HCA (Tableau II).

Tableau II: Répartition des prélèvements selon les services.

Service	Prélèvement			
	Divers pus	Hémoculture	Matériel	
			Cathéter	Matériel implanté
Rhumatologie	-	28	9	-
Gastrologie	58	-	-	-
Endocrinologie	22	13	-	-
Oto-Rhino-Laryngologie	23	19	5	-
Dermatologie	36	-	-	-
Centre des grandes brûlures	50	-	-	-
Chirurgie	59	11	10	10
Réanimation	46	20	30	-
Néphrologie	52	-	25	-
Hématologie	-	20	-	1
Orthopédie	15	-	20	10
Totales	361	111	120	

- **Souches bactériennes**

Une souche de référence de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été fournie par l'Institut Pasteur d'Algérie. Cette souche est utilisée pour valider les différents tests effectués au cours de ce travail.

- **Matériel végétale**

Notre matériel végétal est constitué de graines de *Nigella sativa*, de gel des feuilles d'*Aloe vera* et la plante d'*Artemisia herba alba*. Les graines originaires d'Éthiopie, ont été achetées chez un herboriste de la wilaya d'Alger (la commune de Gue de Constantine). La plante d'*Aloe vera*, elle a été récoltée dans le jardin de la filiale Biotic Gué de Constantine de Baraki. Alors que la plante *Artemisia herba alba* a été récoltée dans la région d'El Meniaa.

II.2. Méthodes

II.2.1. Prélèvement et isolement du *Staphylococcus aureus*

- **Pus**

Les échantillons ont été prélevés par écouvillonnage, puis déchargés en stries condensées sur la moitié de la surface des boîtes de milieu Hektoen, Gélose nutritif, Gélose au sang cuit et Baird Parker et incubé à 37°C pendant 24H. Cette méthode permet d'obtenir des colonies bactériennes isolées, ce qui facilite la réalisation de tests d'identification et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries.

- **Matériel**

Les échantillons ont été soumis à une étape de pré culture systématique dans un bouillon enrichi à base de cœur-cerveille. Les suspensions préparées à partir des cathéters ont été incubées pendant 3 heures à 37°C, puis diluées jusqu'à une dilution de 10^{-3} avant d'être mises en culture sur le milieu Chromagar et incubées à 37°C pendant 24H. Les suspensions préparées à partir d'autres matériaux ont été incubées pendant 3 jours à 37°C, puis mises en culture sur différents milieux tels que la Gélose nutritive, l'Hektoen, le Chromagar et Baird Parker et incubé à 37°C pendant 24H.

- **Hémoculture**

Les échantillons sanguins ont été prélevés selon le protocole de l'automate BACT/ALERT® 3D (Annexe 01), dans lequel on met deux (02) flacons pour une durée d'incubation de 07 jours. Cela permet la détection précoce et l'identification des infections

bactériennes ou fongiques dans le sang. On fait un repiquage pour les flacons positifs sur trois milieux à savoir la Gélose au sang cuit, Hektoen, Baird Parker et Gélose nutritif et le tout est incubé à 37°C pendant 24H.

II.2.2. Identification des souches bactériennes isolées

II.2.2.1. Identification macroscopique

La première étape de l'identification des souches bactériennes consiste en une identification macroscopique, en observant les résultats sur différents milieux de culture après 24 heures d'incubation. Cette méthode repose sur l'observation de la forme, des bordures, de la couleur, du relief et de la taille des colonies bactériennes, qui permettent de caractériser la souche.

II.2.2.2. Identification microscopique

➤ Coloration de GRAM

C'est la coloration de référence en bactériologie (**Denis, 2011**). Cette dernière est réalisée par un automate RAL STAINER (Figure 6). Ce dernier est destiné à la coloration de frottis bactériologiques et hématologiques. Il permet la coloration de 20 lames en autonomie et restitue les lames prêtes à l'observation. Grâce à la lecture d'une étiquette RFID «Radio Fréquence Identification» portée par les kits, il reconnaît les protocoles de coloration à utiliser, gère le renouvellement des réactives et garantit une traçabilité.

La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique sur des cultures jeunes de moins de 24h. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame propre et fixé à la chaleur par un bec électrique. Après fixation, on place les lames manuellement dans l'automate. Quand le processus est terminé, la lame est observée sous microscopie avec l'ajout de l'huile à immersion au grossissement X100. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positifs (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram négatifs (-).

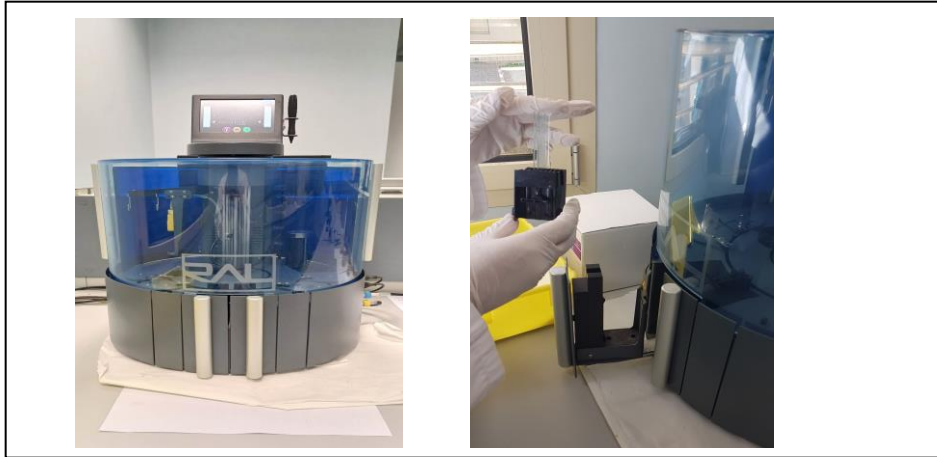


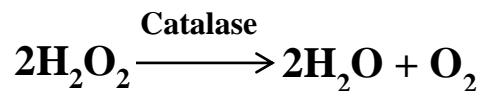
Figure 6: Automate RAL STAINER pour coloration de gram.

II.2.2.3. Identification biochimique

➤ Test de catalase

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif. De plus, il nous permet de différencier les bactéries des genres *Staphylococcus* qui ont une catalase positive, des bactéries des genres *Enterococcus*, *Streptococcus* qui possèdent une catalase négative.

La catalase est une enzyme à la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau (H_2O) et dégagement d'Oxygène (O_2), selon la réaction suivante :



▪ Technique :

Une colonie isolée est prélevée avec une pipette pasteur ou une anse de platine et mise en contact avec une goutte de H_2O_2 placée sur une lame propre.

▪ Lecture :

La dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène est visible par la formation de bulles d'air. S'il n'y a pas des bulles d'air, la bactérie est considérée catalase négative.

➤ Test de coagulase :

Le test de coagulase libre ou staphylocoagulase, est un test biochimique spécifique aux bactéries du genre *Staphylococcus*. Il est utilisé pour différencier *Staphylococcus aureus* qui ont un coagulase positif, des autres espèces de staphylocoques coagulase négatif en se basant sur leur capacité à produire l'enzyme coagulase, capable de coaguler le plasma oxalaté ou

citraté. La détection de cette enzyme est considérée comme un critère majeur d'identification de *S. aureus*.

• **Technique :**

- Dans un tube à hémolyse étiqueté, on prend des colonies et on les mélange avec 0,5 ml de plasma humain.
- Dans un deuxième tube, la même procédure est réalisée avec la souche de référence *S. aureus* ATCC 25923 pour un contrôle positif +.
- Un troisième tube contenant le plasma uniquement servira de contrôle négatif-.
- Les 3 tubes ont été bien fermés et placés dans l'étuve à 37 °C et incubés pendant 24 heures.

• **Lecture**

- Présence d'un caillot (coagulase positif).
- Absence d'un caillot (coagulase négatif).

➤ **Galerie API Staph**

API® Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus* (Lecuire et al., 2007). Il permet d'identifier 20 espèces et sous espèces de *Staphylococcus*. La galerie est composée de 20 microtubes, contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée en API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des changements colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif.

• **Technique :**

- A partir d'une culture jeune et pure de *Staphylococcus* de 18 à 24h d'incubation sur milieu TSA (Annexe 01), une suspension bactérienne homogène, d'opacité égale à 0.5 Mac Farland est préparée dans une ampoule de milieu API Staph Medium.
- Le support de la galerie est rempli par quelques gouttes d'eau pour créer un milieu humide avec le couvercle par-dessus.
- A l'aide d'une pipette pasteur stérile on dépose la suspension bactérienne dans chacun des tubules de la galerie. Pour éviter la formation des bulles d'air au fond des tubes, on pose la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

- Une anaérobiose dans les tests ADH et URE est créé en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine ensuite, on renferme la boîte d'incubation et on incube à 37°C pendant 18 à 24 heures.

• Lecture de la galerie

Après incubation, on lit les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

- Test VP : VP 1 et VP 2, après 10 minutes. Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose claire considérée négative.
 - Test NIT : NIT 1 et NIT 2, après 10 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.
 - Test PAL : ZYM A et ZYM B. Attendre 10 minutes. Une coloration violette indique une réaction positive. Une couleur beige-rosé ou violet très pâle considérée négative.
- Noter les résultats sur la fiche de résultats.

II.2.2.4. Etude de la sensibilité de souches *S. aureus* isolées aux antibiotiques

Pour réaliser l'antibiogramme standard, nous avons testé la liste des antibiotiques recommandée pour l'étude de *S. aureus*. Ces tableaux (annexes 03) sont fournis par le fascicule de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) conformément aux recommandations de l'OMS, 8ème édition 2020.

L'antibiogramme se fait par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton, coulée en boîte de pétri sur une épaisseur de 4mm. Les disques d'antibiotiques sont utilisés en suivant les normes recommandées par le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Ils sont placés et pressés sur la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Cette gélose a été préalablement ensemencée avec un inoculum homogène de *S. aureus* d'opacité égale à 0,5 sur l'échelle de Mac Farland. Il est recommandé de mettre de 6 disques maximum dans chaque boîte. Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, les zones d'inhibition autour des disques lus à l'aide d'un pied de coulisse, fournissent des indications sur la sensibilité des microorganismes testés. Ce test permet de classer les souches en trois catégories possibles : sensible, intermédiaire ou résistant.

II.2.2.5. Conservation

Les souches microbiennes sont repiquées à partir de la culture, puis elles sont ensemencées et conservées dans des tubes inclinés contenant un milieu nutritif en gélose. Ces tubes sont stockés à une température de 4°C, ce qui permet de maintenir les bactéries dans un

état de vie ralentie ou momentanément suspendue, dans des conditions peu propices à leur multiplication. Chaque tube est étiqueté avec des informations telles que le nom de la souche, les numéros de code et la date de conservation.

II.2.3. Sélection des souches formatrices de biofilms

II.2.3.1 Détection de la formation de biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La méthode qualitative du Rouge Congo Agar est une méthode couramment utilisée pour évaluer la formation de biofilm par les souches bactériennes, implique l'inoculation de ces souches sur un milieu contenant du Rouge Congo (**Touati et al., 2007 ; Hassan et al., 2011**). Cette technique est considérée comme une méthode indirecte pour distinguer les souches bactériennes productrices de biofilm de celles qui n'en produisent pas, en se basant sur l'observation de la couleur de colonies pour déterminer leur capacité à produire du slime.

Une suspension bactérienne de 0.5 MC de souche test est ensemencée par stries à l'aide d'une anse stérile en surface du milieu Rouge Congo préparé et coulé en boîtes Pétri. La lecture est faite après 24h d'incubation à 37°C. Les souches formatrices de biofilms donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (**Nasr et al., 2012**).

II.2.3.2. Détection de la formation de biofilm par la méthode Tissue Culture Plate (TCP)

C'est une technique quantitative introduite par **Christensen et al., (1985)**, qui permet une détermination quantitative du biofilm formé en mesurant la densité optique reliée au colorant présent dans le biofilm.

Dans notre étude, la méthode de **Cucarella et al., (2001)** a été utilisée pour évaluer le potentiel de production de biofilm *in vitro* par les isolats de Staphylocoque, avec quelle que modification.

Après avoir cultivé les souches bactériennes dans le Bouillon Tryptone Soja (TSB) additionner de 2,5% de glucose (TSBG) et incubation pendant 24h à 37°C, les puits d'une plaque de microtitration 96 ont été remplis de 200 µl de cette dilution et incubés pendant 24h à 37°C. Après incubation, le contenu de la microplaque est vidé en tapotant doucement. Les puits sont par la suite lavés 03 fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les bactéries non fixées, puis séchés en position inversée et colorés avec 200 µl d'une solution de cristal violet à 0,2% pendant 30 min. L'excès de colorant a été rincé par lavage à l'eau distillée et les plaques sont séchées à la température ambiante. Les cellules adhérentes ont été remises en suspension

dans une solution d'éthanol à 96% pendant 15 secondes et l'absorbance a été mesurée à 620 nm en utilisant un lecteur automatique ELISA (Kara Terki et al., 2020).

- **Lecture :**

Les résultats obtenus présentent sur la base du DO du témoin, les souches ont été classées comme suit (Christensen et al., 1982) :

$DO \leq DO_t(\text{Témoin})$: non formatrice du biofilm.

$DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$: Modérée.

$DO_t \times 4 \leq DO$: Fortement formatrice du biofilm

II.2.4. Préparation des extraits et huiles des trois plantes

II.2.4.1 *Aloe vera*.

L'extraction du gel des feuilles de l'*Aloe vera* a été préconisée selon le protocole d'Iserin, (2001) en réalisant les étapes suivantes (Figure 07).

- Choisir les feuilles fraîches avec des états de croissance similaires.
- Lavé soigneusement avec de l'eau ultra pure pour éliminer toutes les particules de poussière.
- Découper les côtés épineux de la feuille puis coupez la feuille sur le bas de la plante (une feuille "basale") en deux. La feuille doit être en bon état.
- Recueillir le gel en raclant la feuille avec une spatule.
- peser 10 g.
- pressées manuellement à l'aide d'un mortier.

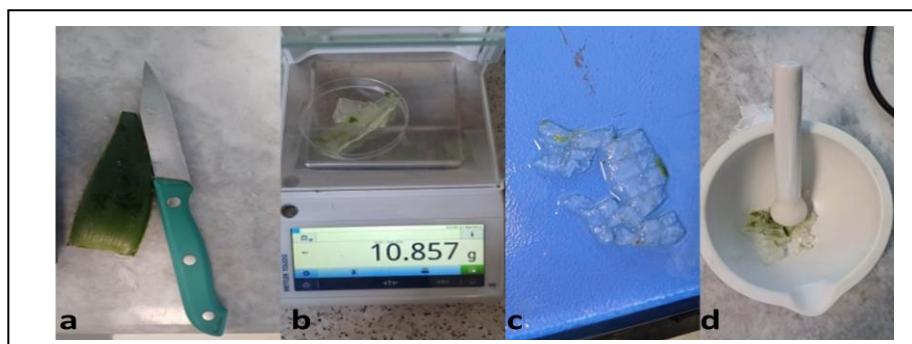


Figure 7: Etapes de préparation du gel d'*Aloe vera*.

a : Découper la feuille. **b:** peser le gel. **c :** découper en petits morceaux

d : Presser le gel à l'aide d'un mortier.

-Ajouter 50 ml du méthanol et laisser macérer pendant 24H, récupérer le premier filtrat ensuite ajouter 50 ml du méthanol sur le macéra après 24H on récupère le 2eme filtrat.

-Mettre les 2 filtrats dans le rota-vapeur pour récupérer l'extrait sec.

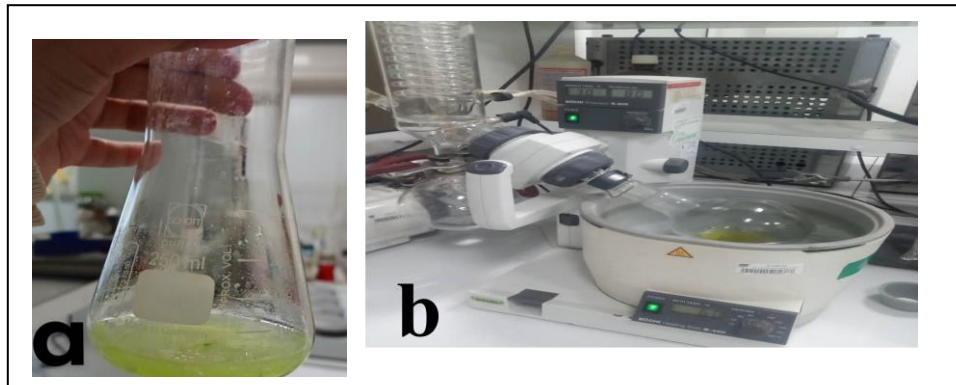


Figure 8:Extraction méthanoïques de l'*Aloe vera*

a : Mélange des fractions du gel d'*Aloe vera* après macération dans l'éthanol. ; **b:** Rota vapeur.

❖ Calcul du rendement

Le rendement est calculé en utilisant la formuler suivante (Iserin, 2001).

$$R(\%) = \frac{M - M'}{M^{\circ}}$$

M = Poids du ballon + extrait.

M' = Poids du ballon à vide.

M[°] = Masse de la matière végétale sèche (prise d'essai).

II.2.4.2 *Artemisia herba alba*

En raison de diverses contraintes rencontrées dans notre laboratoire, nous avons été contraints d'effectuer l'extraction en dehors de notre université. La plante *Artemisia herba alba* été récolté dans la région d'El Meniaa. Par la suite, nous avons utilisé la partie aérienne de la plante séchée pour effectuer l'extraction à Oued el Alleug BLIDA chez BIO Extrapamal.

La méthode d'hydrodistillation par un hydrodistillateur (Figure 9) consiste à placer directement la plante dans l'eau, qui est ensuite portée à ébullition, généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment un mélange azéotropique "HO+HE" avec la vapeur d'eau. Le mélange est ensuite distillé à une température de 100°C sous pression atmosphérique. Ensuite il est refroidi et condensé dans un essencier ou un vase florentin. Une fois condensées, l'eau et les molécules aromatiques se séparent en une phase aqueuse et une phase organique, qui correspond à l'huile essentielle (Elyemmi et al., (2019).



Figure 9: Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.

❖ Calcul du rendement

Le rendement a été calculé en utilisant la formule d'Elyemni *et al.*, (2019).

$$R = \frac{M_{HE}}{M_{MV}} \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle %

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle (g)

M_{MV}: Masse de matière végétale sèche (g)

II.2.4.3 *Nigella sativa*

- Extraction d'huile végétale

Divers méthodes et systèmes d'extraction ont été employés afin d'obtenir de l'huile à partir de graines de la *Nigella sativa*. Parmi ces techniques, la méthode la plus répandue est le pressage mécanique (Figure 10).

Cette méthode du presse à froid est bien connue pour sa capacité à produire un produit de haute qualité, en plus des avantages tels que des besoins en énergie plus faible, une approche plus écologique (non toxique), moins de coûts d'investissement et être plus simple que l'extraction au solvant traditionnelle. Cette technique fonctionne selon le principe d'une presse à vis actionnée par une pression mécanique, ce qui permet la séparation de la phase solide et liquide (Zeaiter, 2019)



Figure 10 : Extraction d'huile végétale des graines de la nigelle par l'appareil de la presse à froid.

❖ Calcul du rendement

Le rendement a été calculé en utilisant la formule de **Saida et al., (2016)**.

$$R(\%) = \frac{M' \times 100}{M_s}$$

R_{HV} : rendement en huile végétale des graines.

M' : masse de l'huile végétale obtenue en gramme.

M_s : masse des graines utilisée et qui vaut 1 kilogramme.

• Extraction méthanolique

L'extrait méthanolique de la *N. sativa* a été obtenu selon la méthode rapporté par Meziti (2012), avec quelques modifications. Les graines de *Nigella sativa* préalablement nettoyées sont mises à macérer dans un mélange solvant + eau (7v/3v) à un rapport de 1/10 (p/v) (1g/10ml), sous agitation douce pendant 48h à 72h à température ambiante et à l'obscurité.

20 g de poudre de nigelle sont mis à macérer avec un agitateur dans 200 ml de solvant (140 ml de méthanol+ 60ml d'eau distillée stérile). L'extraction est répétée trois fois avec renouvellement du solvant et filtration à chaque fois pour épuiser totalement la matière végétale.

Après les trois macérations, l'extrait hydro alcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange avec papier filtre et un entonnoir en verre, le solvant est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite pendant une heure et demi dans un

évaporateur rotatif « rota vapeur » (Figure 11), l'extrait obtenu a été par la suite lyophilisé et conservé à + 4° à l'abri de la lumière au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.



Figure 11: Rota-vapeur.

II.2.5. Etude qualitative et quantitative des compositions chimiques des plantes étudiées, *Nigella sativa*, *Artemisia herba alba* et *Aloe vera*

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord entamé un screening phytochimique pour déterminer la composition qualitative en métabolites secondaires des deux plantes *Nigelle* et *Aloe vera* au laboratoire de chimie-analytique et substances naturelles du CRD SAIDAL. Ensuite nous avons complété par une chromatographie GS-MS afin de révéler la composition chimique globale des huiles végétal et essentielle de Nigelle et Artemisia respectivement, a été réalisé au centre de recherche d'analyse physico-chimique (CRAPC) de Bou Ismail w/Tipaza.

A. Screening phytochimique

- **Principe**

Le screening phytochimique est une méthode permettant de détecter et d'évaluer préliminairement des différentes familles de métabolites secondaires présents dans la partie de la plante étudiée par des réactions qualitatives de caractérisation. La phytochimie qualitative est basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisées sur les extraits (**Mohammedi, 2013**). Les réactions phytochimiques que nous avons effectués dans notre travail sont résumées dans le tableau X (Annexe 03).

II.2.6. Activités antimicrobiennes et antibiofilms

II.2.6.1. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

A. Méthode de diffusion sur disques « Aromatogramme »

L'aromatogramme est une méthode préliminaire utilisée *in vitro* pour évaluer l'activité antimicrobienne des HEs. En effet, cette étape est l'équivalent d'un antibiogramme ou les antibiotiques sont remplacés par les HEs (Kaloustian *et al.*, 2008).

•Préparation d'inoculum

La préparation de suspension microbienne standardisée à 10^8 UFC/ml a été réalisée selon les recommandations de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Une colonie préalablement purifiée de chaque souche étudiée est ensemencée puis incubée dans 5mL de BHIB pendant 18 h à 37°C. Après incubation, les suspensions sont ajustées pour obtenir une turbidité standard de 0.5 Mcfarland ce qui correspond à une densité optique compris entre [0.08-0.13] à une longueur d'onde de 625 nm (CLSI, 2012).

•Protocol

Le protocole utilisé est inspiré de la méthode de Hayes et Markovic (2002). Des boîtes de gélose Müller-Hinton (MH) sont ensemencé par écouvillonnage avec l'inoculum 10^8 UFC/ml dans le but d'obtenir un tapis bactérien uniforme. Puis, des disques en papier filtre (6 mm de diamètre) préalablement imprégnés de 5 μ l de l'HE sont déposés à la surface de la gélose pré ensemencée. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h (Fig 12).

•La lecture des résultats

La lecture se fait par la mesure du diamètre (\emptyset) de la zone d'inhibition (en mm) exprimée en plusieurs niveaux d'activité (Djenane *et al.*, 2011) :

Non sensible : ($\emptyset < 8$ mm) sensible : ($9 < \emptyset < 14$ mm)

Très sensible : ($15 < \emptyset < 19$ mm)

Extrêmement sensible : $\emptyset > 20$ mm.

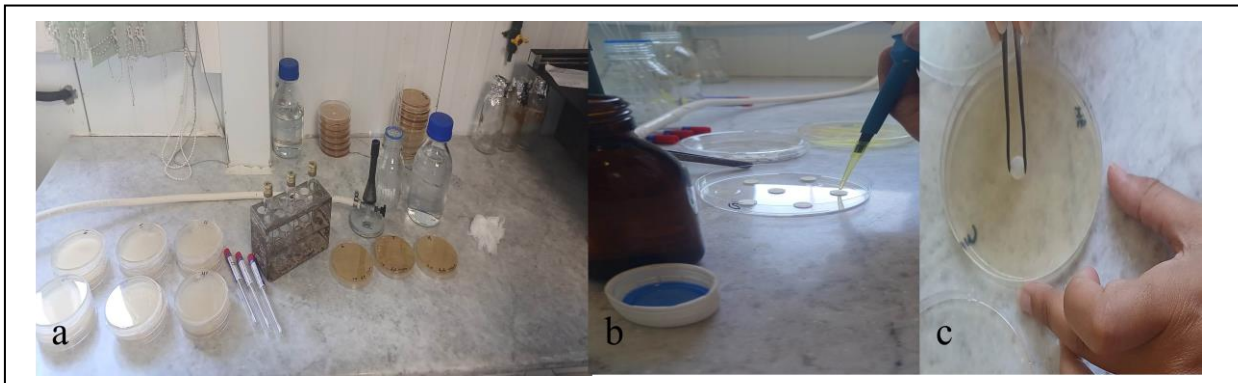


Figure 12 : Etapes de l'activité antimicrobienne

a : préparation des suspensions ; **b:** imbibition d'huile sur les disques vierges ; **c:** déposer des disques sur le milieu à l'aide d'un pince stérile.

- **Recherche d'une synergie**

La recherche d'une éventuelle synergie entre les huiles étudiées est réalisée entre les huiles ayant montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches cibles. 0,5 ml de chaque huile est appliquée on suivant les mêmes étapes précédentes.

La lecture des résultats selon **Burt, (2004)**.

- La synergie est obtenue lorsque le mélange des deux composés antimicrobiens produit une activité antimicrobienne supérieure à la somme de l'activité des composants individuels.
- Un effet additif se produit lorsque la combinaison des antimicrobiens donne un effet égal à la somme des composés individuels.
- Un effet antagoniste est obtenue lorsque les deux composés ont un effet combiné inférieure à la somme des deux effets individuels.

B. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'évaluation de l'activité quantitative par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est réalisée en procédant aux étapes suivantes (**Hammer et al.,2001**).

- Préparer une suspension de 10^8 UFC/ml de la souche bactérienne étudiée
- Préparer le milieu MH avec 0.5% Tween 80 et ce après stérilisation du milieu
- Préparer une série de dilutions d'huile essentielle à étudier allant jusqu'à 0.03% dans le milieu précité.

La réalisation des dilutions se fait comme suit :

- 1 ml d'huile essentielle est dilué dans 50 ml de milieu dans un premier flacon ce qui donne la dilution à 2%.

- Verser la moitié du premier flacon dans un deuxième et ajuster à 50 ml pour obtenir la dilution à 1%.
 - Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.03%.
 - Verser 15 ml de chaque dilution dans 02 boîte de Pétri.
 - Faire sécher les boîtes.
 - Déposer les différentes dilutions à raison de 1 microlitre des suspensions bactériennes à 10 UFC/ml par spotage et à l'aide de micro seringue.
 - Diviser la boîte sur deux pour chaque souche et déposer un disque d'antibiotique vierge correspondant à chaque spotage.
 - Préparer des boîtes témoins (positifs) contenant le milieu MH avec tween sans l'huile essentielle.
 - Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 à 48h.
 - **Lecture** : La CMI est déterminée 24h lire la CMI pour laquelle il n'a pas de culture visible.
- NB** : la présence d'une colonie ou deux ne sont pas prise en considération.

C. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

A partir de la CMI, prendre le disque correspondant à cette dernière ainsi à l'aide d'une pince stérile et les déposer sur gélose MH dépourvu d'huile. Incuber à 35° pendant 24H.

- **Lecture** : Déterminer la CMB à partir du disque n'ayant pas observé une présence de colonie.

II.2.6.2. Evaluation de l'activité antibiofilm

Après la lecture de résultat des CMI de la croissance, les cellules microbiennes flottantes sont éliminées à l'aide d'une seringue et les puits sont ensuite rincés trois fois en utilisant l'eau distillée pour le but d'éliminer les cellules faiblement adhérentes.

➤ Détermination des CMI de la formation de biofilms (CMIB)

Les CMI de la formation de biofilms ont été déterminées par la méthode de micro dilution à l'aide des microplaques de 96 puits (Aouni et al., 2013).

➤ Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir de la suspension standardisée à 10^8 UFC/ml dilué au 1/100 par le même milieu de culture (LB bouillon) pour avoir une densité cellulaire équivalente à 10^6 UFC/ml.

➤ Protocole

Chaque Huile a été diluée dix fois à partir de la solution mère de 500 μ l (200 μ l d'Huile avec 5 μ l de tween 80 et 295 μ l de BHIB) par des dilutions $\frac{1}{2}$ successives. Un mélange de bouillon BHIB et tween 80 à 1% (solution de dilution volume égale à 250 μ l) dans des tubes d'hémolyse stériles pour le but d'obtenir des concentrations compris entre 40 % et 0.08% et une concentration de tween 80 à 1% constant (figure 13).

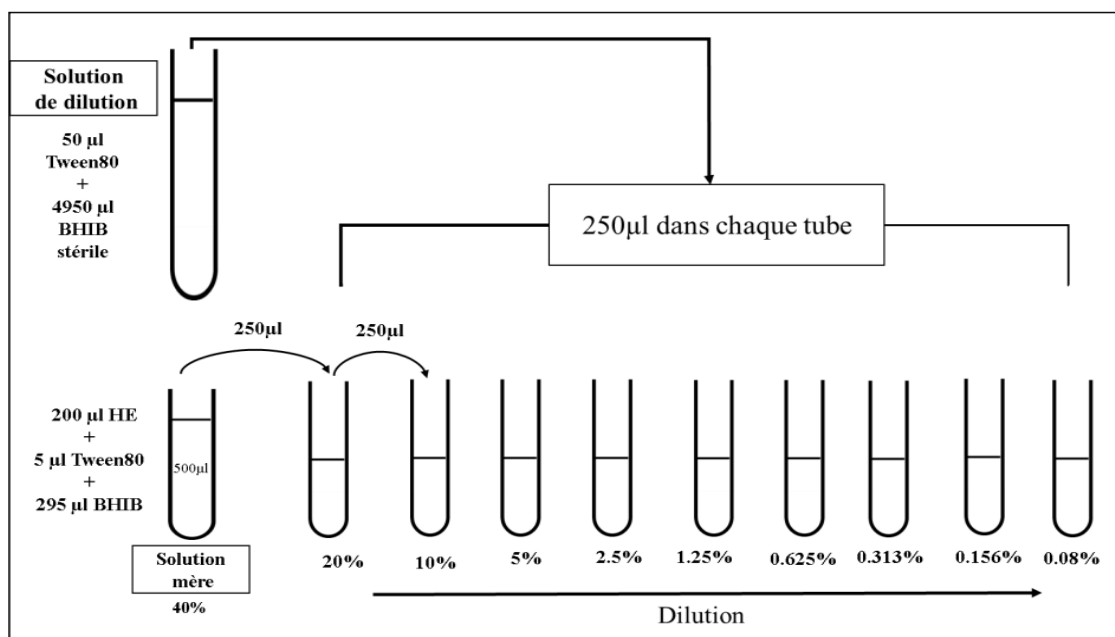


Figure 13 : Une gamme de dilutions pour l'huile utilisée dans chacun des traitements allant de (4% - 0.008%).

Ensuite, les microplaques sont utilisées (une microplaque pour deux souches) dans lesquelles 90 μ l de suspension microbienne de 10^6 UFC/ml est déposé avec 10 μ l de chaque concentration (une rongée des puits pour chaque traitement). Ainsi, les concentrations de chaque traitement dans la microplaque sont comprises entre 4% et 0.008% (Figure 14). Les traitements sont :

- Traitements 1** : Huile essentiel de l'Artemisia + *S. aureus*
- Traitement 2** : Huile végétale de la nigelle + *S. aureus*
- Traitement 3** : Mélange d'HE+HV+ *S. aureus*
- Traitement 4** : La souche de *S. aureus* (Témoin +)
- Traitement 5** : Le milieu BHIB (Témoin -)

Après incubation des microplaques à 37°C pendant 24h, la CMI est déterminée comme la plus petite concentration de l'HE pour laquelle la croissance n'est pas observée à l'œil nu (Absence de dépôt) (Yakhlef et al., 2011).

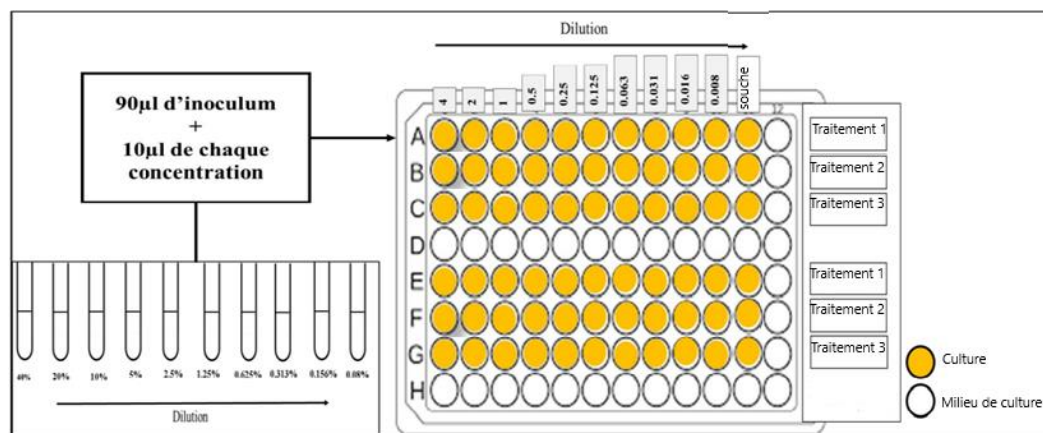


Figure 14 : Préparation de la microplaque

Les CMI de la formation de biofilms ont été déterminées selon la méthode de **Labrecque et al., (2006)**. Après la lecture de résultat des CMI de la croissance, les cellules microbiennes flottantes sont éliminées à l'aide d'une seringue et les puits sont ensuite rincés trois fois en utilisant l'eau distillée pour le but d'éliminer les cellules faiblement adhérentes. Un volume de 150µl de cristal violet à 0.4 % est ajouté dans chaque puits pendant 10 à 15 min pour colorer les biofilms. Ensuite, les puits ont été rincés cinq fois à l'eau distillée pour éliminer l'excès de cristal violet. Ensuite, un volume de 150µl d'éthanol à 99 % est ajouté dans chaque puits avec une agitation pendant 10 minutes. Les CMI de la formation de biofilm sont déterminé en tant que la plus faible concentration d'HE pour laquelle la coloration n'est observée à l'œil nu (**Beckloff et al., 2007**). De plus, l'absorbance a été mesurée à 620 nm en utilisant un lecteur automatique ELISA.

- **Lecture :**

Selon **Obeizi et al., (2020)**, le taux d'inhibition du biofilm a été calculé selon l'équation suivante :

Taux d'inhibition du biofilm % = $(\text{DO control positive} - \text{DO Concentration test}) / (\text{DO Control positive}) \times 100$.

CHAPITRE 03
RESULTATS
ET
DISCUSSION

III.1. Prélèvements et étude microbiologique

Sur une période de trois mois, 592 prélèvements provenant de différents matériels et patients ont été recueillis et réceptionnés au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Hôpital Centrale de l'Armée à Alger.

Sur les 592 prélèvements, 184 (31%) prélèvements étaient positives, et 408 (69%) prélèvements ont été considéré comme négatifs. (Figure 15).

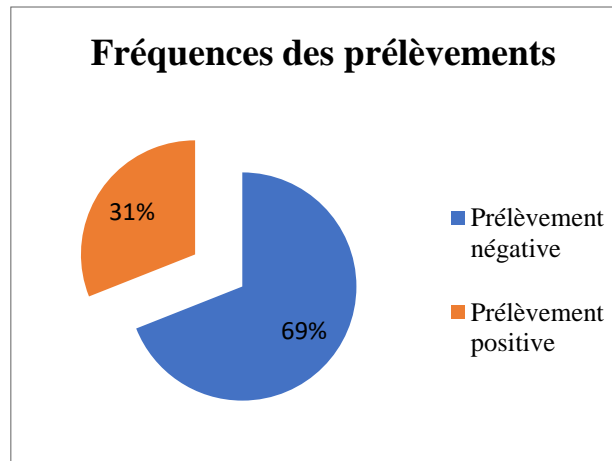


Figure 15 : Fréquence des prélèvements.

III.1.2. Identification des souches isolées

A. Macroscopique

Après incubation à 37°C pendant 24 heures. Les bactéries isolées ont montré une diversité d'aspects cultureux, en fonction du milieu de culture utilisé, permettant de suspecter leur appartenance au genre *Staphylococcus*.

- Milieu Gélose nutritif : C'est un milieu d'isolement non sélectif dont les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent en couleur jaune dorées (Figure 16.a).
- Milieu Chromagar : C'est un milieu non sélectif, les colonies du *S. aureus* apparaissent dorées, opaques, petites (Figure 16.b).
- Milieu Gélose au sang cuit : C'est un milieu non sélectif, les colonies du *S. aureus* ont une couleur blanche, d'un diamètre variant entre 1 à 3 mm de diamètre (Figure 16.c).
- Milieu Chapman : C'est un milieu sélectif, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté (caractéristique principale de *S. aureus*). Ces colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 à 2 mm de diamètre (Figure 16.d).

• Milieu Baird Parker : C'est un milieu sélectif pour *Staphylococcus aureus*, elle est caractérisée par la formation de colonies noires (réduction du tellurite en tellure), brillantes, convexes, entourées d'une zone claire (Figure 16.e).

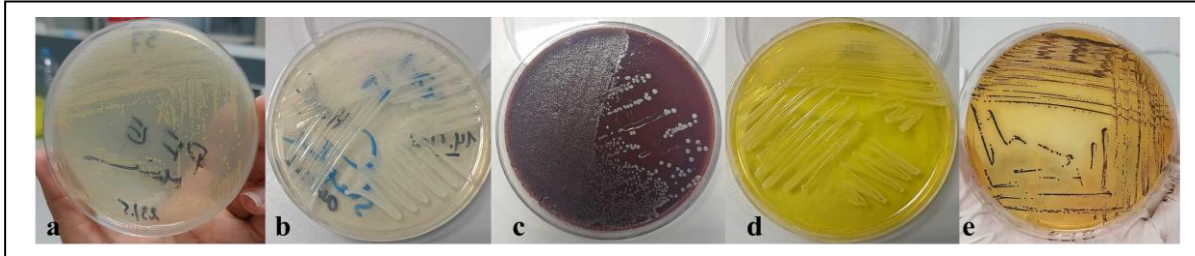


Figure 16 : *S. aureus* sur différents milieux de culture.

B. Microscopique

La coloration de GRAM s'est effectuée sur des colonies de *Staphylococcus aureus* obtenue à l'état pur sur des milieux sélectifs. Ce qui a permis de mettre en évidence des cocci sphériques, en grappe de raisin, en paires et colorés en violet.

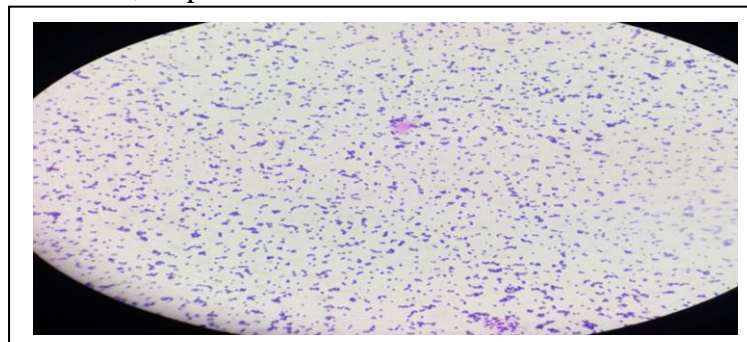


Figure 17 : Observation des souches de *S. aureus* isolés après Coloration de GRAM (GX100).

C. Identification biochimique des souches

Cette étape repose sur une série de réactions enzymatiques et une galerie API 20 Staph.

• Test de coagulase

Ce test a permis de révéler la présence de coagulase caractéristique des *S. aureus* (Figure 18).



Figure 18 : Résultat du test de coagulase.

• Test de catalase

Toutes les souches de *S. aureus* ont la capacité à décomposer le substrat (eau oxygéné) en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz.

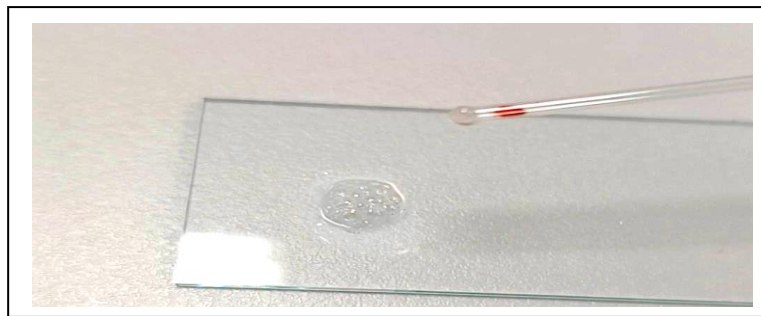


Figure 19 : Résultat du test de catalase.

• Galerie Api Staph et le Phoenix

Dans cette étape nous avons réalisé une identification en utilisant la galerie API Staph et une confirmation par l'automate Phoenix (Figure 20 ; Tableau III).

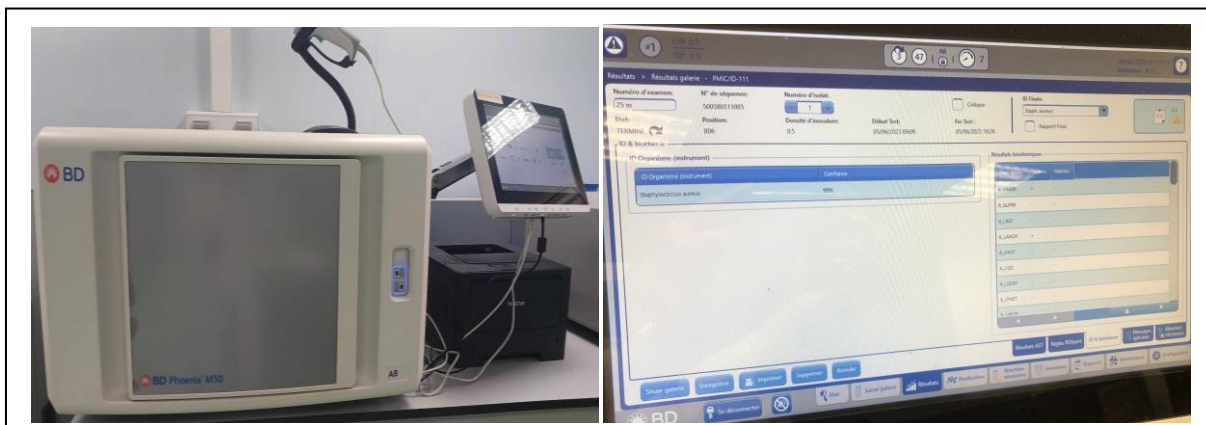


Figure 20 : Résultat de la galerie Api Staph sur l'automate Phoenix.

Tableau III : Résultat de la galerie Api Staph par l'automate Phoenix

Réaction bi oc hi m i- qu e	R	R	R	R	R	S	T	R	P	P	R	R	R	R	R	R	M	M	M	M	M	M	N	N	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Résultat	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

D. Etude de la sensibilité des souches *S. aureus* aux antibiotiques

Les résultats de l'état de résistance des souches de *Staphylococcus aureus* isolées sont représentés par la figure ci-après.

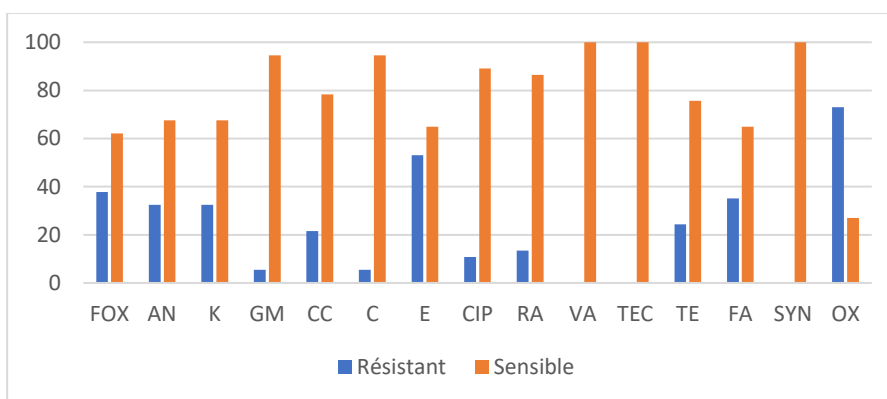


Figure 21 : Taux de résistance et de sensibilité des souches de *S. aureus* aux antibiotiques.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches *S. aureus* analysées a montré un taux de résistance peu élevé vis-à-vis de la plupart des antibiotiques testés. Ainsi la résistance au céfoxitinea permis de classer les 37 souches en deux grands groupes, soit 23 des souches sensibles à la méthicilline (SASM) et 14 résistantes à la méthicilline (SARM).

Alors que pour les antibiotiques amikacine et kanamycine, nous notons une forte sensibilité 25 et un taux faible de résistance 12.

Pour Gentamycine et chloramphénicol, nous observons un taux de sensibilité de 35 souches et un taux de 21 souches de résistance. Pour la Clindamycine, 29 sont sensibles et 8 sont résistantes. Erythromycine et Acide fusidique présentent le même taux de résistance et sensibilité et avec un taux élevé de sensibilités.

Cependant toutes les souches se révèlent sensibles à la vancomycine, la teicoplanime et la speictinomycine. 33 des souches sont sensibles à la cipofloxacine, 32 sont sensibles à la

rifampicine, 28 sont sensibles à la tétracycline. Pour l'Oxacilline 27 sont résistantes (Figure 21).

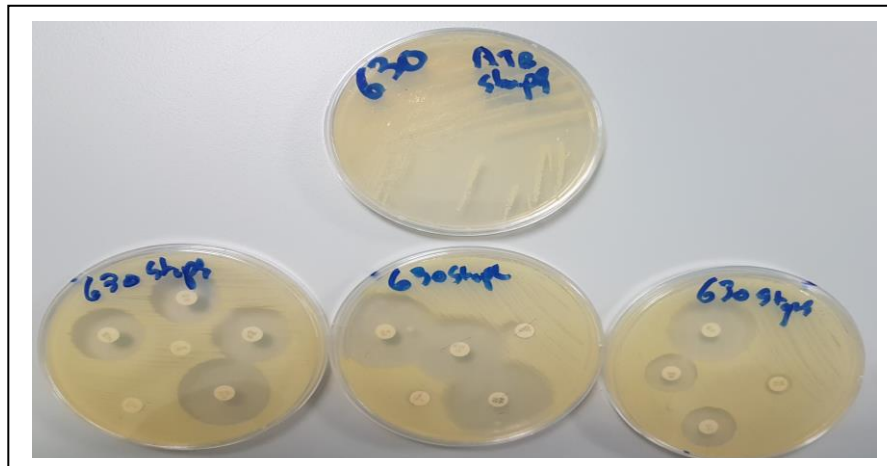


Figure 22 : AntibioGramme de la souche *S. aureus*.

III.3. Fréquence des prélèvements positifs

Rappelons que pour notre étude, le traitement des différents prélèvements a été entrepris uniquement dans le but d'isoler *Staphylococcus aureus*. De ce fait, seules les colonies identifiées au genre *S. aureus* sont retenues et repiquées à nouveau ce qui représente 20%, tandis-que les autres espèces représentent 80% des échantillons analysés (Figure 24).

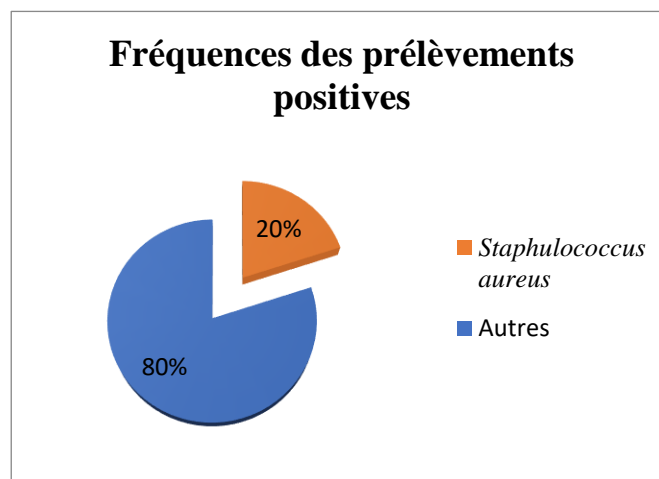


Figure 23 : Fréquence des prélèvements positifs.

III.4. L'aptitude des souches isolées à former de biofilms

La technique du Rouge Congo (RCA) et la technique de plaque de culture (TCP) sont utilisées pour la détection et l'évaluation in vitro de biofilms.

III.4.1 Sélection des souches productrices du biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

Selon la production de slime sur milieu Rouge Congo, nous avons observés que la plupart des souches isolées de *S. aureus* y compris la souche standard ATCC 25923 étaient productrices de slime (97%) à l'exception de la souche isolée d'hémoculture. Les souches productrices de slime présentaient un phénotype similaire, avec des colonies rugueuses de couleur très sombre (Figure 24).

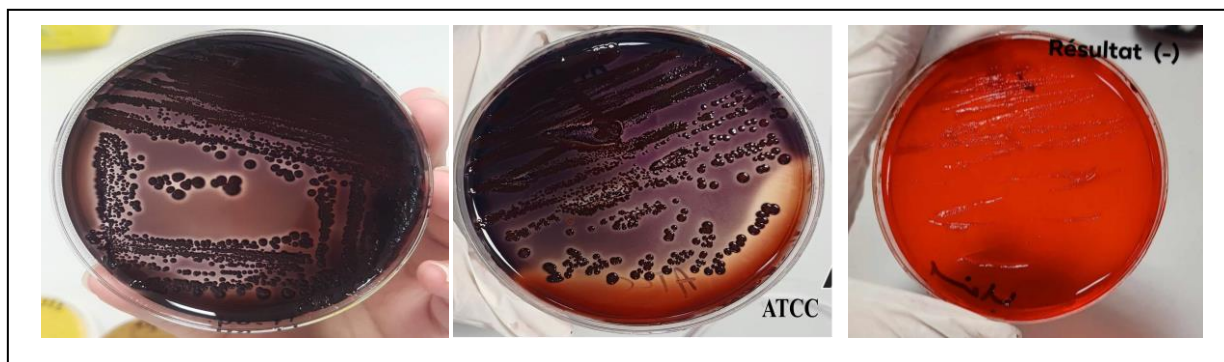


Figure 24 : Production du slime par *S. aureus* sur milieu Rouge Congo.

III.4.2 Sélection des souches productrices du biofilm par la technique de plaque de culture de tissu (TCP)

Cette technique développée par Christensen et son groupe en 1985, est largement utilisée et considérée comme méthode de référence pour détecter la formation de biofilm. Selon la figure 25 et les résultats ont montrés que toutes les souches de *Staphylococcus aureus* ainsi que la souche ATCC 25923 sont formatrices de biofilm. 8% sont fortement formatrice du biofilm ($DO_t \times 4 \leq DO$), 41% ainsi que l'ATCC sont modérément formatrice ($DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$) et 51% ont un pouvoir de formation du biofilm faible ($DO \geq DO_t$) (Figure 25).

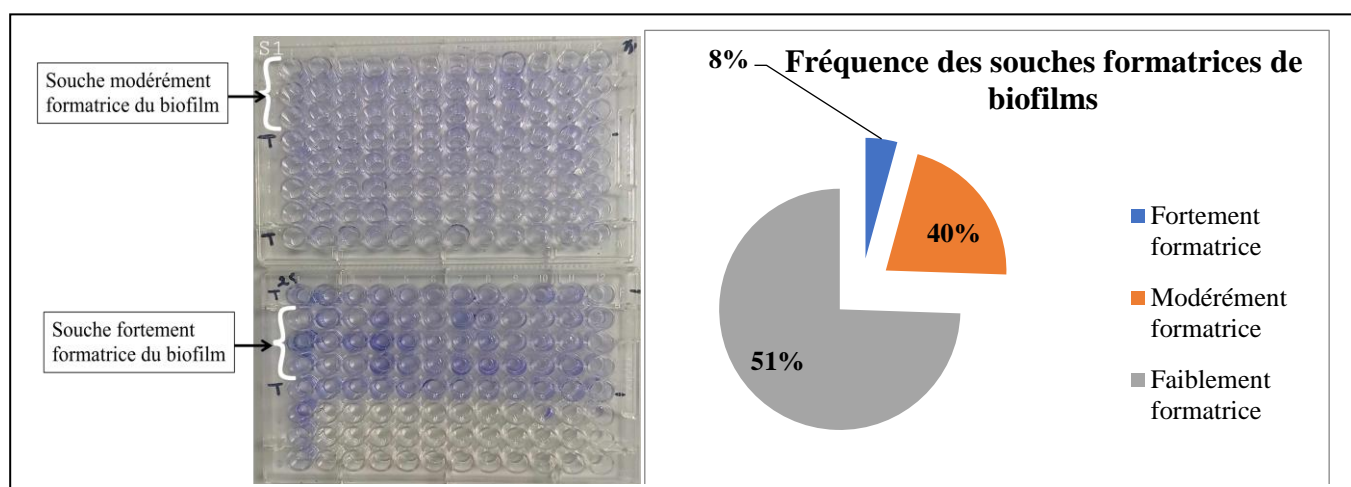


Figure 25 : Résultat de la formation du biofilm sur microplaque.

III.5. Préparation des extraits et huiles des trois plantes

III.5.1. Rendements

Nous avons analysés deux extraits méthanoïques EM_N et EM_A de *Nigella sativa* et *Aloe vera* respectivement, ainsi que l'huile fixe de *Nigelle* et l'huile essentiel de l'*Artemisia*. Les résultats de calcul du rendement sont exprimés dans le tableau si dessous.

Tableau IV : Rendements (%) des différents extraits des trois plantes.

Extrait	Rendement
Huile végétale de <i>N.sativa</i>	19%
Extrait méthanoïque de la <i>N.sativa</i>	56,58 %
Extrait méthanoïque de l' <i>Aloe vera</i>	52,43%
Huile Essentiel d' <i>Artemisia Herba Alba</i>	0.4%

Les extraits méthanoïques de *Nigella sativa* et d'*Aloe vera* ont un rendement de 56,58 % 52,43 % respectivement. L'extraction de l'huile fixe de nigelle et essentielle de l'*Artemisia herba alba* respectivement ont permis d'obtenir des rendements de 19 % e 0.4 % (Tableau IV).

Nous notons que la différence du rendement des extraits étudiés, est attribuée en générale à plusieurs paramètres tels que l'espèce, la technique d'extraction et quantité du produit.

III.5.2. Etudes qualitative et quantitative de la composition chimique des plantes étudiées

A. Screening phytochimique (Etude qualitative)

Les résultats du screening phytochimique de nos extraits sont illustrés dans le tableau ci-après

Tableau V : Résultats de l'étude phytochimique des graines de *N. sativa* et gel d'*Aloe vera*.

Extraits \ Tests	<i>Nigella sativa</i>	<i>Aloe vera</i>
Poly-phénols	++	-
Flavonoïdes	++	++
Tannins	++ tannins gallique ++ tannins catéchique	++ tannins gallique - tannins catéchique
Saponosides	++	+
Alcaloïdes	Par le réactif de Dragendorff: +	Par le réactif de Mayer : -
Composé réducteur	Pas réalisé à cause d'absence de réactif	Pas réalisé à cause d'absence de réactif
Glycoside	++ glycoside cardiaque	+ Glycoside
Mucilage	++	+
Anthraquinone	-	++

(-) : Absence de métabolites secondaires. (+) : Faible présence de métabolites secondaires. (++) : Forte présence de métabolites secondaires.

On comparant les résultats des tests phytochimiques effectués sur les extraits de *Nigella sativa*, avec ceux obtenus sur *Aloe vera*, on constate qu'il existe une différence basée sur la présence ou l'absence de la couleur identifiant le composé en question. Le test a révélé la présence de flavonoïdes, saponosides, tanins gallique, mucilage et glycosides.

Les graine de la nigelle sont riche en flavonoïde, en saponines, en poly phénols, en glycoside cardiaque, en mucilage et en tannins (gallique et cathechique) et dépourvue des anthraquinones alors que le gel d'*Aloe vera* est dépourvu des polyphénols, des alcaloïdes, tannins cathélique et riche en anthraquinone et flavonoïdes.

III .6 Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

Nous avons déterminé l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose des extraits méthanoïques de Nigelle et d'*Aloe vera*, huile végétale de nigelle et une huile essentielle d'*Artemisia* sur les souches sélectionnées précédemment dont cinq souches issues de différents prélèvements et une souche de référence de type ATCC25923 provenant de l'institut Pasteur d'Algérie.

Pour les deux extraits méthanoïques de nigelle et *Aloe vera* étudiés, nous ne notons aucune activité antimicrobienne pour l'ensemble des souches analysés ($\emptyset < 10$ mm)

Alors que l'huile végétale de nigelle, a montré une activité antimicrobienne très importante vis-à-vis des souches étudiées. Toutes les souches étaient très sensibles (excepté la souche S5 qui était sensible).

L'huile essentielle d'*Artemisia* par contre était très efficace, ainsi toutes les souches sont extrêmement sensibles, sauf la souche S5 qui est très sensible.

Pour le mélange des deux huiles, Nigelle / *Artemisia*, nous observons un effet synergétique vis-à-vis des quatre souches étudiées et étaient extrêmement sensibles c'est-à-dire une action potentialisatrice de l'huile végétale de *Nigelle* par l'huile essentielle d'*Artemisia*.

La souche de référence S6 était très sensible vis-à-vis de la combinaison des deux huiles *Nigelle* et *Artemisia*, montrant une zone d'inhibition nettement inférieur à celle obtenue pour chacune des huiles pris séparément, ce qui se traduit par un effet antagoniste entre les deux huiles étudiées.

En conclusion, nos résultats ont montré une importante activité antimicrobienne pour l'ensemble des huiles étudiées à l'exception des extraits méthanoïques des deux plantes *Nigella sativa* et *Aloe vera* ne possédant aucune activité antimicrobienne vis-à-vis des souches analysées.

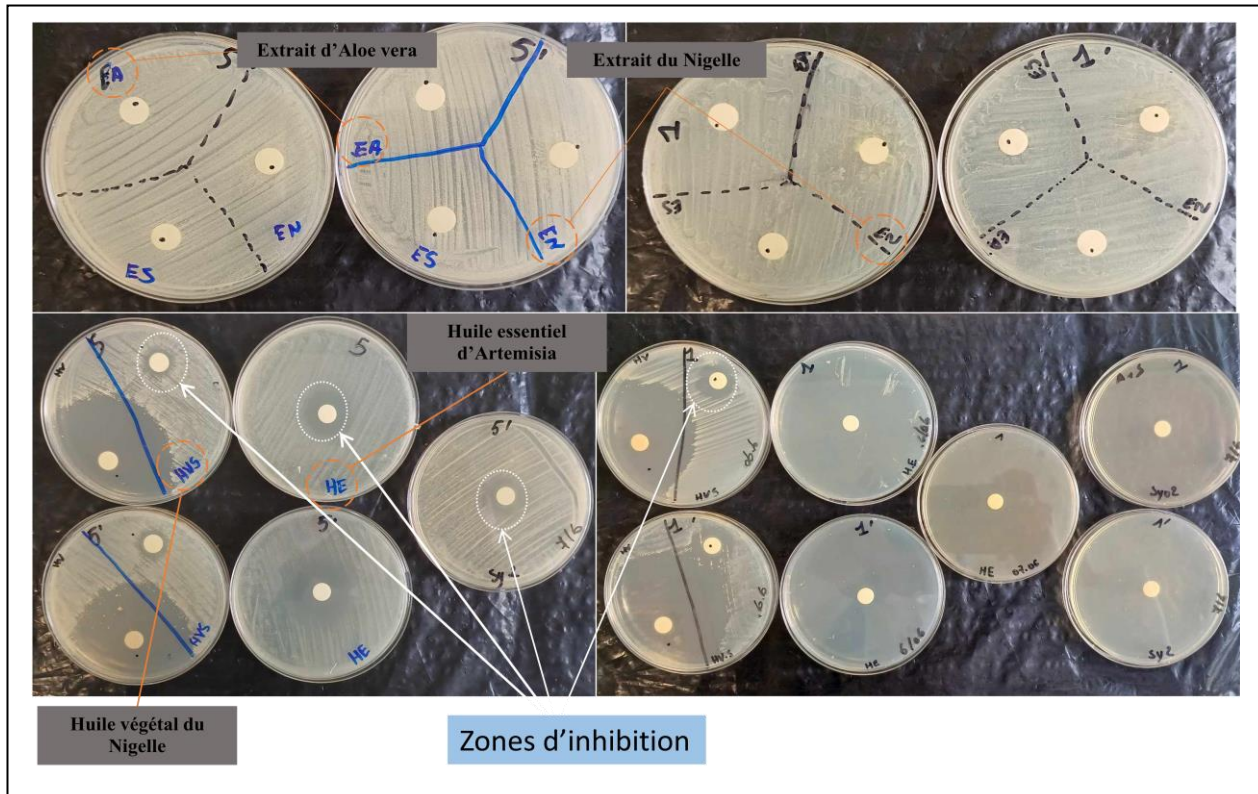


Figure 26 : Résultats de l'activité antimicrobienne par l'aromatogramme.

➤ **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par micro dilution en milieu solide :**

D'après les résultats de l'activité antimicrobienne, la CMI est tester pour les deux souches S 05 et S 06 qui sont les plus résistant.

La valeur de la CMI correspond à la plus petite concentration de l'huile qui ne donne aucune croissance bactérienne visible. Ces dernier résultats ont montré que :

- La valeur de la CMI de notre HV_N nécessaire à l'inhibition de la croissance de la S 05 est de 0.25% et pour la S 06 est de 0.125%.
- La valeur de la CMI de notre HE_A nécessaire à l'inhibition de la croissance est de 0.06% pour les deux souches testées.
- La valeur de la CMI de l'association (HE_A+HV_N) nécessaire à l'inhibition de la croissance pour les deux souches testées est pareil, est de 0.5%

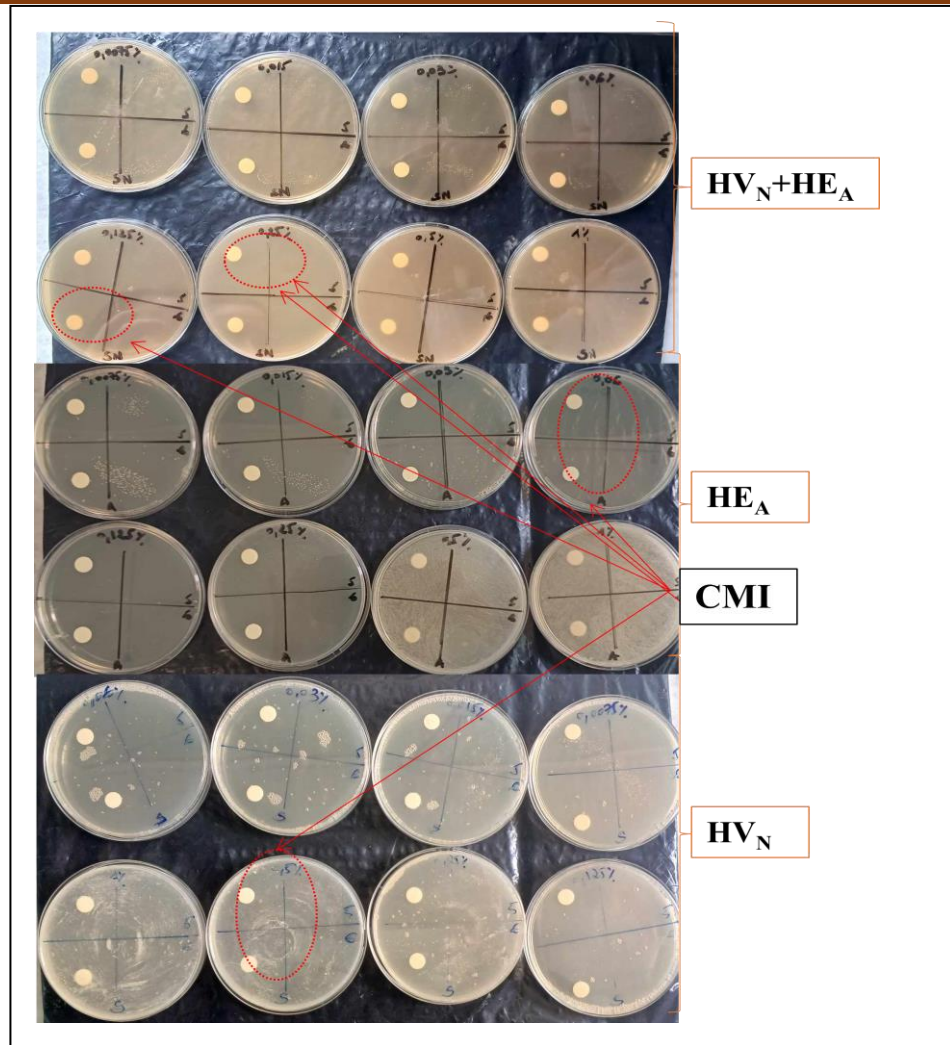


Figure 27 : Résultats du CMI des HV_N , HE_A et HV_N+HE_A vis-à-vis S 05 et S06.

➤ **Détermination de la concentration minimale bactéricide.**

A partir de la CMI, le disque correspondant à cette dernière a été pris et déposé sur gélose MH dépourvu d'huile. Après 24H et à partir du disque n'ayant pas observé une présence de colonie, la valeur de la CMB de notre HV_N pour S 05 est de 1% et pour la S 06 est de 0.5 %.

- La valeur de la CMB de notre HV_A pour S 05 est de 0.25% et pour la S 06 est de 0.125 %.

- La valeur de la CMB de l'association HE_A+HV_N est négative pour les deux souches testées.

- en comparant les valeurs CMI CMB nous remarquons que les valeurs CMB plus grandes que CMI donc interpréter notre huile essentielle d'artemisia est bactéricide à la concentration de 0.25% pour S5 et 0.125% pour S6 nettement inférieurs à ceux trouvés pour l'huile fixe de nigelle dont les valeurs sont de 0.5% à 1% pour S5 et S6 respectivement.

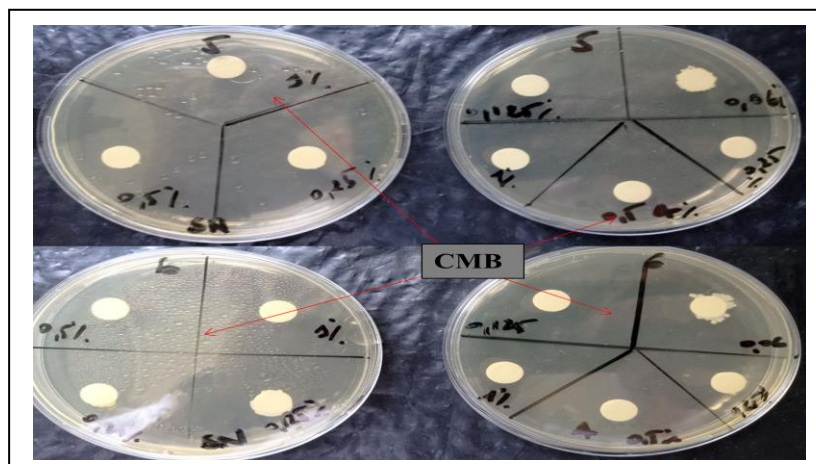


Figure 28 : Résultat du CMB des HV_N, HE_A et HV_N+HE_A vis-à-vis S 05 et S06.

➤ Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur microplaque

Dans cette méthode, aucun résultat significatif n'a été obtenu. L'observation visuelle directe n'a pas permis de détecter les phénomènes recherchés.

III .7 Evaluation de l'activité antibiofilm

Les résultats obtenus pour l'activités antibiofilm de l'HE_A, HV_N et HV_N+ HE_A vis-à-vis *S. aureus* sont illustrer dans la (figure 29)

On remarque que les concentrations minimales inhibitrices de la formation du biofilm (CMIB) des HE_A, HV_N et le mélange sont plus ou moins grandes par rapport les valeurs des CMI_s.

L'HE_A a démonté l'effet inhibiteur le plus significatif sur la formation des biofilms sur 04 souches étudiées. L'HV_N a présenté un effet inhibiteur sur deux souches seulement. Par contre, le mélange HV_N+HE_A n'a aucun effet inhibiteur sur la formation du biofilm.

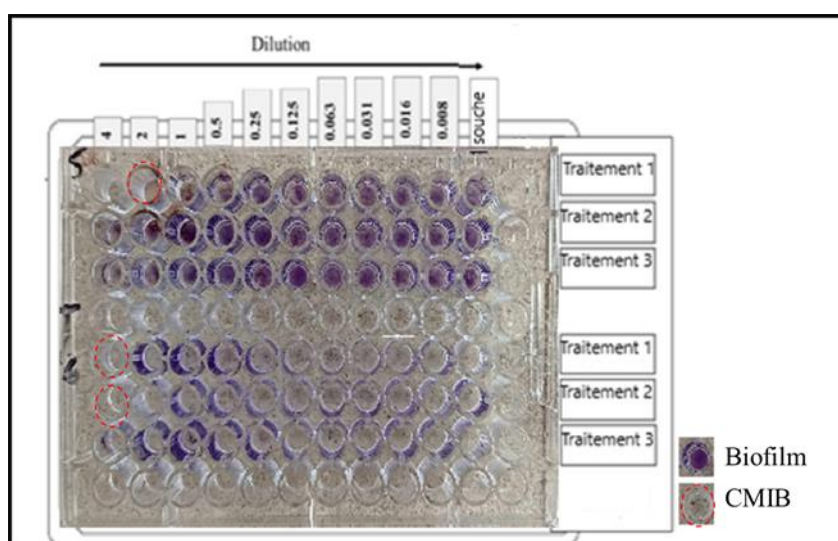


Figure 29 : Résultats des activités antibiofilm de l'HE_A, HV_N et HV_N+ HE_A vis-à-vis *S. aureus*.

Discussion :

Selon les données obtenues à partir des 592 prélèvements ,184 positifs (soit 31%), il a été identifié que parmi 37 d'entre eux étaient des souches de *S. aureus* (soit 20%). Ceci est en parfait accord avec les découvertes de l'étude menée par **Saouide El Ayne et al., (2014)** à l'hôpital El Idrissi au Maroc qui montre un taux de 20% de *S. aureus*. Ces derniers sont identiques avec l'étude faite par **Alioua, (2015)**, à partir de 7620 prélèvements au laboratoire de microbiologie du CHU d'Annaba, qui a obtenu un taux de 35% des prélèvements positifs dont 20% étaient des souches de *S. aureus*. Nos résultats sont cohérents avec l'étude menée par **Mentfakh Laceb et al., (2022)**, qui a révélé un taux de *S. aureus* de 27% dans un hôpital de l'ouest de l'Algérie. Il existe une certaine similarité dans la prévalence de *S. aureus* entre les deux études citées ci-dessus, ce qui indique une tendance commune dans différentes régions de l'Algérie.

Selon les données de la littérature, les graines de *Nigella sativa* renferment des taux élevés en huile totale, compris entre 39.7 et 52. % (**Ashraf et al., 2006 ; Ramadan et Mörsel, 2002**). La variation dans la teneur en huile des graines est due à plusieurs facteurs tels que le biotope (**Cheihk-Rouhou et al., 2007**), la méthode d'extraction (**Atta, 2003 ; Ramadan et Mörsel, 2002**) et l'espèce utilisée (**Kökdil et Hilmaz, 2005**). Dans notre étude l'extraction de l'huile végétal de *nigella sativa* par la méthode presse à froid a permis d'obtenir un rendement de 19%. L'étude menée par **Mahboubi et al., (2018)** a révélé que l'huile végétale représente un rendement compris entre 30 - 44.21%.

D'autre part , nos résultats sur l' huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* a montré un rendement de 0.4% , qui est en accord de celui enregistré dans la région de Djelfa qui est de 0.54% lors d'une étude menée par (**Goudjil et al., 2015**) .Un rendement de 0.264% ± 0.024 (p/p) inférieur au notre a été signalé au cours d'une étude menée dans la région de Kasr El Chellala (**Behih et al., 2020**). Par contre un rendement supérieur à celui trouvé dans notre étude variant de 0.7% à 1.02% qui a été rapporté dans diverses régions de l'Algérie (**Benyoucef et al., 2018**).

Ces résultats révèlent que le rendement des extraits et de l'huile des plantes étudiées peut varier d'une région à l'autre. Cette variation peut être due à plusieurs facteurs tels que les conditions climatiques, le sol, les techniques de culture et les méthodes d'extraction. Il est important de prendre en compte également les variations naturelles et les différences entre les variétés des espèces des plantes utilisées.

Nous avons abordé dans cette étude, la résistance de nos souches de *S. aureus* isolées vis-à-vis d'une batterie d'antibiotiques et d'après l'analyse de nos résultats, nous avons observé un certain pourcentage des *S. aureus* qui sont sensibles à de nombreux antibiotiques, et d'autres qui présentent des résistances importantes à d'autres types qui ont un large spectre de consommation et prédomine dans le milieu hospitalier.

En Algérie, le SARM représente 45,6 % des souches isolées en milieu hospitalier (**Ministère de la Santé, 2015**). D'autres études menées dans la région de Nouakchott (Mauritanie) par Mohamed Lamine Ould Salem, ont montré un taux des SARM élevé entre 25-35% (**Ould Salem et al., 2016**), celui-ci concorde avec notre résultat qui est de 37,8%. Nous avons montré au cours de notre étude, un taux de résistance de nos souches isolées vis-à-vis l'oxacilline qui est de 73%, analogue à celui rapporté par **Touatia (2016)** avec un taux de résistance à la pénicilline et l'oxacilline de 100%.

Des staphylocoques hospitaliers, et plus récemment communautaires, ont développé une résistance croisée aux pénicillines M (mécilline, oxacilline) et les autres β -lactamines grâce à la production d'une enzyme PLP2 a codé par le gène *mecA*, liant les pénicillines (PLP) avec une faible affinité qui est à l'origine de la résistance aux autres β -lactamines (Dumitrescu et al., 2010).

Pour les aminosides, les souches de *S. aureus* sont faiblement résistantes avec un taux de 5,4% pour la gentamicine, et 32,4% à l'amikacine. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus par Guetarni et al., (2016) dans un centre hospitalier universitaire de la région ouest d'Algérie. De même une résistance a été observé aussi vis-à-vis de l'érythromycine, et l'acide fusidique, comparable à notre résultat avec un taux de résistance de 35,1 % r pour l'érythromycine et 32,4% pour l'acide fusidique

Trois mécanismes sont impliqués, le premier consiste en des mutations aux niveaux des gènes codant pour les Protéines ribosomales, qui est rapporté chez les souches de *S. aureus* résistantes à la streptomycine. Le second mécanisme résulte des mutations touchant la perméabilité de l'antibiotique et le troisième est assuré par la production d'enzymes inactivatrices (Lyon et Shurray, 1987 ; Chambers, 2009).

Nos résultats trouvés dans cette étude montrent des taux suivants : 32,4% de résistance pour la kanamicine, 5,4% pour la gentamycine et 21,7% pour la clindamycine, sont en accord avec ceux de l'étude menée par Alioua en 2015 qui a montrer un taux plus faible de 28,6%

des souches résistantes à la kanamicine, 10,7% à la gentamicine, 17,9% à l'ofloxacine et 16,1% à la clindamycine.

La multi résistance du genre staphylocoque aux antibiotiques et à d'autres agents antimicrobiens est souvent acquise par le biais de mutations chromosomiques, de transferts génétiques tels que l'échange de plasmides et de transposons ou par l'inactivation enzymatique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, le flux actif ou la diminution de la pénétration de la molécule (Quincampoix et Mainardi, 2001) (Bagnoli et al., 2017).

Dans ce contexte de multi résistance aux différents antibiotiques et au biofilm nous avons entamé cette étude pour trouver une nouvelle approche thérapeutique. Pour étudier et détecter la formation de biofilm, diverses méthodes d'investigation sont utilisées (**Guzman-Soto et al., 2021**).

Nous avons utilisé au cours de cette étude deux techniques à savoir la méthode qualitative du rouge congo agar (RCA) et quantitative sur plaque de culture de tissu (TCP), pour évaluer la capacité de *S. aureus* à produire le slime et la formation de biofilm. Les résultats de la méthode RCA, montrent que 97% de nos souches *S. aureus* sont formatrices de biofilm sauf une seule souche, et ceux de la méthode TCP révèlent 100 % formatrice de biofilm partagé sur trois phénotypes forte (8%) modéré (41%) et faible (51%) , et celle qui était négative sur le RCA apparait ici fortement formatrice de biofilm.

Eventuellement nos résultats par TCP sont rapprochés de ceux de **Maharjan et al., (2022)**, avec un taux de formation de biofilm qui est de 62,2 %, dont 6 % forte, 15,7 % modéré et 40,6 % faiblement formatrice de biofilm. De plus, le même auteur a montré qu'il n'y avait pas de relation significative entre la production de biofilm et le profil de résistance des souches à la méthiciline. D'autres travaux menés par **Gaire et al., (2021)**, ont confirmé aussi cette hypothèse. Sur 27 isolats de *S. aureus*, 4 % fort producteur, 70 % faibles producteurs et 26 % producteurs modérés de biofilm, et parmi les 19 producteurs de biofilms faibles, 52,6 % sont des SARM et 47,4 % sont des MSSA. Alors que pour les producteurs modérés de biofilm, 71,4 % sont des SARM et 28,6 % sont des MSSA. Ces derniers sont 100% forte productrice de biofilm. Notre résultat confirme cette donnée de la littérature ou nous avons trouvé sur 8% d'isolats un phénotype fort de biofilm constitué de 100 % des souches MSSA.

D'autres résultats rapportés par **Neopane et al., (2018)** sur une étude menée à Chitwan Medical College and Teaching Hospital (CMCTH), montrent que sur 30 isolats étudiées (soit 69,8 %) sont formateurs de biofilm par TCP, partagé en trois phénotypes : 6,97 % fort producteurs de biofilm, 27,90 % modérée et 34,88 % faiblement producteur de biofilm. Une étude similaire réalisée sur TCP par **Mandhar et al., (2018)** a montré sur un total de 375 souches de *S. aureus*, seulement 21 souches (5,6%) étaient fortement adhérentes, 91 souches (24,3%) modérées et 263 souches (70,1%) faibles formatrices de biofilm. Selon la même étude sur RCA, parmi tous les isolats analysés, 20 isolats (5,3%) étaient positifs alors que 355 isolats (94,7%) étaient des biofilms non producteurs du slime (voir figure 24).

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne, sont rapportés dans le tableau VIII correspondant aux différents extraits méthanoïques de graines de *Nigella sativa* et d'*Aloe vera*, l'huile végétale de *Nigelle* et l'huile essentielle d'*Artemisia* vis à vis de cinq souches de *S.aureus* issues de différents prélèvements et une souche de référence ATCC 25923 de l'institut pasteur d'Alger.

Les deux extraits méthanoïques de la *N.sativa* et d'*Aloe vera* étudiées ont montrées aucune activité antimicrobienne contre les souches testées , à l'inverse des travaux de **Derbel et Niar (2019)** sur l'activité antibactérienne des extraits de miel et de graines de *Nigella sativa* vis-à-vis des infections bactériennes à l'est Algérien, ont montré une activité modérée vis-à-vis de *S.aureus* ($\emptyset = 12,6$ mm). D'autres recherches ont été faite par **Saleh et al., (2018)** sur l'analyse phytochimique de la *N.sativa* et son activité antimicrobienne ont révélé une faible activité vis-à-vis des SARM pour EM non diluée et pour EM diluée. De même pour l'extrait méthanoïque d'*Aloe vera* aucune activité antibactérienne n'a été détectée vis-à-vis des souches analysées .Ce résultat est en accord avec celui d'**Alkhail (2005)**. Par contre d'autres études menées par **Mehrishi et al., (2022)** ont rapporté que l'extrait méthanoïque d'*Aloe vera* présente une forte activité vis-à-vis des souches *S. aureus* testés à une concentration de 50 mg/ml de l'extrait méthanoïque.

L'huile végétale de *N.sativa*, a montré une forte activité antimicrobienne vis-à-vis des souches étudiées où toutes les souches étaient très sensibles, excepté une qui était sensible. Nos résultats sont identiques à ceux obtenus par **Belabid et Lazzouni, (2014)** où l'huile de *N. sativa* était active sur les souches *S.aureus*.

Pour l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*, une importante activité est observée, ainsi toutes les souches sont extrêmement sensibles sauf une qui était très sensible. Nos

résultats concordent avec ceux obtenus par **Bertella (2018)** qui a montré une sensibilité variant de 16.3 à 28.3 mm à l'égard de cinq souches de *S. aureus*. Une importante activité antimicrobienne vis-à-vis de huit bactéries à Gram+ avec des diamètres d'inhibition allant de 12.99 jusqu'à 33.79 mm pour *S. aureus*, ont été rapportées par les recherches de **Maidi (2021)** dans la région de Djelfa. Également les travaux de **Goudjil et al., (2015)** ; **Lakehal et al., (2016)** confirment ce résultat de la plante *Artemisia herba alba* récoltée dans la région de Djelfa. A la lumière de ces résultats, nous concluons que l'HE d'*Artemisia* possède une importante activité antimicrobienne.

Le mélange de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* et huile végétale de *N. sativa*, possède un effet antagoniste vis-à-vis des souches S 05 et S 06. Cependant, pour les autres souches S01 à S04, la zone d'inhibition était supérieure à 90 mm, ce qui dépasse la somme des valeurs d'inhibition des deux huiles prises séparément. Ces mêmes valeurs ont été observées lorsque seule l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* était utilisée. En revanche, la valeur d'inhibition était inférieure lorsque seule l'huile végétale de *Nigella sativa* était utilisée. Par conséquent, il n'a pas été initialement possible de détecter l'effet antagoniste. En conclusion, l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* présente un effet plus favorable lorsqu'elle est utilisée seule par rapport à son utilisation en combinaison avec l'huile de nigelle.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de notre HV_N sur la souche S 05 varie de 0.25% et pour la souche S 06 de 0.125%. La concentration minimale bactéricide (CMB) est de 1% pour la souche S 05 et de 0.5% pour la souche S06. Des résultats obtenus par **Gawrona et al., (2019)**, sur l'activité d'extraits de grains de la *N.sativa* ont montré un puissant effet bactériostatique et bactéricide contre *Staphylococcus aureus*, y compris les souches résistantes à la méthicilline (MRSA) isolées en Pologne avec une CMI qui varie entre 0.08 et 0.16 mg/ml et une CMB similaire aux valeurs de la CMI.

La CMI de notre HE_A varie de 0.06% à 0.031 ml pour les deux souches testées, la CMB de notre HV_A varie entre 0.25% et 0.125 % respectivement. Selon les études menées par **Maidi en 2021**, l'HE d'*Artemisia herba alba* a manifesté une activité vis-à-vis de toutes les bactéries testées à l'exception de *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *L. monocytogenes* avec des CMI allant de 0.6 à 10µl/ml et des CMB allant de 2.5 à 10 µl/ml. D'autres études réalisées par **Bertella et al., (2018)** ont trouvés des CMI allant de 10mg/ml jusqu'à 5mg/ml et des CMB allant de 20 jusqu'à 10mg/ml pour l'HE d'*Artemisia herba-alba* récoltée à Batna vis-à-vis des *S.aureus*. **Messaoudi et al., (2020)** ont aussi mis en évidence l'activité antimicrobienne de

l'armoise marocaine avec des CMI allant de 42.67 à 4 $\mu\text{l/ml}$ et des CMB allant de 85 à 16 $\mu\text{l/ml}$.

L'activité antibactérienne attribuée à HV_N sur certaines souches pourrait être expliquée par sa composition chimique probablement riche en mono-terpènes oxygénés (le thymoquinone, le thymol et le carvacrol), composés connus pour leur fort pouvoir antibactériens. Plusieurs études ont également rapporté que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de nigelle est probablement due à ces mêmes composés majeurs, notamment le thymoquinone, le thymohydroquinone, le longifolène, le thymol et le carvacrol (**Bourgou et al., 2010 ; Halawani, 2009**). Les huiles ont une activité antibactérienne en raison de leur composée lipophile (acide gras), et leur capacité à s'accumuler dans la bicouche phospholipidique de la membrane cytoplasmique des bactéries, qui est la cible principale de ces huiles, cela entraîne une augmentation de la fluidité de la membrane (**Bourgou et al., 2010 ; Boukhatem et al.,2010 ; De Oliveira et al.,2011**) et de sa perméabilité aux molécules intracellulaires tels que les ions de potassium (K⁺), les protons (H⁺), l'ATP et les acides nucléiques. De plus, les huiles essentielles peuvent interférer avec la chaîne respiratoire des bactéries, ce qui conduit à la mort cellulaire par apoptose (**De Oliveira et al., 2011; Liolios et al.,2011**). Ces modes d'action ont été attribués à l'huile essentielle de *Nigella sativa* contre *S. aureus*. D'autre part, il a été établi que l'huile fixe de la nigelle testée sur 20 souches de *Listeria monocytogènes* de diverses origines présente une importante activité antimicrobienne. Cette dernière semble être attribuée à l'huile essentielle contenue dans la fraction huile fixe.

L'effet antimicrobien de nos huiles, végétal et essentielle de nigelle et *Artemisia* respectivement, semble être attribué à la richesse en polyphénols et flavonoïdes contenus dans ces deux plantes étudiées. Le screening phytochimique démontre en fait la présence des phénols et flavonoïdes qui sont connus pour leur activité antimicrobienne, comme antioxydants naturels puissants, aussi la richesse en métabolites secondaires de la plante ce qui explique aussi son effet antimicrobien.

Des rapports d'études sur l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* ont révélé diverses activités biologiques liées à la variation de leurs composants particuliers tels qu'antimicrobien, antioxydant, antidiabétique (**Ouguirti et al., 2021**), les principaux composés sont l' α -thuyone, la β -thuyone et camphre (13,1 %). D'autres composants trouvés en petite quantité sont le camphène, le γ -terpinène, bornéol et p-cymène, cette diversité de composants actifs est attribuée à son activité antimicrobienne (**Said et al.,2016**). L'activité

antibactérienne de l'HE d'*A. herba-alba* peut être associée à ses composés hydrocarbures et oxygénés monoterpènes qui peuvent détruire l'intégrité cellulaire entraînant une altération de la perméabilité (Goudjil et al., 2016). De nombreuses études ont rapporté que les huiles essentielles sont légèrement plus actives contre les bactéries Gram+ que Gram- (Zouari et al., 2010). La résistance de ces dernières peut être due à leur enveloppe hydrophile qui peut bloquer la pénétration des composés hydrophobes (Akrouit et al., 2010).

A la lumière de nos résultats sur l'activité antimicrobienne de nos huiles, nous avons décidé d'utiliser les huiles végétale et essentielle de nigelle et artemisia respectivement comme la nouvelle approche thérapeutique pour vaincre la multi résistance aux biofilm bactériens.

Pour évaluer l'activité antibiofilm, nous avons testé différentes huiles, essentielle d'*Artemisia herba alba* HE_A, végétale *Nigella sativa* HV_N ainsi qu'un mélange des deux (HE_A+HV_N) sur cinq souches de *S. aureus* et une souche ATCC 25923. Les résultats ont montré un effet positif significatif pour HE_A sur toutes les souches excepté les souches 02 et 04, un effet antibiofilm pour HV_N vis-à-vis des souches S 01 et ATCC, et aucun effet pour le mélange des deux huiles.

La détermination du pouvoir inhibiteur du biofilm sur cinq souches testées, a montré que l'huile essentielle de l'*Artemisia* possède un effet inhibiteur. D'après l'étude réalisée par Al-Shuneigat et al., (2014) basée sur l'effet d'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* d'origine sud de Jordanie sur la formation de biofilm bactérien, a révélé une activité inhibitrice contre *S. aureus* avec une valeur de CMIB de 1%. Il semble que nos résultats sont plus significatifs ce qui pourrait être attribué à des facteurs géographiques de la région où la plante est cultivée.

Les études précédentes du même auteur ci-dessus, ont montré aussi que l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* a produit des effets inhibiteurs de formation de biofilm contre d'autres isolats (*K pneumonia*, *P mirabilis*, *P aeruginosa*), avec une CMIB qui varie entre 0.5 et 4 %. D'autres résultats trouvés par Mathlouthi et al., (2021) montrent que huile essentielle d'*Artemisia herba alba* réduit la capacité d'*E. coli* à former un biofilm.

Huile végétale de *N. sativa* a révélé un effet inhibiteur de 4% pour deux souches seulement (S01 et l'ATCC). Les résultats de l'étude menée par Gawron et al en 2019 sur l'huile végétale de *N. sativa* contre *S. aureus* y compris l'ATCC 2592, ont montré une activité antibiofilm avec une concentration de 4–16 µg/ml, suggérant un effet plus important par

rapport à celui que nous avons trouvé dans notre étude. Cette variabilité est due à la méthode d'extraction utilisée, notamment la technique sous CO₂ supercritique utilisé par l'auteur qui se révèle une méthode plus efficace et plus puissante quant au rendement et la qualité de l'huile obtenue comparé aux autres méthodes conventionnelles.

L'association HE_A + HV_N à révéler des résultats similaires à celle de l'activité antimicrobienne. Aucun effet inhibiteur de la formation de biofilm n'a été observé visuellement pour toutes les souches testées. Cependant, lors de la comparaison des calculs des densités optiques (DO), une diminution du pourcentage d'inhibition a été observée pour deux souches seulement (S05 et l'ATCC).

L'huile de *N. sativa* a une excellente activité antibactérienne contre les isolats cliniques de *S. aureus* résistant à la méthicilline. Les préparations de *N. sativa* ont réduit la formation de biofilm de toutes les souches bactériennes testées. Une réduction modérée de la formation de biofilm a été notée pour les extraits méthanoliques et l'huile (Saleh et al., 2018). D'autres recherches ont démontré que les extraits de graines de *N. sativa* et la thymoquinone (composant actif) inhibent la formation de biofilm de *S. aureus*

Une recherche présente sur le composant actif de l'huile essentielle de *N. sativa* contre la bactérie pathogène humaine *S. aureus*. Grâce à l'analyse STRING le facteur d'agglutination B (clfB) de *S. aureus* joue un rôle dans la régulation de la voie du biofilm. Par conséquent, huile essentielle sont ancrés à la protéine clfB critique, qui a révélé le p-cymène, la thymoquinone et le carvacrol comme étant la plus grande affinité de liaison empêchant le rôle régulateur du facteur d'agglutination B. De plus, une analyse PCR en temps réel a montré que l'expression de clfB et du gène d'adhésion intercellulaire (icaA et icaD) était significativement modifiée lors du traitement avec de l'huile essentielle de *N. sativa*. Dans l'ensemble, les résultats ont confirmé l'efficacité antibiofilm de l'huile essentielle de *N. sativa* contre *S. aureus* (Alfaiz, 2021).

Partant de nos résultats nous constatons que la thymoquinone retrouvée en faible taux dans la matrice huile végétale de la nigelle, ce qui explique la faible activité antibiofilm vis-à-vis de nos souche testées *S. aureus*

Des recherches montrent que le plus fort effet inhibiteur sur la formation de biofilm contre les deux les souches d'E. coli testées à l'aide de fractions volatiles plantes étudiées est due à la présence de terpènes tels que α -Thujone, beta-thujone et Camphor -pinène, et au potentiel effets synergiques entre les différents composés, Inhibition de la formation de

biofilm par ces composés phytochimiques a déjà été décrit (**Niuet Gilbert 2004 ; Borges et al., 2014**), indiquant qu'un mécanisme général peut s'appliquer plutôt que la capacité de ces composés à se lier à un groupe moléculaire spécifique cibles telles que les fimbriae qui sont critiques pour le biofilm développement chez *E. coli* (**Mathlouthi et al., 2021**).

Partant de nos résultats nous constatons que les terpènes retrouvés à des taux élevés dans l'huile essentielle d'*Artemisia* sont à l'origine de la grande activité antibiofilm vis-à-vis de nos souches testées *S. aureus*.

CONCLUSION

Notre étude qui porte sur l'activité antimicrobienne anti biofilm des extraits des huiles essentielles de trois plantes : *Nigella sativa*, *Aloe vera* et l'*Artemisia herba alba* et recherche d'une synergie antimicrobienne nous a permis d'explorer en profondeur la problématique soulevée et d'apporter des éléments de réponse significatifs. Nous avons analysé les différentes théories existantes et les travaux antérieurs dans le domaine, ce qui nous a permis de construire un cadre conceptuel solide.

Selon les données obtenues à partir des 592 prélèvements, 184 positifs (soit 31%). Notre travail a permis d'isoler 37 (soit 20%) souches de *S. aureus* de différents types de prélèvements au niveau de l'hôpital central de l'armée (Ain Naâdja).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches *S. aureus* analysées a montré un taux de résistance peu élevé vis-à-vis de la plupart des antibiotiques testés. Ainsi la résistance au céfoxitine a permis de classer les 37 souches en deux grands groupes, soit 62,2% des souches sensibles à la méthicilline (SASM) et 37,8% résistantes à la méthicilline (SARM).

Les études d'adhésion bactérienne et de formation du biofilm ont été réalisées par les méthodes rouge Congo et TCP montre que toutes les souches étaient productrices de biofilm et de slime soit 100% des souches partagé sur trois phénotypes forte (8%) modéré (41%) et faible (51%).

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'ensemble des huiles essentielle d'*Artemisia* et végétale de la Nigelle montrent une importante activité à l'exception des extraits méthanoïques, avec des valeurs de CMI variables de 0.25% à 0.125% pour huile végétale de la Nigelle et une CMI de 0.06% pour l'huile d'*Artemisia*. L'association des deux huiles essentielle et végétale n'a pas donné d'effet synergique.

De plus l'activité antibiofilm des huiles essentielle d'*Artemisia* et végétale de la Nigelle ont montré que seul l'huile essentielle a une importante activité par rapport au huile de la nigelle avec une valeur de CMIB de 1%.

A la lumière de nos résultats obtenus dans cette présente étude, nous suggérons L'huile essentielle (HE A) de la plante *Artemisia herba alba* comme candidate pour l'élaboration d'un antibiotique naturel avec moins d'effets secondaires pour vaincre la multi résistance due le plus souvent à la formation de biofilm. Cette nouvelle approche thérapeutique peut être mise à profit pour traiter en milieu hospitalier les infections causés par les staphylocoques formateurs de biofilm et dont l'antibiothérapie reste insuffisante où le plus souvent un échec thérapeutique est noté vu l'apparition de la multi résistance de biofilm.

En perspective, nous nous proposons :

- Elargir l'étude sur des autres souches cibles formant le biofilm dans les industries.
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur chaque étape de formations de biofilm.
- Etude de l'effet de l'huile essentielle de *Nigella sativa* sur la formation du biofilm du *Staphylococcus aureus* et des autres espèces
- Purification et caractérisation structurale de chacune des molécules bioactives qui ont un effet antibiofilm.
- Des études génotypiques sur les mécanismes d'activité antibiofilm pour les souches isolées.
- Recherche de nouvelles substances antibiofilm

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Ababsa N., Boukaous H., (2018).** Etude phytochimique et activités biologiques de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba*. Mémoire de master, Université des Frères Mentouri, Constantine.
- Accarias S., (2014).** Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*, Université Paul Sabatier Toulouse III.
- Akrout A., Jani H E., Amouri S., Neffati M (2010).** Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris l*, *Artemisia herba-alba* asso, & *Thymus capitatus* hoff. et link. growing wild in the southern of tunisia. Recent Research in Science and Technologie, 2(1), 29-39.
- Alfaiz F A., (2021).** Molecular studies of immunological enzyme clumping factor B for the inhibition of *Staphylococcus aureus* with essential oils of *Nigella sativa*, J Mol Recognit
- Alkhail A., (2005).** Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. Pak. J. Biol. Sci., P 413-417.
- Allioua A., (2015).** Les staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* résistants a la méticilline. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée. Faculté des sciences. Annaba. p221.
- Al-Shuneigat J., Al-Sarayreh S., Al-Sarairoh Y., Al-Tarawneh I., Al Qudah M, Albataineh E., (2014).** Effects of Wild *Artemisia herba-alba* Essential Oil on Biofilm-Forming Bacteria. 4, 19, 2273-2280.
- Al-Shuneigat, Jehad and Al- Sarayreh, Sameeh and Al-Qudah, Mahmoud and Al-Tarawneh, Ibrahim and Al-Sarairoh, Yousef and Al-Qtaitat, Aiman., (2014).** GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Wild *Artemisia herba-alba* Grown in South Jordan. British Journal of Medicine and Medical Research, 5 (3). pp. 297-302.
- Andrade Pinho Medeiros., (2016).** Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées, Thèse de doctorat .université Grenoble alpes.

Aumeran C., Balestrino D., Forestier Ch., (2020). Biofilm bactérien et santé, Encyclopédie de l'environnement.

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

Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 15(4), 305–311.

Abou El-Hamd M., El-Sayed M., Hegazy M., Helaly S., Esmail A., Mohamed N.,(2010). Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba*. Record of natural plant, 4, 1, 1-25.

Ainane T., Askaoui Z., Elkouali M., et Talbi M.,(2014). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Nigella sativa* seeds from Beni Mellal (Morocco): What is the most important part, Essential Oil or the rest of seeds? *Journal of Materials and Environmental Science*, vol. 5, no. 6, pp. 2017–2020.

Almatroudi A., Khadri H., Azam M., Rahmani A H., Al Khaleefah F K., Khateef R ,Ansari M A., Allemailem K .S.,(2020). Antibacterial, Antibiofilm and Anticancer Activity of Biologically Synthesized Silver Nano particles Using Seed Extract of *Nigella sativa*. *Processes* 388.

Antwerpen P V., (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène /Chlorure. *Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles*.

1. Archer **N K .,** Mazaitis **M J .,** Costerton **J W .,** Leid **J G .,** Powers **M E .,** Shirliff **M E .,** (2011), *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence*, 2(5): 445–459.

Arciola C R ., Campoccia D., Montanaro L., (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion, *Nature Reviews Microbiology* volume 16, pages 397–409.

Aung M., Win H., Kyu T., Myat Z-M., (2020). PREPARATION OF TiO₂ PHOTO ELECTRODE FOR DYE- SENSITIZED SOLAR CELLS APPLICATION. J. Myanmar Acad. Arts Sci, XVIII, 2 c.

B

Baba Aissa F., (2000). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Edition librai moderne. Rouiba

Beckloff N, Laube D., Castro T., Furgang D., Park S., Perlin D., Clements D., Tang H., Scott R-W., Tew G-N., Diamond G., (2007). Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 51, 11, 4125-32.

Bhattacharya., Bhattacharya M., Malik S and Singh A., (2011). *Aloe Vera* Barbedensis: A review on its Ethanopharmacological value, Journal of Pharmacy Research 2011,4(12),4507-4510, 4 pages.

Bliss O., Emmanuel E., Chigozie N., Maureen E., Michael K., (2022). GC-MS Characterization, in vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Essential Oil from the Leaves of *Stachytarpheta jamaicensis*. Journal of the Mexican Chemical Society, 66,4,11.

Baddour LM., Epstein AE., Erickson CC., (2010). Update on cardiovascular implantable electronic device infections and their management: a scientific statement from the American heart Association. Circulation 121: 458–477.

Belabid H., Lazzouni H. A., (2014). Contribution à l'étude physico-chimique de l'huile de *Nigella sativa* (nigelle) et de son pouvoir antimicrobien. Mémoire de Master en biologie (Sciences des aliments). Université de Tlemcen.

Bertella A., Benlahcen K., Abouamama S., Pinto D. C. G. A., Maamar, K., Kihal M., Silva, A. M. S. (2018). *Artemisia herba-alba* Asso. essential oil antibacterial activity and acute toxicity. Industrial Crops and Products, (116), 137–143.

Borges A., Serra S., Cristina Abreu A., Saavedra MJ., Salgado A., Simoes M., (2014). Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and in vitro cytotoxicity. Biofouling. 30:183–195.

Boukhatem M N., Hamaidi M S., Saidi F., Hakim Y., (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat

- (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Rev. Nat. Technol.*, N° 03: 37–45.
- Bourgou S., Pichette A., Marzouk B., Legault J.,(2010).** Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia South African. *J. Bot.*, 76: 210– 216.
- Bagnoli F., Rappuoli R., Grandi G.,(2017).** *Staphylococcus aureus* Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis, Cham, Switzerland : Springer, 409.
- Baykanerel S., Reznicek G., Şenol S G., Karabay., yavaşoğul N U., Konyalıoğlu S., Zeybek A U .,(2011).** Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia L.* species from western Anatolia, *Turk. J. Biol.*, n° 35, 1-10.
- Beloued A.,(1998).** Plantes médicinales d’Algérie, *Office des Publications Universitaires*. 2^{ème} Ed. Alger, p: 144.
- Benazzouz-Smail L., Achat S., Brahmi F., Bachir-Bey M., Arab R., Lorenzo J M., Benbouriche A., Boudiab K., Hauchard D., Boulekbache L., Madani K.,(2023).** *Biological Properties, Phenolic Profile, and Botanical Aspect of Nigella sativa L. and Nigella damascena L. Seeds: A Comparative Study, Molecules*, 28(2), 571.
- Bloise L.,(2017).** Surveillance, hygiène et entretien des lentilles de contact Contactlens care and maintenance, *Journal Français d’Ophtalmologie* , Volume 40, Issue 4, , Pages 329-337
- BOUZIDI N.,(2016).** Etude des activités biologiques de l’huile essentielle de l’armoise blanche « *Artemisia herba alba Asso* ». Université Mustapha Stambouli de MASCARA.
- C**
- Cahill T. J., Baddour, L. M., Habib G., Hoen B., Salaun E., Pettersson G. B., Schäfers H. J., & Prendergast B. D. (2017).** Challenges in Infective Endocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(3), 325–344.
- 1.1 Chekatt M. A, (2020).** Phytochimie et propriétés pharmacologiques de la plante de *Nigella sativa* et les perspectives thérapeutiques de son miel. Thèse de doctorat . Université de Lorraine.
- Chambers H.F., DeLeo F.R.,(2009).** Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic Era. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7: 629-41

- Chaabna N.,(2014).** Activité anticoccidienne des extraits d'*Artemisia herba alba*. Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbas, Sétif.
- Chibi A.,(2015).** Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen, Mémoire de master Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
- Clave D.,(2013).** Fiche technique bactériologie : *Staphylococcus aureus*, édition Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique, p 4.
- Cucarella, Solano C, Valle J., Amorena B., Lasa I., Penadés J. R.,(2001).** Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation, *Journal of bacteriology*, Vol. 183.
- DUCROT C, FRIC D, LALMANACH A-C, MONNET V, SANDERS P, SCHOULER C.,(2017).** Perspectives d'alternatives thérapeutiques antimicrobiennes aux antibiotiques en élevage. INRA Productions Animales, 30 (1), pp.77-88.
- Costa D.,(2020).** Développement d'une thérapie combinatoire à base d'agents anti-biofilms et de particules d'acide poly-lactique pour la délivrance d'antibiotiques contre des biofilms bactériens, *Hal thèse*, Université de Lyon France .

D

- Djedidi R.,(2021).** Colonisation nasale et infections cutanées à *Staphylococcus aureus*, *Thèse de master*, Université de Larbi Tébessi-Tébessa, p8.
- Dryden M.S.,(2009).** Infection de la peau et des tissus mous : microbiologie et épidémiologie. *Int. J. Antimicrobe. Agents* 34.
- De Oliveira T.L., Soares D.A R., Ramos E .M., Cardoso D .G .M., Alves E., Piccoli R .H., (2011).** Antimicrobial activity of Satureja Montana L. essential oil *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *Int. J. Food Microbiol*, 144: 546-555.
- Dumitrescu O., Dauwalder O., Boisset S., Reverdy M-É., Tristan A., Vandenesch F., (2010).** Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* : Les points-clés en 2010, *Revue médecine/sciences*
- Dyon-Tafani V., (2019).** Infections chroniques à staphylocoques: mécanismes de persistance intracellulaire et nouvelles approches thérapeutiques. *Sciences du Vivant*.

Derek E-M., Kenneth W-B.,(2017).*Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 104, 3, 365–376.

Dieffenbach D., Gupta R., (2019). Dewatering and drying, Bio-solids technical workshop .

Dobell C 1960. *Antony van Leeuwenhoek and his little animals*, New York: Dover Publications INC, 239–55.

Dobignard A., Chatelain C., 2010-2013. Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord. Conservatoire et Jardin botanique de la Ville de Genève. 3 vol.

E

Elyemni M., Louaste B., Nechad I., Elkamli T., Bouia A., Taleb M., Chaouch M., Eloutassi N., (2019). Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *The Scientific World Journal*, 2019.

F

Femenia A., Sánchez E .S., Simal S., Rosselló C., (1999). Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues, *Elsivier* , Volume 39, Pages 109-117.

Flemming H C., Würtz S., (2019). Bactéries et archées sur Terre et leur abondance dans les biofilms *Nature Reviews Microbiology* , volume 17, pages 247–260.

Francis Joannès, (2001). Dictionnaire de la civilisation mésopotamienne. Ed Robert Laffont 2001. ISBN 2221092074.-Fauchere JI, Avril, JI, 2002. Principales analyses pratiquées en biologie médicale, Bactériologie générale et médicale. Paris: Ellipses, page 210.

Ferguson B.J., Stolz DB., (2005). Démonstration du biofilm dans la rhinosinusite chronique bactérienne humaine. *Suis J Rhinol*, 19 : 452–457.

Figueiredo A.M.S., Ferreira F.A., Beltrame C.O., Cortes M.F., (2017). Le rôle des biofilms dans les infections persistantes et les facteurs impliqués dans le développement de biofilms indépendants de l'ICA et la régulation des gènes chez *Staphylococcus aureus*. *Crit. Rév. Microbiol.* 43 602–620.

Fofana, 2018, Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'hémocultures et de collections purulentes au Centre Hospitalier Universitaire du Point "G", Université Des Sciences, Des Techniques Et Des Technologies De Bamako.

G

- Giannakoudakis D.A., Hosseini-Bandegharai A., Tsafrakidou P., Triantafyllidis K.S., Kornaros M., Anastopoulos I., (2018).** *Aloe vera* waste biomass-based adsorbents for the removal of aquatic pollutants: a review. *J Environ Manag*, 227:354e64.
- Gawron G., Krzyczkowski W., Lemke K., Oldak A., Kadziński L., Banecki B., (2019).** *Nigella sativa* seed extract applicability in preparations against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effects on human dermal fibroblasts viability, *Elsevier*, Volume 244.
- Goudjil M. B., Ladjel S., Bencheikh S.E., Hammoya F., Bensaci M. B., Zighmi S., Mehani, M., (2016).** Bioactivity of *Artemisia Herba-alba* essential oil against plant pathogenic fungi. *Der Pharma Chemica*, 8(3),46-52.
- Guetarni N., Zouagui S., Besbes F., Derkaoui A., Hanba M., Ahmed Fouatih Z., (2016).** Infections Nosocomiales (IN) : Enquête de prévalence et d'identification des facteurs de risque dans un centre hospitalier universitaire de la région ouest d'Algérie, 2016, *LA REVUE MÉDICALE DE L'HMRUO*, Volume 4, N 2, page 584-590.
- Ghedira K., Le Jeune R., Paul GOETZ., (2010).** Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa L* (Ranunculaceae), *Phytothérapie*, 8: 124–128.
- Ghedirak., (2006).** La nigelle cultivée : *Nigella sativa L.* (Ranunculaceae), *Phytothérapie*, 4, pages 220–226.
- Gjødsebøl K., Christensen J.J., Karlsmark T., Jorgensen B., Klein BM., Krogfelt K.A., (2006).** Plusieurs espèces bactériennes résident dans les plaies chroniques : une étude longitudinale. *Int Wound J*, 3: 225–231.
- Gaire, U., Shrestha U. T., Adhikari S., Adhikari N., Bastola A., Rijal K. R., Ghimire, P., amp; Banjara M. R., (2021).** Antibiotic Susceptibility, Biofilm Production, and Detection of *mecA* Gene among *Staphylococcus aureus* Isolates from Different Clinical Specimens. *Diseases*, 9, 4, 80.
- Guzman-Soto I., McTiernan C., Gonzalez-Gomez M., Ross A., Gupta K., Suuronen E. J., Alarcon E. I. (2021).** Mimicking biofilm formation and development: Recent progress invitro and in vivo biofilm models. *Iscience*, 24(5).
- Greenish H. G., (1880).** Contribution to the chemistry of *Nigella sativa*. *Pharmac. J. Trans*, 10, 909-911.

Goudji M.B., Ladjel S., Bencheikh S. E., Zighmi S., Hamada D.,(2015).Chemical compounds profile, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the *Artemisia herba-alba* of Southern Algeria, *International Journal of Biological Chemistry*, 9(2), 70–78.

Guignard J., Dupont F., Pelt J.,(2001).*Botanique Systématique Moléculaire*, (Ed. 12e Edition).Paris: Masson Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson.

H

Hanifi N.,(1991).Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. Inconservation des ressources végétales. Publication d'Actes éditions : 47-49.

Hola V., Ruzicka F.,(2011).The Formation of Poly-Microbial Biofilm on Urinary Catheters, *Urinary Tract Infections*, 153- 172.

Halawani E.,(2009). Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa L.* and their interaction with some antibiotics. *Adv. Biol. Res.*, 3: 148–152.

Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.,(2004).*Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.* *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 95-108.

Hamman J. H., (2008). Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 13(8), 1599–1616.

Hanifi N.,(1991). Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication d'Actes éditions : 47-49.

Hannan M. A., Rahman M. A., Sohag A. A. M., Uddin M. J., Dash R., Sikder M. H., Rahman M. S., Timalina B., Munni Y. A., Sarker P. P., Alam M., Mohibullah M., Haque M. N., Jahan I., Hossain M. T., Afrin T., Rahman M. M., Tahjib-Ul-Arif M., Mitra S., Oktaviani D. F., Kim B., (2021).Black Cumin (*Nigella sativa L.*): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients*, 13(6), 1784.

Hansson C., Hoborn J., Moller A., Swanbeck G.,(1995).La flore microbienne dans les ulcères veineux de jambe sans signes cliniques d'infection. Culture répétée à l'aide d'une technique microbiologique standardisée validée. *Acta DermVénéreol*, 75 : 24–30.

2. **Hawas S., Verderosa A.D., Totsika.M.,(2022).**Combination Therapies for Biofilm Inhibition and Eradication: A Comparative Review of Laboratory and Preclinical Studies,*Front Cell Infect Microbiol.*

HEGI G.,(1975).Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Berlin: Parey, éd. 2nd edn, Vol. III.

-Henrici AT., 1933, Studies of freshwater bacteria. *A direct microscopic technique*, J.Bacteriol, 25(3), 277-287.

Herlina S. A., Aziz A., KurniawatiFaridahD .N.,(2017). Changes of thymoquinone, thymol, and malondialdehyde content of black cumin (*Nigella sativa L*) in response to Indonesia tropical. *Journal of Biosciences*, vol. 24, no. 3, pp. 156–161.

Hwang J. R., Cartron A.M., Amor Khachemoune M .D., FAAD F.,(2021).A review of *Nigella sativa* plant-based therapy in dermatology, Volume60, Pages 493-499.

I

Idrees M ., Sawant S., Karodia N., Rahman A.,(2021).Biofilm de *Staphylococcus aureus* : morphologie, génétique, pathogenèse et stratégies de traitement, *Biofilms microbiens - Implications pour la santé et l'environnement*,(14):7602.

Isik S., Kartal M., Erdem S. A., (2017). Quantitative analysis of thymoquinone in *Nigella Sativa L* (Black Cumin) seeds and commercial seed oils and seed oil capsules from Turkey. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, vol. 41, no. 1, pp. 34–41.

J

Jamal M., Ahmad W; Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz, Muhammad A, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil, Muhammad A.,(2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 81(1): 7-11.

Jouault A.,(2019).Altérocine : une protéine antibiofilm sécrétée par la bactérie marine *Pseudoalteromonas sp.* 3J6, Thèse de doctorat en microbiologie.

K

Kara Terki I., Hassaine H., Kara Terki A., Nadira B., Kara Terki N., Bellifa S., Mhamedi I., Iachachi M.,(2020).Effects of certain disinfectants and antibiotics on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from medical devices at the University Hospital Center of Sidi Bel Abbes, Algeria, *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 21 (4): 304 – 310.

- Kara Terki I., Hassaine H., Kara Terki A., Nadira B., Kara Terki N., Bellifa S., Mhamedi I., Iachachi M., (2020).** Effects of certain disinfectants and antibiotics on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from medical devices at the University Hospital Center of Sidi Bel Abbes, Algeria, *African Journal Of Clinical And Experimental Microbiology*.
- Gad G. F., El-Feky M. A., El-Rehewy M. S., Hassan M. A., Abolella H., El-Baky, R. M. (2009).** Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *Journal of infection in developing countries*, 3(5), 342–351.
- Kolenda C., Josse J., Medina M., Fevre C., Lustig S., Ferry T., Laurent F., (2019).** Évaluation de l'efficacité d'un assemblage de trois bactériophages anti *Staphylococcus aureus* contre les bactéries au sein du biofilm ou internalisées dans les ostéoblastes, *Médecine et Maladies Infectieuses*, Volume 49, Pages S84-S85
- Kalia V. C., (2013).** Quorum sensing inhibitors: an overview, *Biotechnology advances*, 31(2), 224-245.
- L**
- Lakehal S.A. M., (2016).** Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herba-alba* Asso Grown in Algeria. *Medicinal Chemistry*, 6(6), 435–439.
- Liolios C. C., Gortzi O., Lalas S., Tsaknis J., Chinou I., (2009).** Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem.*, 112: 77–83.
- Lowy F.D., (2003).** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.*, 111: 1265-1273.
- Lebeaux D., Ghigo J-M., (2012).** Infections associées aux biofilms, *Med Sci(Paris)* Volume 28, page(s) 727-739
- Lambert F., Colin M., Mongaret C., Gangloff S. C., Reffuveille F., (2020).** Tolérance aux antibiotiques du biofilm de *Staphylococcus aureus* dans les infections articulaires périprothétiques et stratégies antibiofilm, *Antibiotiques*, 9 (9), 547.
- Le loir Y., Gantier M., (2010).** *Staphylococcus aureus* (collection Monographies de microbiologie), *Lavoisier* –Paris, 300 pages.

- Le Minor L., Veron M., (1990). *Staphylococcus* et *Micrococcus*, *Bactériologie Médicale*. J. Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.
- Le Moing V., (2022). Bactériémies et endocardites infectieuses à *Staphylococcus aureus* Bacteraemia and infective endocarditis due to *Staphylococcus aureus*, *Elsivier Masson SAS*, 8 page .
- Lee A .S., De Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A., Harbarth S ., (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers* vol 4, 18033.
- Leloir Y., Gautier M., (2010). *Staphylococcus aureus*, page 132_133.
- Lew D.P., Waldvogel F.A., (2004). Ostéomyélite. *Lancette*, 364: 369–379.
- 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.
- Lakehal S. A M., (2016). Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herba-alba* Asso Grown in Algeria. *Medicinal Chemistry*, 6(6).
- Lamache A., Doghri I., Jacques M., Boudjenah-Haroun S., (2020). Étude des biofilms bactériens isolés à partir du système de distribution d'eau potable dans la région sud-est de l'Algérie Characterization of bacterial biofilms isolated from drinking water distribution system in southeastern Algeria, *Revue des Sciences de l'Eau Journal of Water Science*, 448-461.
- Lecuire F., Gontier D., Carrere J., Basso M., Benareau I., Rubini J., (2007). Infections à *Staphylocoque lugdunensis* sur prothèses articulaires. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'Appareil Moteur*, 93, 1, 88–92.
- Liu Y., Granet D., Lin H., Baxter S., Ouyang H., Zhu J., Huang S., Liu Z., Wu X., Yan F., Liu X., Luo L., Heichel C., Zhang M., Cai W., Maas R. L., Zhang K. (2018). Liu et al. reply. *Nature*, 556(7699), E3–E4.

3. **Manandhar S., Singh A., Varma A., Pandey S., Shrivastava N.,(2018).** Biofilm Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal, *FrontMicrobiol*; 9: 2749.
 4. **Marshall J.M.,(1990).** *Aloe vera* gel: What is the evidence? *Pharma Jr*, 24:360-2.
- Mehrishi P., Broor S., Sharma A.,(2022).** Antibacterial and Antibiofilm Properties of *Azadirachta indica* (Neem), *Aloe vera* (Aloe vera), and *Mentha piperita* (Peppermint) against Multidrug-Resistant Clinical Isolates *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*.
- Mathlouthi A., Saadaoui N., Pennacchietti E., DeBiase D., Ben-Attia M.,(2021).** Essential oils from *Artemisia* species inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* EPEC 2348/69, *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*.
- Messaoudi Moussii I., Nayme K., Timinouni M., Jamaledine J., Filali H., Hakkou F.,(2020).** Synergistic antibacterial effects of Moroccan *Artemisia herba alba*, *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Synergy*, 10, 100057.
- MAIDI L.S.,(2021).** Caractérisation chimique et évaluation in vitro du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de plantes de la région de Djelfa : *Saccocalyx satureioides* Coss. & Dur. (Lamiaceae) et *Artemisia herba-alba* Asso. (Asteraceae), Thèse de doctorat, Université KasdiMerbah-Ouargla Faculté des sciences de la nature et de la vie Département des sciences biologiques, 90 page.
- Mehrishi P., Agarwal P., Broor S., Sharma A.,(2022).** Antibacterial and antibiofilm properties of *Azadirachta indica* (Neem), *Aloe vera* (Aloe vera), and *Mentha piperita* (Peppermint) against multidrug-resistant clinical isolates. *Research Journal (BBRJ)*, 6, 1, 98-104.
- Mehta I.,(2017).** History of *Aloe vera*, Department to History Kumaun University, Nainital, Uttarakhand (India). *Journal of humanities and social science (IOSR-JHSS)*.22(8): 21-24.
- Marrie T.J., Nelligan J., Costerton J.W.,(1982).** A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*, 66: 1339–1341

- Manandhar S., Singh A., Varma A., Pandey S., Shrivastava N.,(2018).** Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by Staphylococcal clinical isolates. BMC Research Notes, 11,1.
- Maharjan S., Ansari M., Maharjan P., Rai K. R., Kc S., Kattel H. P., Rai G., amp; Rai, S. K. (2022).** Phenotypic detection of methicillin resistance, biofilm production, and inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus clinical isolates in Kathmandu, Nepal. Tropical Medicine and Health, 50,71,4.
- Matthew J., Arduino D.R.P.H.,(2011).** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques, *Staphylococcus aureus et entérotoxines staphylococciques*, 4, page 1.
- Mehta Indu.,(2017).** History of *Aloe vera*, Department of History Kumaun University, Nainital, Uttarakhand (India). Journal of humanities and social science (IOSR-JHSS).22(8): 21-24.
- Melchior M.B., Vaarkamp.H., Fink-Gremmels J.,(2006).** *Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?* , Vet. J., 171, 398-407.
- Meneses M., Landoni M. F.,(2011).** *Biofilms Bacterianos*. Analecta Vet, 31(2), 44-49.
- Mermel L. A., Allon M., Bouza E., Craven D. E., Flynn P., O'Grady N. P., Raad I. I., Rijnders B. J., Sherertz R. J., Warren D. K. (2009).** Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(1), 1–45.
- Mohammed Z.,(2013).** Etude phytochimiques et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Algérie.
- Moormeier D. E., Bayles K.W.,(2017).** *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism, molecular microbiology.
- Murugan K., Usha M., Malathi P., Al-Sohaibani A.S., Chandrasekaran M.,(2010).** Biofilm formant des *Staphylococcus spp.* Multi résistants aux médicaments. Chez les patients atteints de conjonctivite. *Pol J Microbiol*, 59 : 233–239.

N

- Neopane, P., Prasad Nepal H., Shrestha R., Uehara O., Abiko Y, (2018).** In vitro biofilm

formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance, *International Journal of General Medicine*, 11, 25-32.

Nasser A., Mohammad M.S .D., Jahanbakhshi S ., Azimi T., Nikouei L.,(2022). *Staphylococcus aureus* : Formation de biofilm et stratégies contre celui-ci,*Current Pharmaceutical Biotechnology* , Volume 23, pp. 664-678(15).

NabliM.A.,(1989). Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes. IEDMAB (Faculté des sciences de Tunis) Tunisie 196 – 188.

-Niu C, Gilbert E S, 2004. Colorimetric method for identify-ing plant essential oil components that affect biofilm for-mation and structure. *Appl Environ Microbiol.* 70:6951–6956.

O

Obeaizi Z., Benbouzid H., DjahoudiA .,(2021).évaluation De L'activité Antibactérienne Et Anti-biofilm Des Nanoparticules De Dioxyde D'étain (sno2)

OliveiraW.F ., Silva P.M.S. , Silva R.C.S ., Silva G.M.M ; Machado G, Coelho L.C.BB, CorreiaMTS.,(2018).Infections à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* sur implants, *Journal des infections hospitalières*Tome 98, numéro 2, , Pages 111-117.

Oliveira D., Borges A., SimõesM.,(2018).*Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases, *Toxins*, 10

OlumekunV-O., Osuntokun O-T., Ajayi A-O., Omotuyi I-O., OlonisakinA.,(2022).*Assessment of Antibacterial and Gas Chromatography/Mass Spectrophotometric Analysis (GC-MS) Profile of Purified Volatile Compounds from Multi-phases Solvent Extraction Method from Stem Extract of Aframomummelegueta [Roscoe] K. Schum.* *South Asian Research Journal of Natural Products*, 5, 2, 16-50.

Organisation mondiale de la santé [En ligne]. (2022). Rapport du système mondial de surveillance de la résistance et de l'utilisation des antimicrobiens (GLASS) : 2022.

Ould Salem M L.,S M Ghaber.,Ould Baba S E W., OuldMaouloud M M.,(2016).Sensibilité aux antibiotiques des souches de *staphylococcus aureus* communautaires dans la région de Nouakchott (Mauritanie).

Ouguirti N., Bahri F., Bouyahyaoui A., Wanner J., (2021). Chemical characterization and bioactivities assessment of *Artemisia herba-alba* Asso essential oil from South-western Algeria. *Nat. Volatiles & Essent. Oils*, 8, 2, 27-36.

P

Parastan R ; Kargar M ., Solhjoo K ., Kafilzadeh F., (2020). *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines, Elsevier Iran.

Preda V.G , Sandulescu Q., (2019). La communication est la clé : biofilms, quorum sensing, formation et prévention, *Découvertes (Craiova).*; 7(3) : e100.

Parastan R., Kargar M ., Solhjoo K ., Kafilzadeh F., (2020). Biofilms de *Staphylococcus aureus* : structures, antibiorésistance, inhibition et vaccins, *Elsevier Masson SAS*.

Parul Parvesh V., Anisha Y., Ashu G., Samim A., (2022). *Staphylococcus aureus*: Review of literature in brief, *International Journal Dental and Medical Sciences Research*, volume 04, p 861-865.

Pierangeli G., Vital G., Windell Revera L.J., (2009). *Plants Res*, (3)7, 511.

Pinto R.M., Lopes-de-Campos D., Martins M.C.L., Van Dijck P., Nunes C., Reis S., (2019). *Impact of nanosystems in Staphylococcus aureus biofilms treatment*. *FEMS microbiology reviews*, 46(6), pp. 622-641.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D., (2010). *Microbiologie*, 2ème Edition Française. De Boeck Université.

Psaltis A.J., Weitzel E.K., Ha K.R., Wormald P.J., (2008). L'effet des biofilms bactériens sur les résultats chirurgicaux post-sinus. *Suis J Rhinol*, 22 : 1–6.

Q

Quezel P., Santa S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, C.N.R.S, Editor; Paris. France.

Quincampoix J.C., Mainardi J.L., (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif, *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS*, P: 268.269.270.

R

5. **Ribeiro S M. ,Fratucelli D.O. , Fernandes J .M. , BuenoP C P. ,CavalheiroA., Klein M I.,(2021).** Approche systématique pour identifier les nouvelles molécules antimicrobiennes et antibiofilms à partir d'extraits et de fractions de plantes pour prévenir les caries dentaires,*JoVE Journal Biology*.
6. **JonklaasJ., Bianco A. C., Bauer A. J., Burman K. D., Cappola A. R., Celi F. S., Cooper D. S., Kim B. W., Peeters R. P., Rosenthal M. S., Sawka A. M., American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement (2014).** Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 24(12), 1670–1751.
7. **Petit R. A., 3rd. , Read T. D. (2018).** *Staphylococcus aureus* viewed from the perspective of 40,000+ genomes. *PeerJ*, 6, e5261.

RochemonteixA.C., GenevièveM.,(2009). Les biofilms et la peau. Thèse, mémoire, Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC).

Røder B.L., Wandall D.A., Frimodt-Moller N., Espersen F., Skinhoj P., RosdahlV.T.,(1999). Caractéristiques cliniques de l'endocardite à *Staphylococcus aureus* : une expérience de 10 ans au Danemark. *Arch Stagiaire Med*, 159 :462–469.

Roux A., ChigoJ..M ,(2006).*Les biofilms bactériens Bacteriel biofilms.* Paris, France: Bull. Acad. Vét. France.

S

Sabina S., Hafiz M. A., Naheed A., Asif I., Haleema N., Riaz U. R.,(2015).*Nigella sativa*: monograph.*journal of pharmacognosy and phytochemistry.* 4(4) :1.

Sahu P., Giri D., Singh R., Pandey P., Gupta S., Shrivastava A., Kumar A., Pandey K.,(2013).Therapeutic and Medicinal Uses of *Aloe vera*: A Review," *Pharmacology & Pharmacy*, Vol. 4 No. 8, pp. 599-610.

Said M. E.-A., Vanloot P., Bombarda I., Naubron, J.-V., Dahmane E. M., Aamouche A., Jean, M., Vanthuynne, N., Dupuy N., Roussel C. (2016).Analysis of the major chiral compounds of *Artemisia herba-alba* essential oils (EOs) using reconstructed vibrational circular dichroism (VCD) spectra: En route to a VCD chiral signature of EOs. *AnalyticaChimica Acta*, 903, 121–130.

- Saleh F.A., El-Darra N., Raafat K., El GhazzawiI.,(2018).** Analyse phytochimique de *Nigella sativa L.* Utilisation de la GCMS Exploration de ses effets antimicrobiens contre les bactéries multirésistantes, *Pharmacogne J.* 10(1): 99-105.
- Saida H., Saidi F., Maria tellaB.,(2016).** Etude Analytique de l'huile végétale de *Boragoofficinalis* en vue de sa valorisation. *Agrobiologia*, 6, 2,152-157.
- Silva V ., Correia E ., Pereira J .E., González-Machado C., Capita R .,Alonso-Calleja C., Igrejas G ., Poeta P .,(2022).** Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* from Pets, Livestock, and Wild Animals: Relationship with Clonal Lineages and Antimicrobial Resistance, *Antibiotics* , 11(6), 772.
8. **Stepanović S., Vuković D., DakićI, SavićB. , Švabić-Vlahović M .,(2000),**A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *elsevier*, Pages 175-179
- Sánchez M., González-Burgos E.,IglesiasI ., Gómez-Serranillos P.,(2020).**Pharmacological Update Properties of *Aloe Vera* and its Major Active Constituents. *Molecules*, 25, 1324.doi:10.3390/molecules25061324.
- Sanghi., Shelton (1991).***ALOE VERA : UNE HERBE MÉDICINALE*, Vol. 3 No. 11 (2015):
Volume 3 Numéro 11
9. **SchiefferdeckerP.,Kossel .,(1891).***Gewebelehre- mit besondererBerücksichtigung des menschlichenKörpers*, H. Bruhn, 414 pages.
10. **Schmitt S.,(2022).**Arthriteseptiqueaiguë, Cleveland Clinic Lerner College of Medicine at Case Western Reserve University
- Service de Bactériologie, (2003),** Bactériologie, Disponible sur : http://mas.stephanie.free.fr/microbiologie_bio2/bacterio.pdf, (06.06.2023).
- Surjushe A., Vasani R., SapleD .G., (2008).** *Aloe vera*: A short review. *Indian J Dermatol* [serial online] [cited 2023 Apr 8]; 53:163-6. Available from: <https://www.e-ijid.org/text.asp?2008/53/4/163/44785>

T

- Tristan A., RasigadeJ .P.,(2019).** *Staphylococcus spp*, *société française de microbiologie*, 10 pages .

Touaitia R., (2016). *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : émergence et mécanismes de résistance. Thèse de doctorat en microbiologie. Faculté des sciences. Annaba. p 786.

Tavakkoli A., Ahmadi A., Razavi B M., Hosseinzadeh H ., (2017). Black seed (*Nigella sativa*) and its constituent thymoquinone as an antidote or a protective agent against natural or chemical toxicities. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 16(Suppl), 2.

11. **Taylor T.A., Unakal (2022).** *Staphylococcus aureus* Infection. StatPearls [Internet], July 18, 2022 - ncbi.nlm.nih.gov. **Tlemcen, 79 p.**

Troillet N., (2014). Infections transmitted from cats and dogs, *Revue médicale suisse*, 10: 1859- 63.

V

Verma P., Singh S., (2015). Clinical distribution of biofilm forming *Staphylococcus aureus* and its sensitivity against some antibiotics. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*; Volume 4, Issue 04, 942-952.

Vestby L K., Grønseth T., Sim R., Nesse L L., (2020). Biofilm bactérien et son rôle dans la pathogénèse de la maladie, *Antibiotiques*, 9 (2), 59.

Vieu G., (2014). Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Etude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants, Université Toulouse III.

Von Nussbaum F., Brands M., Hinzen B., Weigand S., Habich D., (2006) . Antibacterial natural products in medicinal chemistry – exodus or revival, Volume 45(31), 5072-5201.

Valour F., Chebib N., Gillet Y., Reix P., Laurent F., Chidiac C., Ferry T., (2013). Infections broncho-pulmonaires à *Staphylococcus aureus*, *Elsevier Masson SAS*.

Y

Yakhlef G., Laroui S., Hambaba L., Aberkane M-C., Ayachi A., (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9(4), 209-218.

Z

Zeaiter A., (2019). Intensification par détente instantanée contrôlée (DIC) de la fonctionnalisation physico-chimiques [sic] des graines végétales (caroube et tournesol). Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle; Université Libanaise, 91.

Zobell C.E., Allen E., (1935). *The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces.* J. Bacteriol, 29, 239–51.

Zouari S., Zouari N., Fakhfakh N., Bougatef A., Ayadi M .A ., (2010). Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba-alba* Asso. Journal of Medicinal Plants Research, 4(10), 871-880.

ANNEXES

Annexe 01 : matériels non biologique.

Matériels de laboratoire :

- Ecouvillons stériles
- Lame et lamelles
- Seringue
- Pipettes pasteur
- Pipettes jaugée
- Boites de pétri
- Anse en plastique stériles
- Micropipettes
- Tubes stériles
- Embouts stériles
- Verreries stérile (Béchers de 500ml et 1000ml, Fioles, Ballon, Compte-gouttes, Entonnoir, Verre de montre, Burette)
- Éprouvette graduée
- Crayon marqueur
- Disque de papier Wattman
- Etiquettes
- Gants
- Papier aluminium
- Papier filtre
- Portoir

Appareillage :

- Agitateur
- Agitateur magnétique
- Autoclave
- Balance de précision
- extracteur de Soxhlet (ou appareil de Soxhlet)
- Plaque chauffante
- Rota vapeur

- Vortex
- Lecteur de microplaque à 96 puits « Elisa »
- Etuve
- Microscope
-

Annexe 02 : Les Milieux de cultures et les solutions utilisées

❖ Milieux de cultures solides

- **La gélose nutritive** : appelée aussi le milieu ordinaire, à usage général pour la croissance d'une grande variété de micro-organismes non exigeants et elle est utilisée pour la conservation des souches bactériennes à court terme.

Composition :

- Extrait de viande.....1,0 g/L
- Extrait de levure.....2,0 g/L
- Peptone.....5,0 g/L
- Chlorure de sodium..... 5,0 g/L
- Agar-agar..... 15,0 g/L
- pH = 7,0

Préparation : 28g de poudre de GN dans 1L d'eau purifiée / distillée ou désionisée. La préparation du milieu est faite automatiquement dans un automate de types : qui nous permet d'obtenir directement notre boîte de pétri couler et stériliser de l'agar nutritif. Conserver les boîtes au réfrigérateur à 2-8 °C.

-**Le milieu Chapman** : ou **gélose au sel de mannitol hyper salé (75 g/l de chlorure de sodium)**, c'est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement, le dénombrement et la différenciation des *Staphylococcus* qui peuvent vivre dans des zones à forte concentration en chlorure de sodium et la fermentation du mannitol, mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol), permet d'orienter le diagnostic.

Composition :

- Extrait de viande (bovin ou porcin).....1g
- Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....10g
- Chlorure de sodium.....75g
- Mannitol.....10g
- Agar.....15g
- Rouge de phénol.....0.025g
- pH=7,6

Préparation : 111g par litre d'eau distillée, stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C. La préparation du milieu est faite automatiquement dans un automate de types «Systec Mediaprep » qui nous à permet d'obtenir directement notre boite de pétri couler et stériliser.

- **Gélose Baird-Parker** : un milieu sélectif pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Composition :

- Digestion pancréatique de caséine.....10.0g
- Extrait de viande.....5.0g
- Extrait de levure.....1.0g
- Pyruvate de sodium.....10.0g
- L-glycine.....12.0g
- Chlorure de lithium.....5.0g
- Agar.....20.0g
- pH=7.2

Préparation :

Pour le milieu déshydraté : 63,5 grammes dans 1 litre d'eau purifiée, chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir 1 minute pour dissoudre complètement la suspension. Répartir en flacons, Autoclaver 15 minutes à 121°C.

Pour le milieu en flacons + jaune d'œuf :

1. Liquéfier le milieu à 100°C au bain-marie.
2. Bien mélanger, laisser refroidir à 45-47°C. Ajouter à 95 ml de milieu, 5 ml d'une solution stérile de jaune d'œuf au tellurite. Bien homogénéiser. En option, on peut ajouter une solution stérile de sulfaméthazine à 0,05 g/l pour éviter l'envahissement de Proteus.
3. Répartir immédiatement en boîtes de Pétri et laisser solidifier sur une surface froide

12. - Le milieu UriSelect : est un milieu chromogène non sélectif, pour l'isolement, la différenciation et la numération des germes pathogènes urinaires.

13. Composition : UriSelect est un milieu gélose non sélectif, composé

- D'une base nutritive riche, contenant quatre peptones, Assurant la culture de tous les germes urinaires.
- De 2 substrats chromogènes pour la détection des enzymes bactériennes : β -galactosidase, β -glucosidase
- De tryptophane pour la mise en évidence de l'activité de la tryptophanase (production d'indole) et du tryptophane désaminase (TDA).
- Mélange de peptones21g
- Silice..... 20g
- Mélange de substrats chromogènes..... <1g
- Tryptophane..... 1g
- Agar..... 16g

-Le milieu Mueller Hinton : La **gélose Mueller Hinton** est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Cette gélose MH peut être supplémentée en sang frais ou en sang cuit lorsque les bactéries testées nécessitent ces milieux enrichis (DENIS, 2011).

Composition :

- Hydrolysate acide de caséine (peptone).....17,5 g

- Extrait de viande.....2 g
- Amidon soluble.....1,5 g
- Calcium.....20 à 25 mg
- Magnésium.....10 à 12,5 mg
- Agar.....17,0 g
- pH = 7,4 +/- 0,2

Préparation :

Mettre en suspension 38g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée, puis autoclaver le mélange à 120°C pendant 15-20 minutes. Refroidir à 47°C, bien mélanger avant de verser dans des boîtes de Pétri stériles.

-Milieu Rouge Congo Agar :

- BHIB..... (37 g/L)
- Saccharose..... (50 g/L)
- Agar..... (10 g/L)
- Rouge Congo..... (0,8 g/L)

Préparation :

La préparation et la stérilisation du milieu est faite dans un automate de préparation «Systec Mediaprep ». Mettre en suspension les composants dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée et les faire mélanger dans une fiole en verre, en suite versé le mélange dans l'automate pour autoclavage à 121° pendant 20 min. Refroidissement à 60°C, et couler automatiquement dans les boîte de Pétri par l'automate .

-Gélose au sang cuit « chocolat » : est un milieu d'isolement non sélectif, utilisé pour la culture de bactéries exigeantes comme les *Neisseria*, *Haemophilus* et *Streptococcus pneumoniae*. Elle est tout particulièrement adaptée pour l'analyse des sécrétions bronchopulmonaires, des prélèvements ORL, des liquides céphalorachidiens, des hémocultures.

Composition :

- Peptone de caséine (bovin)7.5g
- Peptone de viande (bovine ou porcine)7.5g
- Amidon de maïs.....1.0g
- Phosphate dipotassique.....4.0g
- Chlorure de sodium.....5.0g
- Hémoglobine (bovin)10.0g
- Supplément vitaminique comme le polyvitex.....10ml
- Agar.....10.0g
- pH = 7,2

Préparation : Ajouter 5% de sang stérile. Chauffer le mélange au bain-marie environ 10 minutes à 80 °C en agitant tout le temps jusqu'à ce que le milieu devienne brun chocolat, répartir en boîtes de Pétri.

❖ Milieux de cultures liquides :

-Bouillon nutritif : et un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Composition :

- Chlorure de potassium.....0,425g/l
- Chlorure de calcium.....0,125g/l
- Sulfate de magnésium.....0,125g/l
- Chlorure ferrique.....0,0025g/l
- Peptones10g/l
- Hydrolysate de caséine5g/l

Préparation : Dissoudre 60,2 g de poudre dans un litre d'eau distillée.

- **Trypticase Soja Bouillon Glucosé : TSBG** : appelé bouillon trypto-caséine soja ou bouillon trypticase soja est un milieu de culture non sélectif enrichi utilisé en microbiologie pour des bactéries peu exigeantes aérobies et anaérobies.

- Composition :

- Hydrolysate tryptique de caséine.....17g
- Peptone de soja.....3g
- Chlorure de sodium.....5g
- Phosphate dipotassique.....2,5g
- Glucose.....2,5g
- pH $7,3 \pm 0,2$ à 25°C

-**Bouillon Cœur-cerveau (B.H.I.B)** : Ce milieu non sélectif enrichi à usage général, utilisé pour la culture d'une grande variété d'organismes à partir d'une variété d'échantillons cliniques et non cliniques et aussi utilisé pour la culture des germes exigeants. Son utilisation est recommandée pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans les aliments.

- Composition :

- Infusion de cervelle de veau.....12.5g
- Infusion de cœur de bœuf..... 5g
- Peptone.....10g
- Glucose.....2g
- Chlorure de sodium.....2g
- Phosphate di sodique.....5g
- PH= 7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Porter à ébullition et dissoudre complètement le milieu. Répartir dans des tubes à essai .Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

❖ **Les solvants utilisés pour la partie des plantes :**

- Méthanol, pour l'extrait méthanoïque des plantes
- Pour le screening phytochimique des plantes : solution alcoolique de chlorure ferrique (FeCl₃), Acide chlorhydrique concentré (HCl), Magnésium, Réactifs de Mayer, de Wagner et Dragendorff, Chloroforme, acide sulfurique, Ethanol absolu, Acétate de Plomb, acide sulfurique (H₂SO₄), l'ammoniac (NH₄OH)
 - Tween 80% pour la dilution des huiles essentiel des plantes

❖ Les solutions utilisées :

-Eau physiologique stérile (composition en g/l)

- Chlorure de sodium (NaCl).....9 g.
- Eau distillée.....1000 ml.
- pH = 7

-Cristal Violet 0.2%

- 200 mg Cristal Violet
- 25ml Méthanol
- 75ml Eau distillée
- Conservé à une température ambiante

❖ Annexe 03 :

❖ Les antibiotiques utilisés pour la réalisation de l'antibiogramme :

Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 8^{ème} édition 2020

Tableau 1: Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes

Entérobactéries	Staphylococcus spp.	Enterococcus spp.	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.
Ampicilline ^a (10 µg)	Pénicilline (10UI)	Ampicilline ^a (10µg)	Ticarcline (75µg)	Ticarcline (75µg)
Amoxicilline + acide clavulanique (20/10µg)	Oxacilline (CMI seulement)	Gentamicine (120µg)	Ticarcline + acide clavulanique (75/10µg)	Ticarcline + acide clavulanique (75/10µg)
Aztréonam ^a (30µg)	Céfotaxime (30µg)	Streptomycine (300µg)	Pipéracilline (100µg)	Pipéracilline (100µg)
Ceftazidime ^a (30µg)	Kanamycine (30µg)	Erythromycine (15µg)	Pipéracilline + tazobactam (100 µg/10 µg)	Pipéracilline + tazobactam (100 µg/10 µg)
Céfotaxime (30µg)	Amikacine (30µg) ¹	Pristinamycine (15µg) /Quinupristine-dalfopristine (15µg)	Ceftazidime (30µg)	Ceftazidime (30µg)
Céfoxitine (30µg)	Gentamicine (10µg)	Furanes (300µg)	Aztréonam (30µg)	Imipénème (10µg)
Céfoxime ^b (30µg)	Erythromycine (15µg)	Tétracycline ^c (30µg)	Imipénème (10µg)	Meropénème (10µg)
Candamycine (2µg)	Candamycine (2µg)	Vagocomyne (30µg)	Meropénème (10µg)	Amikacine (30µg)
Impénème (10µg)	Pristinamycine (15µg) /Quinupristine-dalfopristine (15µg)	Taicoplanine (30µg)	Amikacine (30µg)	Gentamicine (10µg)
Értapénème (10µg)	Ofloxacine (5µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Gentamicine (10µg)	Tobramycine (10µg)
Meropénème (10µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)	Tobramycine (10µg)	Nétilmicine (CMI seulement)
Amikacine (30µg)	Lévofloxacine (5µg)	Rifampicine (5µg)	Nétilmicine (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)
Gentamicine (10µg)	Chloramphénicol (30µg)	Fosfomycine I (200µg)	Lévofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)
Acide nalidixique (30µg)	Vancomycine (CMI) ^a	Chloramphénicol (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Doxycycline ^d (30µg)
Ciprofloxacine (5µg)	Taicoplanine (CMI) ^a	Tigécycline ^g (CMI)	Lévofloxacine (5µg)	Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)
Colistine ^h (CMI)	Rifampicine (5µg)	Impénème ^a (10µg)	Fosfomycine (CMI)	Colistine (CMI)
Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)		Colistine ^h (CMI)	
Furanes (300µg)	Tétracycline ^c (30µg)			
Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Acide fusidique (10µg)			
Fosfomycine ⁱ (200µg)	Fosfomycine (IV)			
	Composé vibriostatique CV129 ^a			

^a réponse d'interprétation valable pour l'amoxicilline ; ^b réponse d'interprétation valable pour céftazidime, céfotaxime, céfoperazone, céfidinir et céfepodoxime sauf en cas de BLSE, se référer à la page 41 ; ^c réponse d'interprétation valable pour tétracycline et doxycycline ; ^d réponse d'interprétation valable pour les céphalosporines orales (céfalotine, céfalexine, céfadine, céfator, céfidinir, céfoxime) pour les infections urinaires

<http://www.sante.dz/iaam/>

13