

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université De Saad Dahleb Blida-1-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER

Filière : Science Biologique

Option : Microbiologie

Thème

Identification et profil d'antibiorésistance des bactéries à Gram négatif. Et étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* sur quelques souches isolées

Présenté par :

Date de soutenance :
13/07/2023

M^{lle} Lakroun Imane

M^{lle} Harek Hanene

M^{lle} koulla Hafsa

Devant le jury composé de :

Mme BENHOUNA I.	MCB	Université de Blida 1	Présidente
Mme OUAHCHIA C.	MCB	Université de Blida 1	Examinatrice
Mme BOKRETA S.	MCB	Université de Blida 1	Promotrice

Année Universitaire : 2022-2023

Remerciement

Tout d'abord, nous remercions **ALLEH** pour sa bénédiction et son soutien qui nous ont permis de réaliser ce modeste travail.

« يا ربي لك الحمد حتى ترضى، ولك الحمد إذا رضيت ولك الحمد بعد الرضا »

Nous faisons l'agréable devoir de présenter nos remerciements et nos gratitudeles les plus chaleureux et les plus vifs à notre promotrice **Dr BOKRETA S** pour son entière disponibilité, son aide, ses orientations, ses précieux conseils.

C'est avec un grand plaisir que nous remercions **Dr BENHOUNA I** de nous faire l'honneur de présider le jury de Cette mémoire.

Et notre sincère gratitude exprimer à **Dr OUAHCHIA C.**, pour le temps précieux qu'elle a consacré à lire et examiner notre mémoire.

Enfin, nous tenions à remercier l'ensemble des personnes qui ont participé à la réussite de ce travail de recherche.



Dédicace

Loué soit Dieu, avec la grâce duquel les bonnes actions sont accomplies.

Me voilà sur le point d'obtenir mon diplôme. J'ai réussi et je dédie ce succès

A

Mes chers parents, aucune dédicace ne peut vous exprimer mon respect, mon amour éternel et mon appréciation pour les sacrifices que vous avez faits pour mon éducation et mon bien-être. Merci pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez donné depuis mon enfance et j'espère que votre grâce m'accompagnera toujours. Que Dieu vous garde tous les deux comme une couronne au-dessus de ma tête.

Mes frères et sœurs qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Je prie Dieu d'éclairer votre chemin, de vous accorder la réussite et de vous rendre toujours heureux.

A ma famille de grands jusqu'aux petits.

Je dédie ce succès à mes professeurs, de **Mm Hamrouni Hasina** jusqu'au dernier professeur de ma carrière universitaire. Merci pour tout, que Dieu vous récompense pour moi.

A mes amis, mes amours, compléments à mon bonheur.

Sans oublier mon trinôme pour leurs soutiens moraux, leurs patiences et leurs compréhensions tout au long de ce projet. Que Dieu soutienne notre amitié.

Imane



Dédicace

اللهم لك الحمد والشكر على نجاحي فوفقتني يا الله وسخرني لأشكرك واذكر فضلك فيما بقي من حياتي

À la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, qui se fond toujours pour éclairer ma route, à mon cher père **Boualem** je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie.

À la fleur qui rehausse et aromatise mes jours, qui garde les nuits pour que je me rendorme, à ma très chère mère **Houria** je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie.

À mes sœurs **Lamia, Aya et Kaouther**, À ma grand-mère, mes tantes **Karima, Saida, Nassima et Halima**.

À mes cousines **Rania, Fairouz, Samia et Malek** et mes amie **Rania** et **Maroua**

À tous mes enseignants depuis le primaire Jusqu'à l'université, A toutes mes amies de la promotion du Master «2022 /2023 »

À mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université. À mes camarades de ce travail **Hafsa** et **Imane**

En fin, à tous ceux qui m'aime.

Hanane



Dédicace

C'est avec un grand honneur que je dédie humblement ce travail

À mes **chers parents**, mes éternels modèles, mes soutiens moraux et mes sources de joie et de bonheur. Aucun mot ne peut véritablement exprimer le respect, l'amour éternel et la considération que j'ai pour vous. Je vous remercie infiniment. Que Dieu vous garde et vous accorde une longue vie.

À ma deuxième mère, ma chère tante maternelle, que Dieu te protège
À ceux qui représentent mon espoir, mon avenir et les fleurs de ma vie mes
frères et sœurs

(Abdelkader, Iman, Meriem, Sif el-Dine Youcef et ma poupée Nour al-Yaqeen).

À la joie de la maison et sa lumière **(Ihcen, Mohamed et Widjdane).**

À mes chères amies **(Marwa, Meriem, CHaimaa , Imane et Hanane)**.
À tous ceux qui ont été dans mon cœur mais ont été oubliés par ma plume, je
vous dédie le fruit de mon succès.

Hafsa

Liste des tableaux

Tableau I: Caractères des colonies sur les différents milieux de cultures	14
Tableau II: Echelle d'estimation de l'activité antimicrobienne (Sadou et al., 2015).....	19
Tableau III: Interprétation de résultat de l'ECBU	24
Tableau IV: Répartition des bactéries à Gram négative isolées selon l'espèce bactérienne ...	26
Tableau V: Répartition des bactéries isolées selon l'espèce bactérienne	31
Tableau VI: Répartition des BMR Gram négatif par espèce	36
Tableau VII: Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de la sauge.....	37
Tableau VIII: Composition chimique de l'HE de <i>Salvia officinalis</i> identifiée par GC/MS.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau IX: Screening antibactérien de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	Erreur ! Signet non défini.
Tableau X: Concentrations minimales inhibitrices de l'HE de <i>Salvia officinalis</i>	Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures

Figure 1 : Aspects morphologiques de <i>Salvia officinallis</i> (originale. 2023).....	3
Figure 2: Etapes de la démarche d'analyse cyto bactériologique des prélèvements.....	11
Figure 3: Méthode de dénombrement cytologique des urines par la cellule de malassez (photos originale).	12
Figure 4: Méthode d'isolement en quadrant (Denis et al., 2016).	14
Figure 5: Etapes de réalisation de l'antibiogramme (photo originale).....	16
Figure 6: Etapes de réalisation de l'antibiogramme (photo originale).....	17
Figure 7: Etapes d'aromatogramme (photo originale)	18
Figure 8: Mode opératoire de CMI sur milieu solide par des dilutions de ½ au ½ (photos originale)	20
Figure 9: Taux de prévalence de l'infection urinaire	21
Figure 10: Répartition des cas d'IU selon le sexe	22
Figure 11: Répartition des cas d'IU selon l'âge.	22
Figure 12: Répartition des cas d'IU selon le service.....	23
Figure 13: Différents aspects macroscopiques de l'urine (Photo originale).	24
Figure 14: Répartition des germes selon la coloration de Gram	25
Figure 15: Répartition des bactéries isolées d'ECBU selon le groupe bactérien.....	26
Figure 16: Répartition des prélèvements purulents selon les résultats de cultures	27
Figure 17: Répartition des prélèvements purulents positifs selon le sexe.....	28
Figure 18: Répartition des prélèvements purulents selon l'âge	28
Figure 19: Répartition des prélèvements purulents selon le service	29
Figure 20: Répartition des isolats bactériens de pus selon la coloration de Gram.....	29
Figure 21: Répartition des bactéries isolées des prélèvements purulents selon le groupe bactérien	30
Figure 22: Profil d'antibiorésistance d' <i>Escherichia coli</i> isolées	32
Figure 23: Profil d'antibiorésistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolées.....	33
Figure 24: Profil d'antibiorésistance de <i>Proteus mirabilis</i> isolées.	33
Figure 25: Profil d'antibiorésistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées.	34
Figure 26: Profil d'antibiorésistance d' <i>Acinetobacter baumannii</i> isolées.	35

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AK : Amikacine.

AMC : Amoxicilline + acide Clavunamique.

AMX : Amoxicilline.

ATCC : American Type Culture Collection.

ATB : Antibiotique.

ATP : Adénosine-Triphosphate.

BMR : Bactérie Multi Résistante.

BGT : Bouillon Gélosés Tamponné.

BHIB : Bouillon cœur cerveau.

BLSE : bactéries productrices de Béta-Lactamases à Spectre Elargi.

BGN : Bacilles à Gram Négatif.

BGNF : Bacilles à Gram Négatif Non Fermentant.

CRAPC : Le Centre de Recherche scientifique et technique en Analyse Physico-Chimique.

C3G : Céphalosporines 3ème Génération.

CTX : Cefotaxime.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CIP : Ciprofloxacine.

CAZ : Ceftazidime.

CIT : Citrate de Simmons.

CLSI: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DZI : Diamètres de Zone d'Inhibition.

EPH : Establishment Public Hospitalier.

ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines.

GC-SM : La Chromatographie en phase Gazeuse couplée a la Spectrométrie de Masse.

GEN : Gentamicine.

GN : Gélose Nutritive

GSC : Gélose au Sang Cuit

GSF : Gélose au Sang Frais

GEL : Gélatinase.

HE : Huile Essentielle.

H₂S : Sulfured'Hydrogène.

IU : Infection Urinaire.

LEV : Lévoﬂoxacine.

LDC : Lysine décarboxylase.

NA :AcideNalidixique.

ODC: Ornithine décarboxylase.

P : Pu.

PIP: pipéracilline.

R: Resistant

ROS : ReactiveOxygenSpecies .

SXT : Cotrimoxazole / sulfamétozazole.

S: Sensible.

TDA: Tryptophanedésaminase.

TIC: Ticarcylin.

TCC : Tic + acide clavunalique.

TOB: Tobramycine.

UFC: Unité Formant Colonie.

U : Urine.

URE : Urée. **VP** : Voges-proskauer.

Résumé

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (HE) de *Salvia officinalis* sur les bactéries Gram négatif responsables des infections urinaires et purulentes au niveau de l'hôpital de Faubourg de Blida.

Sur l'ensemble de 501 échantillons d'urine analysés, 78 cas d'ECBU étaient positifs traduisant une infection urinaire avec un taux de 15.5%. 71 souches bactériennes Gram négatif ont été isolées des ECBU. Les résultats des prélèvements urinaires montrent une prédominance des entérobactéries dont 45 souches appartenant à *Escherichia coli*, 16 souches à *Klebsiella pneumoniae*, 4 souches à *Proteus mirabilis*, 2 souches pour chacun d'*Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas aeruginosa* et 1 souche de *Salmonella spp* et *Serratia marcescens*.

Parmi les 66 prélèvements purulents, 44 se sont avérés positifs avec un taux de 77.8%. L'épidémiologie des infections purulentes est dominée par les entérobactéries. Les espèces les plus isolées étaient *Klebsiella pneumoniae* (10 souches), *Escherichia coli* (8 souches) *Pseudomonas aeruginosa* (7 souches) et *Proteus mirabilis* (5 souches).

L'extraction de l'HE de la sauge nous a permis d'obtenir une HE avec un rendement de 0.5% et la caractérisation de cette huile par CG/SM indique que les composants majoritaires sont le beta thujone (23.3%), le 1,8 cinéol (16.01%) et le camphore (15.45%). L'huile essentielle de *Salvia officinalis* possède une activité antibactérienne importante vis-à-vis la majorité des bactéries Gram négatif testées dont le diamètre des zones d'inhibition oscille entre 7 et 30 mm. Les souches *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella sp*, *Proteus mirabilis*, et *E. coli* étaient les plus sensibles alors que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* se sont révélés résistants vis-à-vis l'HE de la sauge. Les concentrations minimales inhibitrices obtenues varient de 0.125 à 2 % pour les bactéries testées.

Mots-clés : Activité antibactérienne, Bactéries Gram négatif, Huile essentielle, *Salvia officinalis*.

Abstract

The objective of this study is to determine the antibacterial activity of *Salvia officinalis* essential oil (EO) on Gram-negative bacteria responsible for urinary and purulent infections at the Faubourg hospital in Blida.

Of the 501 tested urine samples, 78 cases of ECBU were positive for urinary tract infection with a percentage of 15.5%. 71 Gram-negative bacterial strains have been isolated from ECBU. Urinary sample results show a predominance of enterobacteria of which 45 strains belong to *Escherichia coli*, 16 strains to *Klebsiella pneumoniae*, 4 strains to *Proteus mirabilis*, 2 strains for each of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* and 1 strain of *Salmonella spp* and *Serratia marcescens*.

Of the 66 purulent samples, 44 were positive with a frequency of 77.8%. The epidemiology of purulent infections is dominated by enterobacteria. The most isolated species were *Klebsiella pneumoniae* (10 strains), *Escherichia coli* (8 strains), *Pseudomonas aeruginosa* (7 strains) and *Proteus mirabilis* (5 strains).

The extraction of EO from *Salvia officinalis* allowed us to obtain an EO with a yield of 0.5% and the characterization of this oil by GC/MS indicates that the major components are beta thujone (23.3%), the 1.8 cineol (16.01%) and camphor (15.45%). The essential oil of *Salvia officinalis* has significant bacterial activity against the majority of tested Gram-negative bacteria with a diameter of the inhibition zones varied between 7 and 30 mm. *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella sp*, *Proteus mirabilis*, and *E. coli* strains were the most sensitive, while *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* strains were resistant to the EO. The minimum inhibitory concentrations obtained vary from 0.125 to 2 % for the tested bacteria.

Keywords: Antibacterial activity Essential oil , Gram-negative bacteria, *Salvia officinalis*.

ملخص

الهدف من دراستنا هو تسليط الضوء على النشاط المضاد للبكتيريا للزيت العطري (HE) لنبات المرسمية (*Salvia officinalis*) على البكتيريا سالبة الجرام المسؤولة عن التهابات المسالك البولية والقيحية في مستشفى الفابور بالبلدية من بين 501 عينة بول التي تم تحليلها، كانت 78 حالة من *ECBU* إيجابية، مما يشير إلى وجود عدوى في المسالك البولية بمعدل 15.5%. تم عزل 71 سلالة بكتيرية سالبة الجرام من *ECBU*. أظهرت نتائج العينات البولية غلبة بكتيريا الأمعاء بما في ذلك *Escherichia coli* 45، و *Klebsiella pneumoniae* 16 سلالة من 4 سلالات من *Proteus mirabilis*، و سلالتان لكل من *Enterobacter cloacae* و *Pseudomonas aeruginosa* وسلالة واحدة من *Salmonella spp* و *Serratia marcescens*.

من بين 66 عينة قيحية، كانت 44 عينة إيجابية بنسبة 77.8%. تهيمن البكتيريا المعوية على وبائيات الالتهابات القيحية. الأنواع الأكثر عزلة هي (10 *Klebsiella pneumoniae* سلالات)، (8 *Escherichia coli* سلالات) *Pseudomonas* (7 *aeruginosa* سلالات) و (5 *Proteus mirabilis* سلالات).

سمح لنا استخراج الزيت العطري من المرسمية بالحصول على عائد بنسبة 5% و يشير توصيف هذا الزيت بواسطة GC / MS إلى أن المكونات الرئيسية هي β -thujone بنسبة (23.3%)، 1,8cinéol بنسبة (01.16%) و camphore بنسبة (15.45%). يحتوي الزيت العطري لـ *Salvia officinalis* على نشاط مضاد للجراثيم كبير ضد غالبية البكتيريا سالبة الجرام التي تم اختبارها حيث يتراوح قطر مناطق التثبيط بين 7 و 30 ملم. كانت سلالات *Acinetobacter baumannii* و *Salmonella sp* و *Proteus mirabilis* و *E. coli* هي الأكثر حساسية بينما تم العثور على سلالات *Pseudomonas aeruginosa* و *Serratia marcescens* مقاومة للزيت العطري. تختلف التركيزات المثبطة الدنيا التي تم الحصول عليها من 0.125% إلى 2% للبكتيريا المختبرة.

كلمات مفتاحية: البكتيريا سالبة الجرام، الزيوت الأساسية، المرسمية، النشاط المضاد للبكتيريا.

Table des matières

Résumer

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Sommaire

I. Introduction.....	1
I. Monographie de <i>salvia officinallis</i>	3
I.1. Description botanique	3
I.2. Dénomination	3
I.3. Position systématique	3
I.4. Huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	4
I.4.1 Définition	4
I.4.2. Activité biologiques de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	4
II. Principaux bactéries à Gram négatif.....	5
II.1. Bacilles à Gram négatif fermentaires (entérobactéries)	5
II.1.1. Généralités	5
II.1. 2. Classification	5
II.1. 3. Habitat	6
II.1.4. Caractères bactériologies des entérobactéries	6
II.1. 5. Pouvoir pathogène	7
II.2 Bacilles à gram négatif non fermentaires	7
II.2.1 Généralités	7
II.2.2 Habitat	8
II.2.3 Pouvoir pathogène	8
III. Antibiorésistance	8

III.1 Définition.....	8
III.2 Types de résistance	8
III.2.1 Résistance naturelle (intrinsèque).....	8
III.2.2 Résistance acquise	9
III.3 Mécanismes de la résistance	9
I. Matériel	10
I.1. Matériel biologique	10
I.2. Matériel non biologique.....	10
II. Méthodes.....	10
II.1 Examen cytbactériologique.....	10
II.1.1 Examen cytbactériologique des urines.....	11
II.1.2 Examen cytbactériologique de pus.....	13
II.1.3. Identification des bactéries à Gram négatifs.....	14
II.1.4 Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)	15
II.2. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	16
II.2.1 Extraction de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	16
II .2.2 Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	17
II.2.3 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> :	17
II.2.4 Composition chimique d'HE de <i>Salvia officinalis</i>	17
II .2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	18
I. Caractéristiques des patients atteints d'infection urinaire.....	21
I.1. Répartition des cas d'infection urinaire selon le sexe.....	21
I.2. Répartition des cas d'infection urinaire selon l'âge.....	22
I.3. Répartition des cas d'infection urinaire selon le service	23
I.4. Résultats de l'examen cytbactériologique des urines.....	23
I.4.1. Aspect macroscopique des urines.....	23
I.4.2. Examen microscopique	24
I.4.3. Examen microbiologique	24
I.4.4. Profil bactériologique des infections urinaires	25
II. Caractéristiques des patients atteints d'infection purulente	27
II.1. Répartition des prélèvements purulents positifs selon le sexe.....	27
II.2. Répartition des prélèvements purulents positifs selon l'âge.....	28
II.3. Répartition des prélèvements purulents positifs selon le service	28
II.4. Profil bactériologique des infections purulentes.....	29

II.4.1. Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram.....	29
II.4.2. Répartition des bactéries isolées selon le groupe bactérien	30
II.4.3. Répartition des bactéries Gram négatives isolées selon l'espèce bactérienne	30
III Profil de résistance des souches isolées de prélèvements purulents et urinaire	31
II.1 Profil de résistance des Entérobactéries.....	31
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i>	31
<input type="checkbox"/> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
<input type="checkbox"/> <i>Proteus vulgaris</i>	33
<input type="checkbox"/> <i>Enterobacter cloacea</i>	33
III.2 Profil de résistance des BGNNF	34
<input type="checkbox"/> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
<input type="checkbox"/> <i>Acinetobacter baumanii</i>	34
III.3 Répartition des bactéries multi-résistantes (BMR) dans les prélèvements urinaires et purulentes	35
IV .1. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	37
IV.1.1 Rendement en l'huile essentielle.....	37
IV .2. Résultats de l'étude analytique de l'huile analytique de <i>Salvia officinalis</i>	37
IV .2.1 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	37
IV .2. 2 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	37
IV .3 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	Erreur ! Signet non défini.
IV .4 Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	Erreur ! Signet non défini.
V-Conclusion.....	43



Introduction

I. Introduction

Les bactéries à Gram négatif constituent une large catégorie de micro-organismes qui sont incapables de retenir une coloration de cristal violet en raison de la structure distincte de leur paroi cellulaire (Vallée,2015). Ces bactéries forment deux groupes largement responsables de plusieurs maladies infectieuses, le premier groupe est les entérobactéries, une très vaste famille qui représente près de 75%des isolements d'un laboratoire bactériologie médicale. Certains sont retrouvés dans les milieux extérieurs le sol et l'eau, mais la plus part commensales de la flore intestinale de l'hôte, incluant *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp* , *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp* et *Serratia marcescens*. L'autre groupe nommé les bactéries non-fermentaires, répandues dans l'environnement notamment dans les milieux hospitaliers et sont responsables d'infections dites opportunistes (*Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*) (Denis et al.,2016).

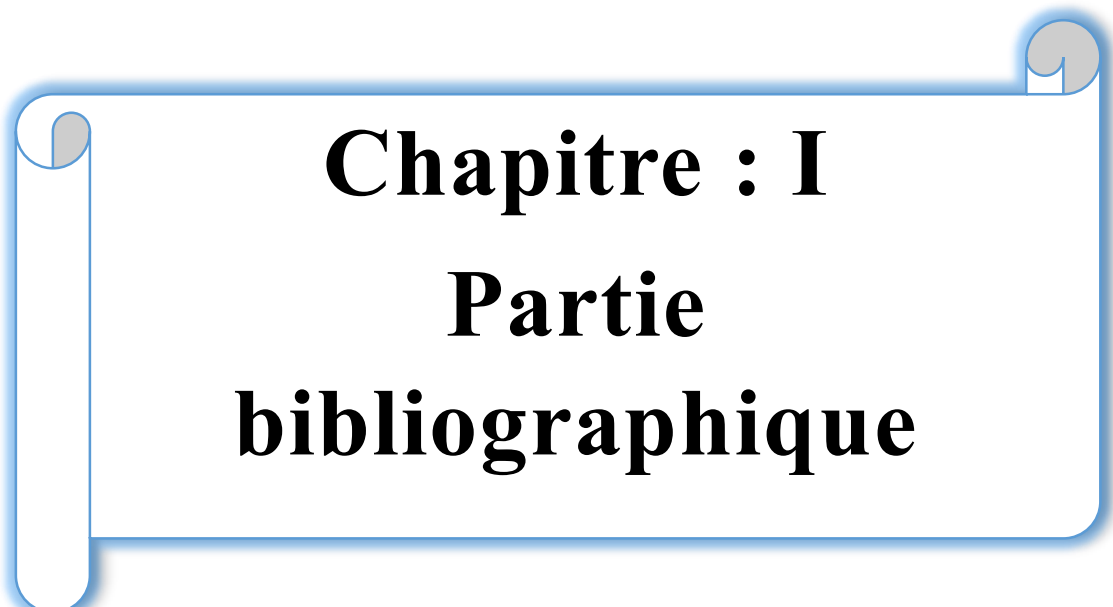
L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram-négatif, particulièrement les Entérobactéries et les bactéries du genre *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, représentent un problème majeur de santé publique (Diene.,2012), Dont les conséquences se mesurent en termes de difficultés thérapeutiques accrues associées à une augmentation de la morbidité et de la mortalité dues à ces germes (Struelens et Rodriguez., 2006). Cette résistance tue environ 700 000 personnes chaque année dans le monde (James., 2019). Ainsi, pour faire face à cette menace mondiale, les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives.

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne (Mebareki., 2010)., on s'est intéressé à une espèce végétale très rependue dans le bassin méditerranéen et très utilisés pour ses innombrable vertus thérapeutique notamment le pouvoir antibactérien. Il s'agit de *salvia officinalis* ou la sauge officinale.

Dans ce contexte, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Isolement, purification et identification biochimique des bactéries Gram négatif responsables des infections urinaires et des infections purulentes au niveau du laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Faubourg de Blida.
- Etablissement d'un profil de résistance des germes isolés vis-à-vis quelques antibiotiques.

- Evaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* sur les bactéries à Gram négative isolés à partir des prélèvements pathologiques



Chapitre : I
Partie
bibliographique

I. Monographie de *salvia officinalis*

I.1. Description botanique

S. officinalis pousse sous la forme d'un sous-arbrisseau vivace à croisements croisés atteignant 60 cm de haut. Les feuilles sont opposées et simples avec des poils blancs sur la face inférieure des feuilles et verdâtres ou gris verdâtre sur la face supérieure. Les tiges sont dressées ou couchées avec d'abondantes branches poilues vert foncé. Les feuilles sont allongées et pétiolées avec une marge dentelée, une surface rugueuse et parfois avec des lobes basaux. Les fleurs mesurent 2 à 4 mm de long à partir du pédicelle et se présentent en pseudoverticillasters avec 5 à 10 fleurs de couleur bleu violet qui forment de faux épis composés (**Hedge, 1972 ; Šilić, 1973**).



Figure 1 : Aspects morphologiques de *Salvia officinalis* (photos originale)

I.2. Dénomination

Historiquement, la sauge est connue comme la "plante du Salut", provenant de l'ancien mot latin "Salvarem", qui signifie « sauver » ou « guérir » (**Jakovljevi et al., 2019**).

En Algérie, près de 30 espèces ont été recensées. Plusieurs noms ont été assignés à sauge. Selon Ibn El Beytar, les Andalous l'appellent "essalma", ce qui ajoute que les botanistes espagnols l'appellent "salbia". El djazairi utilise l'expression "souekennebi" en tant que synonyme de Salem (**Khiredine ,2013**).

I.3. Position systématique

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Salvia*
- Espèce : *Salvia officinalis* (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2006).

I.4. Huile essentielle de *Salvia officinalis*

I.4.1 Définition

En général le terme « huile essentielle » signifie les composants liquides et hautement volatiles des plantes avec une odeur forte et caractéristique synthétisées grâce à l'énergie solaire par les cellules sécrétoires des plantes aromatiques (Anton et Lobstein, 2005).

La définition officielle des huiles essentielles par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) selon la norme Afnor NT 75-006 de février (2006) est la suivante : « une huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des citrus, soit par distillation sèche, et qui est séparé de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

I.4.2. Activités biologiques de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

▪ Activité anti-inflammatoire

La commission E du ministère de la santé allemande reconnaît l'usage de la sauge officinale en usage externe, contre l'inflammation des muqueuses de nez et de la gorge. L'ESCOP (Coordination Scientifique Européenne en Phytothérapie) lui reconnaît en plus des indications spécifiques pour les inflammations du pharynx, des gencives et des muqueuses de la bouche.

En Allemagne, l'efficacité de l'infusion de sauge est aussi reconnue pour traiter les inflammations causées par le port de prothèses dentaires et comme traitement de soutien en cas d'inflammation des muqueuses gastro-intestinales. Cette action pourrait être liée à la présence d'acide phénolique et l'acide rosmarinique (Robert et Rombi., 2007).

▪ Activité Antibactérienne

Les effets de la *Salvia officinalis* sur les microorganismes sont confirmés par de nombreuses études, dont les huiles essentielles de la plante sont hautement bactéricides et bactériostatiques contre les bactéries Gram-positives et Gram négatives. Les pathogènes à Gram positif tel que *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus epidermidis* ont une sensibilité élevée à HE de *Salvia officinalis* (Tour, 2015 ; Ghorbani, 2017).

- **Activité antiparasitaire**

L'huile essentielle de sauge fumigante est active contre le troisième stade de *Spodopteralittoralis*. Cette activité peut être due à l'inhibition de l'acétylcholinestérase, une enzyme très importante dans le système nerveux central de ces insectes, par les monoterpènes présents dans l'HE de la plante (Ben Kheder *et al.*, 2017).

- **Activité antioxydante**

Le stress oxydatif joue un rôle important dans l'initiation et la progression de diverses maladies, notamment le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies neurologiques (Toyokuni., 2016). Les antioxydants naturels protègent les cellules contre la ROS, alors que plusieurs études suggèrent que *Salvia officinalis* possède de puissante activité antioxydante (Horvathovaet *al.*, 2016).

II. Principaux bactéries à Gram négatif

Les bacilles Gram-négatifs occupent une place importante en pathologie humaine. Généralement, ils sont divisés en deux groupes principaux : les bacilles fermenteurs Gram-négatifs (Entérobactéries) et les bacilles à Gram négatif non fermentaires (Liassine.,2000).

II.1. Bacilles à Gram négatif fermentaires (entérobactéries)

II.1.1. Généralités

Les Entérobactéries ou (Enterobacteriaceae) constituent une famille bactérienne hétérogène très importante. Le terme Enterobacteriaceae est issu de deux mots grecs : Enteron « intestin» et bakteron. « Petit bâton » signifie des bacilles intestinaux (Fauchèreet *al.*, 2002).

II.1. 2. Classification

Selon Denis, (2007) Les entérobactéries appartiennent à :

Domaine	Eubactéria
Embranchement	Proteobactéria
Class	Gammaproteobacteria
Ordre	Enterobactériales
Famille	Enterobacteriaceae

La famille Enterobacteriaceae est composée d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces inscrites. Les espèces les plus souvent isolées en bactériologie clinique appartiennent aux 12 genres : Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Salmonella, Serretia, Shigella et Yersinia (Perriere., 1992).

II.1. 3. Habitat

Les entérobactéries sont ainsi nommées car la plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve également dans la bouche, les voies respiratoires supérieures et les organes génitaux. Ils peuvent persister en dehors des organismes vivants et sont présents dans le sol, l'eau et certains aliments (Fauchère et Avril., 2002). *Salmonella typhi* qui est responsable de la fièvre typhoïde n'est retrouvée que dans l'intestin de l'homme malade (Joly et Reynaud., 2002).

II.1.4. Caractères bactériologies des entérobactéries

A. Caractères morphologiques

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de BGN (2-4µm longueur/0.4-0,6 µm largeur), soit mobiles par ciliature péritriche ou immobiles, non sporulés et peuvent être capsulés (Klebsiella). La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion (Le Minor et Veron .,1989).

B. Caractères cultureux

La plupart des espèces d'Entérobactéries sont cultivées sur milieu minimal sans facteurs de croissance. La température optimale de croissance est habituellement entre 35° à 37°C mais la culture est possible entre 20° et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes avec donc un maximum de culture atteint habituellement en moins de 24h d'incubation (El bouamri., 2017).

En milieu gélosé, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Les colonies entièrement muqueuses sont particulièrement fréquentes chez les cultures de *Klebsiella*. Dans un bouillon de culture, les Entérobactéries donnent un trouble homogène avec des ondes moirées (avec des reflets changeants) quand on agite le tube (Joly et Reynaud., 2002)

II.1. 5. Pouvoir pathogène

Dans la plupart des cas, la source d'infection est soit endogène à la flore bactérienne, soit exogène au milieu extérieur. Les entérobactéries sont responsables de nombreuses infections.

Les infections communautaires sont principalement les infections des voies urinaires causées par *Escherichia coli*, les intoxications alimentaires causées par *Salmonella* et les infections pulmonaires causées par *Klebsiella pneumoniae*. Les infections nosocomiales sont courantes, telles que les infections des voies urinaires, les plaies chirurgicales, les infections pulmonaires, la septicémie et d'autres infections (Anglaret et Mortier., 2002).

II.2 Bacilles à gram négatif non fermentaires

II.2.1 Généralités

Parmi les germes responsables d'infections bactériennes, nous avons les bacilles à Gram négatif non fermentaires qui par définition n'utilisent pas les hydrates de carbones comme source d'énergie ou ils les utilisent via des voies métaboliques autres que la fermentation. Ce groupe comprend plus d'une soixantaine de genres, regroupant chacun un nombre variable d'espèces. En médecine, les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Church et al., 2020).

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif, en forme de bâtonnets droits et fins de 1 à 3 µm de long et 0,5 à 1 µm de large, mobiles grâce à la présence d'un flagelle mono triche polaire, non sporulés (Sefraoui et al., 2015). Ce germe pousse facilement sur milieux ordinaires et se caractérise par une odeur de seringas. La température optimale de croissance est entre 30°C et 37°C (Denis et al., 2016). Elle sécrète également certaines pigmentations, les plus courantes sont la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge) (Ben Haj Khalifa et al., 2011).

Acinetobacter baumannii sont des bacilles gram-négatifs ou coccobacilles, mesurant 1,0 à 1,5 µm sur 1,5 à 2,5 µm, immobiles, non sporulés, parfois Capsulés, trapus, assemblés en paire ou en chainettes ; polymorphe prendre la forme filamenteuse dans les cultures âgées (**Fechkeur et Thibault., 1998**).Elles sont des bactéries aérobies stricts qui se développe sur les milieux couramment utilisés à une température de croissance de 41 à 44°C (critères de base du diagnostic différentiel avec autres espèces en 37° C), les colonies sont rondes, de 1 à 3 mm de diamètre, surélevées, d'aspect lisse, parfois mucoïdes, de contour régulier (**Hidri et al .,2012**)

II.2.2 Habitat

Les BGN-NF sont des bactéries ubiquitaires et saprophytes de l'environnement, principalement retrouvées dans les environnements chauds et humides, Notamment dans l'environnement hospitalier (robinet, évier, siphon, vase) (**Abdouchakour et al., 2015**), Mais elles peuvent aussi exister à l'état commensal sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux (**Poyar et al., 2016**)

II.2.3 Pouvoir pathogène

Les BGN-NF sont devenues des agents pathogènes importants dans la pratique médicale, représentant de 12 à 15 % de tous les isolats bactériens prélevés dans des échantillons cliniques. Elles sont associées à diverses infections telles que l'ostéomyélite, la septicémie, la pneumonie, les infections des voies urinaires, la pneumonie associée à la ventilation mécanique et les infections du site opératoire (**Soni et al.,2023**).

III. Antibiorésistance

III.1 Définition

La résistance bactérienne aux antibiotiques est définie comme l'insensibilité des bactéries aux actions antimicrobiennes d'un antibiotique donné (**collins.,1979**).

Les bactéries sont dites multi résistantes aux antibiotiques (BMR) lorsque qu'ils ne restent sensibles qu'à un nombre limité d'antibiotiques, par des mécanismes de résistances acquises, et qui ont un fort potentiel endémique (**Brissot et al., 2020**).

III.2 Types de résistance

III.2.1 Résistance naturelle (intrinsèque)

C'est une résistance stable, caractérisé essentiellement par la présence de gènes spécifiques dans le chromosome de toutes les souches du même genre bactérien (**Malani et al., 2010**).

III.2.2 Résistance acquise

C'est une acquisition d'une nouvelle information génétique à partir de modification dans le profil de résistance génétique via des mutations (**Malani et al., 2010**).

III.3 Mécanismes de la résistance

Les bactéries exhibent une variété de mécanismes de résistance aux antibiotiques, pouvant être classés de la manière suivante :

❖ Les mécanismes enzymatiques

La production d'enzymes capables de modifier ou de dégrader les antibiotiques est un mécanisme fréquemment observé chez les entérobactéries, ce qui confère une résistance à la famille des bêta-lactamines (**Vodovar et al., 2013**).

❖ Les mécanismes non enzymatiques

- La Modification de la cible de l'antibiotique de telle sorte l'antibiotique ne puisse plus se lier. L'imperméabilité membranaire par la réduction des diamètres des porines (**Muylaert et Mainil, 2013**).
- La restriction de l'entrée de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie, par l'activation de pompe à efflux (**Guardabassi et Courvalin., 2006**).
- La Piégeage des antibiotiques par augmentation de la production de leurs cibles ou une autre molécule ayant une affinité pour ce dernier. Ce mécanisme est également impliqué dans des bas niveaux de résistance à la tobramycine chez *E. coli*. (**Cattoir., 2004**).



Chapitre : III
Matériel et Méthodes

L'objectif de notre étude est d'isoler et identifier les bactéries à Gram négative dans différents prélèvements cliniques et de déterminer leur profil d'Antibiorésistance ; ainsi que d'évaluer l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* sur les souches isolées.

Notre étude d'a été réalisé durant la période allant de 12 février au 13 jeun 2023 au niveau des laboratoires suivants :

- Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Fabourg afin d'isoler, identifier et étudier le profil d'Antibiorésistance des bactéries Gram négative et d'évaluer l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*.
- La centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimique (CRAPC) de Bou Ismail ou nous avons fait l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

A. Prélèvements

Cette étude est réalisée sur des prélèvements d'urines et de pus parvenus au laboratoire de microbiologie du l'hôpital faubourg Blida.

B. Matériel végétal

La plante a été récoltée en février 2023 de la région Beni tamou Wilaya de Blida. La partie aérienne utilisée (feuilles et tiges) a été récupérée et stockée dans des sachets. La quantité de la matière fraîche utilisée est (10kg). Le procédé d'extraction utilisé est l'hydrodistillation dans un appareil alambic en inox alimentaire. L'HE est recueilli et stockée dans un réfrigérateur à 4°C à l'obscurité.

I.2. Matériel non biologique

Nous avons utilisé différents milieux de culture, solides et liquides. Par ailleurs, nous avons aussi utilisé divers appareils, de la verrerie, des réactifs et des disques d'antibiotiques (Annexe (01)).

II. Méthodes

II.1 Examen cytobactériologique

Chaque prélèvement parvenu au laboratoire a fait l'objet d'une étude cyto bactériologique comportant les étapes montrées dans le schéma suivant :

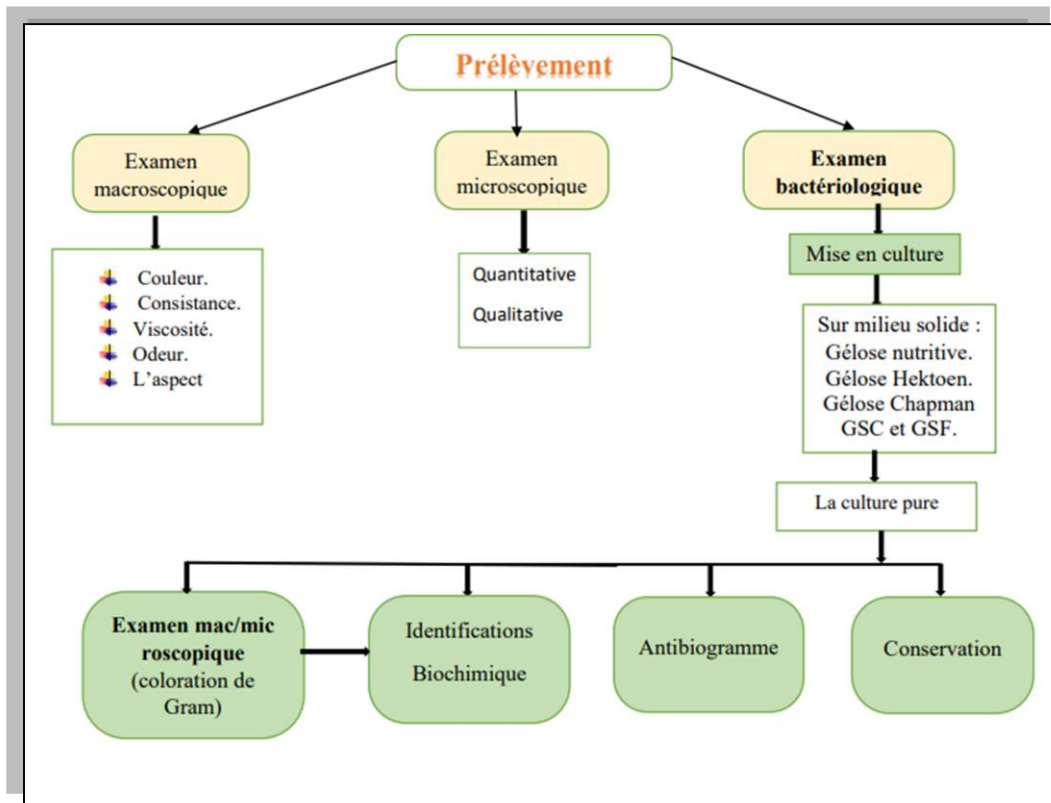


Figure 2:Étapes de la démarche d'analyse cyto bactériologique des prélèvements.

II.1.1 Examen cyto bactériologique des urines

II.1.1.1 Examen macroscopique

L'examen à l'œil nu des urines est effectué dans le but de signaler la présence de modifications des caractères physiques de l'urine qui regroupent l'aspect de l'urine : clair, hématurique, trouble, ictérique, purulent et sa couleur : jaune, ambrée, rougeâtre.

II.1.1.2 Examen microscopique

Cet examen consiste à rechercher et dénombrer au microscope les cellules anormales présentes dans l'urine, après l'homogénéisation. Il est en règle générale une analyse à la fois qualitative et quantitative.

❖ **Etude quantitative** (dénombrement des éléments figurée)

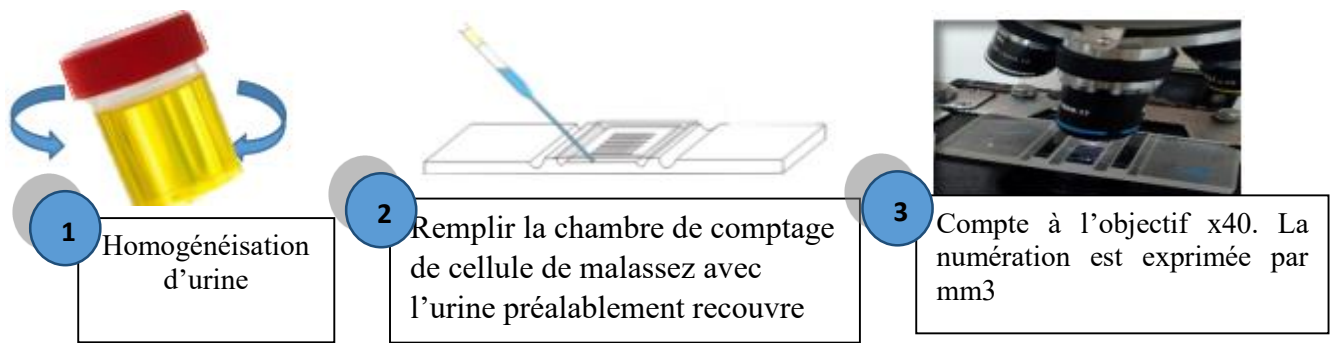


Figure 3:Méthode de dénombrement cytologique (globules blanches et les bactéries) des urines par la cellule de malassez (photos originale).

❖ **Etude qualitative**

Permet de signaler la présence des cellules tel que les hématies, cellules épithéliales leucocytes, cylindres ; différent type des cristaux, levures et les bactéries. (Quevauvilliers et al., 2001).

II.1.1.3 Examen bactériologique (Mise en culture)

La culture des urines est l'étape clé du diagnostic des infections urinaires. C'est la seule méthode qui permet une identification exacte des microorganismes qui colonise l'urine.

❖ **Démembrement**

Méthode de VERON (Méthode de KASS modifiée)

- À l'aide d'une pipette Pasteur ; on prélève 0.1 ml d'urine bien mélangée puis diluer dans 9.9 ml d'eau distillée stérile.
- On dépose 0.1 ml de cette dilution et on les étale sur une GN avec un râteau stérilisé. Incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture et interprétation

Le nombre des colonies est déterminé selon la formule de Kass :

$$N = n \cdot 10^2 \cdot 10 \text{ bactérie /ml}$$

Où : n : Nombre de colonie sur la boîte.

10² : Inverse de la dilution.

10 : l'inoculum.

Nombre de colonie : 1-9 : 10³Bact/ml Numération négative ; 10-99 : 10⁴Bact/ml Numération douteuse. + 100 : 10⁵Bact/ml Numération positive

❖ **Isolement**

A partir des boîtes GN positive et selon l'observation de la coloration de Gram, d'autres milieux peuvent être ensemencés, pour avoir à la fin des colonies bien isolées après Incubation de 18 à 24h à 37°C. Le plus souvent on utilise le milieu l'Hektoen, car une très grande majorité des infections urinaires sont mono microbiennes et dues à des entérobactéries donc des Gram négative qui sont non exigeantes.

II.1.2 Examen cyto bactériologique de pus

II.1.2.1 Examen macroscopique

Cet examen consiste sur l'observation, à l'œil nu de :

- La couleur : varie de la teinte chocolat au blanc, certains pus sont verdâtres ou bleutés,
- L'aspect : hémorragique, purulent, présence d'égrains
- La viscosité : Le pus peut être épais, visqueux, élastique, mélangé au sang ou non, fluide ou séreux, ainsi que l'odeur.

II.1.2.2 Examen microscopique

A l'état frais

- Remplir un des écouvillons par 5ml de l'eau physiologie.
- Une goutte est déposée entre lame et lamelle, puis on l'observe sous microscope optique, au grossissement x40

II.1.2.3 Mise en culture

❖ Enrichissement et isolement

On utilise 2 écouvillons, on les remplit par une petite quantité de bouillon d'enrichissement BGT (bouillon gélosés tamponné) ou BHIB (bouillon cœur cerveau), l'un pour la culture et l'autre pour la réensemencer s'il n'y a pas d'une pousse bactérienne dans les premières boîtes après une incubation de 24h.

Du fait de la diversité des bactéries isolées, des milieux de culture spécifiques et sélectifs sont nécessaires notamment pour les prélèvements contaminés par une flore commensale, les prélèvements seront ensemencés sur : (Hektoen ; Chapman ; gélose au sang frais ; gélose au sang cuit).

Les boîtes sont ensuite incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 h, sauf les boîtes GSC et GSF, sont tout d'abord introduit dans une jarre avec une bougie (atmosphère enrichie en CO₂) pour favoriser la multiplication des capnophiles. La jarre est placée ensuite dans l'étuve pour

laisser incuber les boîtes à 37°C pendant 24 à 48h. Des réincubations sont possibles s'il n'y a pas d'une pousse bactérienne dans les boites de GSC et GSF et Chapman.

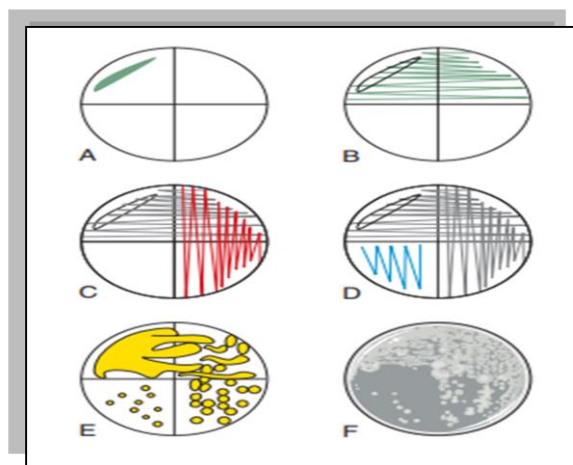


Figure 4: Méthode d'isolement en quadrant (Denis et al., 2016).

II.1.3. Identification des bactéries à Gram négatifs

II.1.3.1 Etude des caractères morphologiques

❖ Etude macroscopique

On doit contrôler le critère suivant :

Tableau I:Caractères des colonies sur les différents milieux de cultures

La forme	Le relief	la pigmentation	Le contour	L'aspect	L'odeur
ronde, irrégulière, entoile, envahissante	plat, bombé	blanche, verte, grisâtre fluorescente	régulier, irrégulier	lisse, rugueuse, muqueuses	Selon les produits volatiles

❖ Etude microscopique :

C'est la coloration de référence en bactériologie. Elle permet de distinguer entre les bactéries à Gram positif (+) et les bactéries à Gram négatif (-) en se basant sur les propriétés de la paroi bactérienne. Les étapes de réalisations de coloration de Gram sont présentées dans Annexe (03).

II.1.3.2 Tests d'orientation

❖ Test d'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries ; à partir de leur culture en milieu gélosé prendre une colonie de bactérie à l'aide d'une pipette pasteur isolée : on la gratte sur un disque d'oxydase imprégné par le réactif et imbibé

par l'eau distillée, l'observation est immédiate si le disque reste incolore signifie Oxydase (-). Si Le disque prend une teinte bleue ou violette donc la bactérie est Oxydase (+).

II.1.3.3 Identification biochimique des bactéries par la galerie d'Api20E

La galerie API 20E (Bio Mérieux) est un système normalisé qui permet d'effectuer rapidement et facilement 20 tests biochimiques miniaturisés afin d'identifier des bacilles à Gram (-) appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. Voici les différentes étapes de réalisation de galerie :

1. **Préparation de l'inoculum :** A partir de culture jeune de 18 ou 24h, et à l'aide d'une pipette pasteur, on prélève quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et sont mises dans 10ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl). La suspension bactérienne a été bien homogénéisée et standardisée à une DO équivalente à 0.5 Mc Ferland (10^6 UFC /ml).
2. Humidification de la galerie
3. On introduit la suspension bactérienne dans les tubules de la galerie à l'aide d'une seringue tout en évitant la formation des bulles au fond des tubes :
 - Pour les tests encadrés CIT, VP, GEL, on remplit les tubules et les cupules.
 - Pour les tests soulignés ADH, ODC, LDC, H₂S, URE, on remplit les cupules avec de l'huile de vaseline pour créer une anaérobiose.
 - Pour les autres tests on ne remplit que les tubules.
4. On ferme la boîte d'incubation et on place dans l'étuve à 37°C, pendant 24 h. La détermination de la positivité et la négativité effectuée après l'ajoute des réactifs dans certains tests permet le : pour le Test IND : Kovacs, test VP : VP1 et VP2 ; et le TDA: TDA.
5. La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Annexe 8) et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique.

II.1.4 Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)

L'antibiogramme est réalisé en utilisant la technique de diffusion sur gélose, également appelée méthode de Kirby-Bauer (Amady et al., 2021). Voici les étapes générales de cette technique :

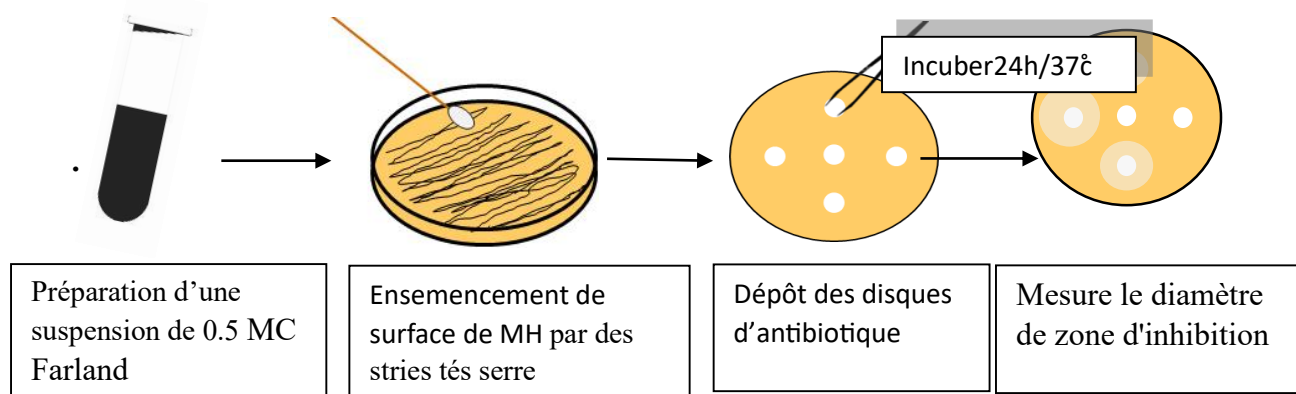


Figure 5: Etapes de réalisation de l'antibiogramme

Après l'incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibition (zones où il n'y a pas de croissance bactérienne) autour de chaque disque d'antibiotique. La taille de ces zones est corrélée à la sensibilité de la souche bactérienne à l'antibiotique. Pour interprétation en comparant les résultats avec les valeurs critiques figurant dans Annexe (04). Cela permet de classer les bactéries en sensible, intermédiaire ou résistante.

La recherche de BLSE était réalisée par la méthode de la synergie entre deux disques de Céphalosporine de 3ème génération (CTX) et d'AMC, distants de 30 mm. La présence d'un aspect synergique en « bouchon de champagne » confirmait la présence d'une BLSE (**Gaudré et al. ,2019**).

❖ Conservation des souches (à court durée)

On effectue des repiquages sur milieu gélosé en tube inclinée et conservée au réfrigérant à 4°C, lorsqu'il est nécessaire de réutiliser les souches celle –ci est mise en subculture sur un nouveau milieu (**Denise et al. , 2016**).

II.2. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

II.2.1 Extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

L'extraction d'huile essentielle de *Salvia officinalis*, dans un appareil de type alambic 58 en inox alimentaire 304, par la technique d'hydrodistillation

• Principe

C'est la méthode la plus simple et là plus anciennement utilisée. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Sous l'effet de la chaleur les cellules végétales s'éclatent et libèrent les molécules odorantes qu'elles contiennent. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont

condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (Zaibet.,2018).

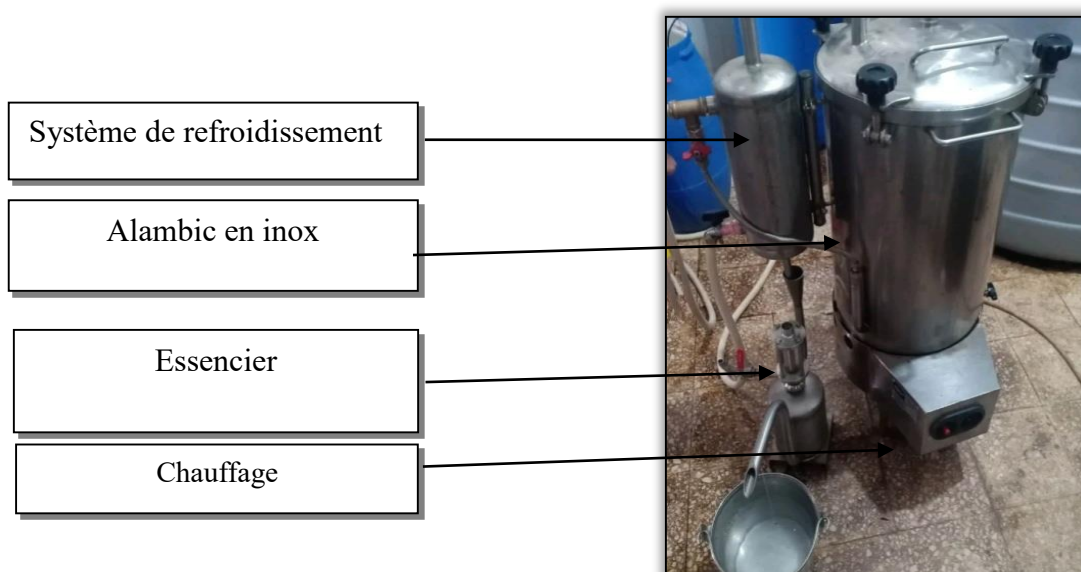


Figure 6: Etapes de réalisation de l'antibiogramme (photo originale)

Les différentes étapes de la méthode sont illustrées en Annexe (06).

II .2.2 Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

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

$$RHE = (M'/M) \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle de la matière végétale.

M' : masse d'huile essentielle exprimée en gramme.

M : masse de la matière végétale sèche exprimée en gramme.

II.2.3 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* :

Dans cette étude, la qualité organoleptique a été évaluée en se basant sur trois critères : l'odeur, la couleur et l'aspect de l'huile essentielle.

II.2.4 Composition chimique d'HE de *Salvia officinalis*.

❖ Mode opératoire

L'analyse GCMS des huiles essentielles a été réalisée par Un chromatographe Hewlett-Packard Agilent 6890 équipé d'une colonne capillaire de type HP-5MS (30m x 0.25mm,

épaisseur film 0.25µm, Hewlett-Packard) avec 5% Phenyl 95% le diméthylpolysiloxane en phase stationnaire, relié à un détecteur (FID), la température du four a été programmée à 60°C pendant 8 min, 2°C/min jusqu'à 250°C et isotherme 10 min ; pour un temps d'analyse de 113 min. Le volume injecté est de 0,2 µl en mode d'injection : Split 80 :1 à 250°C de température de détection (interface). Gaz vecteur : hélium pur 6.0 envoyé avec un débit de 0,6 ml/min. Les conditions du spectromètre de masse sont : l'analyseur de masse : des quadripôles, une ionisation par impact électronique de 70eV, et la température de l'interface est de 270°C, les spectres de masse des électrons ont été acquis en mode SIM scan. L'identification des composés a été réalisée par la base de données NIST 08.

II .2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

II .2.5.1 Aromatogramme (Méthode de diffusion en milieu gélosé)

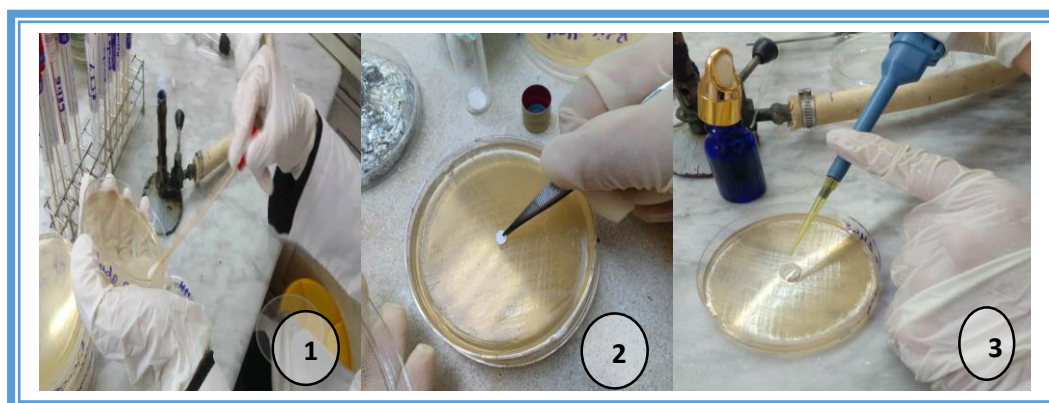
❖ Principe

L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode de l'aromatogramme, qui est une technique de laboratoire similaire à celle de l'antibiogramme, dans lequel les antibiotiques sont remplacés par des disques imprégnés par l'huile essentielle (**Benkheraet al.,2011**).

❖ Technique :

Un disque (6 mm de diamètre) imprégné de 20 µl d'HE de *Salvia officinalis* placé sur une gélose (4 mm d'épaisseur ; dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre) préalablement inoculer par une suspension bactérienne de 0.5McFarland.

Les boîtes sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Les zones d'inhibition ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse.



1. Ensemencement par écouvillonnage. 2. Dépôt du disque. 3. Imprégnation d'HE

Figure 7: Etapes d'aromatogramme (photo originale)

❖ Pour chaque bactérie on réalise trios essais.

❖ **Lecture**

Après l'incubation, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en mm (y compris le diamètre du disque de 6 mm). L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne évaluée par la méthode d'aromatogramme est citée dans le tableau suivant :

Tableau II: Echelle d'estimation de l'activité antimicrobienne (Sadou et al., 2015)

Activité d'inhibition	Diamètre de la zone d'inhibition
Action inhibitrice très efficace	ZI \geq 25 mm (+++)
Action inhibitrice importante	16 \leq ZI < 25 mm (++)
Action inhibitrice intermédiaire	10 \leq ZI < 16 mm (+)
Sans action inhibitrice	ZI < 10 mm (-)

II .2.5.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu solide

La CMI est défini comme étant la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'inhibe la croissance bactérienne. Pour confirmer l'effet antimicrobienne de l'huile essentielle de la sauge, la concentration minimale inhibitrice a été déterminer par la méthode de dilution sur milieu solide (CLSI, 2006).

A partir des résultats obtenus de l'étude de l'aromatogramme, nous avons sélectionné les souches ayant des diamètres de zone d'inhibition les plus important.

Mode opératoire

1. Préparation des suspensions bactériennes standardisées.
2. Préparation des dilutions d'HE de 2% à 0.03% : dans le premier flacon en diluant 1 ml d'HE pure (100%) additionné de DMSO stérile dans 48 ml de milieu MH stérile et refroidir à 45-50°C, on agite légèrement afin de bien homogénéiser le mélange c'est la concentration 2%. On réalise des dilutions de 1/2 au 1/2 en versant la moitié de la dilution 2% dans le deuxième flacon et compléter avec 25 ml de milieu MH stérile ce qui donne la dilution 1%. On procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 0.03%.
3. Les dilutions sont ensuite coulées dans des boîtes de Pétri numérotées avec le nombre de dilution convenable.

4. L'ensemencement sera fait sur la surface de la gélose par touche à l'aide d'un écouvillon.
5. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, La lecture des résultats se fait à l'œil nue par observation et la CMI correspond à la plus faible concentration d'huile à laquelle aucune croissance microbienne n'est visible.

Remarque : Des Témoin positif (MH additionné de DMSO + l'inoculum) et un témoin négatif (MH additionné DMSO) doit être prévu. Pour chaque bactérie on réalise deux essais.

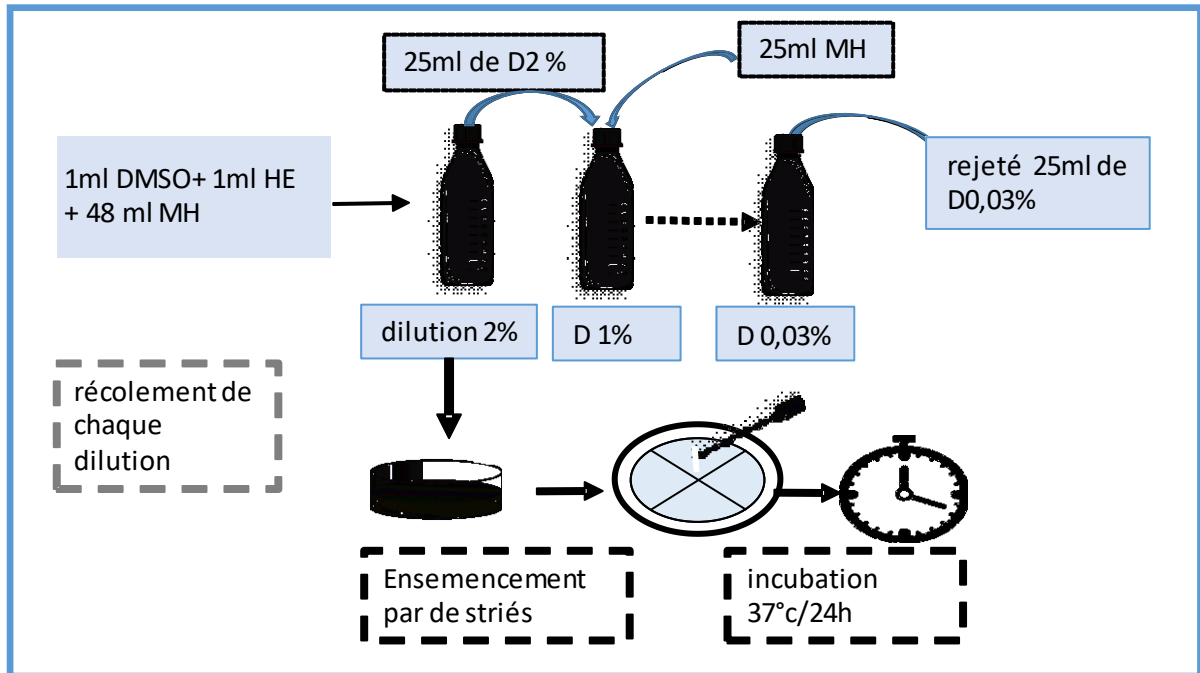


Figure 8: Mode opératoire de CMI sur milieu solide par des dilutions de $\frac{1}{2}$ au $\frac{1}{2}$ (photos originale)

- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SPSS version 17.00 e par les teste NOVA



Chapitre : III
Résultats et
discussion

Durant notre étude, on a reçu 555 échantillons dont 501 étaient des prélèvements urinaires et 54 des prélèvements purulents, provenant de patients hospitalisés dans les divers services de l'Établissement Public Hospitalier (EPH) de Faubourg et d'autres provenant de patients non hospitalisés. Ainsi, les bactéries isolées ont été identifiées afin de déterminer leur profil de résistance aussi bien aux antibiotiques qu'à l'huile essentielle de *Salvia officinalis*. Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus.

I. Caractéristiques des patients atteints d'infection urinaire

Parmi les 501 patients inclus dans notre étude, 78 ont présenté une infection urinaire confirmée par l'examen direct et la culture, soit un taux de prévalence d'IU de 15.6%. Alors que 380 ECBU étaient négatifs (75.8%) et 43 ECBU étaient contaminés (8.6%) (**Figure (09)**).

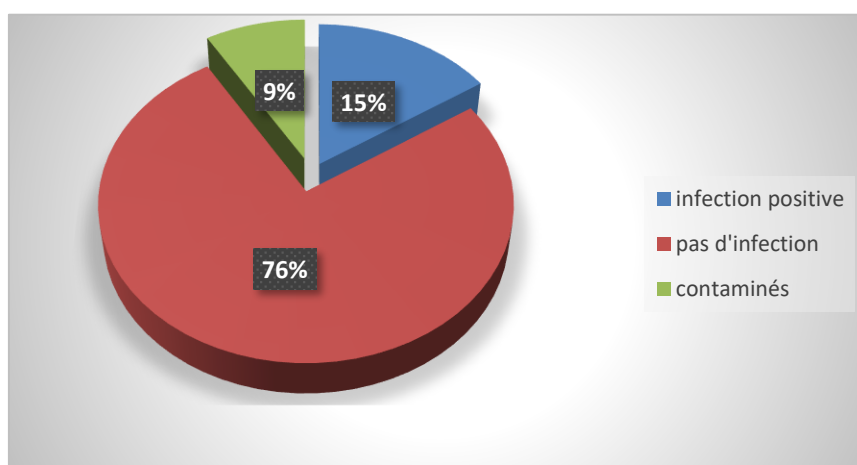


Figure 9: Taux de prévalence de l'infection urinaire

La prévalence des infections urinaires dans notre étude est légèrement supérieure à celle trouvée par **Nakhli et al., (2022)** avec un taux de 13 %. En revanche, notre taux est inférieur à celui obtenu par **Zahir et al., (2019)** et **Mukubw et al., (2023)**, où les pourcentages de positivité étaient respectivement de 23 % et 29,3 %. Cette différence de taux de prévalence peut être expliquée par l'inégalité de la taille de la population étudiée.

I.1. Répartition des cas d'infection urinaire selon le sexe

On note une prédominance du sexe féminin (59%) par rapport au de sexe masculin (41%). Cette prédominance féminine n'était pas statistiquement significative (valeur $p = 0,8$).

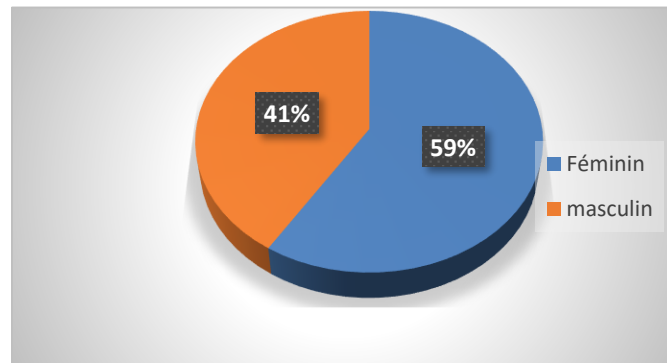


Figure 10: Répartition des cas d'IU selon le sexe

Cette prédominance chez les femmes est cohérente avec les résultats rapportés par plusieurs autres études **Bellazreg et al., (2019)** ; **Gninkoun et al., (2019)** ; **Nakhli et al., (2022)**) et **Bendjilali et al., (2023)**. La fréquence des infections urinaires chez le sexe féminin peut s'expliquer par le passage des germes, de l'urètre vers la vessie, est particulièrement facile chez les femmes dont l'urètre est court et surmonté d'un sphincter plus large que chez les hommes (**Vallè et al., 2022**).

I.2. Répartition des cas d'infection urinaire selon l'âge

La répartition des IU selon l'âge montre que les infections du tractus urinaire sont moins fréquentes chez les enfants (19.2%) que chez les adultes (80.8%) (Figure (10)). Cette étude démontre qu'il n'existe pas un lien statistiquement significatif entre la présence d'infection urinaire et l'âge ($p=0,4$).

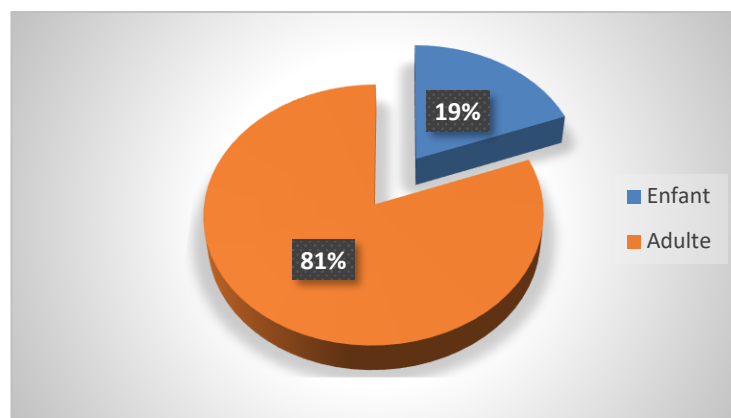


Figure 11: Répartition des cas d'IU selon l'âge.

La fréquence de l'IU observée chez les personnes âgées est expliquée par diverses pathologies dont les maladies prostatiques, les sondes à demeure, l'hypoactivité vésicale et le diabète

(Amady et al., 2021). De plus, la déshydratation, le manque d'hygiène et la diminution des défenses immunitaires sont également des facteurs contributifs (Barrier., 2014).

I.3. Répartition des cas d'infection urinaire selon le service

Les prélèvements d'urine reçus des malades au niveau du laboratoire de bactériologie pendant notre étude, provenaient de 4 services. Le nombre le plus élevé des IU positive appartenait aux patients consultant à titre externe avec un pourcentage de 62.8% (49/78) suivi par les patients hospitalisés au niveau du service de pédiatrie et du service de médecine interne avec des taux de 17.9% (14/78) (Figure (12)).

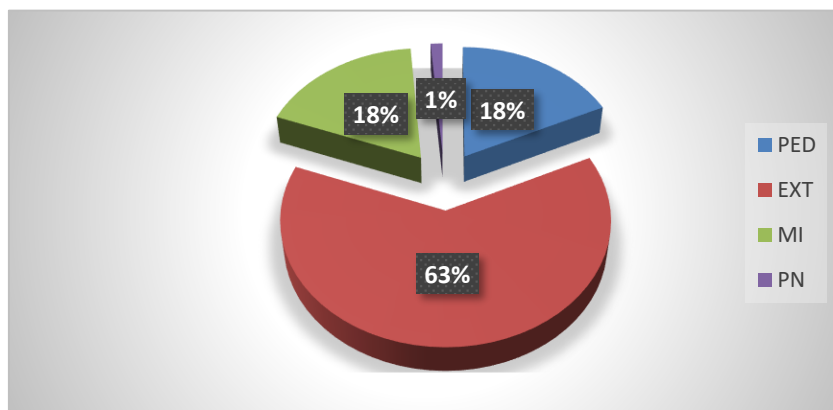


Figure 12: Répartition des cas d'IU selon le service

I.4. Résultats de l'examen cyto bactériologique des urines

I.4.1. Aspect macroscopique des urines

- **L'aspect normal** présente une couleur jaune ou jaune doré, il est clair et transparent.
- **L'aspect trouble** peut être le résultat d'une infection bactérienne et/ou de la présence des leucocytes. Cependant, il est important de noter que la turbidité de l'urine n'est pas toujours liée à une pathologie, elle peut également être causée par la présence de cristaux ou de pertes vaginales.
- **L'aspect hématurique** (hématurie) peut être dû à une pathologie sous-jacente ou à une alimentation riche en pigments rouges, voire à la prise de certains médicaments.



Figure 13: Différents aspects macroscopiques de l'urine (Photo originale).

I.4.2. Examen microscopique

- **Examen qualitatif :** La présence des leucocytes, des globules rouges et des germes (sous forme de Cocci ou de bacilles) et des levures dans la cytologie des urines est un signe d'infection urinaire. En revanche, la présence de différents cristaux peut être liée à la prise de certain aliment ou des médicaments. La présence de cellules épithéliales est normale, car elles correspondent à une perte des cellules superficielle des tissus de voie urinaire basse et peut être vides par la miction, tandis que la présence de plus de 3 cellules/ μL d'urine suggère une possible affection tubulaire.
- **Examen quantitatif :** pour confirmer s'il y a une infection bactérienne, le nombre de bactériurie et leucocytaire doit attenter à certaine seule.

Tableau III : Interprétation de résultat de l'ECBU

Leucocytaire	Bactériurie	Culture sur GN	Interprétation de résultat
<10 ⁴ /ml	>10 ³ UFC/ml	Négative	Urine stérile
	≥10 ⁵ UFC/ml	Positive 01 seule espèce bactérienne	Infection récente
≥ 10 ⁴ /ml	<10 ³ UFC/ml	Négative	Infection résolue grâce à un traitement antibiotique, étiologie non bactérienne.
	≥ 10 ³ UFC/ml	Positive 01 seule espèce bactérienne	Infection urinaire confirmée selon l'espèce
		Positive 02 seule espèce bactérienne	Présence d'une contamination ou d'une infection confirmée par un ECBU de contrôle.

I.4.3. Examen microbiologique

I.4.3.1 Examen macroscopique et microscopique de la culture

Après 24h d'incubation à 37°C, les différents résultats positifs obtenus sont résumés dans le tableau (IV) Annexe (03). La plus par des cultures sont mono microbienne et l'examen microscopique révèle la prédominance des bactéries à Gram négatifs (Annexe (03)).

I.4.3.2 Identification biochimique

❖ Les tests d'orientation

Les résultats de test d'oxydase sont illustrés dans l'Annexe (03).

❖ La galerie Api 20 E

L'identification des souches par galerie 20 E a montré qu'ils répondent aux profils numériques spécifiques, comme indiqué dans l'Annexe (05).

I.4.4. Profil bactériologique des infections urinaires

I.4.4.1. Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram

Dans l'ensemble des cultures positives, nous avons identifié 78 souches bactériennes. Les résultats montrent que les bactéries Gram négatif sont la principale catégorie impliquée dans les infections urinaires, représentant 71 des cas par un parentage de 91,02 %. En revanche, les bactéries Gram positif représentaient 6 souche par un pourcentage de 8,97 % des cas.

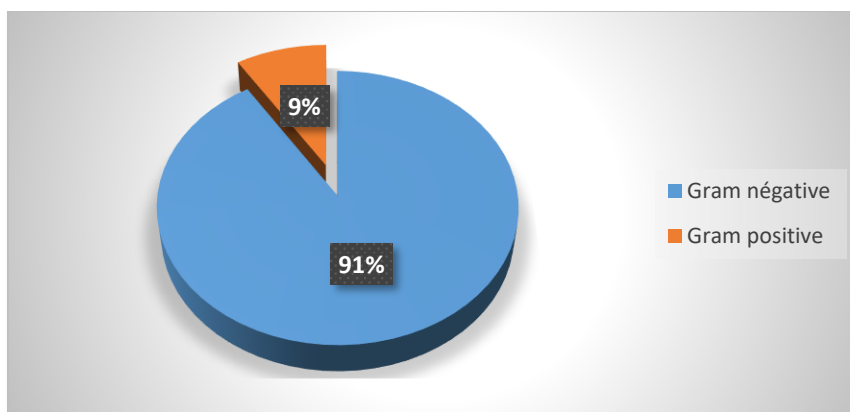


Figure 14: Répartition des germes selon la coloration de Gram

Nos résultats sont semblables à ceux de **Chervet et al.,(2018)** (91% Gram négatives et 9% Gram positives) ; et (**Nakhil et al.,(2019)** (93% Gram positives et 6.5%). Cette prédominance peut être expliquée par leurs capacités à coloniser et infecter les voies urinaires.

I.4.4.2. Répartition des bactéries isolées d'ECBU selon le groupe bactérien

L'ensemble des cultures positives est dominé par les Enterobacteriaceae avec un taux de 88.46% (69 souches), suivis par les Staphylococcaceae avec un pourcentage de 5.12 % (04souches) puis Enterococcaceae avec 3.84 % (03 souche) et le plus faible pourcentage a été noté chez les Pseudomonaceae avec un taux de 2,56% (02 souches) (**Figure (15)**).

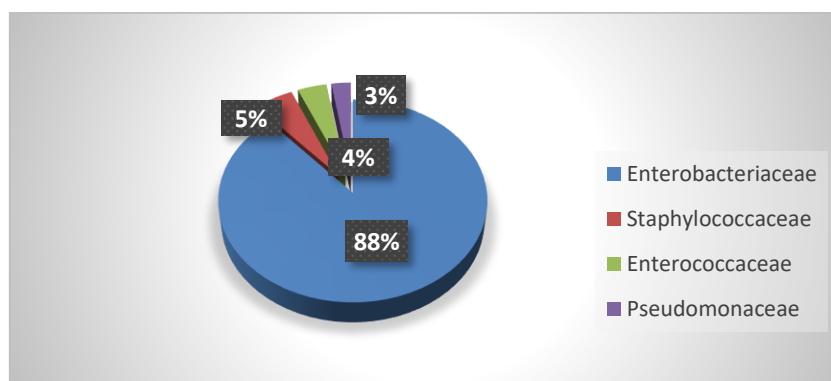


Figure 15: Répartition des bactéries isolées d'ECBU selon le groupe bactérien

Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par **Ben Djilali et al., (2023)** et **Mukubwa et al., (2023)**. Les entérobactéries sont les germes les plus rencontrés et isolés dans la bactériologie clinique, responsables des infections urinaires. En effet, ces germes font partie de la flore périnéale et sont souvent responsables de la majorité des infections urinaires, qui se propagent par ascension dans les voies urinaires.

I.4.4.3. Répartition des bactéries à Gram négative isolées selon l'espèce bactérienne

Parmi les 71 Gram négatifs isolés d'ECBU (Tableau 4), nous avons observé qu'*Escherichia coli* est l'espèce la plus isolée représentant 63.38 % (45 souches) ; suivie de *Klebsiella pneumoniae* avec 16 souches (22.53%), *Proteus mirabilis* avec un taux de 04 souches (5.63%), puis *E. cloacea* et *Pseudomonas aeruginosa* avec 2.81 % (02 souches), *Serratia marcescens* et *Salmonella spp* avec 1.41% (1 souche).

Tableau IV: Répartition des bactéries à Gram négative isolées selon l'espèce bactérienne

Famille/ genre	Espèce	Nombre (%)
Entérobactéries 69 (97.18%)	<i>Escherichia coli</i>	45(63.38%)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16(22.53%)
	<i>Proteus mirabilis</i>	4(5.63%)
	<i>Salmonella spp</i>	1(1.41%)
	<i>Enterobacter cloacea</i>	2(2.81%)
	<i>Serratia marcescens</i>	1(1.41%)
BGNF 02(3%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02(2.81%)
Totale des Gram négatif		71 souche

Cette répartition est globalement comparable à celle retrouvée dans les études de **Yan et al., (2023)** qui ont rapporté un taux de 58.23% d'*E. coli*, 16.47% de *K. pneumoniae* et 6.88% de *Proteus*. En raison de la proximité anatomique de la zone anale avec la région génito-urinaire

chez les humains, une mauvaise hygiène peut justifier la forte incidence d'*E. coli* dans les infections urinaires, car cette bactérie fait partie des coliformes fécaux et peut facilement coloniser les voies urinaires et prédispose aux infections urinaires (Mukubwa et al., 2023).

II. Caractéristiques des patients atteints d'infection purulente

Durant la période de notre stage, nous avons récolté 54 échantillons de pus. Nous considérons comme positifs, les prélèvements qui, après culture sur les différents milieux utilisés, montrent un développement bactérien. Parmi les 54 prélèvements de pus étudiés, 42 se sont avérés positifs, soit un taux de positivité de 77.8%, alors que 12 prélèvements se sont révélés négatifs, soit un pourcentage de 22.2% (Figure (16)).

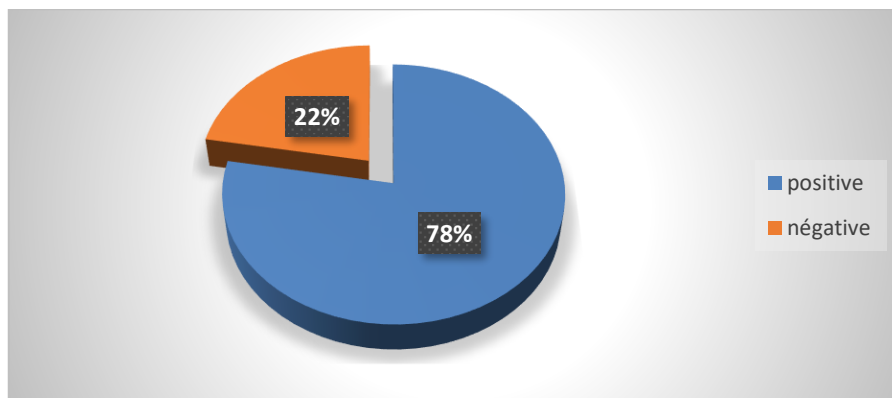


Figure 16: Répartition des prélèvements purulents selon les résultats de cultures

Nos résultats sont proches à ceux de **chaundhary et al., (2019)** ; **Ambreen et al ,(2022)**; **khan et al.,(2018)** et **Batra et al.,(2020)** avec des taux de positivité de 68,5% ; 72 ,5 % ; 65,2% et 85,02 % respectivement.

II.1. Répartition des prélèvements purulents positifs selon le sexe

D'après les résultats de cette étude, le taux de prélèvements purulents positifs chez les patients de sexe féminin (57.1%) est supérieur à celui des patients de sexe masculin (42.9%) (P= 0.2) (Figure (17)).

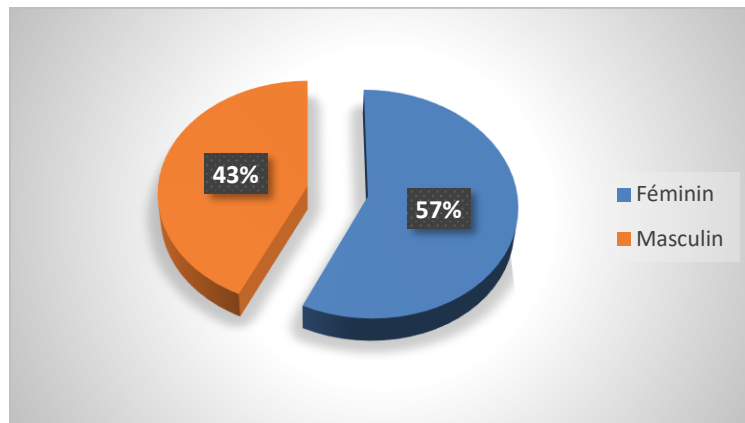


Figure 17: Répartition des prélèvements purulents positifs selon le sexe

Nos données sont en accord avec celles de **pujji et al., (2019)**, **Misha et al.,(2021)**, et **Gupta et al.,(2019)** rapportant la dominance de sexe féminin pour les infections purulentes. Par contre, nos résultats divergent des résultats obtenus par **Batra et al.,(2020)** ; **Mudassar et al.,(2018)** et rapportant une prédominance des infections purulentes chez le sexe masculin. Cette différence pourrait s'expliquer par l'inégalité de la taille de la population étudiée.

II.2. Répartition des prélèvements purulents positifs selon l'âge

La répartition des prélèvements de pus positifs selon l'âge montre que les infections purulentes sont moins fréquentes chez les enfants (11.9%) que chez les adultes (88.1%) (**Figure (18)**).

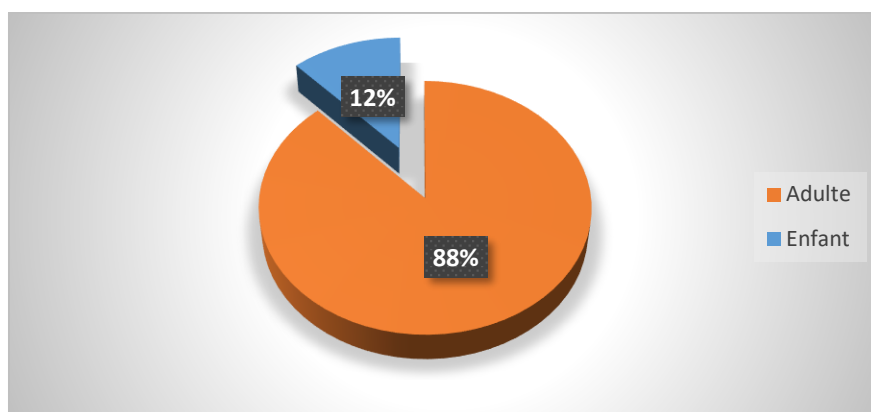


Figure 18: Répartition des prélèvements purulents selon l'âge

Nos résultats sont en accord avec celles de **Amaefule et al., (2019)** et **Yefou et al.,(2022)**. La forte incidence des infections purulentes chez les adultes peut être liée à des modifications physiologiques de leur système immunitaire et à diverses pathologies chroniques associées.

II.3. Répartition des prélèvements purulents positifs selon le service

Les prélèvements externes présentait le taux le plus élevé de positivité de pus avec un pourcentage de 47.6%, suivi par le service de médecine interne, avec un taux de 35.7%. La fréquence la plus faible a été enregistrée au niveau de service de chirurgie 7.1% (**Figure (19)**). La différence des taux de positivité en fonction de service n'était pas statistiquement significative ($p = 0.2$).

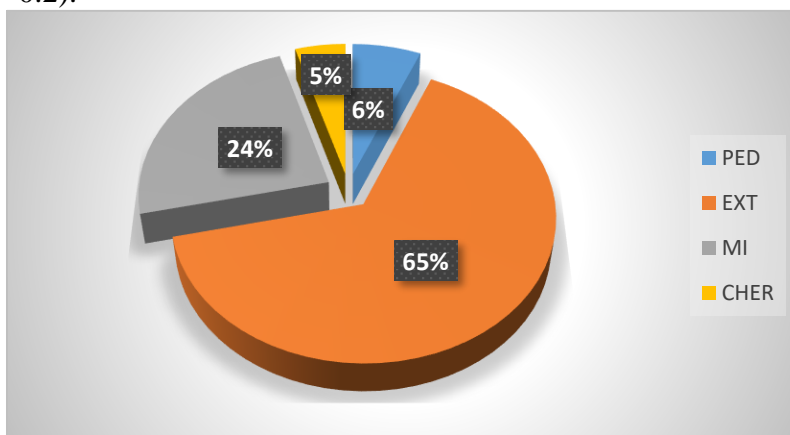


Figure 19: Répartition des prélèvements purulents selon le service

La prédominance de service médecine interne pourrait s'expliquer par la présence des patients immunodéprimés.

II.4. Profil bactériologique des infections purulentes

II.4.1. Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram

Dans l'ensemble des cultures positives, nous avons isolé et identifié 41 germes. Les résultats illustrés dans la figure 34 indiquent que 26 souche (63,4%) du total des isolats sont des bactéries à Gram négatif alors que 15 souches (36,6%)sont des bactéries à Gram positif.

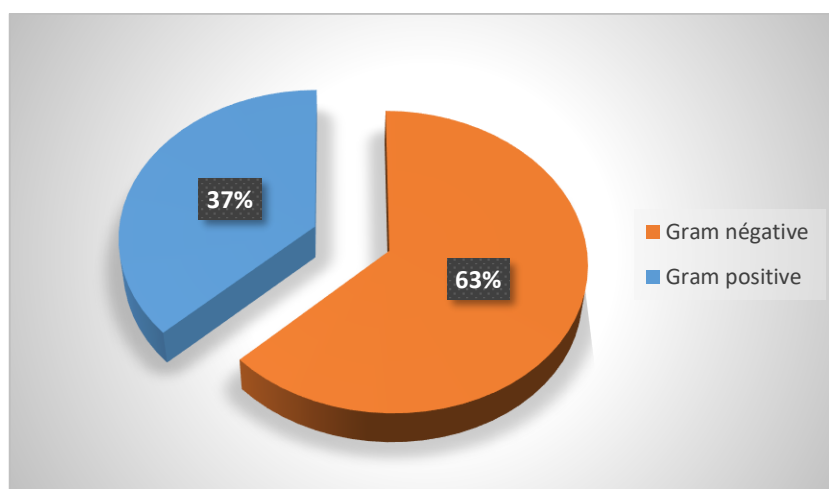


Figure 20: Répartition des isolats bactériens de pus selon la coloration de Gram

Nos résultats sont semblables à ceux de **Batra et al., (2020)** (76.44% Gram négatives et 23.56% Gram positif), **Ambreen et al., (2022)**, (70.96% Gram négatif et 29.23% Gram positif) et **Kanakadurgamba et al., (2021)** (72.8% Gram négatif et 27.2% Gram positif). La prédominance des bactéries Gram-négatives dans les infections purulentes peut être due à une plus grande résistance aux médicaments de ces bactéries par rapport aux isolats Gram-positifs.

II.4.2. Répartition des bactéries isolées selon le groupe bactérien

La répartition des souches isolées des prélèvements purulents selon le groupe bactérien montre que les entérobactéries sont les germes les plus incriminés avec un taux de 51,8% (29 souches), suivis par les staphylocoques avec un taux de 19,6% (11 souches), et les Pseudomonas avec un taux de 19,6% (11 souches), puis les entérocoques avec un taux de 7,1% (04 souches) et des levures (*Candida albicans*) avec un taux de 1,8 % (01 souche).

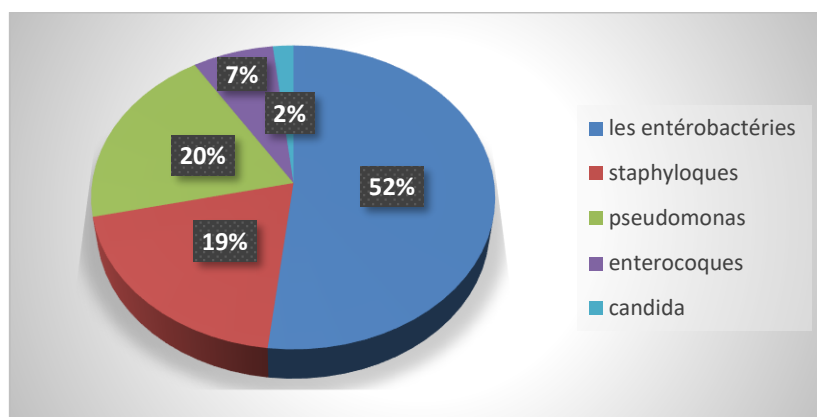


Figure 21: Répartition des bactéries isolées des prélèvements purulents selon le groupe bactérien

Nos résultats sont en concordance avec les résultats de **kanakadurgamba et al., (2021)** et **kumar et al., (2020)** qui ont montré une prédominance des entérobactéries suivi par les staphylococcus. Les espèces de cette famille sont la flore interne de l'intestin. Ils sont responsables d'un grand nombre d'infections locales et hospitalières (**Lee et al., 2017**).

II.4.3. Répartition des bactéries Gram négatives isolées selon l'espèce bactérienne

parmi 41 souches bactéries Gram négatif isolées (Tableau 5), nous avons observé que *Klebsiella pneumoniae* est l'espèce la plus isolée représentant 25% (10 souches) suivie d'*Escherichia coli* avec 08 souches (20%), *Pseudomonas aeruginosa* avec 07 souches (17,5%) et *Proteus mirabilis* avec 05 souches (12,5%), *Acinetobacter baumannii* avec 04 souches (10%)

, *Proteus vulgaris* avec 02 souches (5%) puis *Proteus spp*, *Enterobacter sakazakii*, *Citrobacter braekki*, *Enterobacter aerogenes* avec un taux de 2,5% (01 souche).

Tableau V: Répartition des bactéries isolées selon l'espèce bactérienne

Famille/ genre	Espèce	Nombre (%)
Entérobactéries 29 (72,5%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10(25%)
	<i>Escherichia coli</i>	08(20%)
	<i>Proteus mirabilis</i>	05(12,5%)
	<i>Proteus vulgaris</i>	02(5%)
	<i>Proteus spp</i>	01(2,5%)
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	01(2,5%)
	<i>Citrobacter braekki</i>	01(2,5%)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	01(2,5%)
BGNNF 11 (27,5%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07(17,5%)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	04(10%)
Totale des Gram négatif		41 souches

Nos résultats de la prédominance de *Klebsiella pneumoniae* dans les infections purulentes ont proches à ceux rapportés par plusieurs études : **Mundhada et al ., (2015)** (34,4%) et **Lee et al ., (2017)** (22,8%). *Klebsiella pneumoniae* est l'une des espèces les plus pertinentes sur le plan clinique chez les personnes immunodéprimées responsables des infections nosocomiales et contractées dans la collectivité, y compris les pneumonies, les infections urinaires, les infections purulente, les bactériémies et les abcès du foie (**Lee et al ., 2017**).

III . Profil de résistance des souches isolées de prélèvements purulents et urinaire

II.1. Profil de résistance des Entérobactéries

❖ *Escherichia coli*

Pour les 53 souches isolées, une sensibilité élevée vis-à-vis la Gentamycine (GEN) (75%), Ciprofloxacine(CIP) (67.92%), cefotaxime (CTX) (61 ,67%) a été remarquée. Par contre, une grande résistance a été enregistrée aux : Amoxicilline + Acide clavunalique(AMC) (79,31%), Amoxicilline(AMX) (90%), Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (SXT) (50%) , ainsi que et Acide nalidixique (NA) (66,39%).

Pour les 03 souches d'*E. coli* BLSE positifs, l'antibiogramme a montré une résistance totale à l'Amoxicilline(AMX), Amoxicilline + Acide clavunalique (AMC), Triméthoprime-Sulfaméthoxazol (SXT), Céfotaxime (CTX) et Acide nalidixique (NA). Par contre, ces souches sont sensibles à Ciprofloxacine(CIP) et la Gentamycine (GEN).

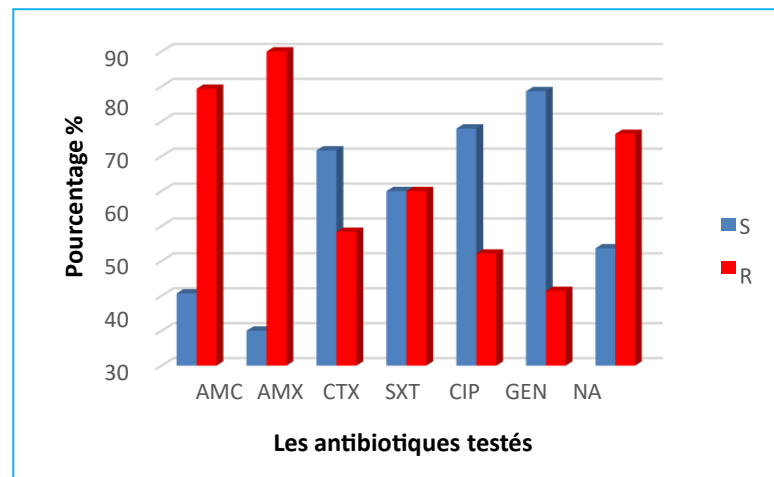


Figure 22: Profil d'antibiorésistance d'*Escherichia coli* isolées

❖ *Klebsiella pneumoniae*

Pour les 26 souches isolées de *Klebsiella pneumoniae*, l'antibiogramme a montré une résistance élevée à Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC) (82,5%), Amoxicilline (AMX) (100%), cefotaxime (CTX) (76,25%), Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT) (53,12%), Acide nalidixique (NA) (53,12%). Par contre, une sensibilité élevée a été enregistrée aux : ciprofloxacine (CIP) (54,38%) et gentamycine (GEN) (70,78%).

Pour la souche de *Klebsiella Pneumoniae* BLSE positifs, l'antibiogramme a montré une résistance totale à l'Amoxicilline (AMX), l'Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC), Cefotaxime (CTX) et ciprofloxacine (CIP). Par contre cette souche est sensible à Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT), Acide nalidixique (NA), et gentamycine (GEN).

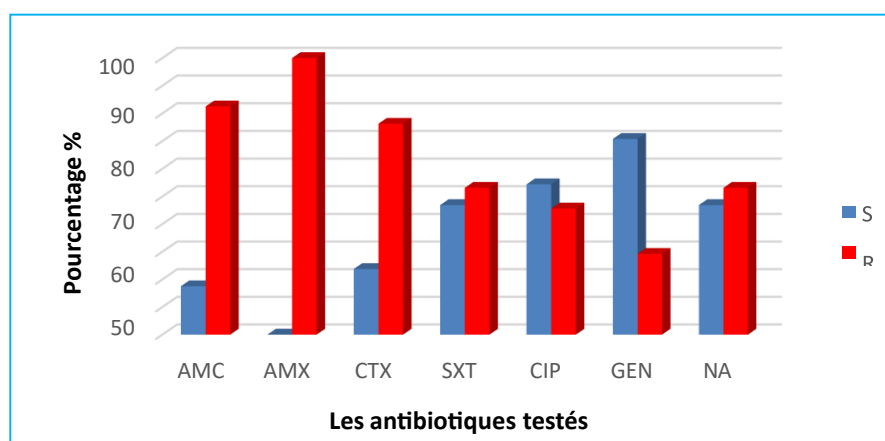
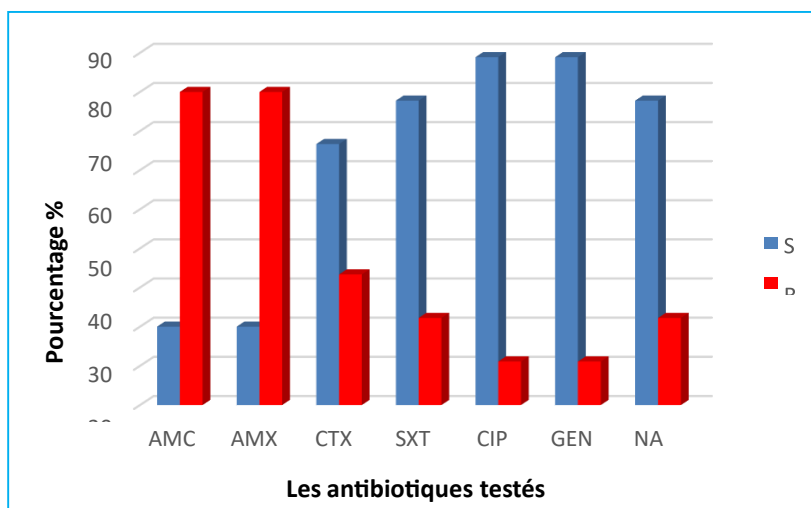


Figure 23: Profil d'antibiorésistance de *Klebsiella pneumoniae* isolées.❖ *Proteus mirabilis*

Pour les 9 souches isolées de *Proteus mirabilis*, l'antibiogramme a montré une résistance élevée à Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC) (80%) et Amoxicilline (AMX) (80%). Par contre, une grande sensibilité a été enregistrée aux Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT) (77,78%), ciprofloxacine (CIP) (88,89%) ainsi que cefotaxime (CTX) (66,67%), gentamycine (GEN) (88,89%) et Acide nalidixique (NA) (80%).

**Figure 24:** Profil d'antibiorésistance de *Proteus mirabilis* isolées.❖ *Proteus vulgaris*

Les deux souches isolées de *Proteus vulgaris* sont totalement résistantes aux Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC), Amoxicilline (AMX) et Acide nalidixique (NA). Les deux souches étaient sensibles aux cefotaxime (CTX) et Gentamycine (GEN), ciprofloxacine (CIP), Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT).

❖ *Enterobacter cloacea*

Pour les deux souches isolées d'*E. cloacea*, l'antibiogramme a montré une résistance totale à l'Amoxicilline et l'Amoxicilline + Acide clavulanique. Par contre, une sensibilité totale était observée vis-à-vis, cefotaxime, Triméthoprim-Sulfaméthoxazole, l'acide nalidixique, Ciprofloxacine, et Gentamycine.

III 2. Profil de résistance des BGNNF

❖ *Pseudomonas aeruginosa*

Les 9 souches isolées de *Pseudomonas aeruginosa* l'antibiogramme a montré une résistance élevée à Ticarcilline (TIC) (88,89%), Ticarcilline + Acide clavunalique(TCC)(100%) Pipéracilline (PIP) (77,78%) et Ceftazidime (CAZ) (100%).et Par contre, une sensibilité élevée a été enregistrée aux : Ciprofloxacine (CIP) (55,56%), Tobramycine (TOB) (88,89%), et Amikacine (AK) (66,67%).

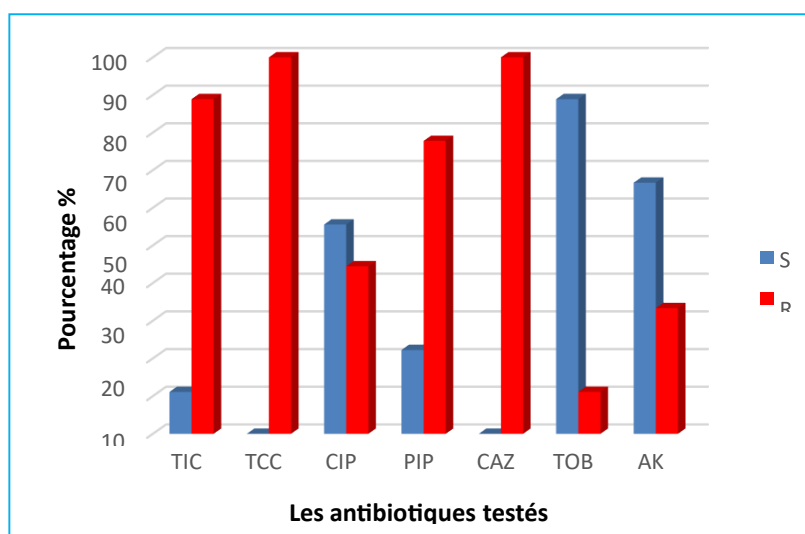


Figure 25: Profil d'antiorésistance de *Pseudomonas aeruginosa* isolées.

❖ *Acinetobacter baumannii*

Pour les 4 souches isolées de *Acinetobacter baumannii* l'antibiogramme a montré une résistance élevée à Ticarcilline (TIC) (100%), Ticarcilline + Acide clavunalique(TCC)(100%), Ciprofloxacine (CIP) (100%) , Pipéracilline (PIP) (100%) Ceftazidime (CAZ) (100%) Tobramycine (TOB) (75%),et Amikacine (AK) (50%).

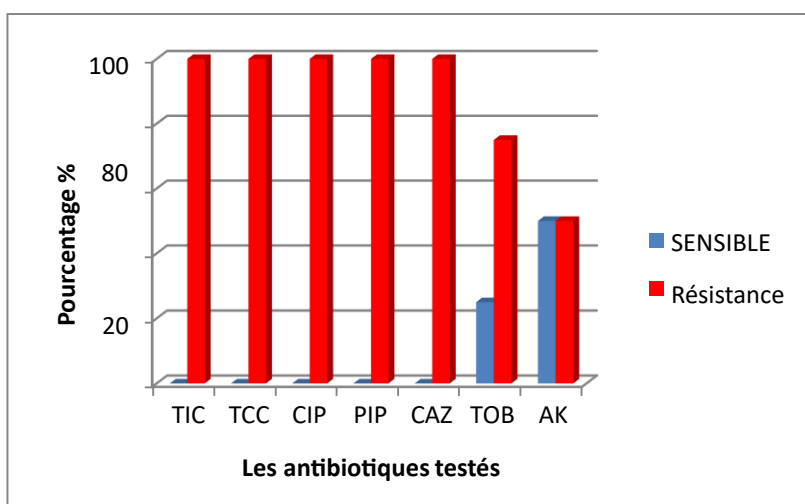


Figure 26: Profil d'antibiorésistance d'*Acinetobacter baumannii* isolées.

L'étude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques a révélé un niveau élevé de résistance pour la plupart des antibiotiques testés. Ce constat, qui est également rapporté dans diverses études, est le résultat de la pression de sélection exercée par la prescription excessive et souvent abusive d'antibiotiques à large spectre, ainsi que de leur utilisation excessive dans les élevages d'animaux destinés à la consommation alimentaire. De plus, la transmission croisée de résistances acquises par des mécanismes plasmidiques contribue également à cette résistance élevée (Moutachakir et al., 2015).

D'après les résultats de notre antibiogramme, nous avons constaté une résistance significative des souches d'*E. coli* à l'ampicilline et à l'amoxicilline + acide clavulanique. Cette résistance est similaire à celle rapportée par Gaudré et al., (2019) (92,3 % et 70% respectivement) et par Zahir et al., (2019) (80 % et 59 % respectivement). La résistance à l'amoxicilline + acide clavulanique peut s'expliquer par une diminution de l'efficacité de l'inhibiteur des bêta-lactamases en raison d'une hyperproduction de pénicillinases, ou par l'inactivation de l'inhibiteur lui-même (Gaudré et al., 2019).

La résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux pénicillinases est innée en raison de la production d'une β -lactamase de classe A par cette bactérie (Vora , 2009), ce qui confirme nos

Résultats. En revanche, *Proteus mirabilis* est naturellement sensible à toutes les β -lactamines. Cependant, l'émergence de la résistance dans nos souches isolées peut être un résultat d'une acquisition de résistance, ce qui permet à cette souche de produire des β -lactamases plasmidiques (Mahamat et al., 2006).

Parmi les bactéries non fermentaires, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* sont fortement impliquées dans la survenue des infections associées aux soins. Ces bactéries montrent une résistance élevée vis-à-vis la Ticarcilline+acide clavulanique, Ticarcilline, Pipéracilline et Ceftazidime. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Koné., (2022) ;Batarseh et al ., (2015) ; El khayari .,et al .,(2012). Par contre, chez *P. aeruginosa*, une sensibilité élevée a été remarquée à la Ciprofloxacine, Tobramycine , et Amikacine, ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Pandeya et al . , (2017).

III.3 Répartition des bactéries multi-résistantes (BMR) dans les prélèvements urinaires et purulentes

41 BMR Gram négatif ont été isolées des prélèvements cliniques étudiés. La répartition des BMR isolées par espèce met en avant *E. coli* et *k. pneumoniae* comme principales pathogènes isolées avec des taux de 46.3% et 34.1% respectivement, suivi par *P. aeruginosa* (7.3%) et *A. baumannii* (4.9%).

Tableau VI: Répartition des BMR Gram négatif par espèce

Famille	Espèce	Nombre (%)	Origine
Entérobactéries (4 BLSE)	<i>E. coli</i>	19 (46.3%)	Urine 24 (58.5%)
	<i>k. pneumoniae</i>	14 (34.1%)	
	<i>P.mirabilis</i>	1(2.4%)	
	<i>Serratia marcescens</i>	1(2.4%)	
	<i>Salmonella spp</i>	1(2.4%)	Pus 17 (41.5%)
BGNF	<i>P. aeruginosa</i>	3(7.3%)	
	<i>A. baumannii</i>	2(4.9%)	

De plus, parmi ces souches, on a trouvé 4 souches BLSE (trois *E. coli* et une *K. pneumoniae*), représentant un pourcentage de 9,7%. Les BLSE aujourd'hui sont des B00MR majoritaires qui sont à l'origine d'infections potentiellement sévères et de prescriptions d'antibiotiques à large spectre, qui menacent l'activité future des molécules de dernière ligne. Leur implication dans les infections communautaire et hospitalier, constitue un réel problème de santé publique (Sbiti et al., 2017). D'après nos résultats, le taux de BLSE qui nous avons montré est proche à la fréquence retrouvée chez lahlou et al., (2009) et cohan et al., (2012) (9% et 10 % respectivement) et assez supérieur à celui trouve chez Mahamat et al., (2018) (4.2%). L'antibiorésistance des souches d'*E. coli* BLSE a mis en évidence des taux de résistance plus élevés à un grand nombre d'antibiotiques en comparaison aux souches d'*E. coli* non productrices de BLSE. Ceci peut être expliqué par le fait que les gènes des BLSE, portés généralement par des plasmides, sont souvent associés à des gènes de résistance aux antibiotiques (Arsalane et al .,2014).

Concernant les BGN-NF, 5 BMR ont été isolée, comprenant 2 souches d'*Acinetobacter baumannii* et 3 souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces bactéries ont la capacité de persister et de résister dans l'environnement hospitalier. Le cumul de facteurs de résistance chez ces bactéries conduit rapidement à une impasse thérapeutique, ce qui explique les taux de résistance

observés.

IV .1. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

IV.1.1 Rendement en l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne fraîche de la plante *Salvia officinalis* a permis d'obtenir un rendement de 0.5%. Ce résultat est proche à celui rapporté par **Djousse et al. , (2022)** en Ouest-Cameroun (0.53 %), et à celui de **DIF et al.,(2015)** qui est de (0.42%). Cependant, ce rendement est nettement supérieur à ceux rapportés par **Boutebouhart et al.,(2019)** (0,22%), tandis qu'il est inférieur à celui rapporté par **Mattazi et al. ,(2015)** en Maroc (1.97%), ainsi à celui de **Boutebouhart et al., (2019)** qui est estimé à (0,99%).

Cette variation observée sur les rendements peut être attribué à l'origine de la plante mais aussi à l'imbrication d'une multitude de facteur tel que la température, l'humidité, la durée totale d'insolation, le régime des vents, l'apport des engrais organique et/ou minéraux et aux méthodes d'extraction ainsi que la période de récolte, l'âge de la plante et le cycle végétatif (**Djousse et al.,2022**).

IV .2. Résultats de l'étude analytique de l'huile analytique de *Salvia officinalis*

IV .2.1 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

Tableau VII: Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de la sauge.

Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Limpide, fluide et mobile
	Couleur	Incolore à jaunepale
	Odeur	Caractéristique, acidulée, très aromatique.

Les propriétés physiques et organoleptiques sont considérées comme étant des critères de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Nos résultats montrent que les paramètres organoleptiques de notre huile essentielle sont conformes aux normes AFNOR.

IV .2. 2 Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

Les résultats de l'identification des composés après l'analyse CG/SM sont regroupés dans le **tableau (VIII)**. Notre étude a été axée sur les composés volatiles majoritaires de l'HE tandis que les molécules ayant des fragments de masse inférieure à 2% n'ont pas été rapportées. Nos résultats montrent que l'huile essentielle de la sauge est composée majoritairement du : beta thujone (23.3%), 1,8 cinéol (16.01%), le camphore (15.45%) ainsi que l'alpha thujone (7.42 %)

Tableau VIII: Composition chimique de l'HE de *Salvia officinalis* identifiée par CG/SM.

N°	Temps de rétention	Composant	Pourcentage
1	5.333	Camphène	2.99%
2	6.391	Beta-pinène	3.684%
3	9.386	1,8-cineol	16.01%
4	14.495	Bêta-thujone	23.31%
5	15.061	Alpha-thujone	7.42%
6	16.816	Camphor	15.47%
7	44.833	Veridiflorole	4.67%

Nos résultats sont approximativement comparables à ceux de **Boutebouhart et al.,(2019)** qui ont trouvés une prédominance des composants 1,8 cinéol, alpha thujone, beta thujone ainsi que le camphor avec des proportions égales à (11%), (5.65%), (15.8%), (10.7%) respectivement. En revanche, la composition chimique de l'huile essentielle étudiée diffère totalement de celles précédemment publiées par d'autres études et affiche un profil chimique de l'huile essentielle très fluctuant (**Mettazi et al., 2015 ; Joshi et al., 2021 ; Benkherara et al., 2015**).

Cette divergence dans les résultats explique le rôle que peuvent jouer les facteurs environnementaux et climatiques sur la composition biochimique et sur la qualité d'extrait de l'espèce végétale (**Benkherara et al., 2015**).

IV.3. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* a été réalisée *in vitro* sur des souches bactériennes, Gram négatif, isolées cliniquement. Au total, 29 bactéries ont été étudiées dont 13 étaient des BMR. Les résultats de l'effet antibactérien sont rapportés dans le **Tableau (IX)**.

Tableau IX: Screening antibactérien de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

souches bactériennes	DZI (20 µl)	Origine de prélèvement
<i>E. coli</i> (S1)	15mm	U
<i>E. coli</i> (S2)	16mm	U
<i>E. coli</i> (S3)	18mm	U

<i>E. coli</i> (S4) BMR	15 mm	P
<i>E. coli</i> (S5)	18mm	U
<i>E. coli</i> (S6) BMR	11mm	P
<i>E. coli</i> (S7) BMR	10mm	U
<i>E. coli</i> (S8) BMR	12mm	U
<i>E. coli</i> (S9) BMR BLSE +	12mm	P
<i>K. pneumoniae</i> (S1)	15mm	U
<i>K. pneumoniae</i> (S2)	16mm	U
<i>K. pneumoniae</i> (S3) BMR	9mm	U
<i>K. pneumoniae</i> (S4) BMR	11mm	U
<i>K. pneumoniae</i> (S5)	9mm	U
<i>K. pneumoniae</i> (S6)	15mm	P
<i>K. pneumoniae</i> (S7) BMR	7mm	P
<i>Proteus mirabilis</i> (S1)	16mm	P
<i>P. mirabilis</i> (S2)	18mm	P
<i>P. vulgaris</i> (S3)	12mm	P
<i>A. baumannii</i> (S1) BMR	51mm	P
<i>A. baumannii</i> (S2) BMR	40mm	P
<i>A. baumannii</i> (S3)	36mm	P
<i>Enterobacter cloacea</i>	11mm	U
<i>Serratia marcescens</i>	R	U
<i>Salmonella spp</i>	24mm	U
<i>P.aeruginosa</i> (S1) BMR	R	U
<i>P.aeruginosa</i> (S2) BMR	R	P
<i>P. aeruginosa</i> (S3)	7mm	P
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	9mm	27853

- **U** = urine
- **P** = pus

D'après le **tableau (IX)**, nous pouvons constater que la quasi-totalité des souches bactériennes étudiées sont sensibles vis-à-vis l'huile essentielle de *S. officinalis*. Les résultats ont rapporté des diamètres de zone d'inhibition (DZI) variant entre 7 et 30 mm.

Cependant, cette huile a présenté une action inhibitrice importante contre les souches de *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp* et les souches d'*E. coli* sensibles aux ATB avec des zones d'inhibition allant de 16 à 25mm de diamètres, et une activité intermédiaire estimé de (10 à 15mm) pour les souches *Enterobacter cloacea*, *Proteus vulgarise* les souches de *Klebsiella pneumoniae* sensibles aux ATB, ainsi que les souches d'*E. coli* résistantes aux ATB (*E. coli* BMR).

Par ailleurs, toutes les souches de *P. aeruginosa*, et *Serratia marcescens*, ainsi que les souches de *K. pneumoniae* résistantes face aux ATB (*K. pneumoniae* BMR) sont apparus résistants vis-à-vis l'huile étudiée. Et ce qui a retenu notre attention parmi les résultats obtenues est les souches *Acinetobacter baumannii* réputés par leur résistance face à la plupart des ATB, elles se sont révélé ici très sensibles par rapport aux autres souches testées, avec des DZI attendre jusqu'à > 30mm. Cela a été également rapporté dans les résultats de **Chahboun et al. , (2015)** avec l'huile essentielle de (*Lavandula officinallis*).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par de nombreux chercheurs, notamment ceux réalisés par **Benkherara et al., (2011)** qui ont obtenus une activité très efficace de l'HE de *Salvia officinalis* contre les souches d'*E. coli* et les souches de *Proteus mirabilis*, et ceux de **d'Aïste et al ., (2022)** qui ont trouvé que l'HE de la sauge est potentiellement efficace pour supprimer la croissance bactérienne des souches *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, et les souche de *P. vulgaris* avec une gamme de zones d'inhibition de 12.5 à 17.9mm . De même, **Derradji et al ., (2020)** ont affirmé que les souches de *Serratia* et *P. aeruginosa* se sont révélés résistants vis-à-vis l'HE de la sauge.

Cette importante bio-activité de l'HE testée contre les microorganismes utilisés dans cette étude peut être attribuée à la présence de certain composé tel que 1,8-cinéole, Camphen, (**Tohidpour et al. ,2010**), ainsi que α , β -thujone ayant un potentiel antibactérien (**Zemboriné et al .,2020**) .Ces composés phénoliques causent des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassium, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation da la force proton motrice

et une dénaturation des protéines intracellulaires (**Bakkali et al . ,2008 ; Burt ,2004**). Il est également probable que cette activité antibactérienne n'est pas due à la présence des substances majoritaires seulement, mais sont le résultat d'une action synergique entre divers structures aromatiques (**Delaquis et al . , 2002**) . En plus de ces composés majoritaires, les composés mineurs peuvent contribuer significativement à l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

D'autre part, la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux HE n'est pas surprenant du fait que ces souches possèdent une résistance intrinsèque à une vaste gamme de biocides, associée à la nature de leur membrane externe, qui permet la synthèse d'agrégats structurés appelés biofilm. Ces derniers constituent une barrière physique contre l'entrée d'agents antimicrobiens et elle secrète également un complexe enzymatique extracellulaire capable de décomposer les huiles essentielles (**Maoz et al., 2000**).

VI.4 Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La gamme de dilution en HE utilisée lors de cette étude varie entre 2% et 0.03%. Les résultats CMI obtenus sont représentés par le tableau ci-dessous.

Tableau X: Concentrations minimales inhibitrices de l'HE de *Salvia officinalis*

Souche bactérienne	CMI (%)
<i>E. coli</i> (S1), (S2), (S3) , (S4), (S5)	0.5
<i>E. coli</i> (S6), (S7), (S8), (S9) BMR	2
<i>K. pneumonia</i> (S1) ; (S2) ,(S6)	1
<i>P.mirabilis</i> (S1)et (S2)	0.5
<i>P. vulgaris</i> (S3)	2
<i>A. baumannii</i> (S1),(S2)BMR, (S3)	0.125
<i>Salmonellala spp</i>	0.25

Les résultats de notre analyse ont révélé que les souches testées présentaient des concentrations minimales inhibitrices (CMI) variant entre 0,125 % à 2%. Plusieurs études ont démontré que cette huile possède une activité antibactérienne avérée mais la concentration nécessaire pour inhiber les germes varie en fonction des souches bactériennes. Il est important de noter qu'il est difficile, voire problématique, de comparer les valeurs de CMI entre différentes publications. D'une part, la composition chimique de l'huile essentielle de sauge est influencée par divers facteurs, ce qui peut entraîner des variations entre les différentes études (**soucade., 2018**). D'autre part, il n'existe pas de méthode universelle et précise permettant d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles

essentiels (**Fontanay et al., 2015**), de plus le choix des germes diffère d'une étude à l'autre. De même, les résultats sont exprimés avec différentes unités, telles que mg/ml, µl/ml ou % ce qui rend la comparaison des résultats difficile entre eux.



Conclusion

Conclusion

Notre travail a permis d'une part : d'identifier les différentes espèces bactériennes Gram négatif incriminées dans les infections urinaires et purulentes, et d'établir leur profil de sensibilité vis-à-vis les antibiotiques couramment utilisé dans l'EPH de Faubourg, et d'autre part l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE de *Salvia officinalis* sur les souches isolées. A la lumière des résultats obtenus, il en sort que :

- La prévalence des infections urinaires et des infections purulentes était de 15.5% et 67.92 % respectivement, avec une prédominance de sexe féminin (59%, 71.1%) et de sujet adulte (80.8%, 88.1%).
- 71 souches bactériennes Gram négatif ont été isolées des ECBU. Les résultats des prélèvements urinaires montrent une prédominance des entérobactéries dont 45 souches appartenant à *Escherichia coli*, 16 souches à *Klebsiella pneumoniae* et 4 souches à *Proteus mirabilis*.
- L'examen cytotobactériologique des prélèvements purulents nous a permis d'isoler 41 bactéries Gram négatif avec une prédominance des entérobactéries. Les espèces les plus isolées étaient *Klebsiella pneumoniae* (10 souches), *Escherichia coli* (8 souches) *Pseudomonas aeruginosa* (7 souches) et *Proteus mirabilis* (5 souches).
- Les résultats de l'antibiogramme ont enregistré la sensibilité de la plupart des bactéries aux Aminosides et Fluoroquinolones chez les entérobactéries et les Aminosides chez les pseudomonas, alors que le niveau de résistance acquise aux ATB devient plus élevé pour certains autres notamment Aminopénicilline et quinolones de première génération chez les entérobactéries, et Carboxypénicillines, Pénicillines et Céphalosporine de 3^{ème} génération chez les BGNNF.
- L'extraction de *Salvia officinalis* a montré qu'elle possède un rendement de 0.5 %. La composition chimique de l'HE a été faite par CG-SM et a révélé les principaux composants, dits majoritaires : bêta-thujone (23.3%), 1,8 cinéol (16.01%), le camphore (15.45%) ainsi que l'alpha thujone (7.42 %).
- Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *S. officinalis* a révélé qu'elle possède un important pouvoir antibactérien important contre la majorité des bactéries Gram négatif testées avec un DZI variant entre 7 et 51 mm. Les souches *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella sp*, *Proteus mirabilis*, et *E. coli* étaient les plus sensibles alors que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marscecence* se sont révélés résistantes vis-à-vis l'HE de la sauge.

En perspective, il serait intéressant de mener une étude approfondie afin d'identifier les molécules responsables de cette activité antimicrobienne. Il conviendrait également d'élargir la gamme des souches étudiées et d'explorer l'utilisation de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* en synergie avec d'autres huiles pour potentialiser son effet antibactérien. Une augmentation de la dose d'huile essentielle pourrait être envisagée afin de déterminer la relation dose-effet. Par ailleurs, il serait bénéfique d'étudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes, telles que leurs propriétés anti-inflammatoires, antivirales, antiparasitaires, et autres.



Référence
bibliographique

-A-

- **Abdouchakour, F., Dupont, C., Grau, D., Aujoulat, F., Mournetas, P., Marchandin, H., ... & Jumas-Bilak, E.** (2015). *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. clonal selection leads to successive waves of contamination of water in dental care units. *Applied and environmental microbiology*, 81(21), 7509-7524.
- **AFNOR**, Paris. AFNOR, Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6 ED, AFNOR, Paris. NF T 75-006 AFNOR, 2000
- **Aiste ,B.,Mindaugas ,L ., Viktorija ,P., Jonas ,V ., Valdimaras ,J . , Pranas V., Egidijus ,G .,Virginija ,J.**2022 .Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Application as an Antioxidant and Antimicrobial Agent .
- **Amady, S. Y., Diop,O., MBODJI, M., FAYE, M., FAYE, F. A., NDIAYE, F., ... & FAYE, N.** (2021). Profil de résistance aux bêta-lactamines des entérobactéries uropathogènes isolées dans le laboratoire de biologie médicale du Centre Hospitalier Régional de Thiès. *Revue Africaine de Médecine Interne*, 8(1), 39-47.
- **Amaefule, K. E., Dahiru, I. L., Okpe, I. O., Aliyu, S., & Aruna, A. A.** (2019). Clinico-microbial profile of diabetic foot infections in Zaria, North-West Nigeria. *Sahel Medical Journal*, 22(1), 28.
- **Ambreen, F., Gohar, H., Dawood, K., Siddiqui, H. Z., Sajjad, M., & Naseem, S.** (2022). Bacteriological Profile and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Pus Isolates from Tertiary Care Hospital. *Journal of Liaquat University of Medical & Health Sciences*, 21(03), 190-195.
- **Anglaret X, Mortier E.,** 2002. *Maladies infectieuses*, 3 ème édition, Paris, De BoeckEstem, 292 p
- **Anton, R., Teuscher, E., & Lobstein, A.** (2005). *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles* (p. 552). Tec & Doc.

-B-

- **BAKKALI, F., AVERBECK, S., & AVERBECK, D.** (2008). Biological effectis of essential oils. *Food and Chemical Toxilology*.
- **Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., & Zupancic, A.** (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology*, 75(2-3), 125-132.
- **Barrier Letertre C.** (2014). Thèse de Docteur en Pharmacie, Infections urinaires chez les personnes âgées, Université Angers, Rennes.
- **Batarseh, A., Al-Sarhan, A., Maayteh, M., Al-Khatirei, S., & Alarmouti, M.** (2016). Antibiogram of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical specimens at King Hussein Medical Centre, Jordan: a retrospective analysis. *East Mediterr Health J*, 21(11), 828-34
- **Batra, S., Balothia, V., Agarwal, S., & Sharma, R.** (2020). Bacteriological profile and antimicrobial susceptibility pattern of pus culture isolates from a tertiary care

- hospital, SMS Medical College Jaipur. European Journal of Molecular & Clinical Medicine (EJMCM), 7(11).
- **Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., Khedher, M.** (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 69, 393–403
 - **Ben Kheder, M. R. Ben Khedher, S. Ben Kheder, I. Chaieb**(2017). Chemical Composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia”. *EXCLI Journal*, vol 16, pp : 160-173.
 - **Bendjilali-Sabiani, J. J., Aïn, C., Pantel, A., & Poujol, H.** (2023). Colonisation urinaire et antibiothérapie : évaluation des pratiques dans un centre hospitalier universitaire. *Médecine et Maladies Infectieuses Formation*, 2(2), P42.
 - **Benkherara, S., Bordjiba, O., & Djahra, A. B.** (2011). Etude de l’activité antibactérienne des huiles essentielles de la Saugue officinale : *Salvia officinalis* L. sur quelques entérobactéries pathogènes. *Synthèse : Revue des Sciences et de la Technologie*, 23, 72-80.
 - **Boris Merlain ,K., DJOUSSE, F. , Henri G. ,DJOUKENG , L., Nono , H. ,SOGANG, K.**2022.Cameroon Journal of Biological and Biochemical Sciences, Vol 30, Serie 2, 121-133
 - **Bouguenoun W.** (2017). Etude de résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l’environnement hospitalier de la région de GUELMA. Thèse de doctorat d’état, université Badji Mokhtar, Annaba, 218 p.
 - **Boutebouhart, H., Didaoui, L., Tata, S., & Sabaou, N.** (2019). Effect of extraction and drying method on chemical composition, and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from *Salvia officinalis* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(3), 717-727.
 - **Brissot, E., Villate, A., Alsuliman, T., Beauvais, D., Bonnin, A., Mear, J. B., ... & Bazarbachi, A.** (2020). Dépistage des bactéries multirésistantes (BMR) et hautement résistantes émergentes (BHRe) aux antibiotiques en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bulletin du Cancer*, 107(1), S7-S11.
 - *British Pharmaceutical Codex* (1979) 11th Edition, the Pharmaceutical Press, London. p 791.
 - **Burt, S.** (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253. Composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia”. *EXCLI Journal*, vol 16, pp : 160-173.

Référence bibliographique

- **Cattoir, V.** (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*, 52(10), 607–616
- **Chahboun, N., Esmail, A., Abed, H., Barrahi, M., Amiyare, R., Berrabeh, M., ... & Ouhssine, M.** (2015). Evaluation de l'activité bactériostatique d'huile essentielle de la *Lavandula Officinalis* vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques. *J. Materials Environ. Sci*, 6(4), 1186-1191.
- **Chaudhary, N. A., Munawar, M. D., Khan, M. T., Rehan, K., Sadiq, A., Bhatti, H. W., & Rizvi, Z. A.** (2019). Epidemiology, bacteriological profile, and antibiotic sensitivity pattern of burn wounds in the burn unit of a tertiary care hospital. *Cureus*, 11(6).
- **Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., & Ed-Dra, A.** (2016). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*, 14(6), 355-362.
- **Chervet, D., Lortholary, O., Zahar, J. R., Dufougeray, A., Pilmis, B., & Partouche, H.** (2018). Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections in Paris in 2015. *Medecine et maladies infectieuses*, 48(3), 188-192.
- **Church, D. L., Procop, G. W., Hall, G. S., Janda, W. M.** (2020). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. États-Unis : Jones & Bartlett Learning. Chapitre 7 the non fermenté gram –négative bacille.
- **CLSI** (2006): Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. Seventh Edition. CLSI document M7-A7 (ISBN 1-56238-587-9). 26 (2): 31 pages.
- **Cohen, R., Gillet, Y., & Faye, A.** (2012). Synthèse de la prise en charge des infections urinaires de l'enfant. *Archives de Pédiatrie*, 19, 124–128

-D-

- **Dekaia, A.** (2012). Infections nosocomiales (2). *Réanimation*, 22, S210-S213.
- **Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G.** (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 101-109.
- **Denis F, Le Hello S, Barraud O.** (2016).. Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-
• *officinalis* *L.Melissa officinalis* anaérobies. In: *Bactériologie Médicale*. Elsevier;. p. 301- 87
- **Derradji L., Saidi O., Hadeff Y.**, 2020. Evaluation of the antibacterial activity of three essential oils extracted from plants used in traditional medicine in Algeria (*Salvia L* and *Origanum vulgare L*). *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 181-188.
- **Diene, S. M** (2012) Analyse génomique et moléculaire d'isolats cliniques de bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Thèse pour l'obtention de doctorat en Pathologie humaine, Marseille : Université Aix Marseille

Référence bibliographique

- **Dif S., Stella Abdul Hussain M., Saidi F., Khali M.,** 2015. Activité antimicrobienne des huiles essentielles et l'extrait méthanolique de *Salvia officinalis* L. Afrique Science, 11(4)

-E-

- **El bouamri MC.** (2017). Etude épidémiologique-moléculaire des Entérobactéries productrices de β lactamases à spectre élargi au CHU de Marrakech. Thèse de Doctorat : Faculté de Médecine et de Pharmacie. Rabat, Maroc : université Mohammed V, 131p.

-F-

- **Fauchère J. L. et Avril J. L.** (2002). Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. Paris.368P.
- **Fechkeur Y and Thibault M.** 1998. Acinetobacter: aspect bactériologique, habitat, pouvoir pathogène et sensibilité aux antibiotiques. Feuillet de Biologie, 1998. 39(222) : 39-4
- **Fontanay, S., Mougenot, M. E., & Duval, R. E.** (2015). Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*, 5(2), 109-118.

-G-

- **Gaudré, N., Drame, B. S., Poudiogo, A., Kassogué, A., Koné, H., & Diarra, A.** (2019). Profil de résistance aux bêta-lactamines des entérobactéries isolées des prélèvements urinaires à l'Hôpital du Mali. 14 (2)
- **Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M.** (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(4), 433-440.
- **Gill, M. K., & Sharma, S.** (2019). Bacteriological profile and antibiotic sensitivity patterns of aerobic pus isolates: A study conducted in tertiary care hospital of North India. *Int J Med Microbiol Trop Dis*, 5(2), 99-102
- **González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S., & Tunon, M. J.** (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, 22(3), 287-293
- **Gupta, M., Naik, A. K., & Singh, S. K.** (2019). Bacteriological profile and antimicrobial resistance patterns of burn wound infections in a tertiary care hospital. *Heliyon*, 5(12).

-H-

- **Hedge, I. C.** (1972). *Flora Europaea* In : Tutin TG, Heywood VH, Burgess NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds.), *Salvia* L. vol 20 P237--237

Référence bibliographique

- **Hidri N.** Identification d'Acinetobacter spp. au laboratoire. Revue Francophone des Laboratoires, 2012. 441: 37-42.
- **Horvathova E., Srancikova A., Regendova-Sedlackova E., et al.** (2016). Enriching the drinking water of rats with extracts of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* increases their resistance to oxidative stress. *Mutagenesis*.31 : 51-5.

-I-

- **Ishrat, A., Sharma, S. S., & Choudhary, S.** (2022). The burden of recurrent urinary tract infections in patients attending a tertiary care hospital in Northern India.11(1),P 4.

-J-

- **Jakovljevi, M., Joki, S., Molnar, M., Jaši, M., Babic, J., Juki, H. and In Banjari.** (2019).Bioactive Profile of Various *Salvia officinalis* L. Preparations, *Plants* 2019, 8, 55.
- **Joly B. et Reynaud A.** (2002). Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. Ed TEC & DOC et Ed médicales Inter Nationales. Paris. 356P.
- **Joshi, S., Pandey, R. D., Bhattarai, R., & Gharti, B. B.** (2021). Antimicrobial activity of essential oil and crude organic extracts of *Salvia officinalis* L. leaves from Nepal. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 6(2).

-K-

- **Kanakadurgamba, T., Koripella, R. L., Gowtham, B., & Peddapalli, A. R.** (2021). Study of Aerobic Bacterial Etiology and Their Antibigram from Pus Samples in a Tertiary Care Hospital.
- **Khan, R. A., Jawaid, M., & Khaleel, M.** (2018). Bacteriological profile and antibiogram of isolates from pus samples in a tertiary care centre. *Int J CurrMicrobiol App Sci*, 7(01), 387-394.
- **Khirdline, H.** (2013). comprimés de poudre de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie. these magister. université M'Hamed Bougara.p : 11-13
- **Kumar, M., Lakra, N., Sharma, A. K., Prasad, A., & Seema, K.** (2020). Bacterial Profile and Antibiogram of Pus Isolates in a Tertiary Care Hospital. *Culture*, 60, 39-45.
- **Kumari, D, T. S. H., & Amausi, L.** Isolation of bacteria from pus samples and antibiotic sensitivity pattern in a tertiary care hospital, Lucknow.

-L-

- **Lahlou, A., Chegri, M., & L'Kassmi, H.** (2009). Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires à l'hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès. *Antibiotiques*, 11(2), 90–96.
- **Lavigne, J. P ; Bouziges, N ; Daurès, J. P et Sotto, A** (2006) Profils de résistance des souches urinaires de *Proteus mirabilis* de 1999 à 2005 au CHU de Nîmes. *Pathologie biologie*, 54(8-9), P 460.

Référence bibliographique

- **Le Minor I, Veron N.** (1989). Bactériologie Médicale Med. Science, Edition Flammarion Paris, 333- 318 ; 773-823.
- **Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., Kim, Y. B., Cha, C. J., ... & Lee, S. H.** (2017). Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 483.

-M-

- **Malani, P. N.** (2010). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Jama*, 304(18), 2067-2071.
- **Maoz, M., & Neeman, I.** (2000). Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 479-482.
- **Martins, A.** (2020). Les huiles essentielles antibactériennes : exemple du thym (thymus). Thèse de Doctorat en pharmacie .p30.
- **Mattazi, N., Abdellah, Farah., Mouhcine, F., Chraïbi., & Benbrahim, K. F.** (2015). Essential oils analysis and antibacterial activity of the leaves of *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Mentha piperita* cultivated in Agadir (Morocco). *Int J Pharm Pharm Sci*, 7(9), 73-9.
- **Moutachakir, M., Chinbo, M., Elkhoudri, N., & Soraa, N.** (2015). La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries uropathogènes en milieu pédiatrique au CHU de Marrakech. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 28(1), 16-22.
- **Mudassar, S., Khan, S. W., Ali, M., & Mahmood, F.** (2018). Aerobic bacteriological profile and antimicrobial susceptibility pattern of pus isolates in a teaching hospital, Lahore, Pakistan. *Int J Contemp Med Res*, 5(4), D1-3.
- **Mukubwa, G. K., Lukusa, F. N., Kavulikirwa, O. K., Liesse, J. I., Tshilolo, L. M., & Memvanga, P. B.** (2023). Resistance profiles of urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates to antibiotics commonly prescribed for treatment of urinary tract infections at Monkole Hospital Center, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 24(1), 51-60..
- **Mundhada, S. G., Waghmare, P. H., Rathod, P. G., & Ingole, K. V.** (2015). Bacterial and fungal profile of burn wound infections in Tertiary Care Center. *Indian Journal of Burns*, 23(1), 71.
- **Muylaert, A., & Mainil, J.** (2013). Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur " contagiosité". In *Annales de Médecine vétérinaire* (Vol. 156). ULg-Université de Liège, Liège, Belgium.
- **Mwangi, J., Yin, Y., Wang, G., Yang, M., Li, Y., Zhang, Z., & Lai, R.** (2019). The antimicrobial peptide ZY4 combat multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(52), 26516-26522.

-N-

- **Nakhli, R., Rada, R., Arsalane, L., Zouhair, S., & El Kamouni, Y.** (2022). Bacteriological Profile of Urinary Tract Infections at the Avicenne Military Hospital in Marrakech. *Saudi J Pathol Microbiol*, 7(2), 90-97.

-O-

- **Ozenda, P.** (2006). *Les végétaux, organisation et diversité biologique*. 2ème Edition, Dunod, Paris. 516 P.

-P-

- **Pandeya, U., Raut, M., Bhattarai, S., Bhatt, P. R., & Dahal, P. R.** (2017). Bacteriological profile and antibiogram of bacterial isolates from pus samples in tertiary care hospital of Kathmandu. *Tribhuvan Univ J Microbiol*, 4, 55-62.
- **Perriere, G.** (1992). Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation certains aspects de l'expression des gènes chez E. coli UCBL. Thèse doctorat. Université de Lyon I. France. 135p.
- **Pujji, O. J. S., Nakarmi, K. K., Shrestha, B., Rai, S. M., & Jeffery, S. L. A.** (2019). The bacteriological profile of burn wound infections at a tertiary burns center in Nepal. *Journal of Burn Care & Research*, 40(6), 838-845.

-Q-

- **Quevauvillier J., Perlemuter L., Perlemuter G., Amar B. et Aubert L.** (2001). *Nouveaux cahiers de l'infirmière*. Ed. Masson. 284 P.
- **Quezel, P., Santa, S.** (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome 2ème Ed: C.N.R.S, Paris. 1107P.

-R-

- **Rodriguez-Villalobos H and Struelens MJ.** 2006. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation*, 2006. 15(3): 205-213

-S-

- **Šilić, Č.** (1983). *Atlas drveća i grmlja*. Ed. 188 P.
- **Souaed. M.** (2018) activité antimicrobienne de quelques souches médicinales et amélioration de leur production en culture in vitro. Thèse de doctorat. Université ARBI BEN M'HIDI Oum el Baoughi P -53.

-T-

- **Toyokuni S.** (2016). Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. *Arch BiochemBiophys.* 595: 46-49.
- **Toure, D.** (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre Plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de Doctorat. Organic chemistry. Université Felix Houphoet Boigny, Côte d'Ivoire, French P -23.
- **Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., & Nazemi, J.** (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Phytomedicine*, 17(2), 142-145

-V-

- **Vodovar, D., Marcadé, G., Raskine, L., Malissin, I., & Mégarbane, B.** (2013). Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : épidémiologie, facteurs de risque et mesures de prévention. *La Revue de médecine interne*, 34(11), 687-693.
- **Vallée, M., Lafforest, S., Magnier, A., Le Goux, C., Zahar, J. R., Sotto, A., ... & Grammatico-Guillon, L.** (2022). Incidence des infections urinaires hospitalisées en France : une cohorte PMSI. *Santé Publique*, 34(HS1), P 8.

-Y-

- **Yamashita, S. K., Louie, M., Simor, A. E., & Rachlis, A.** (2000). Microbiologic Surveillance and Parenteral Antibiotic Use in a Critical Care Unit. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 11, 107-111.
- **Yan, L., Ge, H., Zhang, Y., & Li, N.** (2023). Epidemiology of pathogens and antimicrobial resistance of nosocomial urinary tract infections in patients with spinal cord injuries in China: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 1-17.
- **Yefou, M. D., Jingi, A. M., Etoga, M. C. E., Mekobe, F. M., Agoons, B. B., Ngassam, E., ... & Mbanya, J. C.** (2022). Bacterial profile of diabetic foot infections and antibiotic susceptibility in a specialized diabetes centre in Cameroon. *The Pan African Medical Journal*, 42.

-Z-

- **Zahir, H., Draiss, G., Rada, N., Abourrahouat, A., Sbihi, M., Bouskraoui, M., & Soraa, N.** (2019). Écologie microbienne et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées d'infections urinaires chez l'enfant au Maroc. *Revue francophone des laboratoires*, 2019(511), 65-70.

Référence bibliographique

- **Zaibet, W.** (2018). Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de *Daucus aureus* (Desf) et de *Reutera lutea* (Desf.) Maire, et leur application comme agents antimicrobiens dans le polyéthylène basse densité (PEBD). Thèse de Doctorat. D'UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF-1 UFAS (ALGERIE). P-14.
- **Zámboriné Németh, É. & Thi Nguyen, H.** (2020). Thujone, a widely debated volatile compound: What do we know about it? *Phytochemistry reviews*, 19, 405-423.



Annexes


Annex01 :






Tableau I : Matériel non biologique

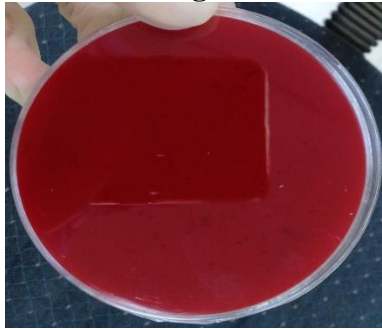
Instruments de laboratoire	Instrument spécialisés	Appareillages	Réactifs
Gants stériles Anse de platine Micro pipette Pipette graduée Pince Les embouts Boîtes de Pétri Flacons stériles Compressees stériles Eau physiologique stérile Huile de vaseline Pied à coulisse Pipette Pasteur Tubes à essais stériles Portoir Lames et lamelles Tubes secs Pince métallique Ecouvillons Seringues Stériles Bocal et eau de javel. Jarre d'anaérobiose Crayon de Gram Cellule de Malassez	Huile essentielle de <i>salvia officinallis</i> Disques d'antibiotiques Galerie API 20 E	Etuve Autoclave Réfrigérateur Microscope optique Agitateur thermique Bec bunsen Applicateur Automate Bain marie Balance Densitomètre	Réactif de COVAX Réactif de VP1 et VP2 Réactif de TDA Diluant DMSO

Annexe 2 :

Tableau II : Milieux de cultures et leurs compositions


MILEU	COMPOSITION	UTILISATION
Gélose chromagare 	Peptones et extrait de levure17,0 g Mix chromogénique1,7 g Agar1,0 g pH = 7	Pour l'isolement et la différenciation des agents pathogènes des voies urinaires

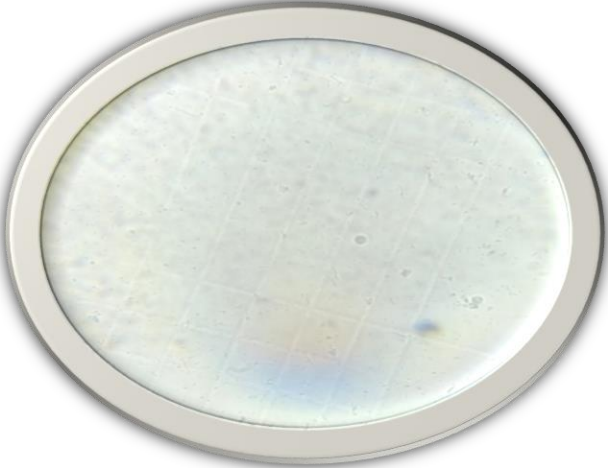
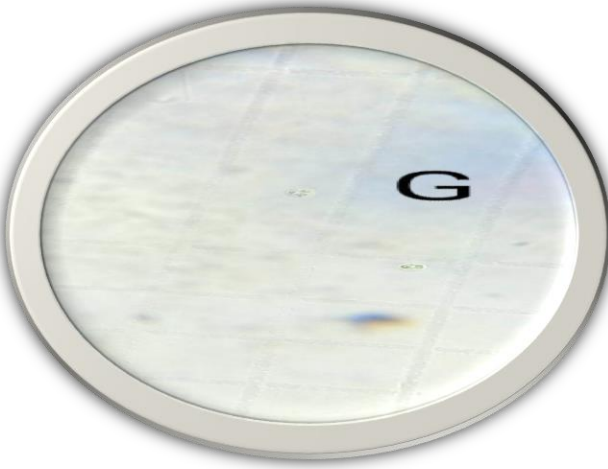
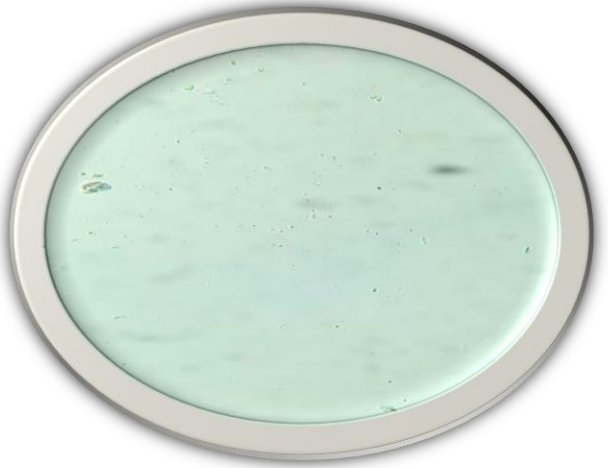
<p>Gélose Muller Hinton</p> 	<p>Infusion de viande de bœuf..... 300g. Hydrolysate de caséine 17.5g. Amidon.....1.5g. Gélose.....17g. pH=7.4</p>	<p>Réalisation de l'antibiogramme.</p>
<p>Gélose Nutritive (GN)</p> 	<p>Extrait de viande1g. Extrait de levure2g. Peptone5g. Chlorure de sodium5g Agar-agar 15g. PH=7.4</p>	<p>Milieu d'isolement pour les germes non exigeants.</p>
<p>Gélose Hektoen</p> 	<p>Protéose peptone12g. Extrait de levure3g. Chlorure de sodium5g. Thiosulfate.....5g sels biliaires9g. Citrate de fer ammoniacal1.5g. Salicine2g. Lactose12g. pH=7.4</p>	<p>Milieu d'isolement des bacilles à Gram négatif.</p>
<p>Gélose Chapman</p> 	<p>Peptone10.0g Extrait de viande de boeuf1.0g. Chlorure de sodium75g. Mannitol10g. Rouge de pénéol0.025g. Agar-Agar15g. Eau distillée1000ml. pH=7.4</p>	<p>Milieu sélectif pour l'isolement des staphylocoques</p>
<p>Gélose au sang cuit</p> 	<p>La gélose au sang cuit possède les mêmes éléments cités précédemment pour la gélose au sang frais sauf que les globules rouges sont lysés à cause de chauffage, ce qui apporte au milieu de nombreux facteurs de croissance</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le facteur X ou hémine (apporté par l'hémoglobine). - Le facteur V ou NAD 	<p>Milieu d'enrichissement pour les germes exigeants</p>

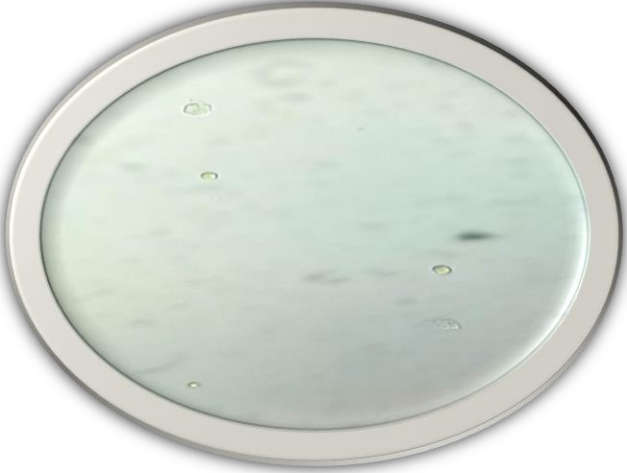
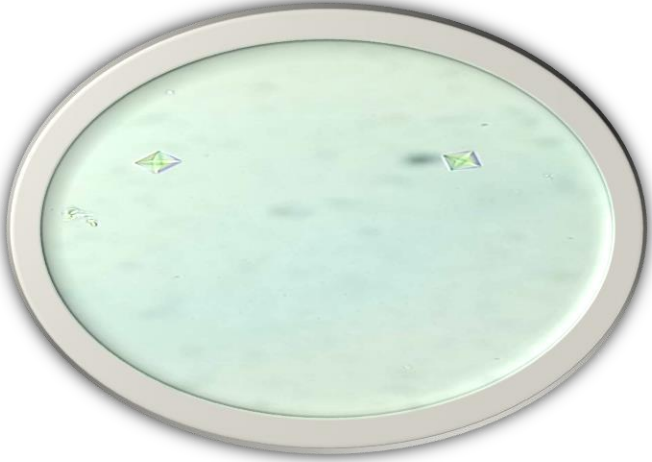

<p>Gélose au sang frais</p> 	<p>La gélose au sang frais, est Constituée d'une base nutritive non sélective à laquelle a été ajoutée 5% de sang frais. La gélose de base au sang et de la composition suivante :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Protéase peptone.....15 g - Extrait de foie.....2,5 g - Extrait de levure.....5 g - Chlorure de sodium.....5 g - Agar.....12 g - pH = 7,4 ± 0,2 	<p>Isolement et identification de certaines bactéries exigeantes par exemple les Streptococcus Neisseria meningitidis, les corynébactéries et bien sûr toutes les bactéries non exigeantes, et permet de Mettre en évidence le pouvoir hémolytique de certaines bactéries (hémolyse alpha et bêta)</p>
--	---	---

Annexe 3 : Résultats des lectures déférentes techniques microbiologiques utilisées

Tableau III : L'Examen microscopique

Etat frais	
	<p>Observations par le microscope optique G (×40) des cellules épithéliales a l'état frais à partir des urines frais originale ,2023)</p>

	<p>Observations par le microscopes optique G (×40) des Bactéries a l'état frais à partir des urines frais (originale ,2023)</p>
	<p>Observations par le microscope optique Avec G (×40) des globules blancs a l'état frais à partir des urines frais (originale, 2023)</p>
	<p>Observations par le microscope optique Avec G (×40) des cristaux d'urate a l'état frais à partir des urines frais (originale, 2023)</p>

	<p>Observation microscopique des hématies à l'état frais avec G (×40) (originale, 2023)</p>
	<p>Observations par le microscope optique Avec G (×40) des Cristaux d'oxalate de calcium a l'état frais à partir des urines frais (originale, 2023)</p>
	<p>Observations par le microscope optique Avec G (×40) des levures a l'état frais à partir des urines frais (originale, 2023)</p>

Coloration de Gram

1. Principe

La coloration de Gram permet de différencier entre deux grands groupes taxonomiques, les Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Cette différence de coloration est liée à des différences de nature de la paroi bactérienne, Elle permet de renseigner aussi la forme, la taille et La mode de regroupement des bactéries.

2. Technique

Préparation d'un frottis : à l'aide pipette pasteur, prélever une parcelle de la colonie à étudier et la déposer sur une goutte d'eau physiologie sur une lame propre et bien l'étaler afin d'éviter les agglomérations des bactéries.

Fixation du frottis : Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur, puis laisser refroidir, ou bien laisser sécher à l'air ou séchoir.

Coloration et explications : (attention aux éclaboussures, mettez des gants)

Coloration primaire : Recouvrir la lame avec le violet de Gentiane ; laisser agir une minute, puis rincer à l'eau de robinet.

Fixation et mordantage : Verser le lugol et le laisser agir pendant une minute, puis rincer.

Décoloration : inonder la lame avec l'alcool éthylique jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis puis rincer à l'eau.

Recoloration : verser quelques gouttes de Fuch sine basique et laisser agir pendant une minute, rincer à l'eau.

Lecteur : Après avoir sécher la lame, ajouter une goutte d'huile à immersion et observer au microscope optique à l'objectif×100.

Les bactéries Gram négatif prennent la couleur rose de la fushine et les bactéries Gram positif conservent la couleur violette.

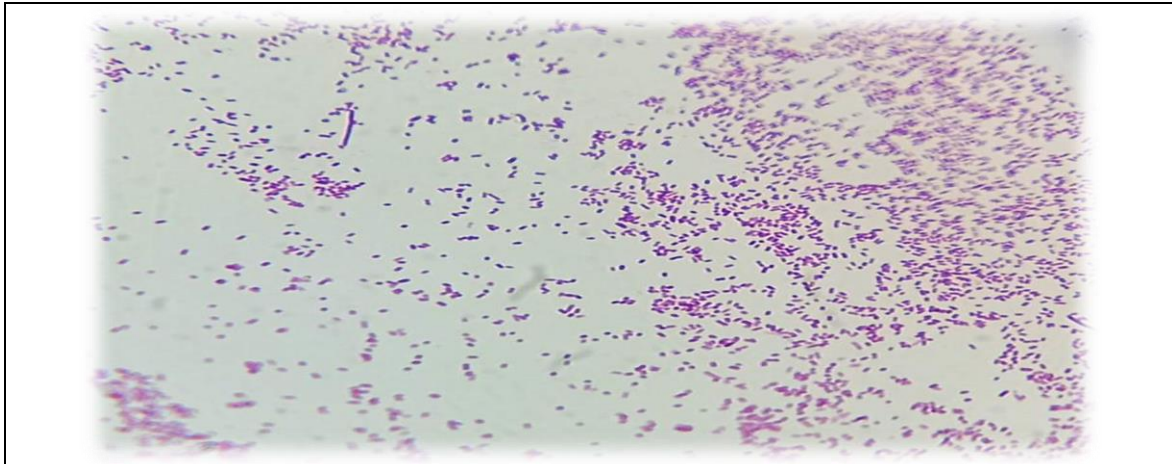


Figure 01 : Bacille à gram négatif *E.coli* (originale, 2023)

Test oxydase

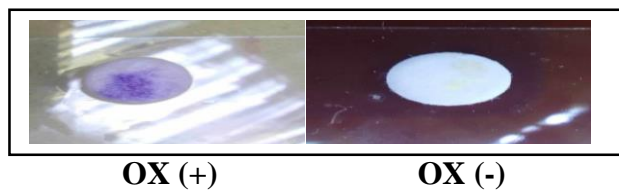


Tableau V : Résultat de l'observation macroscopique des colonies

Escherichia coli



Sur Gélose Hektoèn



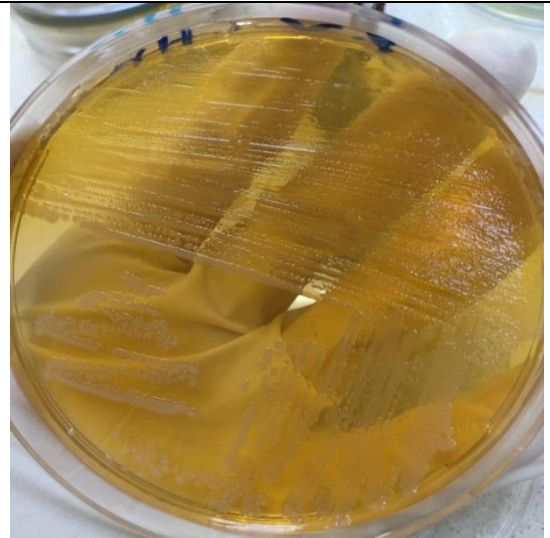
Sur Gélose chromagare

Salmonella spp



Sur Gélose hektoèn

Proteus vulgaris

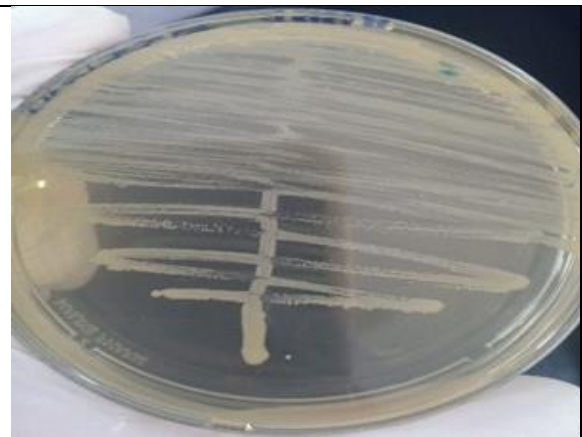


Sur Gélose chromagare

Acinetobacter baumannii



Sur Gélose hektoèn



Sur Gélose chromagare

Pseudomonas aeruginosa

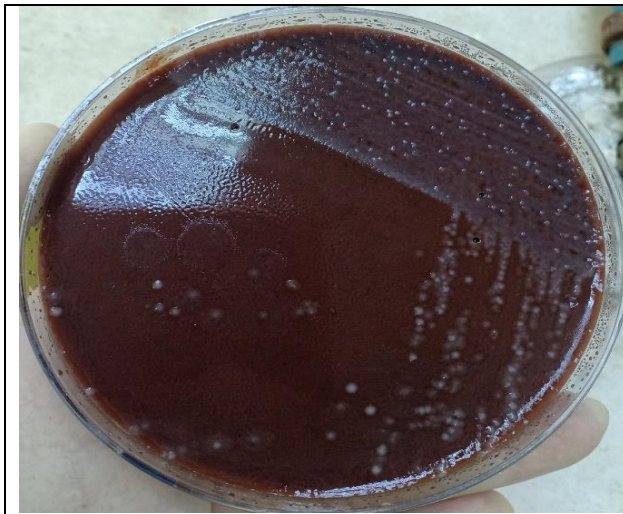


Sur Gélose hektoèn

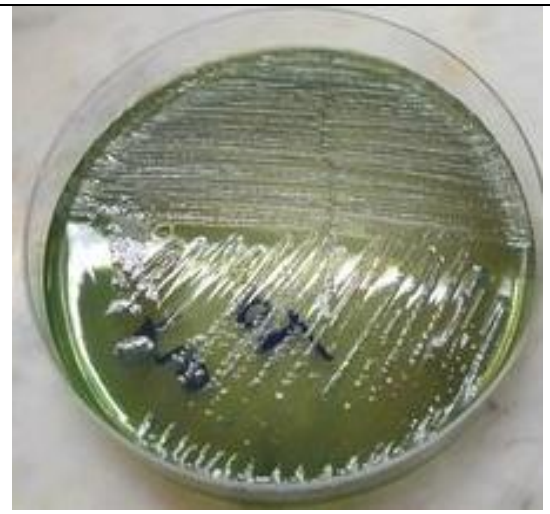


Sur Gélose nutritive

Proteus mirabilis



Sur Gélose au sang cuit



Sur Gélose hektoèn

Klebsiella pneumoniae







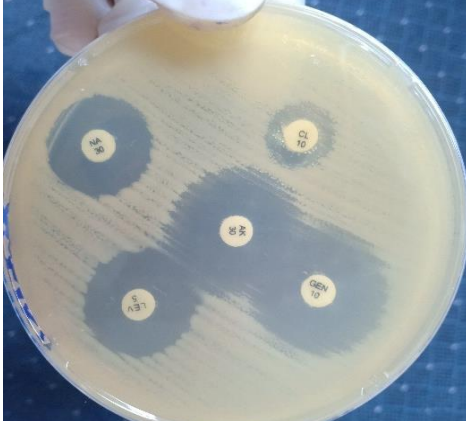

Sur Gélose hektoèn

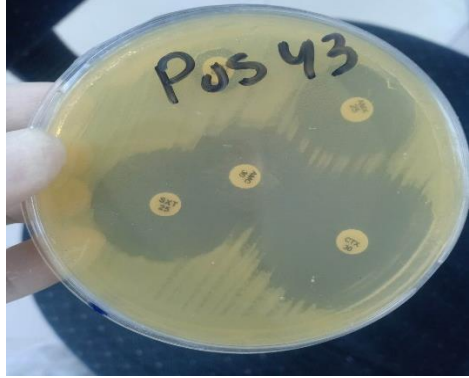







Serratia marcescens



Sur Gélose nutritive

Tableau VI : Résultat de l'antibiogramme

Germes isolés	L'antibiogramme	
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Serratia marcescens</i>		

<p><i>Proteus mirabilis</i></p>		
<p><i>Proteus vulgaris</i></p>		
<p><i>Enterobacter cloacae</i></p>		
<p><i>Salmonella spp</i></p>		

Klebsiella pneumoniae



Acinetobacter baumannii



Annexe 04 : Les listes d'antibiogramme

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

Table de lecture 1* : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8	La réponse à l'ampicilline est valable pour l'amoxicilline.
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4	Les breakpoints des céphalosporines et de l'aztréonam ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. Ainsi, l'application de ces breakpoints dépend du respect de posologies précises : céfotaxime (2g toutes les 8h), céfotaxime (1g toutes les 8h), céfotaxime (1g toutes les 8h).
Céfazoline	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2	Suite à la révision des breakpoints des céphalosporines, la lecture interprétative anciennement basée sur la détection ou non d'une BLSE, n'est plus nécessaire. La réponse R, I ou S se fait en se référant aux seuls diamètres mesurés.
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	A souligner cependant que la détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt, dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière.
Céfotaxime	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1	L'application de ces breakpoints dépend du respect des posologies suivantes : 1g toutes les 12h.
Céfazoline (Infections non compliquées du tractus urinaire)	30µg	≤ 14	—	≥ 15	≥ 32	—	≤ 16	Les résultats de la céfazoline permettent de prédire les résultats pour les céphalosporines orales : céfadior, céfépirim, céfuroxime, céfprozil, céfuroxime axétil, céfalexone et loracarbef quand elles sont utilisées pour le traitement des infections non compliquées du tractus urinaire dues à <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> et <i>P. mirabilis</i> . Cefpodoxime, céfépirim et cefuroxime axétil peuvent être testés individuellement car certaines souches peuvent être sensibles à ces antibiotiques alors qu'elles sont résistantes à la céfazoline.
Aztréonam	30µg	≤ 17	18 – 20	≥ 21	≥ 16	8	≤ 4	L'application de ces breakpoints dépend du respect des posologies suivantes : 1g toutes les 8h.
Impipénème	10µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1	Les critères d'interprétation sont basés sur la posologie de 1g toutes les 8h.
Méropénème	10µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1	Les breakpoints des carbapénèmes ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. L'application de ces breakpoints dépend du respect des posologies suivantes : Impipénème : 500 mg toutes les 6h ou 1g toutes les 8h, Ertapénème : 1g toutes les 24h.
Ertapénème	10µg	≤ 18	19 – 21	≥ 22	≥ 2	1	≤ 0,5	La détection phénotypique d'une carbapénémase par le test MHT est réservée aux études épidémiologiques.
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16	
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	—	≤ 16	La sensibilité diminuée aux fluoroquinolones est détectée chez les salmonelles isolées d'infections extra-intestinales en testant l'acide nalidixique à l'antibiogramme.
Ciprofloxacine	5µg	≤ 21	22 – 25	≥ 26	≥ 1	0,5	≤ 0,25	Valable pour les entérobactéries autres que <i>Salmonella Typhi</i> et <i>Salmonella spp.</i>
Ciprofloxacine <i>Salmonella spp.</i>	5µg	≤ 20	21 – 30	≥ 31	≥ 0,06	0,12 - 0,5	≤ 1	
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	Ne pas reporter en routine pour les souches isolées d'ITU sauf pour les salmonelles. Valable pour <i>S.Typhi</i> et <i>Salmonella spp.</i> extra-intestinales.
Colistine	CMI	—	—	—	≥ 2**	—	≤ 2**	La détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide, CBDE (technique d'éluion des disques) et CAT (dilution en milieu gélosé) sont acceptables (voir tests complémentaires). Le disque et le E-test ne doivent pas être utilisés*. Pour l'usage thérapeutique des polymyxines se référer à l'international consensus guidelines***
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32	
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64	Indiqué uniquement pour les souches d' <i>E.coli</i> isolées d'infections urinaires. Le disque de 200µg contient 50µg de glucose-6-phosphate. La CMI est déterminée par la technique de dilution en gélose supplémentée de 25µg/ml de glucose 6-phosphate.
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	1,25/ 23,75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/76	—	≤ 2/38	

*Tableau extrait du Document M100, 30th ed., 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. ** Extraits des recommandations de l'EUCAST 2020.

Table de lecture 2* : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ticarilline**	75 µg	≤ 15	16 - 23	≥ 24	≥ 128	32 - 64	≤ 16	Les valeurs critiques pour la piperacilline (avec ou sans tazobactam) et la ticarilline (avec ou sans ac.clavulanique), sont basées sur une posologie d'au moins 3g toutes les 6 h.
Ticarilline + ac.clavulanique	75/10µg	≤ 15	16 - 23	≥ 24	≥ 128/2	32/2 - 64/2	≤ 16/2	Détecter une BLSE en plaçant le disque de TCC entre le disque de CAZ et le disque d'ATM.
Pipéracilline	100 µg	≤ 14	15 - 20	≥ 21	≥ 128	32 - 64	≤ 16	L'application des breakpoints pour les céphalosporines dépend du respect de posologies précises, céftazidime et aztréonam : 1g toutes les 6h ou 2g toutes les 8h.
Pipéracilline+ tazobactam	100 µg/10 µg	≤ 14	15 - 20	≥ 21	≥ 128/4	32/4 - 64/4	≤ 16/4	
Céftazidime	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	
Aztréonam	30 µg	≤ 15	16 - 21	≥ 22	≥ 32	16	≤ 8	
Impipénème	10 µg	≤ 15	16 - 18	≥ 19	≥ 8	4	≤ 2	En cas de diamètre R ou I, faire une détection de carbapénémases
Méropénème	10 µg	≤ 15	16 - 18	≥ 19	≥ 8	4	≤ 2	Valeurs critiques basées sur une posologie de 1g toutes les 8 h ou 500mg toutes les 6 h.
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16	
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Tétramicine	30 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 32	16	≤ 8	
Cloramycine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Ciprofloxacine	5µg	≤ 18	19 - 24	≥ 25	≥ 2	1	≤ 0,5	
Évofloxacine	5µg	≤ 14	15 - 21	≥ 22	≥ 4	2	≤ 1	
Fosfomycine***	—	—	—	—	—	—	—	Des observations cliniques suggèrent que les infections dues à des souches pour lesquelles la CMI de la fosfomycine est ≤ 128 mg/L (ECOFF) pourraient être traitées avec de la fosfomycine.
Colistine	CMI	—	—	—	≥ 4****	—	≤ 2****	La détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide, CBDE (technique d'éluion des disques) et CAT (Dilution en milieu gélosé) sont acceptables (voir tests complémentaires.) Le disque et le E-test ne doivent pas être utilisés*. Pour l'usage thérapeutique des polymyxines se référer à l'international consensus guidelines****

Figure 2 : Les valeurs critiques standards conformément aux normes EUCAST ,2020

Annexe 05 : Lecture de la galerie API 20 E.

Proteus vulgaris



Proteus mirabilis



Escherichia coli



Klebsiella pneumoniae



Acinetobacter baumannii



Enterobacter cloacae



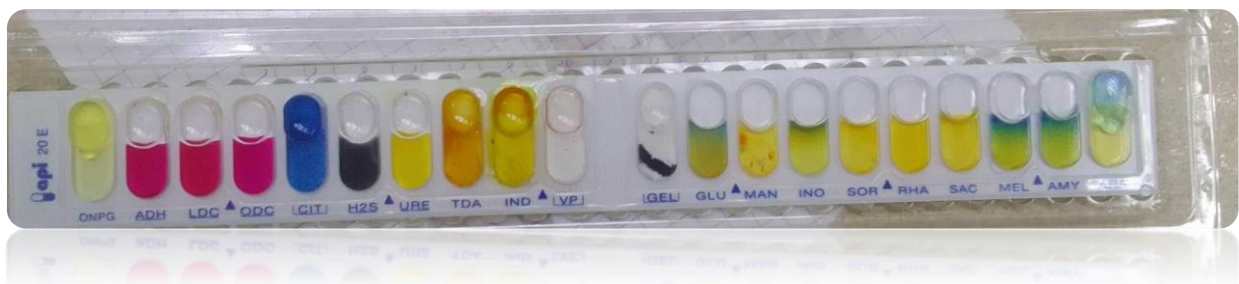
Pseudomonas aeruginosa



Serratia marcescens



Salmonella spp



Annexe 06 : Résultats de l'extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

- **Méthode d'extraction**

(A) : Dans un alambic en inox, on introduise 10 kg de plantes fraîches.

(B) : Ensuite, on ajoute 20 litres d'eau.

(C) : La chaudière est chauffée, faisant bouillir l'eau jusqu'à 100°C ce qui entraîne générant de la vapeur. La vapeur monte à travers les plantes, entraînant les composés volatils, y compris les huiles essentielles.

(D) : La vapeur chargée d'huiles essentielles passe ensuite dans un réfrigérant, où elle se refroidit et se condense. Après 3 h la condensation transforme la vapeur en un mélange d'huiles essentielles et d'eau.

(E) : Le mélange résultant est collecté dans un essencier. Les deux phases se séparent naturellement en raison de leurs différences de densité, avec les huiles essentielles flottant à la surface et l'eau se trouvant en dessous du récipient de décantation.

(F) : Le mélange est ensuite transféré dans un entonnoir. L'hydrolat (le distillat) est recueilli dans un bicher, tandis que l'huile essentielle est recueillie dans des flacons opaques,

(G) : HE obtenues est conservé dans des flacons opaques, hermétiquement fermés, à l'abri de la lumière et de la chaleur de température (4°C).

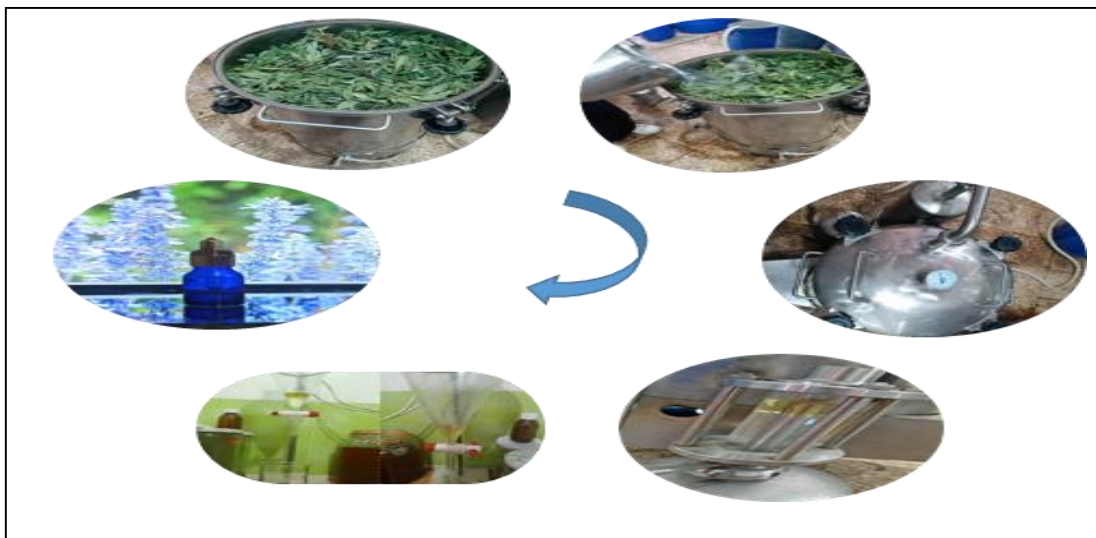


Figure03 : les étapes de l'extraction d'huile essentielle (photos originale)

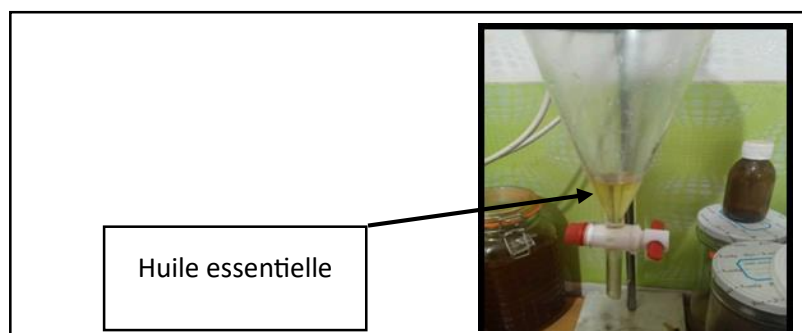


Figure 04 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

- Composition chimique de l'huile essentielle de *salvia officinalis*

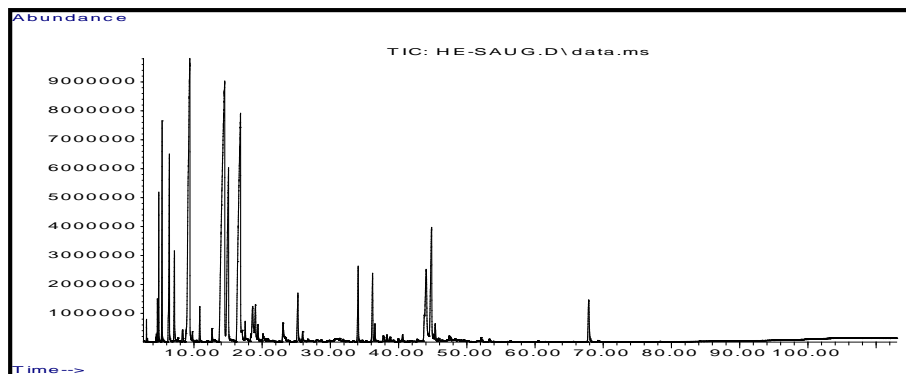
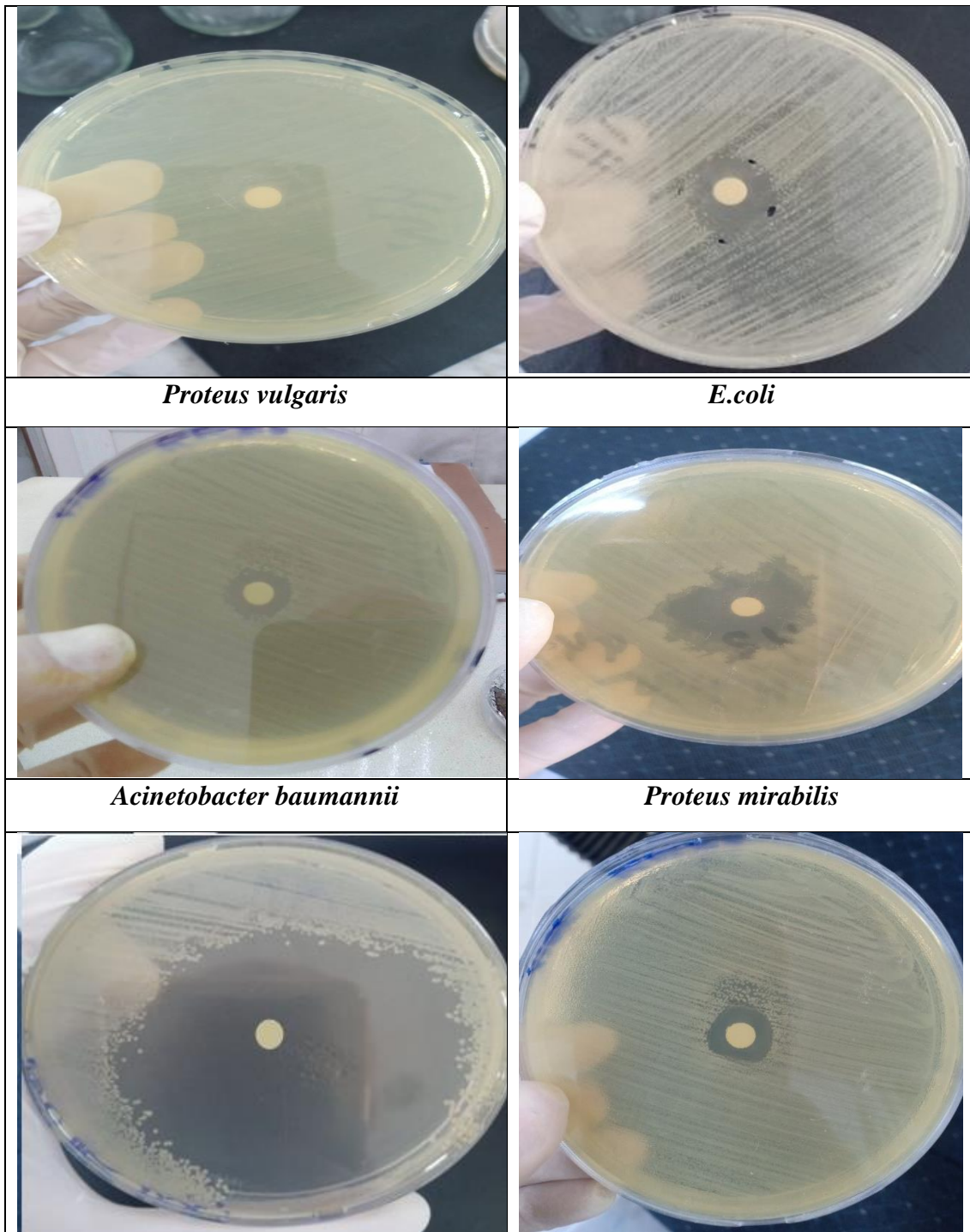


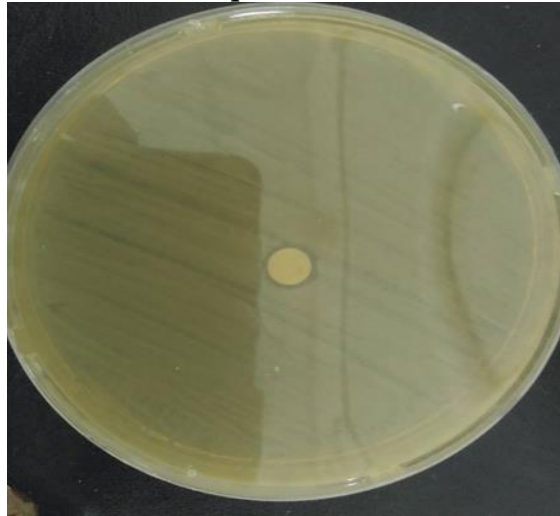
Figure05 : Chromatogramme GC/MS de l'huile essentielle de *salvia officinalis* (abondance en fonction du temps de rétention en minutes).

- Résultat de l'aromatogramme

<i>Salmonella spp</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli BMR</i>



Klebsiella pneumoniae BMR



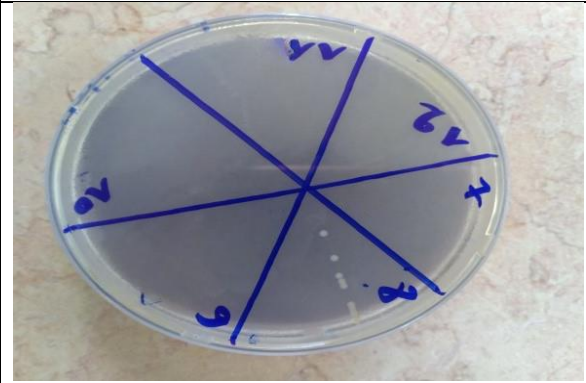
Annexe 06 : Résultat de cmi



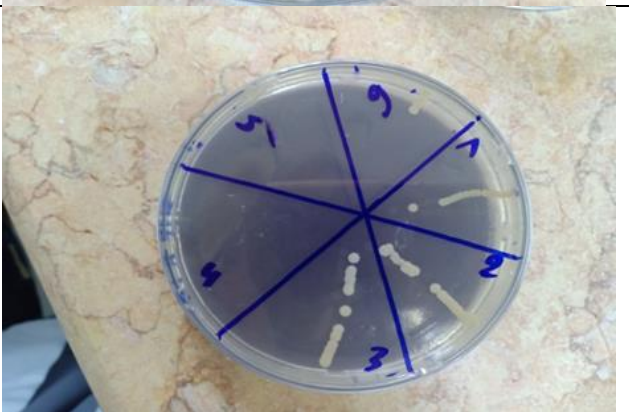
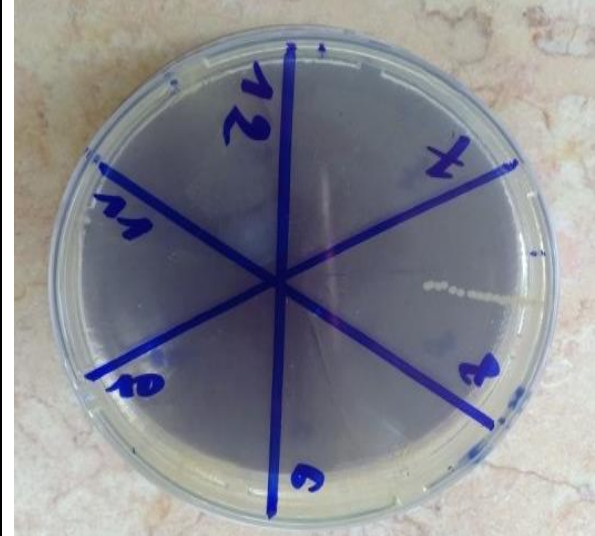
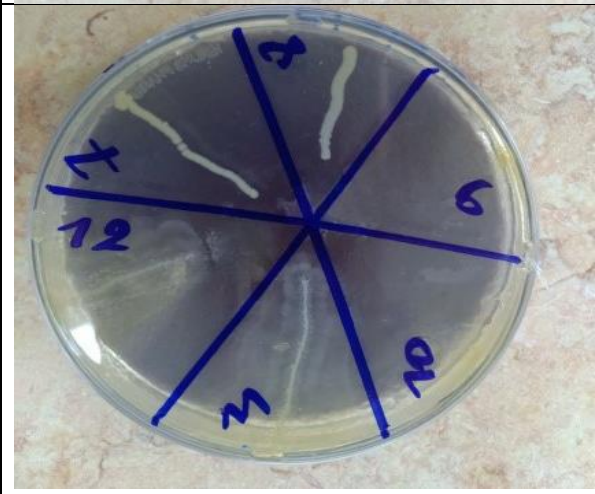
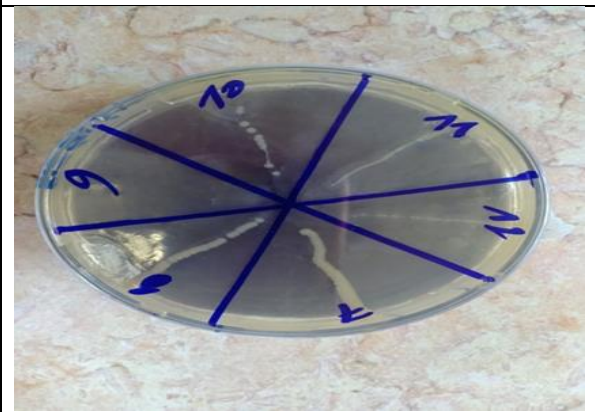
1 : *E. coli* 2 : *E. coli* BMR 3 : *K. pneumonie* 4 : *Acinetobacter baumannii*
 5 : *Acinetobacter baumannii* 6 : *E. coli* BMR 7 : *E. coli*
 8 : *P.vulgaris* 9 : *Acinetobacter baumannii* 10 : *Salmonella spp* 11 : *E. coli* 12 : *Proteus mirabilis*

2%



1%



0,5%	 A petri dish divided into six sectors by blue lines, labeled 1 through 6. The sectors contain varying amounts of white bacterial growth.
0,25%	 A petri dish divided into six sectors by blue lines, labeled 1 through 6. The bacterial growth is more extensive than in the 0.5% dish.
0,125%	 A petri dish divided into six sectors by blue lines, labeled 1 through 6. The bacterial growth is sparse and localized.
	 A petri dish divided into six sectors by blue lines, labeled 1 through 6. The bacterial growth is visible in several sectors.
	 A petri dish divided into six sectors by blue lines, labeled 1 through 6. The bacterial growth is more pronounced than in the 0.5% dish.
	 A petri dish divided into six sectors by blue lines, labeled 1 through 6. The bacterial growth is sparse and localized.

0,06%

