

République Algérienne Démocratique & Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et la Recherche scientifique



Université Dr Tahar-Moulay de Saida

Faculté de Science
Département de Biologie



Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie

Thème :

Etude comparative des effets antibactériens des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo* et des herbicides "Metribuzine & Linuron" envers certains microorganismes

Présenté par :

Mlle **HEBRI Saida**

Mlle **AMARA Aicha**

Soutenu le 30/06/2018 devant le jury :

Président : Mr TERRAS Mohamed MCA Université de Saida

Examineur : Mr AMMAM Abdelkader MCB Université de Saida

Encadreur : Mr BERROUKCHE Abdelkrim MCA Université de Saida

Année universitaire :

2017 – 2018

Remerciement

Nous remercions DIEU le tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce travail ; Nous tenons à remercier :

Comme le veut la tradition, la page des remerciements, est une tâche difficile qu'aucune expression, ni aucun geste, ne peut combler nos sentiments envers les gens, à qui ce Mémoire n'aurait eu le jour sans la confiance, la patience et la générosité.

Nous commençons par adresser nos plus chaleureux remerciements à la première personne qui a nous aidé Mr. BERRONKECHE maître assistant classe A à la faculté des Sciences de l'Université Dr. Moulay Tahar d'avoir accepté de nous encadrer qui a su nous laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de notre recherche tout en y gardant un sérieux et avisé. Merci pour votre rigueur scientifique et vos conseils toujours judicieux et aussi d'avoir eu la patience de corriger notre mémoire et de nous avoir responsabilisées du début jusqu'à la fin de notre travail.

Nos remerciements vont particulièrement à :

Mr TERRAS Mohamed, Maître de conférences à la faculté des sciences Moulay Tahar-Saida- d'avoir accepté de présider nos jurys de mémoire.

Mr., Mr ANMAM Abdelkader de conférences à la faculté des sciences Moulay Tahar-Saida- d'avoir accepté de jury de mémoire.

Nous remercions tous les techniciens du département de biologie qui ont nous aidé durant notre travail.

Enfin nous remercions tous qui sont participés de près ou de loin à ce travail.

Dédicace



Je dédier ce travail à tous ceux qui ont sacrifié leur noble existence pour bâtir la mienne, qui par leurs précieux conseils et soutien ont me su guider vers la réussite:

A mes très chers parents, nous demandons à Dieu de les protéger et les réserver une longue vie ;

A mes chers frères et soeurs ;

A toute ma famille Habri et Fekih ;

A l'ensemble des professeurs qui m'ont suivi durant toutes ses années d'étude ;

A mes amies : Khadidja et mebrouka ; A mes collègues de travail A tous ceux qui ont participé pour terminer ce travail

Saida

Résumé

Bien que l'utilisation des herbicides, en agriculture, cherche à protéger les champs de légumes et de fruits contre les insectes et les parasites, elle est devenue menaçante pour la santé de l'homme et l'environnement. La santé par le naturel, ou la médecine traditionnelle, est devenue l'alternative pour remplacer la médication à effets indésirables. L'huile végétale des graines de *Cucurbita pepo* (citrouille) a des vertus nutritionnelle et thérapeutique. Cette huile possède des propriétés pharmacologiques, antioxydantes, inflammatoires, antibactériennes et antitumorales.

L'objectif de cette étude est de comparer les effets antibactériens des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo* avec ceux des huiles végétales commerciales de la citrouille et des herbicides Métribuzine et Linuron. Une analyse de la composition chimique des huiles extraites des graines a été réalisée par la méthode de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Une étude microbiologique a été entamée en testant l'huile extraite des graines de la citrouille sur des souches bactériennes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* et *Pseudomonas aerogenosa*. Les résultats de CG-SM ont montré la prédominance des acides gras saturés (Acide palmitique 13,1 % et l'acide myristique 8,8 %), des acides gras insaturés (l'acide linoléique 45 % et l'acide oléique 19,6 %) et les phytostérols (β -sistostérol 47 %, stigmastérol 23,6 % et campestérol 21,5 %).

L'huile végétale extraite des graines de *C.pepo* a présenté une forte activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella* mais faible contre *Pseudomonas aerogenosa*. La plupart des souches ont montré une résistance envers l'huile végétale commerciale de la citrouille. L'herbicide Métribuzine et Linuron ont présenté des effets antibactériens insignifiants.

La CMI des huiles végétales extraites à partir des graines de *Cucurbita pepo* a été de 1,52 mg/mL. L'huile extraite des graines est doté d'un pouvoir antibactérien meilleur que celui des huiles commerciales et des herbicides. Cette huile pourra faire l'objet de plusieurs investigations afin de produire des bioherbicides qui se substitueront à des produits chimiques toxiques dangereux pour la faune et la flore.

Mots clés :

Cucurbita pepo, Citrouille, Herbicides, Metribuzine, Linuron, Acide gras, Phytosterols, Bactéries, CMI.

ABSTRACT

Although the use of herbicides in agriculture seeks to protect vegetable and fruit fields from insects and pests, it became a threat to human health and the environment. Natural health, or traditional medicine, became the alternative to replace adverse reaction medication. The vegetable oil of the seeds of *Cucurbita pepo* (pumpkin) has nutritional and therapeutic virtues. This oil has pharmacological, antioxidant, inflammatory, antibacterial and antitumor properties.

The objective of this study is to compare the antibacterial effects of vegetable oils extracted from the seeds of *Cucurbita pepo* with those of commercial vegetable oils of pumpkin and herbicides Métribuzine and Linuron. An analysis of the chemical composition of the oils extracted from the seeds was carried out by gas chromatography method coupled with mass spectrometry (GC-MS). A microbiological study was initiated by testing the oil extracted from pumpkin seeds on bacterial strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* and *Pseudomonas aerogenosa*. The results of GC-MS showed the predominance of saturated fatty acids (palmitic acid 13.1% and myristic acid 8.8%), unsaturated fatty acids (linoleic acid 45% and oleic acid 19, 6%) and phytosterols (β -sistosterol 47%, stigmasterol 23.6% and campesterol 21.5%).

The vegetable oil extracted from seeds of *C.pepo* showed strong antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella* but weak against *Pseudomonas aerogenosa*. Most strains showed resistance to the commercial vegetable oil of the pumpkin. Metribuzin and Linuron showed insignificant antibacterial effects.

The MIC of the vegetable oils extracted from the seeds of *Cucurbita pepo* was 1.52 mg / mL. The oil extracted from seeds has a better antibacterial effect than commercial oils and herbicides. This oil may be the subject of several investigations to produce bio herbicides that will replace toxic chemicals well known as dangerous for the fauna and flora.

Key words:

Cucurbita pepo, Pumpkin, Herbicides, Metribuzine, Linuron, Fatty acid, Phytosterols, Bacteria, MIC.

ملخص

على الرغم من أن استخدام مبيدات الأعشاب في الزراعة يهدف إلى حماية حقول الخضر والفاكهة من الحشرات والآفات ، فقد أصبح تهديداً لصحة الإنسان والبيئة. أصبحت الصحة الطبيعية ، أو الطب التقليدي ، بديلاً لتحل محل دواء التفاعل الضار. إن الزيوت النباتية من بذور القرع *Cucurbita pepo* لها فضائل غذائية وعلاجية. هذا الزيت له خصائص دوائية ، مضادة للأكسدة ، التهابية ، مضادة للبكتيريا ومضاد للورم. وكان الهدف من هذه الدراسة هو مقارنة تأثيرات مضادة للجراثيم من الزيوت النباتية المستخرجة من بذور القرع بيبو مع تلك الزيوت النباتية التجارية لليقطين و مبيدات الأعشاب *linuron metribuzin* . تم إجراء تحليل التركيب الكيميائي للزيوت المستخرجة من البذور من بواسطة كروماتوغرافيا الطور الغازي المزدوج بمطيافية الكتلة (GC-MS) وقد بدأت دراسة علم الأحياء الدقيقة من خلال اختبار الزيت المستخرج من بذور اليقطين على السلالات البكتيرية القولونية، المكورات العنقودية الذهبية، الكلبسيلا و *pseudomonas aerogenosa*.

وأظهرت النتائج GC-MS غلبة الأحماض الدهنية المشبعة (حمض البالميتيك 13.1% وحمض الميريستيك 8.8%)، والأحماض الدهنية غير المشبعة (حمض اللينوليك 45% حمض الأوليك 19، 6% و فيتوستيرولات (-β - سيستروستيرونول 47%)، ستيغماستيرونول 23.6% و كامبستيرونول 21.5%).

أظهر الزيت النباتي المستخرج من بذور *C. pepo* نشاط مضاد للجراثيم قوي ضد *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus* et *klebsiella pseudomonas* ولكنها ضعيفة ضد *aerogenosa* أظهرت معظم السلالات مقاومة للزيت النباتي التجاري للحمضيات. أظهر مبيدات الأعشاب *Linuron* و *Metribuzin* آثار مضادة للبكتيريا *pseudomonas aerogenosa*.

كان CMI من الزيوت النباتية المستخرجة من بذور القرع *Cucurbita pepo* 1.52 ملغ / مل، الزيت المستخرج من البذور له تأثير مضاد للجراثيم أفضل من الزيوت التجارية ومبيدات الأعشاب، قد يكون هذا الزيت موضوعاً لعدة تحقيقات لإنتاج مبيد بيوهيربيدس الذي يحل محل المواد الكيميائية السامة التي تشكل خطراً على الحيوانات والنباتات.

الكلمات المفتاحية:

القرع، *Cucurbita pepo*، مبيد الأعشاب، *Linuron* و *Metribuzin*، الأحماض الدهنية، فيتوستيرولات، البيكتيريا، CMI.

Liste des abréviations

- **(AR)** : récepteurs androgéniques
- **(DMT)** : La dose maximale tolérée
- **(DMT)** : La dose maximale tolérée
- **(TSH)** : hypersécrétion de la thyroestimuline

- **AGPI** : Acide gras polyinsaturé
- **AGS : acide gras sature**
- **ANOVA**: Analyse Of Variance
- **ATCC** : American Type Collection Culture
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **av. J.-C** : Seigneur Jésus-Christ', est un terme qui désigne l'année supposée de la naissance de Jésus-Christ'.
- **C.pepo**: cucurbita pepo.
- **CMB** : concentration minimale bactericide
- **CMI** : concentration minimale inhibitrice
- **CPG-SM** : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- **DMSENO** : La dose maximale sans effet nocif observable
- **DMSO** : Diméthyl sulfoxide
- **DO** : densité optique
- **H.C.P et H.C**
- **H.V**: huiles vegetal
- **MI** : millilitre
- **NCCLS** : National Committee for Clinical Laboratory Standartrd
- **NOAEL**: (No Observed Adverse Effect Level)
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène
- **SARM** : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline.
- **UFC** : Colony forming units
- **UV** : Ultra-violet
- **ZOI** : zone d'inhibition

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
Figure 01	Quelques espèces de certaines cucurbitacées	04
Figure 02	Les régions de cultivassions d'espèce <i>cucurbita pepo</i>	06
Figure 03	Structure de métribuzine	15
Figure 04	Processus de détoxication et de biotransformation des xénobiotiques	17
Figure 05	Différents types de récepteurs des xénobiotiques	17
Figure 06	Structure moléculaire de Linuron	19
Figure 07	Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique	25
Figure 08	la bactérie dans l'espace	31
Figure 09	Aspects microscopique de <i>Pseudomonas</i>	31
Figure 10	Aspect de klebsiellaen microscopie électronique	36
Figure 11	Aspect des colonies de <i>K. pneumoniae</i> sur milieu gélosé	36
Figure 12	<i>Escherichia coli</i> sous microscope électronique a G X 1000	41
Figure 13	situation géographique de la zone d'étude	44
Figure 14	photographie des graines de <i>C. pepo</i>	45
Figure 15	Photographie d'un flacon d'huile commercial de la citrouille	45
Figure 16	Photographie des différents pesticides utilisés	46
Figure 17	Schéma d'un appareil de Soxhlet	49
Figure 18	photographie d'extraction de l'huile de <i>cucurbita pepo</i> par Soxhlet	50
Figure 19	photographie de séparation de l'H.V par Evaporateur rotatif (Rotavapor)	51
Figure 20	préparation des dilutions de l'huile végétale de <i>C.pepo</i>	62
Figure 21	Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri	63
Figure 22	photographie de dépôt des disques	64
Figure 23	photographie de la détermination de la CMI sur une microplaque	66
Figure 24	Différents rendements de plusieurs extractions de H.V de <i>C. pepo</i>	69

Figure 25	Huile extraite à partir des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	69
Figure 26	représentation graphique Composition en acides gras de H.V extraites des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	72
Figure 27	Chromatogramme de la composition en acides gras des huiles végétales extraites des graines de <i>Cucurbita pepo</i> (ou Citrouille)	73
Figure 28	composition en phytostérols des huiles végétales extraites des graines de <i>Cucurbita pepo</i>	75
Figure 29	Chromatogramme de la composition en phytostérols des huiles végétales extraites des graines de <i>Cucurbita pepo</i> (ou Citrouille).	75
Figure 30	les observations microscopiques des souches utilisées G:x100	76
Figure 31	profil des zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations des huiles (H.V de <i>cucurbita pepo</i>	79
Figure 32	profil des zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations des huiles (l'huile commerciale de la citrouille	79
Figure 33	Expression de l'activité de l'H .V des graines de <i>cucurbita pepo</i> sur les souches bactériennes testées	80
Figure 34	profil des zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations des pesticides (Metribuzine)	81
Figure 35	profil des zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations des pesticides (Linuron)	82
Figure 36	Expression de l'activité de pesticide (Metribuzine)	82
Figure 37	Expression de l'activité de pesticide (linuron)	84
Figure 38	profile antibiogramme des germes étudiés en présence des différents Antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm).	86
Figure 39	Sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques testés	87
Figure 40	Concentrations minimales inhibitrices des solutions testées (CMB).	93

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
Tableau 01	Les noms vernaculaires de la citrouille	04
Tableau 02	Classification de <i>Cucurbita pepo</i>	06
Tableau 03	Illustration de quelques organes de <i>Cucurbita pepo</i> .	07
Tableau 04	Composants bioactifs et leur pourcentage dans les graines de citrouille (valeur nutritive pour 100 g)	09
Tableau 05	la classification hiérarchique du Phylum XIII (<i>Firmicutes</i>)	24
Tableau 06	Différents caractères bactériologiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Tableau 07	Caractères distinctifs de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Tableau 08	Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Tableau 09	Principales pathologies causées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et classées Selon le site d'infection	33
Tableau 10	Taxonomie de <i>Klebsiella</i>	35
Tableau 11	Caractères biochimiques de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
Tableau 12	La classification d' <i>Escherichia coli</i> selon le Bergey's manual 2012.	40
Tableau 13	Les caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i>	42
Tableau 14	Matériels et produits de laboratoire	43
Tableau 15	Localisation géographique (fr.DB-city.com/Algérie-Saïda-sidi-Boubekeur-sidi Amar)	44
Tableau 16	Caractéristiques physico-chimiques du Métribuzine et Linuron	47
Tableau 17	Référence des souches bactériennes utilisées	47
Tableau 18	Indentification biochimique à l'aide de la galerie classique.	60
Tableau 19	le rendement en H.V de <i>cucurbita pepo</i>	68
Tableau 20	Caractéristiques organoleptiques de notre huile végétale	69
Tableau 21	Analyses par CPG-SM de la composition en acides gras des huiles végétales extraites des graines de <i>Cucurbita pepo</i> (citrouille).	71

Tableau 22	Proportions des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et insaturés (AGPI) présents dans les huiles végétales des graines de <i>Cucurbita pepo</i> (Citrouille)	72
Tableau 23	Analyses par CPG-SM de la composition en phytostérols des huiles végétales extraites des graines de <i>Cucurbita pepo</i> (ou Citrouille).	74
Tableau 24	observations microscopiques	76
Tableau 25	Identification biochimique (galerie classique) :	77
Tableau 26	Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'huile végétale extrait des grains de <i>cucurbita pepo</i> et huile commercial.	78
Tableau 27	Diamètres (mm) des zones d'inhibition pesticides (Metribuzine et Linuron)	81
Tableau 28	Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents Antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm).	85
Tableau 29	résultats des CMI des huiles de <i>C.pepo</i> et huile commercial de la citrouille	91

Sommaire

Introduction :	1
----------------------	---

Revue bibliographique

Chapitre I : Plante Cucurbita pepo (Citrouille)

I-Généralités sur les cucurbitacées	3
I-1-Origine et distribution des cucurbitacées	3
I-1-2-Les noms vernaculaires de la citrouille	4
I-1-3- Classification des cucurbitacées.....	4
I-2-Généralité sur cucurbita pepo.....	5
I-2-1-Répartition géographique.....	5
I-2-2-Classification et taxonomie de Cucurbita pepo :	6
I-2-3-Description botanique	7
I-2-4- Exigence climatique et de sol.....	8
I-2-5-Composition chimique de la citrouille cucurbita pepo.....	8
I-2-6-Composition et caractérisation de l'huile de graines de Cucurbita pepo	10
I-2-7-Utilisations culinaire et thérapeutique de la citrouille.....	10
I-2-8-Observations chez l'homme	11
I-2-9- Emploi des graines de la citrouille en santé naturelle :	12
I-2-10- Aucun risque de toxicité :	12

Chapitre II : Pesticides

II - Généralités.....	13
II -1- Classification des pesticides.....	13
II -1-1-Classification biologique	13
II -1-2- Classification selon la nature	13
II -1-2-1- Bio-pesticides	13
II -1-2-2- Produits chimiques	14
II- 2. Métribuzine	15
II-2-1- Propriétés chimiques.....	15
II-2-2- Toxicité.....	15
II-2-3- Métabolisme des pesticides	16
II-2-4. Effets toxiques des pesticides.....	18
II-3- Linuron.....	19
II-3-1- Propriétés chimiques.....	19
II-3-2-Applications.....	20

II-3-3- Toxicité.....	20
-----------------------	----

Chapitre III : Présentation de quelques souches bactériennes

III-Staphylococcus aureus	22
III-1-Généralité sur les Staphylococcus	22
III-1-1-Historique et nomenclature.....	22
III-1-2-Habitat	23
III-1-3-Classification et taxonomie	24
III-1-4-Caractères bactériologiques.....	24
III -1-4-1-Morphologie.....	24
III -1-4-2-Caractères cultureux.....	26
III -1-4-3-Caractères physiologiques et biochimiques	26
III -1-5 Pouvoirs pathogènes	27
III-2-Pseudomonas aeruginosa	28
III-2-1-Généralités.....	28
III-2-2- Historique et nomenclature.....	28
III-2-3- Habitat	29
III-2-4- Classification	29
III-2-5- Caractères bactériologiques.....	30
III-2-5- 1-Morphologie.....	30
III-2-5-2-Caractères cultureux.....	31
III-2-5-3-Caractères physiologiques et biochimique.....	32
III-2-6-Physiopathologies.....	32
III -3-Klebsiella	34
III-3-1-Généralités.....	34
III-3-2-Historique et nomenclature.....	34
III-3-3-Habitat	34
III-3-4-Classification	35
III-3-5-Caractères bactériologiques.....	35
III-3-5-1-Morphologie.....	35
III-3-5-3-Caractères biochimiques	37
III-3-6-pouvoirs pathogènes	38
III-4-Escherichia coli.....	38
III-4-1-Généralité	38
III-4-2-Historique et nomenclature.....	39
III-4-3-Habitat	39
III-4-4-Classification	39

III -4-5-Caractères bactériologiques.....	40
III-4-5-1-Caractères morphologiques et culturaux :.....	40
III-4-5-2-Caractères biochimiques	41
III-4-5-3- Caractères antigéniques.....	42
III-4-6-Pouvoir pathogène.....	42

Partie expérimentale

IV-1-Objectif.....	43
IV-2 - Matériels.....	43
IV-2-1- Matérielles et produits de laboratoire.....	43
IV-2-3-Matériel végétal.....	44
IV-2-3-1-Récolte et conservation de le la plante de la citrouille (Cucurbita pepo).....	45
IV-2-4-Huile végétale commerciale extraites des graines de citrouille.....	45
IV-2-5-Pesticides.....	46
IV-2-6-Matériel biologique	47
IV-2-6-1-Conservation des souches	48
IV-2-6-2-Choix des milieux de culture	48
IV-3-Méthode.....	48
IV-3-1-Extraction d'huile végétale de Cucurbita pepo	48
IV-3-1-1- Dispositif de l'extraction.....	48
IV-3-1-2-Procédé de l'extraction	50
IV-3-1-3-Elimination du solvant organique	51
IV-3-1-4-Conservation de l'huile végétale extraite.....	51
IV-3-1-5-Détermination des rendements d'extraction des huiles végétales.....	51
IV-3-1-6-Caractérisation des huiles végétales.....	52
IV-3-1-6-1-Caractérisations organoleptique et physique	52
IV-3-1-6-2-Caractéristiques physico-chimiques	53
IV-3-1-6-2-1-Propriétés physiques.....	53
IV-3-1-6-2-2-Propriétés chimiques	53
IV-3-1-6-2-2-1-Dosage des Acides Gras d'une huile végétale par chromatographie en phase gazeuses avec un détecteur à ionisation de flamme (C P G / F I D).....	54
IV-3-1-6-2-2-2-Dosage des phytostérols D'une huile végétale par chromatographie en phase gazeuses avec un détecteur à ionisation de flamme (C P G / F I D).....	56
IV-3-2-Etude de l'activité antibactérienne	58
IV-3-2-1-Isolement et purification	58
IV-3-2-2-Identification.....	58

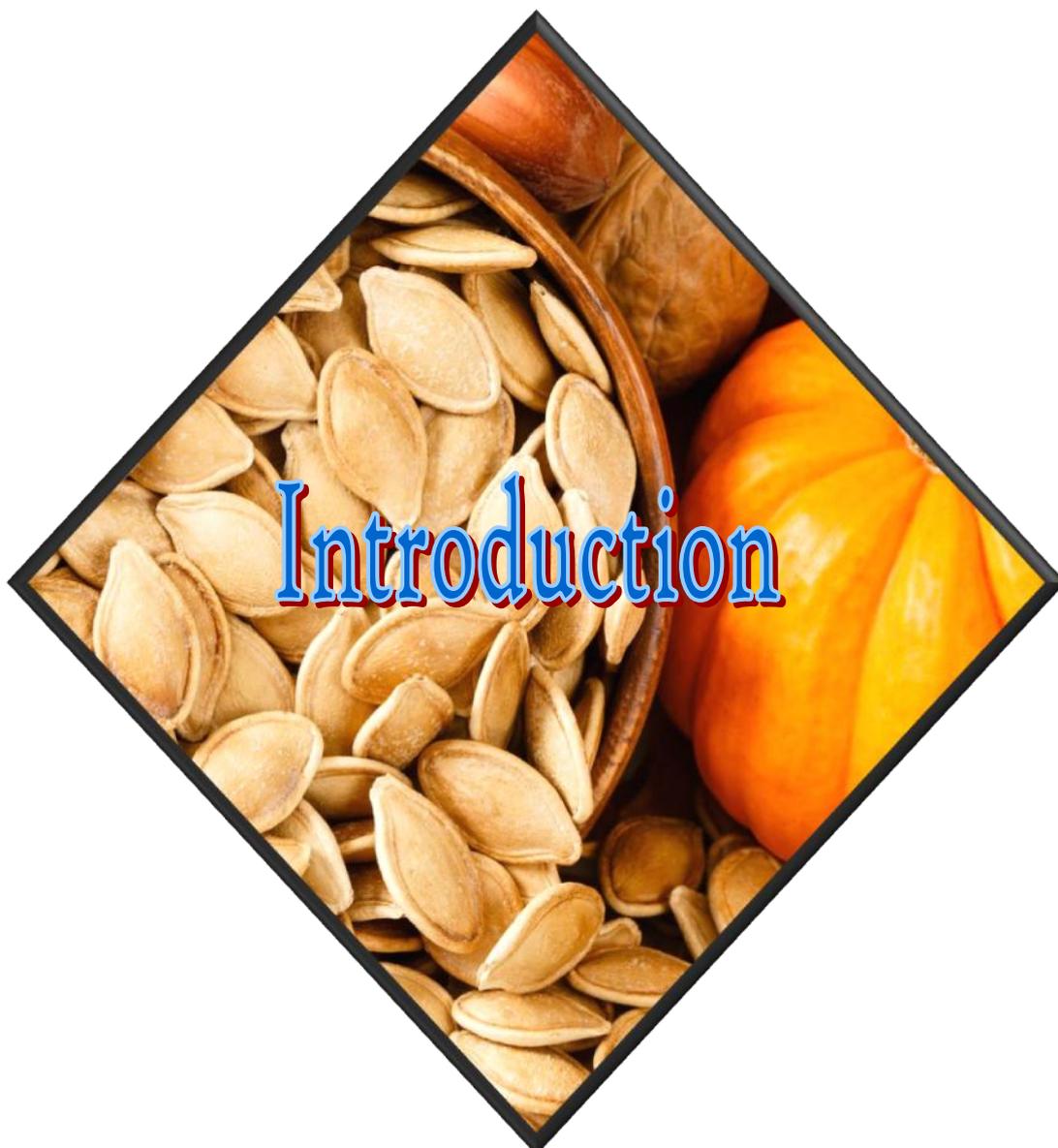
IV-3-2-3-Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles extraites des graines de C. pepo et des huiles commerciales	61
IV-3-2-3-1-Préparation des précultures.....	61
IV-3-2-3-2-Préparation de l'inoculum (suspensions bactériennes).....	61
IV-3-2-3-3-Préparation d'une série de dilutions	62
IV-3-2-3-4-Tests antibactériens	62
IV-3-2-3-4-1-Méthode de diffusion à partir d'un disque solide (l'aromatogramme)	63
IV-3-2-3-4-2-Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide	65
IV-3-2-3- Etude de l'activité antimicrobienne in vitro des herbicides (Linuron et Metribuzine)	66
IV-4-Analyse statistique.....	67

Résultats et discussion

1 ^{er} partie : Préparation et analyses physico-chimiques d'huile végétale des graines de cucurbita pepo	68
1-Rendements des huiles extraites.....	68
2-Caractérisation des huiles végétale	69
2-1-Caractéristiques organoleptiques	69
2-3-Caractéristiques physico-chimiques	70
2-3-1-Propriétés physiques.....	70
2-3-2-Propriétés chimiques	70
2-3-2-1-Composition chimique des huiles végétales des graines de Cucurbita pepo déterminée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).....	70
2-3-2-1-1-Composition en acides gras des huiles végétales extraites des graines de Cucurbita pepo ..	70
2-3-2-1-1-Composition en phytostérols des huiles végétales extraites des graines de Cucurbita pepo	73
2 ^{ème} partie : Activité antibactérienne.....	76
IV-2-1- Caractérisation microscopique des souches étudiées	76
IV-2-2- Caractérisation biochimique.....	77
IV-2-3- Activité antibactérienne.....	77
IV-2-3-1-Aromatogramme	77
IV-2-3-2-Antibiogramme : Sensibilité aux antibiotiques.....	85
Conclusion :.....	94

Références bibliographiques

Annexe



Introduction



Introduction :

Dans la nature, de nombreuses plantes étaient des sources de remèdes dans les premiers temps. Les plantes aromatiques se sont révélées très utiles dans le domaine de la phytothérapie. L'intérêt médical de ces plantes réside au niveau de leurs substances bioactives. Les constituants majeurs sont des polyphénols, acides phénoliques, flavonoides, tanins, terpenoides et alcaloïdes. Leur richesse en ces composants a permis de les considérer comme un matériel support pour le développement de médicaments. Il y a plusieurs rapports sur l'activité antimicrobienne de différents produits à base de plantes extraits dans différentes régions du monde (**Caili et al, 2006**).

En raison des effets secondaires des antibiotiques et surtout de la résistance que les bactéries pathogènes développent contre eux, le recours aux extraits biologiquement actifs à partir d'espèces végétales a montré son efficacité en matière de prévention (**Essawi et Srour ,2000**). Dans la présente étude, la plante *Cucurbita pepo* (ou citrouille) appartenant à la famille des Cucurbitacées a été sélectionnée pour évaluer ses possibles activités antibactériennes. Les cucurbitacées ont été cultivées pendant longtemps pour la nutrition et leurs propriétés médicinales. De particulières propriétés médicales ont été attribuées à chaque partie végétale du fruit notamment les graines de la plante. Cependant, les cucurbitacées sont classées en plusieurs espèces selon leurs structures et leurs pédoncules. Les citrouilles (*Cucurbita*) qui ressortissent de cette famille, comprennent quatre sous-espèces en l'occurrence, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* et *Cucurbita maxima*. La citrouille est probablement originaire d'Amérique du nord, et elle est maintenant cultivée partout (**Castilho et al., 2007**).

En Algérie, la citrouille locale (*Cucurbita pepo*) a été largement cultivée dans plusieurs grandes régions productrices pendant de nombreuses décennies et peut être considérée comme l'une des principales cultures de légumes.

Les graines de *Cucurbita pepo* et leur huile végétale ont fait l'objet de plusieurs études dans le domaine de santé. La citrouille se présente sous une forme ronde et de couleur orangée (**Castilho et al., 2007**).

Les graines de *Cucurbita pepo*, produit résiduel après l'élimination de la chair, pouvaient être utilisées (**BenAlia, 2016**).

Les graines de citrouille ont un effet thérapeutique fort qui peut aider à éliminer les parasites intestinaux, nettoyage des vaisseaux sanguins, de normaliser le taux de cholestérol et de stimuler l'activité rénale (**Gemrot et al., 2006**).

Les graines de citrouille sont riches en huile végétale et en protéines. Elles peuvent en contenir jusqu'à 35% d'huile, des protides riches en acides aminés essentiels et la cucurbitacine et également riches en zinc (**Bachmann et Adam, 2010**).

Certaines études épidémiologiques ont démontré une relation entre la consommation de citrouille et la diminution du risque de certains types de cancers (**Matsuo et al., 2004**).

De ce fait l'huile végétale de *Cucurbita pepo* est visée par de nombreuses études pour sa richesse en composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines E, phytostérols et aussi pour ces différentes propriétés biologiques, antimicrobiennes (**Caili et al, 2006**).

Les pesticides sont, en terme générique utilisé pour désigner toutes les substances naturelles ou de synthèse capables de contrôler, de repousser, de détruire ou de s'opposer au développement des organismes vivants parasites considérés comme indésirables pour l'agriculture, l'hygiène publique et la santé publique (**Djabali et Khelili, 2009**).

Les pesticides sont présents dans presque tous les milieux de l'environnement y compris les eaux de surface, les eaux souterraines, l'air ambiant, la poussière et le sol (**Berrah, 2011**).

Les pesticides sont diffusés partout, car les résidus de pesticides ont été trouvés dans plus de 70 % des fruits et légumes, plus de 60 % des échantillons de blé et de 99% pour cent de lait, Ils sont également présents dans les organes de presque tous les adultes et les enfants (**Berrah, 2011**).

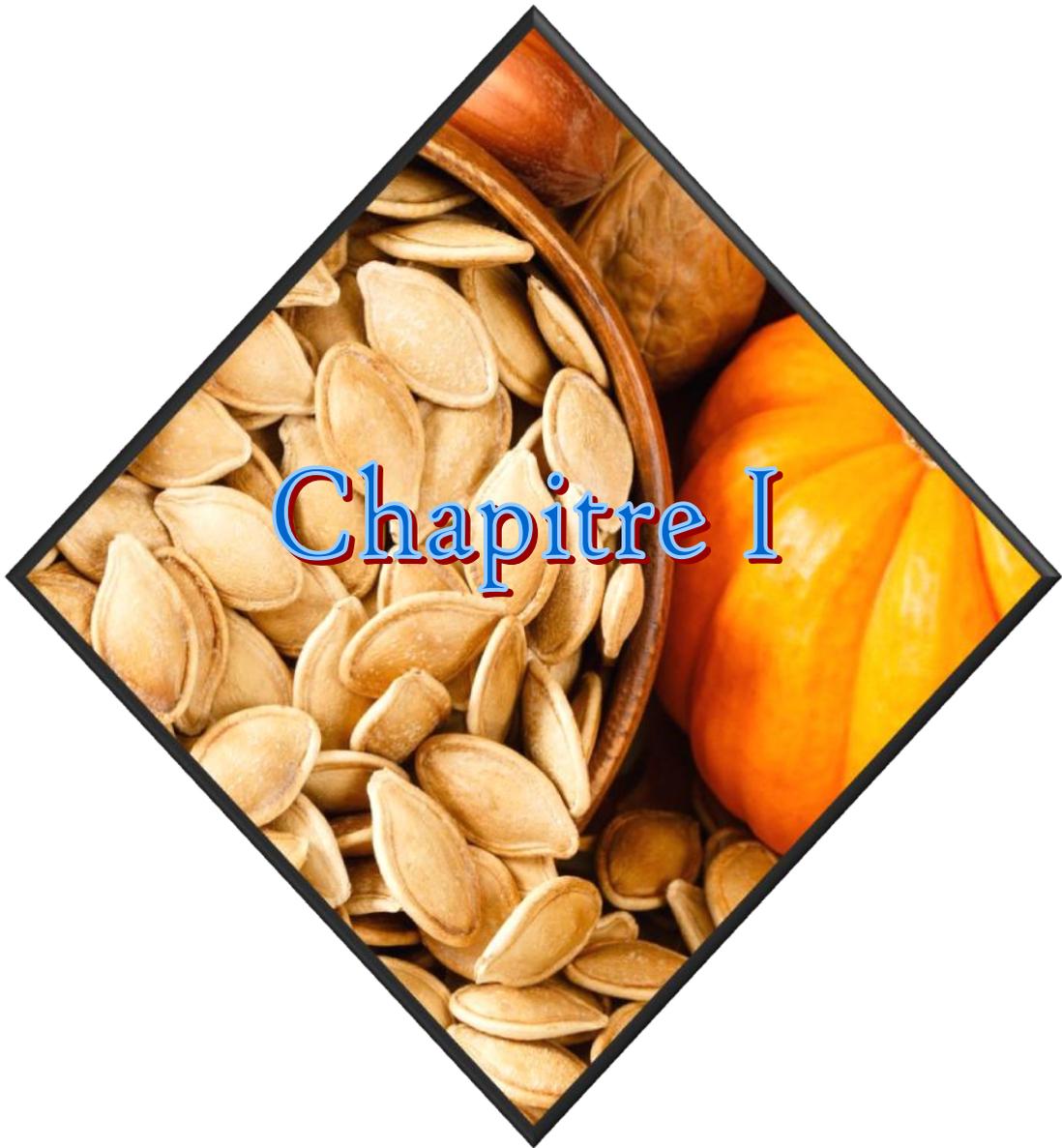
Dans ce contexte, notre projet a pour objectif de comparer les activités antibactériennes des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo*, des huiles commerciales de la citrouille et des herbicides (Métribuzine et Linuron) entre eux.

Notre plan de travail s'articule autour de trois parties importantes, à savoir :

Revue bibliographique mettant l'accent sur la plante médicinale *Cucurbita pepo* (Citrouille), et la toxicité des herbicides Métribuzine et Linuron enfin la présentation de quelques souches bactériennes responsables d'infections urinaires et d'intoxication alimentaire.

- Partie expérimentale consacrée à la caractérisation des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo*, cultures de bactéries choisies et l'étude antibactérienne des huiles végétales extraites et commerciales de la citrouille.

- Présentation des résultats et leur discussion.



Chapitre I



Chapitre I : Plante *Cucurbita pepo* (Citrouille)

I-Généralités sur les cucurbitacées

Cucurbita (latin pour calabasse) (**Burrows et al., 2013**) est un genre d'herbacées vignes de la famille des cucurbitacées. Cette famille végétale offre une incroyable diversité de fruits : la volupté de leur forme, la couleur de leur peau, la multiplicité de leurs usages expliquent que les cucurbitacées comptent parmi les plantes les plus connues et les plus cultivées au monde. Elles ont eu un rôle majeur dans le développement de l'agriculture naissante en Amérique, d'où leur culture s'est propagée à tous les continents. Un peu partout sur le globe, les cucurbitacées sont aujourd'hui consommées (melon, pastèque, courgette), utilisées comme objets du quotidien (gourde) ou comme médicament (margose) (**Bérard et al., 2000**).

I-1-Origine et distribution des cucurbitacées

Citrouilles, y compris *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo* et *Cucurbita maxima* sont des courges de calabasse qui appartiennent au genre *Cucurbita* et la famille Cucurbitacées (**Okada, 2002**). Les citrouilles ont été principalement utilisées par les Américains indigènes pendant des siècles. La preuve est liée à des graines de citrouille datées entre 5500 et 7000 av. J.-C, qui ont été trouvées en Mexique (**Ghedira et Goetz, 2013**) et plus tard adaptées par Européen suite aux expéditions de Christophe Colomb dans le nouveau monde au XVIème siècle (**Ahamat-Silaye, 1981**). Actuellement, les États-Unis sont le plus grand centre de production de citrouilles, suivis du Mexique, de l'Inde et de la Chine. La citrouille est une plante tropicale importante pour les feuilles et les légumes, riche en valeurs nutritives et médicinales traditionnelles (**Nkang et al., 2004**). Ses fruits, fleurs et graines ont été consommés sous forme de légumes, riches en vitamines et en antioxydants, notamment A, C et E. Les extraits de citrouille (croûte, chair, huile de graines et graines dégraissées) possèdent divers activités biologiques qui peuvent être caractérisées en activités antimicrobiennes, antivirales, cytotoxiques et anti tumorales (**Badr et al., 2011**).

I-1-2-Les noms vernaculaires de la citrouille

Les différentes dénominations attribuées à la citrouille sont données dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Les noms vernaculaires de la citrouille (Ghedira et Goetz, 2013).

	Dénomination de la citrouille
Français	courge, courge pépon, courgette, pépon, gourde
Allemand	Kürbissamen, Gewöhnlicher Kürbis
Anglais	Gourd, pumpkin, field pumpkin, squash, vegetable marrow
Italien	zucchina, zucca, zucchette
Espagnol	Calabacin, calabaza de San Juan
Grec	Σ κουός
Arabe	Qaraa, Elyaqtin " الفرع , اليقطين "

I-1-3- Classification des cucurbitacées

Dans la grande famille des Cucurbitacées, les botanistes ont identifié environ 130 genres différents, eux-mêmes divisés en 800 espèces environ (BenAlia, 2016). Parmi eux on distingue le genre *cucurbita* (Figure n°1). Ce genre comprend treize espèces, dont cinq sont cultivées pour l'alimentation :

- *Cucurbita ficifolia* : par exemple la courge de siam
- *Cucurbita maxima* : communément appelée potiron
- *Cucurbita mixta* : communément appelée la courge mexicaine
- *Cucurbita moschata* : communément appelée courge musquée ou muscades
- *Cucurbita pepo* : communément appelée citrouille



Figure n° 1 : Quelques espèces de certaines cucurbitacées (BenAlia, 2016)

I-2-Généralité sur *cucurbita pepo*

Cucurbita pepo ou citrouille est originaire d'Amérique est indigène sur les plateaux d'Amérique centrale et du sud, mais est cultivé dans le monde entier (Nkang et al., 2004). *Cucurbita pepo*, courge d'hiver, citrouille, calabaza ou moelle, est une espèce de cucurbitacée originaire d'Amérique du Sud et cultivée par des indigènes depuis plus de 2000 ans mais maintenant cultivée dans des régions chaudes du monde entier dans le commerce et dans les jardins familiaux, et fourrage pour animaux et pour l'huile des graines. *C. pepo* est à l'origine de nombreuses variétés de courges d'hiver (gland, banane, renoncule, kabocha, golden delicious, hubbard et lakota), ainsi que des variétés de courges géantes (de plus de 45 kg) (Whitaker et Davis, 1962). Ils sont caractérisés par leur huile de graines. La plante de citrouille a été cultivée depuis la première histoire de l'humanité (Brucher, 1989). Citrouilles sont cultivées dans le monde entier pour la variété des fins agricoles, les graines montrent anti-helminthic, diurétique de ténion, cardio tonic, anti-inflammatoire, anti-diabétique, anti-hyperlipidémie, activité anti-giardique stimulant du SNC, activité inhibitrice de la mélanogénèse et immunité immunitaire. action modulatrice. L'huile de graines est tonique nerveine. Les graines de *Cucurbita pepo* sont une bonne source de vitamines, minéraux, calories et protéines. Plusieurs formes de phytase trouvées dans les cotylédons de *cucurbita maxima* en germination des graines. Les graines sont riches en tocophérols (δ tocophérols), en triterpènes et en acides gras insaturés (Das, 2010).

I-2-1-Répartition géographique

La citrouille est cultivée dans toute l'Inde et dans la plupart des régions chaudes du monde (Mitra et al., 2009). Différents types de courges de cette espèce ont été introduits en Amérique du Nord dès le 16ème siècle. Par la Révolution américaine, l'espèce était cultivée par des tribus amérindiennes dans les États-Unis actuels. Au début du 19e siècle, on sait qu'au moins trois variétés ont été introduites commercialement en Amérique du Nord à partir de graines obtenues auprès d'Amérindiens. Les centres secondaires de diversité comprennent l'Inde, le Bangladesh, le Myanmar et peut-être le sud des Appalaches (Hutton et Robinson, 2014). (figure n°2).

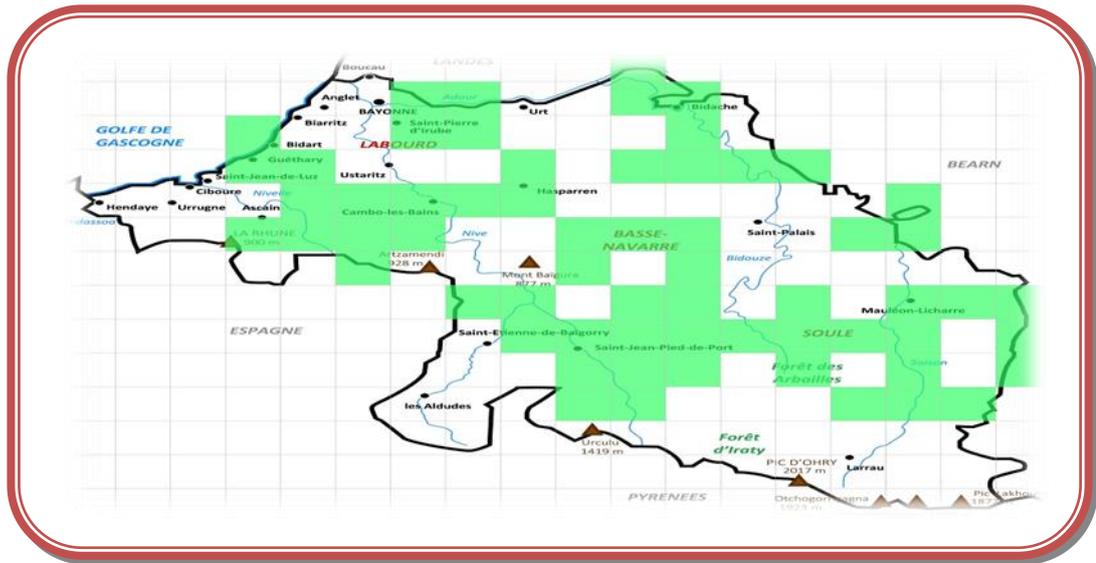


Figure n° 2 : Les régions de cultivassions d'espèce *cucurbita pepo* (Hutton et Robinson, 2014)

I-2-2-Classification et taxonomie de *Cucurbita pepo* :

La classification de *Cucurbita pepo* est représentée dans le tableau 02.

Tableau 02: Classification de *Cucurbita pepo* (Mythili et Siddha, 2017).

Règne	Plantae
Division	Manoliophyta
Subdivision	Spermatophytes
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Poly patellae
Superordre	Rosanae
Ordre	Cucurbitales
Famille	Cucurbitaceae
Genre	<i>Cucurbita</i>
Espèce	<i>pepo</i>



I-2-3-Description botanique

Les plantes de *C. pepo* sont des plantes herbacées annuelles intolérantes au gel, prostrée, grimpant par des vrilles latérales à 3-4 branches fortement ramifiées, ayant de grand fruit charnus de 15 à 40 cm de diamètre et peut atteindre jusqu'aux 50 kg (**Fedha et al., 2010**). Les tiges, plus ou moins épineuses, sont généralement des lianes rampantes ou grimpantes atteignant jusqu'à 10 m de longueur, avec des vrilles qui permettent de leur permettre de s'agripper aux supports. Les feuilles sont simples, alternes et superficielles à profondément lobées. Elle est caractérisée par de grandes fleurs (07- 12 cm) jaunes citron à jaunes doré, solitaires et unisexuées (**Boullard, 2001**). Les fruits (techniquement appelés pepos) sont relativement gros et nécessitent généralement une longue période de croissance pour le développement.

La citrouille varie beaucoup de forme, allant d'oblat à oblongue. La croûte est lisse et habituellement légèrement nervuré. Bien que les citrouilles soient généralement orange ou jaune, certains fruits sont vert foncé, pâle vert, orange-jaune, blanc, rouge et gris (**Blancard et al., 1994**). Renferme de nombreuses graines blanchâtres, ovoïdes, aplatis et entourées d'un bourrelet périphérique (**Ghedira et Goetz, 2013**). Les différents organes de la citrouille (*Cucurbita pepo*) sont illustrés dans le tableau 03.

Tableau 03 : Illustration de quelques organes de *Cucurbita pepo*

Espèce	Feuilles et fleur	Fruits	Graines
<i>C. pepo</i> (citrouille)	 https://www.visoflora.com	 https://tr.123rf.com	 http://yoan-sourisse.fr

I-2-4- Exigence climatique et de sol

La citrouille est largement cultivée dans les régions tropicales et subtropicales (**Das et Banerjee, 2015**). Elle nécessite une température élevée au-dessus de 25 °C au cours de la période de croissance (Températures de 20 °C à 35 °C sont idéales pour une production maximale) et une humidité assez faible (**Obiakor-Okeke et Alawuba, 2014**). Elle pousse mieux dans les sols fertiles bien drainés avec un pH entre 6 et 6,5, bien qu'elle tolère les sols légèrement acides ou légèrement alcalins, périodes de croissance de 4 à 5 mois (**Napier, 2009**).

I-2-5-Composition chimique de la citrouille cucurbita pepo

La citrouille est un légume sain et fonctionnel ayant une valeur nutritionnelle très élevée, mais varie d'une espèce ou d'un cultivar à un autre (**Rakcejeva et al., 2011**). Les fruits à la citrouille sont principalement constitués de pulpe et de graines. Beaucoup composants nutritionnels, y compris les polysaccharides de citrouille, les caroténoïdes, les minéraux, les acides aminés et les protéines actives sont trouvés dans la pulpe de citrouille (**Zhou et al., 2007**). Selon (**Chigwe et al., 1994**), la composition proche de la pulpe de citrouille variait entre 75,8 et 91,33% d'humidité, 0,2 et 2,7% de protéines brutes, 0,47 et 2,1% de cendres brutes et 3,1 et 13% de glucides. Elle est également une source précieuse d'autres vitamines, par exemple B6, K, thiamine et riboflavine, ainsi que des minéraux, par exemple du potassium, du phosphore, du magnésium, du fer et du sélénium (**Assous et al., 2014**). Le principal caroténoïde de la citrouille (> 80%) est le β -carotène, avec des quantités moindres de lutéine, de lycopène, de β -carotène et de cis- α -carotène (**Seo et al., 2005**).

Les graines de citrouille sont riches en huile et la variabilité de la teneur en huile est due à sa grande diversité génétique. Les graines de citrouille ont une valeur nutritive élevée (tableau 04), fournissent une huile de bonne qualité et une excellente source de protéines. En raison de la présence d'acides gras hautement insaturés. **Alfawaz (2004)** a signalé que la graine de *cucurbita maxima* contenue 39,25%: protéines brutes, 27,83% de pétrole brut, 4,59% de cendres et 16,84% de fibres brutes concentration de P, Mg et K. L'huile de graines de citrouille est bien adaptée pour améliorer les avantages nutritionnels des aliments.

Tableau 04 : Composants bioactifs et leur pourcentage dans les graines de citrouille (valeur nutritive pour 100 g) (Hussain Dar et al., 2017).

Composants	Valeur nutritive	Pourcentage de RDA
Énergie	559Kcal	28
Les glucides	10.71g	8
Protéine	30.23g	54
Graisse totale	49.05g	164
Cholestérol	0mg	0
Fibres alimentaires	6g	16
Vitamines		
Folate	58µg	15
Niacine	4.987mg	31
Acide pantothénique	0.750mg	15
Pyridoxine	0.143mg	11
Riboflavine	0.153mg	12
Thiamine	0.27mg	23
Vitamine A	16IU	0.5
Vitamine C	1.9µg	3
Électrolytes		
Sodium	7mg	0.5
Potassium	809mg	17
Minéraux		
Calcium	46mg	4.5
Cuivre	1.343mg	159
Le fer	8.82mg	110
Magnésium	592mg	148
Manganèse	4.543mg	19
Phosphore	1.233mg	176
Sélénium	9.4mg	17
Zinc	7.81mg	71

I-2-6-Composition et caractérisation de l'huile de graines de Cucurbita pepo

L'huile de graines de citrouille est de couleur vert foncé qui contient une grande quantité d'acides gras libres dont quatre acides gras dominants (oléique, linoléique, palmitique et stéarique) sont présents avec une répartition relative de 43,8%, 33,1%, 13,4% et 7,8% représentant respectivement 98 + 0,1% de la quantité totale d'acides gras (**Badr et al., 2011**). La teneur en huile des graines de citrouille sèches est de 47,03%. Cependant, la variabilité de la teneur en huile de diverses espèces de citrouilles est principalement attribuée à sa grande diversité génétique (**Younis et al., 2000**). L'huile de graines a également été trouvée riche en tocophérols avec une prédominance de δ -tocophérol (42,27%). Le marqueur de stérol β -sisostérol représentait 39,6% des stérols totaux contenus dans huile de graines. l'acide phénolique (protocatéchique, caféique, syringique, vanillique, p-coumarique et férulique) (**Richa et al., 2012**).

Fait important, l'huile de graines de citrouille est utilisée comme complément alimentaire pour les sources naturelles de protéines, acides gras essentiels, acides gras polyinsaturés, oméga 3, 6 et 9, carotènes, lutéine, vitamines telles que caroténoïdes et β - et γ -tocophérols, phytostérols, chlorophylle et des oligo-éléments, tels que le zinc et le sélénium (**Tsai et al., 2006**).

I-2-7-Utilisations culinaire et thérapeutique de la citrouille

De nos jours, la citrouille est cultivée à la fois pour les fruits et les graines qui sont utilisés de façon variée (**Zdunić et al., 2015**). Elle est l'un des légumes riches en constituants nécessaires à la bonne santé de l'Homme, elle a joué depuis les temps anciens un rôle essentiel dans le régime alimentaire des communautés rurales ainsi que dans la médecine traditionnelle. Elle a de nombreuses applications culinaires où elle est utilisée soit fraîche comme un dessert en Turquie (**Aydin et Gocmen, 2015**), ou cuite comme plat principal ou ingrédient dans les tartes, soupes, ragouts et préparations de boulangeries (**Durante et al., 2014**), ou bien traitée pour obtenir le jus et les marinades (**Aydin et Gocmen, 2015**).

De manière significative, les extraits de graines de citrouille ont été utilisés en tant qu'adjuvant pour l'immunomodulation, la santé reproductive et à des fins thérapeutiques pour une large gamme de pathologies (**Fruhworth et al., 2007**).

En outre, les acides gras essentiels omégas 3 et 6 dans l'huile de graines de citrouille sont importants pour le fonctionnement sain du cerveau et du corps ainsi que pour la prévention et l'amélioration des problèmes de la vessie et de la prostate (**Taylor et al., 2006**).

La consommation d'huile de graines de citrouille peut aider à la prévention et la thérapie des maladies cardiovasculaires, les infections des voies urinaires, problèmes digestifs (**Filbrandt et Katelyn, 2012**), le cancer de la prostate et du sein (**Nakic et al., 2006**).

Les graines sont utilisées comme un ténicide. L'huile est prescrite comme un tonique nerveux. La pulpe du fruit est souvent utilisée comme cataplasme. Les graines sont un remède populaire ancien pour ténia Malte, généralement considéré comme très efficace et sûr. Le fruit est considéré comme sédatif, émollient et réfrigérant. La pulpe est appliquée aux brûlures et aux échaudures, les inflammations, les abcès et les furoncles; il est également prescrit dans la migraine et la névralgie. Les graines sont utilisées comme anthelminitiques, plus particulièrement comme ténicides (**Sarvesh, 2012**). Cependant, elle présente diverses activités pharmacologiques tels que : les activités antioxydante et antimicrobienne, et les effets hypoglycémians, antihypertenseurs, antalgique (**Ponka et al., 2015**) et anticancéreux notamment du cancer gastro-intestinal (**Hosseinzadeh-Colagar et Amjadi-souraki, 2012**).

Elle inhibe la prolifération et le développement de plusieurs genres bactériens, par exemple *Klebsilla*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* et *Stapylococcus aureus* (**Caili et al., 2006**).

Des études *in vivo* en induisant le diabète par l'alloxane aux souris, montrent que les polysaccharides de la citrouille liés aux protéines provoquent une augmentation significative de taux de l'insuline sérique. En outre, ils réduisent le taux de glucose sanguin et améliorent de la tolérance au glucose (**Jin et al., 2013**).

I-2-8-Observations chez l'homme

Les études cliniques ont permis de mettre en avant les excellents résultats de traitement avec les graines de la citrouille tant pour l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) stades I et II selon Alken dans la majorité des études que pour l'inflammation de la vessie (**Alken, 1973**).

Notamment une étude clinique multicentrique, portant sur 2245 patients atteints d'HBP a été conduite sur une durée de 12 semaines, avec 500 à 1000 mg d'extrait de citrouille par jour.

L'influence sur la qualité de vie a été soigneusement notée chez plus de 46 % des sujets et 96 % d'entre eux n'ont mentionné aucun effet indésirable au cours du traitement (**Schilcher et al, 1990**).

L'efficacité d'un extrait des graines de la citrouille associé à un extrait de palmier nain a également été démontrée chez un groupe de 53 hommes souffrant d'HBP. Après 3 mois de

traitement, les résultats montrent une amélioration significative des paramètres étudiés (difficulté dans l'évacuation de l'urine, le débit urinaire, la fréquence de la miction) (**Carbin et al, 1990**).

I-2-9- Emploi des graines de la citrouille en santé naturelle :

Les graines de la citrouille ont longtemps été utilisées par la médecine populaire pour leurs propriétés vermifuges (**Zhang et al, 1994**).

Ses propriétés diurétiques et de laxatif doux étaient aussi reconnus. Ce n'est que récemment que l'on a découvert les propriétés décongestionnantes de l'huile extraite des graines, utilisées dans le traitement des symptômes de l'hyperplasie bénigne de la prostate (**Carbin et al, 1990**).

I-2-10- Aucun risque de toxicité :

Provenant d'un aliment très répandu, les graines de la citrouille ne présentent *a priori* aucun danger.

Toutefois, avant tout traitement concernant un problème urinaire, il est indispensable de consulter préalablement un médecin pour identifier clairement l'origine du problème.

Un emploi prolongé ou excessif des huiles extraites des graines la citrouille peut entraîner une baisse du taux de potassium. En dehors de cette précaution, aucune contre-indication est à signaler, même pas pour la femme enceinte ou allaitante. Aucune interaction médicamenteuse n'est connue. Quelques cas d'allergie ont été signalés et étudiés (**Figueredo et al, 2000**).



Chapitre II : Pesticides

II - Généralités

Les pesticides sont des produits chimiques synthétiques très utilisés en agriculture pour détruire les ravageurs et parasites responsables de la transmission de maladies à l'homme et l'animal ainsi que tous les organismes vivants indésirables (végétaux et animaux) induisant des dommages durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires et des produits agricoles ou des aliments pour animaux. Les pesticides tendent aussi à combattre les insectes, les arachnides et d'autres parasites présents dans ou sur les corps des animaux domestiques (**Council of Europe, 1992**). Les pesticides sont des substances ayant une activité biologique orientée vers les fonctions physiologiques des prédateurs ou parasites et entraînent leur élimination (**Calvet et al., 2005**).

II -1- Classification des pesticides

II -1-1-Classification biologique

Les pesticides peuvent être classés sur la base de leurs objectifs de ravageurs visés. Ces catégories sont décrites ci-dessous (**Freedman., 1995**) :

1- Les fongicides sont utilisés pour protéger les plantes et les animaux cultures de champignons.

2- Les herbicides sont utilisés pour tuer les plantes adventices, de manière à libérer des plantes cultivées souhaitées de la concurrence.

3- Les insecticides sont utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les vecteurs de maladies humaines mortelles telles que le paludisme, la fièvre jaune, trypanosomais, la peste et le typhus.

II -1-2- Classification selon la nature

Les pesticides sont classés en bio-pesticides toxiques traditionnels et produits chimiques (**Jesse-Uneke., 2007**).

II -1-2-1- Bio-pesticides

Les bio-pesticides s'appliquent avec un pulvérisateur conventionnel ce qui en facilite l'adoption par les producteurs agricoles. Ils sont généralement compatibles avec des méthodes

de lutte biologique classiques (exemple ; lâchers de prédateurs ou de parasites), même s'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes utiles. Les bio-pesticides peuvent être à base de bactéries, champignons, virus, nématodes et d'extraits de plantes (**Vincent et al., 2000**).

Les bio-pesticides peuvent être des plantes, des produits phytosanitaires incorporés (PIP), des pesticides biochimiques, des régulateurs de croissance des insectes, des pesticides microbiens et des produits de fermentations (avermectines) (**Jesse-Uneke., 2007**).

II -1-2-2- Produits chimiques

❖ *Pesticides inorganiques*

Ils ne contiennent pas de carbone dans leur composition chimique. Ces composés ont généralement des poids moléculaires relativement faibles et contiennent souvent moins de 10 atomes. Plusieurs sels inorganiques (souvent blancs et cristallins) sont classés dans cette catégorie de pesticides. Leur utilisation a diminué après le développement de pesticides organiques plus efficaces et moins persistants (**Pimentel., 2002**).

❖ *Pesticides organométalliques*

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe d'un métal tel que le zinc et le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate. Des exemples de ces pesticides sont le mancozèbe (avec le zinc) et le manèbe (avec le manganèse) (**Calvet et al., 2005**).

❖ *Pesticides organiques*

Les composés organiques ont une structure à base d'atomes de carbone combinés avec de l'hydrogène et d'autres éléments. Les pesticides organiques de synthèse peuvent être séparés en groupes en fonction de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires. On distingue comme principales familles (**Chiali., 2013**). :

- **Organochlorés** : comprenant les composés aromatiques comme le DDT (bis(4-chlorophényle)-1,1,1-trichloroéthane) et les cyclodiènes comme la dieldrine. Parmi les organochlorés; le lindane, biphényles polychlorés (BPC).

- **Organophosphorés** : La synthèse des esters d'acide phosphorique a permis l'émergence de cette famille d'insecticides afin de protéger les cultures.

- **Pyréthrinoïdes de synthèse et les carbamates** : Les pyréthrinoïdes de synthèse sont des analogues stables de dérivés naturels du pyrèthre. Elles représentent actuellement 30 % du marché mondial, et sont utilisées comme phytosanitaires, insecticides ménagers et antiparasitaires

vétérinaires et humains. Les carbamates sont agi là d'un groupe chimique très important du point de vue phytosanitaire puisqu'on y trouve à la fois des insecticides, des fongicides et des herbicides.

- **Organoazotés** : principalement utilisés comme herbicides (Exemple: atrazine, simazine, triazine, etc...).

II- 2. Métribuzine

C'est un herbicide de type Triazine. Il agit au niveau des systèmes de transport des électrons lors du processus de la photosynthèse chez les plantes (**McFarland et al., 2011**).

II-2-1- Propriétés chimiques

Métribuzine a pour nom chimique ; 4-amino-6(1,1-diméthyléthyl)-3-(méthylthio)-1,2,4-triazine-5(4H) one) (figure n°03).

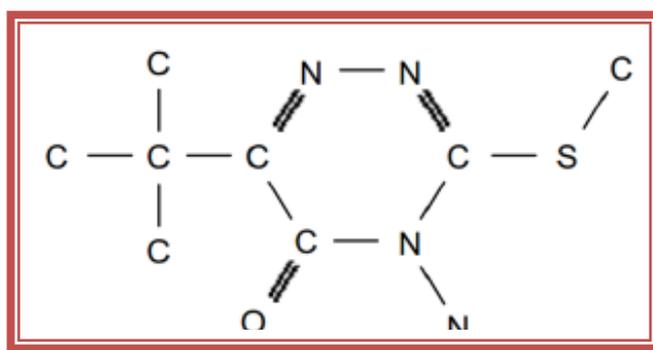


Figure n°03 : Structure de métribuzine (**Morgan., 2001**).

C'est un solide cristallin blanc, soluble dans l'eau de à 20°C, ce qui le rend mobile dans le sol, avec une demi-vie de 30 à 60 jour dans le sol.

Sa dose létale (DL₅₀ orale) par voie orale chez le rat est de 1090 mg/kg (**Monaco et al, 2002**). Métribuzine a une toxicité aiguë modérée par voie orale, chez les mammifères (DL₅₀ 322 mg / kg), cette toxicité est faible par la voie cutanée et par inhalation (DL₅₀ > 5000 mg / kg et CL₅₀ > 2,0 mg / L, respectivement) (**EFSA., 2006**). La métribuzine est relativement stable et non décomposé par les photons radiations à UV (**Monaco et al, 2002**).

II-2-2- Toxicité

La métribuzine présente différents effets nocifs (**Pohanish., 2012**):

-**Exposition à court terme** : Métribuzine peut affecter le système respiratoire par inhalation et aussi s'introduit rapidement dans l'organisme par simple contact avec la peau.

L'intoxication aiguë peut causer des troubles de respiration et de la somnolence. Des expositions fréquentes à la Métribuzine peuvent entraîner des maux d'estomac, la fatigue et une atteinte du système nerveux central, provoquant une mauvaise coordination, des tremblements et une faiblesse.

-Exposition à long terme : une forte exposition ou une exposition répétée peut altérer l'activité des enzymes hépatiques, développer le goitre et ainsi affecter la fonction thyroïdienne.

❖ **Tissus cibles** : Système nerveux central, la thyroïde et foie.

NOAEL de la Métribuzine : La dose maximale sans effet nocif observable (DMSENO) ou NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) correspond à la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe pas d'augmentation significative en fréquence ou en sévérité d'un effet nocif, dans un groupe exposé à la substance par rapport à un groupe non exposé. Cette dose est inférieure à 30 ppm (McMahon., 1993).

DMENO de la Métribuzine : c'est la dose minimale pour un effet nocif observable ou LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level). Cette dose pour la Métribuzine est de 30 ppm (McMahon., 1993).

Dose maximale tolérée (DMT) : est définie comme la dose induisant des signes de toxicité non susceptibles d'exercer des effets létaux (OECD., 2013). La dose maximale tolérée (DMT) de métribuzine est de 900 ppm (McMahon., 1993).

II-2-3- Métabolisme des pesticides

Le métabolisme des pesticides, chez les animaux, est un mécanisme important par lequel les organismes à se protéger contre l'effet toxique des xénobiotiques (produits chimiques étrangers). Le foie est le principal organe qui intervient dans ce mécanisme.

La membrane des cellules constitue une barrière efficace protégeant les cellules contre des xénobiotiques hydrosolubles. Après pénétration dans une cellule, le xénobiotique est rapidement pris en charge par des transporteurs membranaires ou pompes d'efflux qui vont l'exporter à l'extérieur de la cellule. Il peut également être transformé par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques au cours de plusieurs réactions afin de faciliter son excrétion. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques représentent un système complexe essentiel à la protection de l'organisme (figure n°04).

La première étape (phase I) met souvent en jeu des cytochromes P450 (CYPs). Elle consiste en une activation métabolique qui conduit à la formation d'intermédiaires électrophiles hautement réactifs qui seront alors soumis aux enzymes de la phase II (enzymes de conjugaison ou transférases comme la glutathion-S- ou glucuro- transférase), capables de greffer des résidus hydrophiles (comme le glutathion). Les métabolites ainsi transformés sont excrétés de la cellule par des transporteurs membranaires d'efflux dits de phase III.

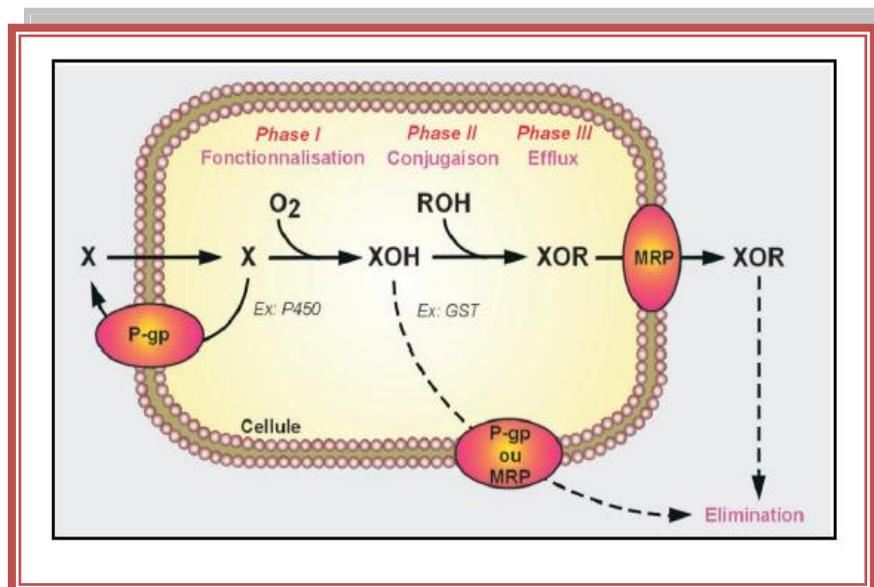


Figure n°04 : Processus de détoxification et de biotransformation des xénobiotiques (BenAlia, 2016)

L'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques dépend de la liaison des xénobiotiques à des récepteurs nucléaires. La fixation des xénobiotiques sur différents récepteurs nucléaires ou cytoplasmiques (PXR, Pregnane X Receptor ; CAR, Constitutive Androstane Receptor; AhR, Aryl hydrocarbon Receptor) déclenche la transduction d'un signal permettant l'induction des enzymes du métabolisme et des transporteurs nécessaires à leur élimination. Il s'agit d'une adaptation d'une cellule face au stress. Ce mécanisme de défense est lié aux processus de détoxification en générant des métabolites très toxiques qui interagissent avec des macromolécules cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides membranaires). L'activité de certains cytochromes P450 (cytochromes CYP1A1 et CYP2E1) peut conduire à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (Alpas et al., 2011).

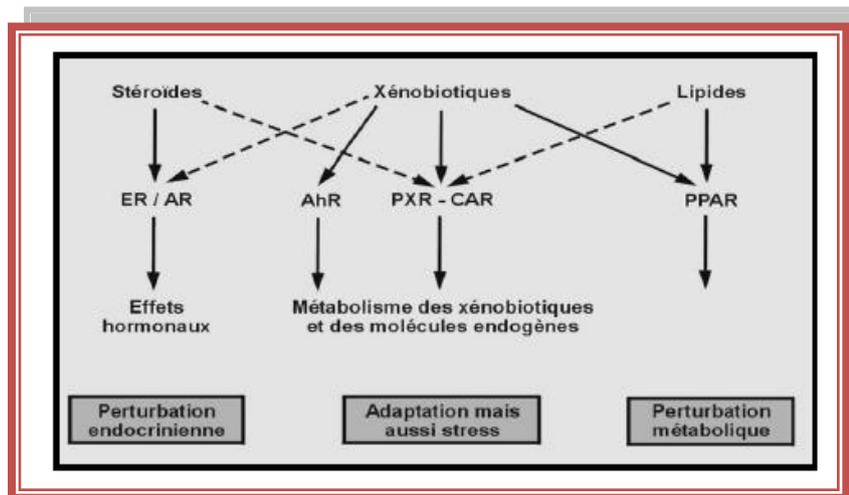


Figure n°05: Différents types de récepteurs des xénobiotiques (Ben Alia, 2016).

II-2-4. Effets toxiques des pesticides

➤ *Sur l'environnement*

Les pesticides contribuent à l'augmentation de la production agricole et à la qualité de la production végétale, mais ils peuvent s'accumuler dans le sol et dans l'eau et provoquer des dommages à la flore et à la faune, lorsque les concentrations dans les chaînes alimentaires deviennent assez élevées pour nuire à la faune et à la flore sauvage. Par ailleurs, les résidus des pesticides portent atteinte à la qualité des eaux potables et contaminent les aliments destinés à la consommation humaine. Ils ont des effets négatifs sur la santé des agriculteurs qui y sont directement exposés (OECD., 1999).

➤ *Sur la fertilité et la reproduction*

Les pesticides et leurs sous-produits ont été également identifiés en tant qu'agents susceptibles de porter atteinte au processus de fertilité masculine, via une toxicité testiculaire. Le lien entre pesticides et infertilité chez la femme reste inconnu. Des études faites sur des rats ont clairement montré les effets nocifs des pesticides sur le système de reproduction (Joshi et al, 2013). Il a été remarqué que chez des femmes exposées à des pesticides, le risque de mortalité intra-utérin augmentait et que la croissance foetale diminuait. A noter aussi que des pesticides ont été retrouvés dans le cordon ombilical mais aussi dans le lait maternel, ce qui pourrait expliquer le mauvais développement du fœtus, les malformations congénitales et les anomalies du système nerveux central. Les conséquences sont des avortements spontanés, des enfants mort-nés et des malformations congénitales. Il est souvent invoqué aussi une baisse de la fertilité qui est peut-être dûe à une perturbation endocrinienne (Levario-Carillo et al., 2004).

➤ *Effets cancérigènes des pesticides*

Rachel Carson montrait les effets délétères des pesticides chez l'homme, en particulier avec le développement des cancers. L'effet cancérigène de plusieurs pesticides est certain, probable ou possible selon le Circ (Centre international de recherche sur le cancer). Ce lien entre exposition aux pesticides et cancers est aujourd'hui démontré par les travaux de certains épidémiologistes. Par ailleurs, les agriculteurs qui utilisent des pesticides pour leurs cultures développent plus fréquemment certains types de cancers et en particulier les leucémies, les lymphomes et des myélomes multiples (**Deleage., 2013**).

➤ *Effets sur le système endocrinien*

Les effets toxiques induits par l'exposition chronique aux polluants environnementaux impliquent des dérèglements physiologiques qui vont affecter les fonctions essentielles de l'organisme, parmi lesquelles les fonctions endocriniennes et immunitaires. Les perturbations vont affecter le rôle que joue le système endocrinien dans le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité physiologique. Ces effets vont se répercuter sur la croissance, le métabolisme et sur la reproduction, mettant ainsi en danger la survie de la population. Parmi les polluants environnementaux, les modulateurs endocriniens tels que les pesticides et les métaux sont aujourd'hui largement étudiés. Les pesticides sont des perturbateurs endocriniens affectant le système hormonal et l'axe hypothalamus-hypophyse d'où une défaillance de l'équilibre homéostatique (**Pelletier et al., 2004**).

II-3- Linuron

C'est un herbicide qui agit par inhibition de la photosynthèse. Il fait partie de la famille des urées substituées. Il pénètre par les racines puis est transporté jusqu'aux feuilles par la sève brute. Il agit au maximum pendant quatre mois. On l'utilise à des doses de 500 à 1000g/ha.

Des expériences ont montré qu'une exposition in utero au Linuron altérerait la différenciation sexuelle de rats mâles par effet de perturbation endocrinienne (**Wolf et al., 1999**), en inhibant la conversion des androgènes en oestrogènes par l'aromatase (**Hirsh et al., 1984**).

II-3-1- Propriétés chimiques

Linuron a pour :

- **Nom chimique** : 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea

. **Formule moléculaire** : C₉H₁₀Cl₂N₂O₂

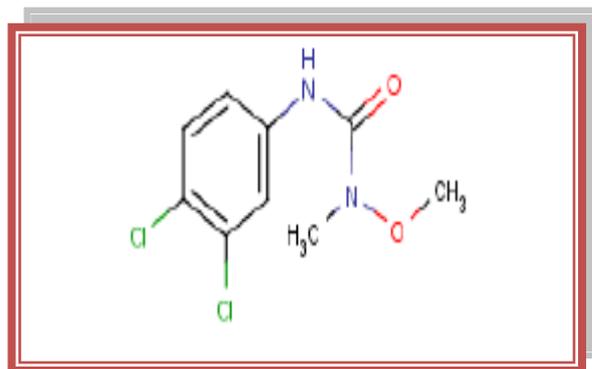


Figure n°06 : Structure moléculaire de Linuron (Petersen *et al.*, 2007)

II-3-2-Applications

Linuron est actuellement commercialisé comme herbicide et sélectionné pour le contrôle des mauvaises herbes durant les cultures de maïs, blé, soja, sorgho, coton, carottes et des pommes de terre (Bureau of National Affairs, 1988; U.S. EPA, 1988).

II-3-3- Toxicité

Linuron fait partie des substances pour lesquelles des effets endocriniens ont été mis en évidence (Petersen *et al.*, 2007).

Une ancienne étude menée sur la toxicité du linuron, par voie orale, chez le rat a élaboré une dose létale approximative allant de 1,0 à 2,25 g / kg (Hodge *et al.*, 1968). Les effets de linuron, sur une courte durée, étaient moins toxiques ou pas toxiques dans trois expérimentations différentes sur la génotoxicité à savoir : les mutations géniques, aberrations chromosomiques et les dommages l'ADN et leur réparation (Bureau of National Affairs, 1988 ; U.S.EPA, 1988).

Une étude de la toxicité de linuron chez des rats males, réalisée durant deux ans, a montré que le taux des cellules de Leydig endommagées était important à différentes doses croissantes de linuron : 0 ppm (5.9%), 50 ppm (16. 1%), 125 ppm (29.7%), and 625 ppm (56.1%) (Bureau of National Affairs, 1988; U.S. EPA, 1988).

Il a été suggéré que la toxicité de linuron induisait une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien responsable de l'apparition d'un carcinome folliculaire de la thyroïde (Hill *et al.*, 1989).

La toxicité de linuron a entraîné un dysfonctionnement physiologique. Un mécanisme impliquant une hypersécrétion de la thyroïdostimuline (TSH) a causé le développement de tumeurs thyroïdienne (Paynter *et al.*, 1988).

Le concept du dérèglement du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien favorise le développement des tumeurs thyroïdiennes. Ce concept a été appliqué à d'autres tissus endocriniens comme les testicules et générant ainsi des tumeurs des cellules de Leydig.

Linuron a été décrit comme un antagoniste des androgènes au niveau de leur récepteur cellulaire AR.

In vitro, le linuron inhibe de manière compétitive la liaison des androgènes à leur récepteurs AR à une dose 100 μM (**Bauer et al., 2001**) et agit comme un antagoniste AR faible dans les tests d'activation transcriptionnelle (**Lambright et al., 2000**).

Il a été montré que des doses élevées de linuron administrées in utero (75-100 mg / kg / jour) réduisaient la synthèse de la testostérone fœtale pendant la période critique de la différenciation sexuelle (**Wilson et al., 2004**).

L'augmentation de l'incidence des anomalies du développement de l'appareil reproducteur mâle est due à l'exposition à long terme à ce genre d'herbicide qui est une situation très alarmante (**Storgaard et al., 2006**).

Ces substances chimiques toxiques interagissent avec les récepteurs androgéniques (AR) et altèrent le métabolisme et la production de la testostérone ce qui endommagerait le fonctionnement physiologique des testicules chez la progéniture fœtale male.

Les malformations congénitales des organes de l'appareil génital male sont irréversibles. Plusieurs études ont confirmé les effets toxiques de Linuron au niveau de l'appareil reproducteur male des organismes aux stades fœtal et postnatal. Il est établi que la synthèse de l'hormone testostérone est régulée par les activités enzymatiques du cytochrome c P450. Ces enzymes catalysent la formation de testostérone à partir des molécules précurseurs de pregnenolone, cholestérol et $3\beta\text{-HSD}$ (**Issop et al., 2013**).

La compréhension du mécanisme de toxicité de Linuron nécessite l'exploration des modifications fonctionnelles de P450 induits par cette toxicité.

Peu d'informations ou de données sont disponibles à ce jour pour mieux comprendre comment la toxicité de Linuron altérerait le système reproducteur male, son mécanisme d'action reste toujours non élucidé.



Chapitre III : Présentation de quelques souches bactériennes

III-Staphylococcus aureus

III-1-Généralité sur les Staphylococcus

Les staphylocoques, membres de notre écosystème cutané, ensemble avec les streptocoques et les pneumocoques font partie d'un groupe d'agents pathogènes à Gram positif opportunistes et envahissants, connus sous le nom de cocci pyogènes, responsables d'une variété d'infections humaines (**Lowy, 1998**). *Staphylococcus aureus*, l'espèce la plus virulente du genre *Staphylococcus*, a émergé comme l'un des agents pathogènes humains les plus importants, et a été au cours des dernières décennies, une des principales causes des infections hospitalières et communautaires (**Lyon et Skurray, 1987**). Impliqué dans des pathologies variées dont 1 à 5% des infections communautaires et jusqu'à 30% des infections acquises en milieu hospitalier (Infections nosocomiales)(**Lowy, 2003**).*S. aureus* provoque un large éventail d'infections cliniques, allant des infections courantes telles que les infections de la peau et des tissus mous à des infections meurtrières comme la septicémie, la pneumonie et les toxinoses, telles que le syndrome du choc toxique (**Johnson, 2011**). L'une des raisons qui expliquent le succès de ce pathogène humain est son importante variabilité survenant à différentes périodes et lieux avec divers types de clones et profils de résistance aux antibiotiques selon les régions et les pays (**Kopp et al, 2004**).

Les caractères métaboliques au sein d'un même groupe ont permis d'individualiser quelques 39 espèces et sous-espèces (**Kloos et Bannerman, 1994**) qui présentent des adaptations variables selon le biotype pouvant être l'espèce de l'hôte ou l'habitat chez un même hôte. Chez l'homme, les infections à Staphylocoques peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané. Elles peuvent aussi diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique et un polymorphisme symptomatique extrême. L'existence de souches multirésistantes et l'apparition de nouvelles résistances peuvent poser de sérieux problèmes pour le choix du traitement de ces infections.

III-1-1-Historique et nomenclature

Plusieurs travaux réalisés dans les années 1870 ont mis en évidence la présence de cocci dans des pus et des abcès. Considérés comme une entité unique, ils furent nommés *Coccobacteriasepticum* par Billroth en 1874 (**Hill, 1981**).

Dans les deux premières communications à l'académie des sciences en 1876 et 1880, Louis Pasteur a révélé et insisté sur l'existence de cette bactérie, qu'il avait isolée à la fois du pus de l'anthrax et de l'ostéomyélite et aussi des eaux de la seine (**Fasquelle, 1974**).

Ces germes, disposés en grappes de raisin à l'examen microscopique, ont été décrits par Robert Koch en 1878 (**Spicer, 2003**).

Ces isolats observés et identifiés en 1879 dans des pus de furoncle et d'ostéomyélite par Pasteur comme étant "un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associés en petits amas". Ainsi, ils les ont cultivés en 1880 et disait que "l'ostéomyélite est le furoncle de la moelle épinière" (**Spicer, 2003**).

Ce n'est que plus tard; en 1882 que le nom "Staphylocoque" a été donné par le chirurgien Ogston, pour décrire ces grains (*kokkos*), groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (*Staphylos*) (**Eykin, 1996**). .

Koch, Pasteur et Ogston ont réussi à reproduire des abcès chez l'animal par inoculation des prélèvements de pus (**Fasquelle, 1974**).

En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries, il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (**Avril et al, 2003**).

III-1-2-Habitat

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont ubiquitaires, peu exigeantes et capables de vivre dans de nombreux sites, essentiellement en saprophyte de l'environnement extérieur, mais aussi en commensal des épithéliums cutanés et muqueux des hommes et des animaux.

Ils sont largement disséminés dans l'environnement, retrouvés dans le sol, les poussières (l'air), l'eau et dans certains produits alimentaires (laitages, conserves salées) (**Brecheet al, 1988**).

Ces bactéries survivent et prolifèrent du fait de leur particulière résistance aux conditions hostiles de l'environnement, tels que la dessiccation (ils survivent plusieurs mois dans des produits pathologiques desséchés), aux variations de température (ils résistent 2 h à 55° C, voire 1 h à 60° C), au choc osmotique (salinité de l'eau) et résistent encore mieux en milieux albumineux. L'Homme constitue un réservoir de plusieurs espèces de staphylocoques, dont *Staphylococcus aureus*. La bactérie colonise la peau, le tube digestif et la région périnéale des nouveau-nés puis reste en portage chronique chez 20 % des individus sains et en portage intermittent chez 30 à 50 % d'entre eux.

Les porteurs chroniques sont colonisés par une souche présente en forte densité, au contraire des porteurs intermittents colonisés par des clones différents au fil du temps et présents à des densités plus faibles. De ce fait, les porteurs chroniques sont plus à risque d'infection (**Wertheim *et al.*, 2005**). Différents facteurs de risque de colonisation liés à l'hôte sont identifiés : les sujets masculins, un âge supérieur à 60 ans, l'éthylisme chronique, le diabète, la présence d'un néoplasie, d'une insuffisance rénale terminale ou encore les pathologies pulmonaires chroniques (**Wertheim *et al.*, 2005**).

III-1-3-Classification et taxonomie

Selon la 9ème édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en GC, dans le phylum des firmicutes (**Prescott *et al.*, 2010**)

Tableau 5: la classification hiérarchique du Phylum XIII (*Firmicutes*)

Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

III-1-4-Caractères bactériologiques

III -1-4-1-Morphologie

A l'examen microscopique, les staphylocoques se présentent sous l'aspect de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînes de 3 à 5 éléments positivement colorés au Gram (**Fleurette, 1990**). Le mode de groupement dit en "grappe" ou en "amas" est plus caractéristique après culture sur un milieu gélosé (**Novick, 1990**). La disposition en amas s'explique par la division cellulaire des staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres, et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues (**Brun *et Bes*, 1990**).

Sur le plan individuel, ce sont des cocci mesurant 0,7 à 1,2µm (**Fleurette, 1990**), immobiles, asporulés, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule (**Kloos *et Lambe*, 1981**).

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (Fauchere et Avril ,2002).

Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (en générale de 3 à 5 éléments) (Le Minor et Veron, 1990).

Tableau 06 : Différents caractères bactériologiques de *Staphylococcus aureus* (Prescott et al, 2012).

Morphologie	Regroupé en paire, tétrade ou amas réguliers Immuable; non sporulé
Dimension (µm)	0,5-1.5
Teneur en GC (mol%)	33%
Taille du génome (Mb)	2,8 - 2,9
Type respiratoire	Aéro anaérobie facultatif
Type trophique	chimioorganotrophe
Métabolisme	Fermentaire et /ou respiratoire
Autres caractères	Catalase positive – oxydase négative Halophile – mésophile (37°C) et psychrophile (6-12°C) Neutrophile pH opt=7 ; pHm ; Aw : basse, jusqu'à 0,83

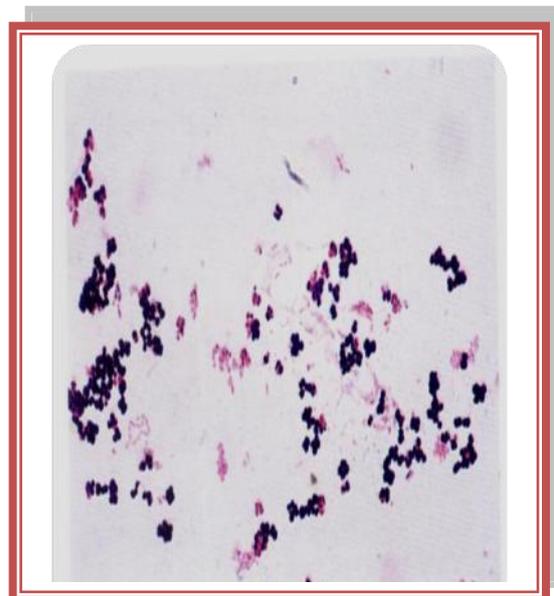
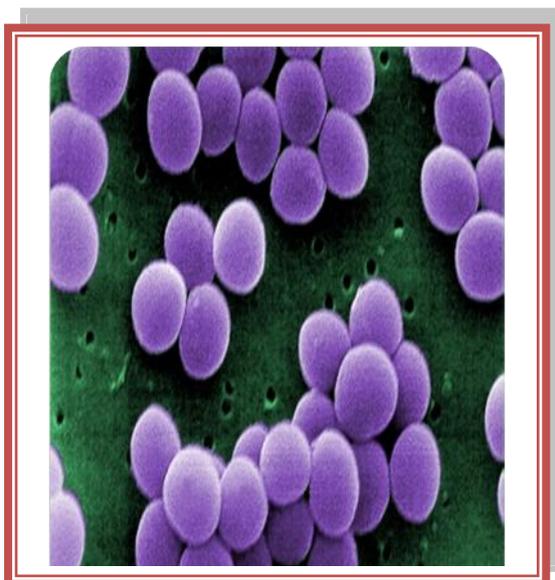


Figure n°7 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)(AOUATI HANANE.2009)

III -1-4-2- Caractères cultureux

Peu exigeants sur le plan nutritif, les staphylocoques sont aérobies anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO₂ pour croître), et croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. Certains facteurs de croissance sont indispensables (Vitamine B1, acide nicotinique) mais ils n'exigent pas de biotine ni de tryptophane, ils poussent en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et un de quatorze acides aminés dont la cystéine, la thiamine et l'acide nicotinique. La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7,5, mais de grandes variations sont tolérées (**Le Minor et Veron, 1990**). La température optimale de croissance est de +30 à +45°C avec un maximum à 37°C et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5 (**Fleurette, 1990**).

En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les staphylocoques semultiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt (**Fleurette, 1990**).

En milieu solide, on observe des colonies opaques, régulièrement rondes, lisses, plus ou moins bombées avec un diamètre variant de 1,5 à 4mm. La plupart des souches produisent alors un pigment doré non diffusible en 24 heures à 37°C, pigment qui sera plus prononcé après 24 à 48 heures de plus à la température ambiante (**Novick, 1990**).

En milieu gélosé au sang, on observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (bêta hémolyse) autour des colonies. Ceci est lié au fait que certains staphylocoques, en particulier *S. aureus*, sont susceptibles de synthétiser quatre hémolysines distinctes et variables d'une souche à l'autre, et dont l'activité diffère selon le type d'hématie en cause (**Novick, 1990**).

III -1-4-3- Caractères physiologiques et biochimiques

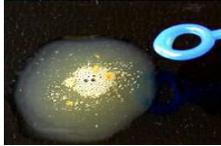
L'étude des différents caractères biochimiques et métaboliques de souches de staphylocoques a permis le développement de galeries d'identification rapides et efficaces, permettant de définir les différents profils biochimiques de souches appartenant à une même espèce (**Kloos et Bannerman, 1994**).

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (**Le Minor et Veron, 1990**).

De plus, la plupart des souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque. *S. aureus* possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques (**Ferron, 1984**).

Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés; (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis* (Fasquelle, 1974).

Tableau 07 : Caractères distinctifs de *Staphylococcus aureus* (AOUATI HANANE.2009)

	Espèce <i>S. aureus</i>	Autres espèces de staphylocoques	
Aspects des colonies	Pigment doré	Blanches	
Milieu de Chapman	Acidification du mannitol (jaune)	Pas d'acidification du mannitol (rouge) sauf <i>S. epidermidis</i>	
Staphylo-coagulase	Positive	Négative	

III -1-5 Pouvoirs pathogènes

➤ Infections à *Staphylococcus aureus*

S.aureus est typiquement porté de façon asymptomatique par l'homme et les animaux. Cependant, il est responsable d'une large gamme d'états pathologiques nécessitant un traitement. La nature et l'étendue de la maladie dépendent des caractéristiques de la souche infectante, la susceptibilité de l'hôte et la voie d'entrée. Les infections les plus courantes sont les infections de la peau et des tissus mous (*SSTIs* pour « *Skin and soft tissue Infections* ») incluant : la folliculite, le furoncle, l'anthrax, l'abcès, la cellulite, l'impétigo, les plaies chirurgicales postopératoires (Cohen, 2007) et les ostéomyélites (Cunningham et al, 1996).

Les souches portant des toxines particulières peuvent être associées à des états pathologiques spécifiques, y compris le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée (*SSSS* pour « *Staphylococcal scalded skin syndrome* ») (Ladhani et al., 1999) le syndrome du choc toxique (*TSS* pour « *Toxic shock syndrome* ») (Novick et Subedi, 2007).

la toxi-infection alimentaire (**Le Loir et al, 2003**) et la pneumonie nécrosante (**Labandeira-Rey et al.,2007**).*S. aureus* peut aussi provoquer une septécimie ou *sepsis*, lorsque le flux sanguin est infecté. Entre 1995 et 2002, 20% de septicémie nosocomiales aux États-Unis ont été causés par *S. aureus* (**Wisplinghoff et al., 2004**). De plus, les infections à *S. aureus* aux États-Unis causées par le SARM (64% en 2003) (**Klevens et al., 2006**) ont été associées statistiquement à une mortalité plus élevée (**Cosgrove et al., 2003**).

III-2-Pseudomonas aeruginosa

III-2-1-Généralités

La bactérie pathogène opportuniste actuellement connue sous le nom de *P. aeruginosa* reçu plusieurs noms à travers son histoire sur la base de ses cultures de coloration bleu-vert caractéristique produisant le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine, ainsi que son odeur aromatique caractéristique (seringat) (**Lister et al., 2009**).

Considéré longtemps comme un organisme largement opportuniste, *Pseudomonas aeruginosa* est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immunocompromis ou affaiblis (**Pier et Ramphal, 2005**).*P. aeruginosa* est un commensal du tube digestif, peu abondant chez l'homme en bonne santé (2 à 10 % de porteurs), mais la proportion de porteurs asymptomatiques chez les patients hospitalisés (essentiellement des personnes immunodéprimées) peut atteindre 50% sur certains sites et 60 % sur les plaies de brûlures ou d'escarres (**Minchella et al., 2010**). Ainsi, la principale source de contamination des patients hospitalisés est donc leur flore endogène mais l'environnement est également incriminé (**Minchella et al., 2010**). La transmission croisée est le plus souvent manuportée par le personnel soignant, soit directement de patient à patient, soit indirectement à partir de surfaces inertes préalablement contaminées. Dans les services de soins intensifs, *P. aeruginosa* évolue par bouffées épidémiques sur un fond endémique (**Lister et al., 2009**).

III-2-2- Historique et nomenclature

La bactérie fut découverte par Carle Gessard (1850-1925), Le chirurgien Charles-Emmanuel Sedillot en 1850 fut le premier à observer que la coloration de pansements chirurgicaux a été associée à un agent transmissible (**Lister et al., 2009**). C'est en 1869 que Fordos a souligné que la coloration était due à un pigment bleu cristallin appelé pyocyanine (**Williams et Cameron, 1894**). *P. aeruginosa* a été isolé pour la première fois treize ans plus tard en 1882 par Gessard qui a

démonstré que ce pigment a été le produit d'un organisme, *Bacillus pyocyaneus*(bacille pyocyanique) (**Gessard, 1984**).

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie versatile et ubiquitaire dans l'environnement. Etymologiquement, le mot issu du grec *pseudo* (=simili ou imitation) et *monas*(=unité) désignait les germes du début de la microbiologie. Le mot *aeruginosa*, qui signifie vert de gris en latin, fait référence au pigment contenu par la bactérie qui donne à la colonie sa couleur caractéristique. *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce type de *Pseudomonas*, également composé de 12 autres membres (**Yeterian, 2010**).

III-2-3- Habitat

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie saprophyte de l'air, l'eau et du sol, commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, elle possède un pouvoir pathogène étendu (**Bedouiet al, 2006**).

Le bacille pyocyanique est essentiellement une bactérie pyogène qui provoque chez l'homme et chez l'animal des suppurations superficielles et profondes à partir de ces suppurations on peut l'isoler (**Bedoui et al, 2006**).

Pseudomonas aeruginosa présente fréquemment dans le milieu hospitalier elle atteint essentiellement les sujets débilisés : cancéreux brûlés, insuffisants respiratoires. Sa présence dans certains prélèvements par exemple : les urines-témoigne de manœuvres instrumentales et du caractère iatrogène de l'infection. Il est également possible de l'isoler de coprocultures sans qu'un rôle pathogène précis puisse lui être attribué (**Ben messaoud, 2005**).

En revanche, les sujets atteints de mucoviscidose sont très souvent infectés au niveau pulmonaire par un type particulier de souches ; les pyocyaniques muqueux (**Ben messaoud, 2005**).

III-2-4- Classification

P.a est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des Pseudomonadaceae qui inclut dix genres : *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, et *Serpens*. P.a est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sa taxonomie est présentée dans le tableau 1 :

Tableau 08 : Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa*. (Ben messaoud, 2005).

Règne	Bacteria
Embranchement	Prokaryota
Division	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Aeruginosa</i>

III-2-5- Caractères bactériologiques

III-2-5- 1-Morphologie

Pseudomonas aeruginosa est un bacille Gram négatif en forme de bâtonnet, de 0.5 à 0.8 μm de diamètre sur 1 à 3 μm de long. Mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique, dépourvu de spores et de capsules. La paroi du bacille pyocyanique est caractéristique de celle des bactéries à gram négatif (Sadolff et Artenstein, 1974). Elle est constituée d'une membrane externe et d'un espace péri plasmique et du peptidoglycane. La membrane externe est une bicouche asymétrique constituée du lipopolysaccharide (LPS) et de phospholipides (PL) où se trouvent de nombreuses protéines telles que les porines qui assurent la diffusion de divers types de molécules à travers la membrane externe (Pages, 2004). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, on distingue plusieurs types de porines : Opr D (D1 et D2), Opr E (E1 et E2), OprH (H1 et H2), Opr G et Opr F qui présentent la majorité de porines non spécifiques dans cet organisme (Nikaido et al., 1991). La membrane de *Pseudomonas aeruginosa* est aussi caractérisée par l'existence de nombreuses pompes d'efflux telles que MexA- MexB –OpeM, MexC-MexD-OprJ, qui jouent un rôle important dans l'injection des agents antimicrobiens (Xavier et al., 2010).



Figure n°8 : la bactérie dans l'espace
(Kamer, 2013).



Figure n°9 :. Aspects microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* (354×300) www.microbeedu.org/.../imgburk/gram3.jpg

III-2-5-2-Caractères cultureux

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie très peu exigeante se multipliant sur des milieux synthétiques simple (Liletet al.,1983) elle pousse facilement en 24 heures à 37°C. Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30°C. Par contre, elle supporte de moindres variations de pH (6.5 à 7.5) avec un pH optimal de 7.2 (Souley, 2002).

Aérobies strictes, les bactéries de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* pouvant utiliser pour respiration les nitrates comme accepteurs d'hydrogène, en conséquence dans les milieux anaérobies contenant des nitrates, Elle est caractérisée par une odeur florale (Flandrois, 1997).

Un milieu sélectif à base cétrimide (ammonium quaternaire) permet la recherche et l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de produits biologiques (selles, urines, pus, liquide céphalo-rachidien...) en bactériologie médicale (Delarras, 2007).

Selon Denis (2007), trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée sur milieux solides :

- Colonies larges "L" de 2 à 3 mm de diamètre à bord irrégulier rugueux une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques.
- Colonies plus petites lisses "S" bombées à bord régulier.
- Colonies muqueuses "M" bombées coalescentes, filantes rencontrées chez les souches produisant un slime composé d'un polymère d'alginate.

- En 2 à 4 jours, on assiste souvent à un bleuissement ou verdissement des milieux de culture dû aux pigments diffusibles élaborés par la bactérie (**Lilet et al., 1983**).

III-2-5-3-Caractères physiologiques et biochimique

❖ La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* possède :

- La réduction des nitrates allant souvent jusqu'au stade azote gazeux.
- La présence d'une oxydase.
- Le métabolisme oxydatif des sucres, appréciable en milieu MVAG ou de Hugh et Leifson (milieu très pauvre en peptone recouvertes ou non de vaseline), retenir essentiellement l'action sur le glucose et sur le D-arabinose.
- Le pouvoir protéolytique : liquéfaction de la gélatine en entonnoir puis couper enversé.
- La présence d'une lécithinase, qui souvent ne peut être révélée qu'en milieu liquide :
 - sur milieux gélosés les « réactions restreintes » (techniques bactériologiques de la présente collection) sont fréquents.

• **Caractéristiques de divers pigments produits par *Pseudomonas aeruginosa***

D'après **Delarras (2007)**, *Pseudomonas aeruginosa* produit deux types de pigments (fluorescent ou non) qui servent à son identification. Ils peuvent être mis en évidence dans le milieu de King B et King A.

- **Pyoverdine**: pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme.
- **Pyocyanine (phénazinique)** : pigment bleu-vert non fluorescent soluble dans l'eau et le chloroforme. Cette espèce est la seule à le produire.

III-2-6-Physiopathologies

➤ **Les infections à *P. aeruginosa***

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste capable d'infecter une grande variété d'hôtes :

humain, souris, insectes, nématodes, plantes et amibes (**D'Argenio et al., 2001**). Chez l'homme, elle n'adhère pas à l'épithélium normal intact et ne provoque de maladie que lorsqu'il existe une défaillance du système immunitaire ou une lésion préexistante. *P. aeruginosa* colonise particulièrement les personnes immunodéprimées (patients atteints de leucémie, SIDA, cancer), les grands brûlés, les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose (**Branski et al., 2009**). Elle est capable de coloniser une grande diversité de tissus. Elle provoque des bactériémies, des infections intestinales, urinaires, des dermatites, des otites externes, des kératites ulcéreuses chez les

porteurs de verres de contact, des infections de la peau chez les grands brûlés, des endocardites chez les patients abusant de drogues intraveineuses, (Branski et al., 2009). *P. aeruginosa* est également capable de causer des méningites et des ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (Carek et al., 2001). Cette bactérie est impliquée dans des infections nosocomiales (Rosenthal et al., 2011). Elle cause plus de 4000 décès par an en France (Institut de Veille Sanitaire, 2007). Elle est en effet responsable de 16% des pneumonies nosocomiales, 12% des infections du tractus urinaire acquises à l'hôpital, 8% des infections liées aux interventions chirurgicales et 10% des infections du flux sanguin (Vitkauskienė et al., 2010).

Suite aux signaux environnementaux, *P. aeruginosa* est capable de provoquer une infection aiguë ou chronique. Chaque type d'infection est caractérisé par un certain nombre de facteurs de virulence exprimés par la bactérie (Hogardt and Heesemann, 2010). Le type de l'infection dépend aussi de l'efficacité du système immunitaire de l'hôte. Les principales pathologies causées par *Pseudomonas aeruginosa* sont résumées dans le tableau 09.

Tableau 09: Principales pathologies causées par *Pseudomonas aeruginosa* et classées Selon le site d'infection (Mesaros, 2007).

Site d'infection	Pathologie spécifique	Fréquence (dans une population à risque)
Tractus respiratoire	Pneumonie aiguë Infections chroniques de l'arbre bronchique	Fréquent (hôpital, soins intensifs) Mucoviscidose
Sang	Bactériémie et septicémie	Fréquent
Tractus urinaire	Infections aiguës Infections chroniques	Relativement fréquent (complication suite à la présence de corps étrangers)
Oreille	Otite externe ("oreille du nageur") Otite externe maligne Otite moyenne chronique suppurative	Fréquent
Peau et tissus mous	Dermatite Infections de plaies Ecthyma gangrenosa pyodermite Folliculite acné vulgaris résistant	Relativement fréquent (Traumatismes)
Oeil	Kératite (ulcère cornéen) Enophtalmie Ophtalmie néonatale	Rare (traumatisme)
Système nerveux central	Méningite Abscesses cérébrales	Rare (secondaire à une neurochirurgie ou à un traumatisme)
Tractus gastro-intestinal	Entérocolite nécrosante Infections périrectales	Rare
Coeur	Endocardite	(Abus de drogues intraveineuses)

III -3-Klebsiella

III-3-1-Généralités

L'infection microbienne occupe actuellement la première place dans les pathologies médicales. Elle est connue depuis longtemps, et depuis l'utilisation des antibiotiques, elle a progressivement changé de visage et les cliniciens ont été confrontés à des infections à germes autrefois réputés non pathogènes ou saprophytes. Un des exemples le plus frappant pour illustrer ce propos est *Klebsiellapneumoniae* (Kariuki et al., 2007).

Les infections à *Klebsiella* sont généralement des infections nosocomiales suite à des actes chirurgicaux lourds, de la pose de cathéter, de dialyse. Elles surviennent surtout chez les débilisés (cancéreux, cirrhotiques, diabétiques, vieillards et nourrissons.). Les septicémies à *Klebsiella* sont de pronostic sévère (Cisse, 2006). Elle est responsable de plus de 10% des infections nosocomiales (Hennequin et Forestier, 2007).

Les *Klebsiella* sont des bactéries très répandues dans la nature (l'eau, le sol, les végétaux, la flore fécale des animaux), sur la peau, les muqueuses et surtout les voies respiratoires supérieures de l'homme provoquant ainsi des pneumonies mortelles c'est pourquoi Friedlander les a appelé pneumobacilles (Le Minor et Veron, 1989). Elle résiste à la majorité des antibiotiques utilisés et rend ainsi difficile le traitement. Ceci pose un problème de santé publique car la population touchée est fragile (cancéreux, cirrhotiques, diabétiques, vieillards et nourrissons), surtout avec la problématique du VIH(13ème rapport d'évaluation de l'institut Pasteur d'Alger, 2011).

III-3-2-Historique et nomenclature

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan en 1887 pour honorer Klebs Edwin, un microbiologiste Allemand du 19ème siècle. L'espèce type est *Klebsiellapneumoniae*, connue autrefois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie (Freney et al, 2000).

III-3-3-Habitat

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire, et fréquemment isolée dans l'environnement à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, de végétaux, et de muqueuses des mammifères, en particulier de la flore fécale. Chez l'homme, cette espèce végète sur la peau, les muqueuses, les voies respiratoires supérieures et elle est isolée des selles chez 30 % des individus. Pour ce qui est des infections nosocomiales, le tube digestif des patients hospitalisés et les mains du personnel sont les deux sources principales. Les deux sous-espèces *K. pneumoniae subsp. ozaenae* et

K. pneumoniaesubsp. rhinoscleromatis n'ont été isolées qu'en situation pathogène de l'arbre respiratoire de l'homme (Baerwolf et al., 2002).

III-3-4-Classification

Tableau 10 : Taxonomie de *Klebsiella* (Avril et al., 2000).

Règne	Bactéria
Embranchement	Protéobactéria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Klebsiella</i>

Le genre *Klebsiella* (*Klebsielles*) comporte cinq espèces dont l'espèce type est *K.p* (Bergogne-Berézin et Dellamonica, 1995).

L'espèce *K.pest* subdivisée en 3 sous espèces : *K. pneumoniaesubsp pneumoniae*, *K. pneumoniaesubspzoaenae* et *K. pneumoniaesubspRhinoscleromatis* (Avril et al., 2000).

III-3-5-Caractères bactériologiques

III-3-5-1-Morphologie

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram négatif de 0.3 à 1.0µm de diamètre sur 0.6 à 6 µm de longueur, se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes chaînes et présentant les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae (Jonas et al. 2004). Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies (Nauciel, 2000). Très souvent encapsulés.

Cette capsule de nature polysaccharidique contient des acides hexuroniques (acides glycuronique et galacturonique), et de 2 à 4 sucres (galactose, glucose, mannose, fucose, rhamnose) (Richard et Grimont, 1992).



Figure n° 10 : Aspect de klebsiella en microscopie électronique (X 20000)

<https://www.gettyimages.fr/photos/>

klebsiella-pneumoniae .sort

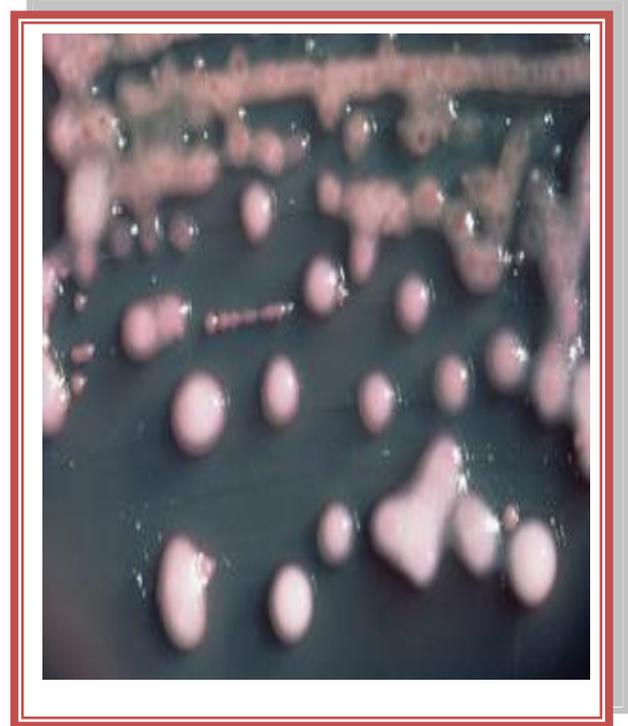


Figure n° 11 : Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu gélosé.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9e/Klebsiella_pneumoniae_01.png

Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, MacConkey), les colonies de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont lactoses positives, bombées, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine, d'un diamètre de 3 à 4 mm en 18 - 24 h à 37°C. En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30° et 37 °C pour *K. p* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface. A la différence des autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90% des souches de *K. pneumoniae* croissent à 44 °C en bouillon lactose bilié vert brillant et plus de 80% en fermentant le lactose avec production de gaz (**Le Minor et Véron, 1989**).

III-3-5-3- Caractères biochimiques❖ **Caractères biochimiques de l'espèce- type de *Klebsiellapneumoniae***

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries : c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive, possède une nitrate-réductase. *K. pneumoniae* est : VP+, LDC+, ODC-, IND-, Citrate+, Urée+, ONPG+, H₂S-, TDA-, réduction des nitrates en nitrites (NO₃⁺). Les caractères biochimiques sont illustrés dans le tableau 11.

Tableau 11: Caractères biochimiques de *Klebsiellapneumoniae* (Le Minor et Véron, 1989).

Caractères biochimiques	<i>Klebsiellapneumoniae</i>
ONPG, KCN	+
H ₂ S, désaminase, IND	-
VP	+
RM	-
Uréase	+/-
Citrate de Simmons	+
LDC	+
ODC	-
ADH	-
Rhamnose	+
Arabinose	+
Raffinose	+
Gélatinase	-
Lipase, DNase	-

III-3-6-pouvoirs pathogènes

➤ Les infections à *Klebsiellapneumoniae*

Klebsiellapneumoniae est un germe opportuniste, responsable d'infections diverses infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires qui peuvent être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère, principalement chez les malades immunodéprimés, cancéreux, brûlés, cirrhotiques, diabétiques, chez les vieillards, nourrissons, nouveau nés et prématurés (Sahly et al., 2004). Il est responsable de plus de 10% des infections nosocomiales (Podschun et Ullmann, 1998).

Klebsiellapneumoniae et *Klebsiella oxytoca* sont principalement isolées chez l'homme de bronchopneumopathies, aiguës et subaiguës (en particulier *Klebsiellapneumoniae* types capsulaires 1 et 2) et d'infections urinaires, secondairement d'infections hépatovésiculaires, de pus divers, d'infections péritonéales post-opératoires. L'infection par *Klebsiella* peut survenir à la suite d'une dialyse péritonéale ou de la pose d'un cathéter. Le rôle pathogène de *Klebsiellapneumoniae* dans l'étiologie de quelques épidémies de gastro-entérite infantile a pu être évoqué lorsque la flore des selles diarrhéique était, avant tout traitement, composée à plus de 80% de *Klebsiellapneumoniae* appartenant chez tous les malades au même type capsulaire ; ce rôle est cependant controversé. Chez les animaux, on les isole d'infections diverses : mastite des bovidés, métrite des juments due en particulier aux types capsulaires K1, K2 et K30, qui seraient responsables d'avortement (Kone, 2010).

III-4-Escherichia coli

III-4-1-Généralité

Escherichia coli fait partie de la flore bactérienne intestinale normale des humains et des animaux. *E. coli* est un organisme très diversifié. Bien que la majorité des souches soient inoffensives, il existe une variété de souches pathogènes pouvant causer des infections autant intestinales qu'extra-intestinales (Croxen et Finlay, 2010). Il est estimé qu'*E. coli* est responsable de la mort de plus de deux millions de personnes par année (Tenailon et al., 2010). Les souches pathogéniques sont groupées en virotypes (décrits ci-dessous) selon leur capacité à causer certains types de maladies et syndromes et selon leur facteur de virulence (Croxen et Finlay, 2010).

III-4-2-Historique et nomenclature

Le nom *Escherichia coli* a été donné en hommage aux travaux du pédiatre allemand Théodore Escherich qui décrit pour la première fois, en 1885, le bacille *Bacterium coli* dans des selles de nourrisson. *E. coli* fait partie de la microflore bactérienne normale du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de la plupart des animaux à sang chaud (Gouali et Weil, 2012).

III-4-3-Habitat

E. coli appartient à la microflore commensale de l'homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud (carnivores, omnivores, herbivores et oiseaux) mais également des reptiles (Gordon et Cowling, 2003). Le tractus digestif constitue son habitat primaire. Cette bactérie est présente principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations environ $> 10^6$ UFC (Unité Formant Colonie) /g de contenu intestinal (Ducluzeau et Raibaud, 1985). *E. coli* se niche plus particulièrement dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif qui constitue une niche écologique propice à son développement de par ses conditions de température, d'humidité et de disponibilité en nutriment.

La flore bactérienne intestinale aérobie-anaérobie facultative est représentée par *E. coli* à hauteur de $7,9 \pm 0,5 \log_{10}$ UFC/ g fèces chez l'homme, de $6,9 \pm 0,5 \log_{10}$ UFC/ g de fèces chez les animaux d'élevages (volailles, porc, mouton, vache) et de $6,2 \pm 0,8 \log_{10}$ UFC/ g de fèces chez les animaux sauvages (sanglier, cerf, lapin) (Smati et al., 2015).

E. coli est rejeté dans l'environnement via les fèces à une concentration d'environ 10^8 UFC/ g de fèces (Smati et al., 2015). Il se retrouve dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les fumiers des animaux d'élevage ou par les déjections des animaux d'élevage ou des animaux sauvages.

III-4-4-Classification

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, appartenant à la classe des protéobactéries. En plus de l'espèce *E. coli*, il existe au sein du genre *Escherichia* cinq autres espèces : *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*.

Tableau 12 : La classification d'*Escherichia coli* selon le Bergey's manual 2012

(Smati et al., 2015).

Règne	bacteria
Embranchement	proteobacteries
Classe	Gamma proteobacteries
Ordre	Enterobacteriales
Famille	enterobacteriaceae
Genre	Escherichia
Espèce	Escherichia. coli

III -4-5-Caractères bactériologiques

III-4-5-1-Caractères morphologiques et cultureux :

E.coli ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 µm de long sur 0.4 à 0.6 µm de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. Elle se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang, elles peuvent être hémolytiques. (Avril et al, 2000).

Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. *E. coli* est Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja) (King et al, 2014).



Figure n°12: *Escherichia coli* sous microscope électronique à G X 1000 (Flaudrois, 2004)

III-4-5-2-Caractères biochimiques

E.coli possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase. L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille (Avril et al, 2006).

E. coli est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la glucuronidase (Glu). La majorité des souches fermentent le sorbitol. La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E. coli* en dehors du sérotype O157 :H7 qui ne fermentent pas le sorbitol, à l'exception de certains mutants qui ont la capacité de fermenter ce sucre (King et al, 2014) et qui sont dépourvus de l'activité Glu. Ces caractéristiques particulières sont utilisées pour sa recherche et son isolement dans l'environnement et l'alimentation (ISO 16654:2001). Ces caractères sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Les caractères biochimiques d'*Escherichia coli* (Flaudrois, 2004)

Test	GLU	LAC	H ₂ S	GAZ	CS	ONPG	GEL	MAL	NIT	LDC	ODC	ADH	URE	TDA	IND	RM	VP	ESC
Résultat	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-

+ : caractère positif

- : caractère négatif

+/- : caractère inconstant

III-4-5-3- Caractères antigéniques

Les antigènes O sont associés aux lipopolysaccharides de la paroi et ont une variabilité qui permet de décrire au moins 164 spécificités. Les antigènes H sont associés aux protéines des flagelles et sont également variés. Leur identification permet de déterminer le sérotype d'une souche de colibacille. Les antigènes K sont de nature polysaccharidique et sont inégalement répartis dans l'espèce (Joly et Beynaud, 2002).

III-4-6-Pouvoir pathogène

➤ Les infections à *E. Coli* :

Les souches d'*E. Coli* pathogènes sont capables de se multiplier et de persister dans le tractus digestif de l'hôte en contournant les défenses immunitaires et d'induire des dommages cellulaires. L'étude de différents modes d'interactions entre l'hôte et la bactérie lors des infections permet de classer les souches de *E. coli* pathogènes en deux principaux pathotypes regroupant les pathogènes extraintestinaux (ExPEC), responsables d'infections urinaires, de méningites chez les nouveau-nés ou de septicémies et les pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de maladies entériques (Kern Benaïbout 2006).



IV-1-Objectif

L'objectif de notre projet est de mettre en évidence d'éventuels effets antibactériennes des huiles végétales extraites à partir des graines de *Cucurbita pepo* et de les comparer d'une part à ceux d'une huile végétale commerciale extraite des graines de la même plante et d'une autre part à ceux des herbicides Metribuzine et Linuron.

IV-2 - Matériels

IV-2-1- Matérielles et produits de laboratoire

Les verreries et l'appareillage, les milieux de culture ainsi que les solvants utilisés au cours de la réalisation de ce travail sont résumés dans le tableau 14 :

Tableau 14: Matériels et produits de laboratoire.

Verreries et appareillage	milieux de culture	solvant utilisés
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Soxhlet ▪ Autoclave ▪ Bain marie ▪ Balance analytique ▪ Bêchers ▪ Boîtes de pétri ▪ Papiers filtre Wattman ▪ Erlenmeyer ▪ Etuve de 37°C ▪ Chouffe- ballon ▪ Lames et lamellés ▪ Microscope optique ▪ Pipettes pasteur ▪ Ecouvillons ▪ Réfrigérateur ▪ Micro-plaque ▪ Tubes à essais ▪ Anse de platine ▪ Bec bunsen ▪ Pipetteet micropipettes ▪ Pince ▪ vortex ▪ Règle graduée 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gélose nutritive ▪ Chapman ▪ Hiktoen ▪ Bouillon nutritive ▪ Gélose Mueller Hinton (MH) ▪ Milieu citrate de SIMMONS ▪ Milieu Mannitol Mobilité 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eau distillée ▪ Eau physiologique ▪ Eau oxygénée ▪ Hexane ▪ DMSO

❖ La composition de ces milieux et indiquée dans l'annexe.

IV-2-3-Matériel végétal

Notre choix a été porté sur l'espèce de citrouille (*Cucurbita pepo*), cultivée dans la Wilaya de Saïda (Sidi Amar : environ 25.5 km au nord du chef-lieu de la wilaya de Saïda) (figure n°13). Les paramètres géographiques de cette région sont représentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Localisation géographique
(fr.DB-city.com/Algérie-Saïda-sidi-Boubekeur-sidi Amar)

Station	Saïda
Latitude	35°13'1 Nord
Longitude	0°6'26' Est
Altitude	583 m
Superficie	176.06 Km ²
Climat de sidi Amar	Semi-aride, sec et froid



Figure n°13 : Localisation géographique de la zone d'étude
(sidi Amar –wilaya de Saïda- Algérie)

IV-2-3-1-Récolte et conservation de la plante de la citrouille (*Cucurbita pepo*)

Les citrouilles étudiées ont été récoltées entre les mois d'octobre et décembre 2017. Le choix à été fixé sur les graines de la citrouille. Elles ont été séparées de la chair, nettoyées, lavées avec de l'eau du robinet puis séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Elles ont été ensuite pesées, broyées finement dans un broyeur à mortier de marque « type 4 in 1 juicer / blender ; SJB-309 » (**Annexe 03**) et récupérées dans des boites en verre (figure n°14).

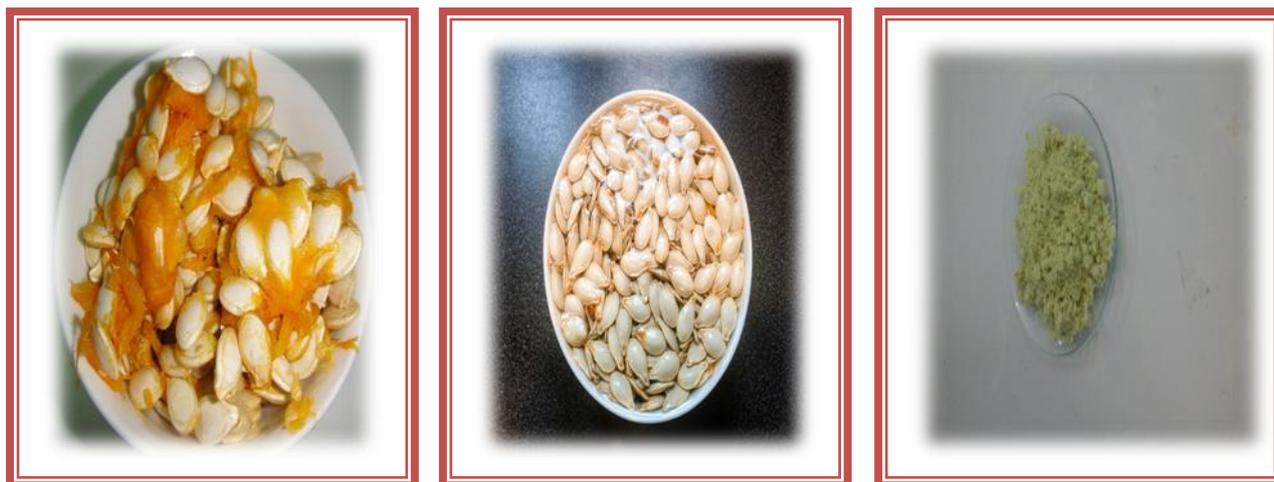


Figure n°14 : Photographie des graines de *C.pepo* (séparées de la chair, nettoyées et broyées).

IV-2-4-Huile végétale commerciale extraites des graines de citrouille

Un flacon de 30 ml d'huile de graines de citrouille a été acheté chez l'herboriste dans la ville de Saïda. Ce produit a été importé de l'Egypte (*compagnie de Captain*).



Figure n°15 : Photographie d'un flacon d'huile commerciale de la citrouille.

IV-2-5-Pesticides

1. Insecticides utilisés

Les produits chimiques, utilisés dans notre projet, sont représentés par deux pesticides qui sont **Métribuzine** et **Linuron** (figure n°16).

- **Métribuzine** est un produit chimique fabriquée par une firme chinoise (ZHEIANG Chemicals Import & Export). Son importation, en Algérie, est assurée par une entreprise nationale SARL AGRO RAYANE.
- **Linuron** est un produit chimique fabriquée par une entreprise Française (GEORGES-S-DARAS S.A, Marseille). Son importation, en Algérie, est assurée par une société nationale SARL SAPHYTO.



Figure n°16 : Photographie des différents pesticides utilisés (Linuron et Metribuzine).

Leur utilisation en tant qu'insecticides dans le secteur agricole a été autorisée par le Centre Anti Poison CHU de Bab El-Oued, Alger.

Ces produits chimiques ont été achetés au niveau d'un magasin, vendant les engrais azotés et les pesticides, localisé dans la ville de Saida.

Les caractéristiques physico-chimiques des deux pesticides sont mentionnées dans le tableau ci-dessous :

Partie expérimentale

Tableau 16 : Caractéristiques physico-chimiques du Métribuzine et Linuron

Pesticides Caractéristiques	Métribuzine	Linuron
Nature chimique	Dérivé Organo- phosphoré	Dérivé organochloro- azoté
Famille	Triazine	Urée substitué
Fonction	Herbicide	Herbicide
Formule chimique	C₈H₁₄N₄OS	C₉H₁₀Cl₂O₂
Nom chimique	4-amino-6tert-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-onr	3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylure
Masse moléculaire (g/mol)	214,28	249,09
Masse volumique (g/ cm³)	1,28	1,49
Solubilité	Eau & Solvants organiques	Eau
Température de fusion	126°C	94°C

IV-2-6-Matériel biologique

Les souches bactériennes, utilisées dans notre étude, font partie de deux groupes de microorganismes, qui sont pathogènes et contaminant. Les expérimentations ont été réalisées sur quatre souches bactériennes. Ces souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) ont été fournies par le laboratoire de recherche de l'université Aboubakr-Belkaid Tlemcen. Dans cette étude, nous avons pu retenir les espèces suivantes (tableau 17) :

Tableau 17 : Références des souches bactériennes utilisées

Bactéries	Souches	Références
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
Gram négatif	<i>Klebsilla pneumonie</i>	ATCC 700603
	<i>E. coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

IV-2-6-1-Conservation des souches

Les souches étaient conservées à une température de 4°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (Milieu Chapman, Gélose nutritive (GN), Milieu hektoen).

IV-2-6-2-Choix des milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

❖ **Gélose nutritive (GN)** ; a servi à l'isolement et l'obtention d'une culture jeune de souches bactériennes ;

❖ **Milieu Chapman**: Isolement de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

❖ **Gélose nutritive (GN)**: *Klebsilla pneumonie* ATCC 700603.

❖ **Milieu hektoen**: *E. coli* ATCC 25922.

❖ **Gélose nutritive (GN)**: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Muller Hinton (MH):C'est le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne. C'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens (**Gachkaret al., 2007**).Ce milieu est préparé selon la méthode suivante :

Une quantité de poudre déshydratée du MH (38 g) est placée dans un ballon à laquelle est ajouté un volume de 1000 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé avec agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 20 min afin d'assurer une bonne dissolution des cristaux. Le milieu MH est ensuite réparti dans des flacons stériles avant d'être porté dans une autoclave pour être incubé pendant 15 min à 121°C et à une pression de **1** bar.

IV-3-Méthode

L'extraction et l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile végétale des graines de *Cucurbita pepo* ont été réalisées au niveau du laboratoire pédagogique du département de biologie, faculté des sciences, université Dr Moulay-Tahar-Saida durant le mois de décembre 2018.

IV-3-1-Extraction d'huile végétale de *Cucurbita pepo*

IV-3-1-1- Dispositif de l'extraction

L'extraction de l'huile de grains de *C.pepo* a été réalisée par l'extracteur de Soxhlet avec un solvant polaire tel que l'hexane sur une matrice solide qui est le broyat des graines. L'extracteur de Soxhlet est un appareil utilisé en chimie analytique qui permet de faire à chaud l'extraction par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Cet appareil porte le nom de son inventeur: **Franz Von Soxhlet**.

❖ Montage de Soxhlet

L'extracteur Soxhlet est constitué d'un (Figure n°17):

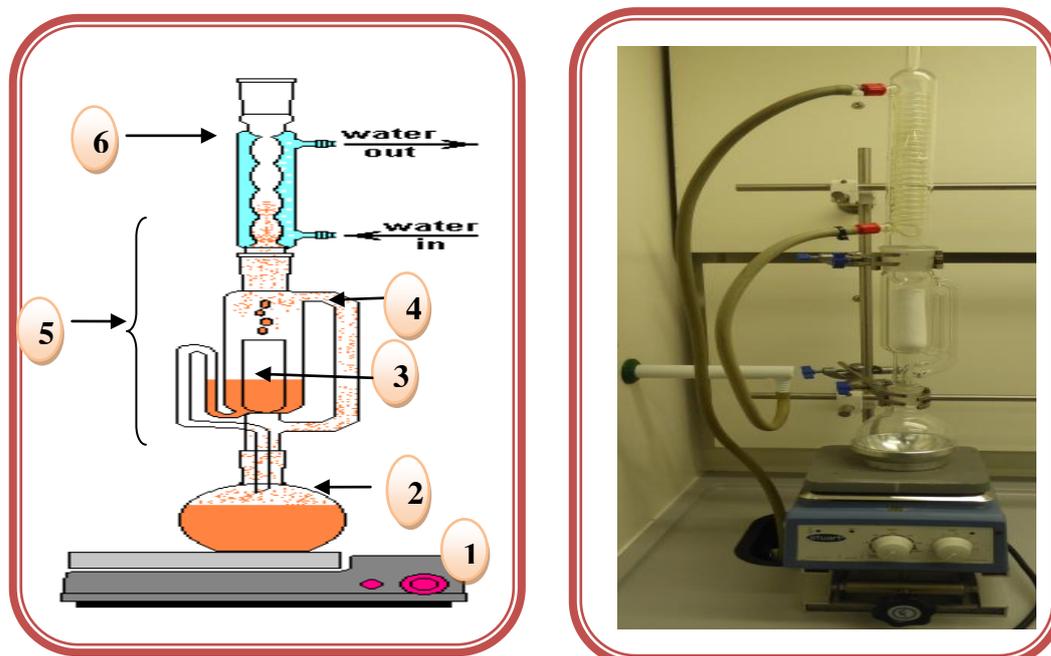
- Ballon contenant une réserve de solvant.
- Extracteur proprement dit permettant le contact entre le solvant et le solide dans une cartouche poreuse.
- Siphon qui permet l'évacuation de la solution vers le ballon.
- Réfrigérant à eau qui permet la condensation des vapeurs de solvant dans la cartouche.

Le solide est toujours en contact avec le solvant pur grâce au remplissage régulier de la cartouche, ce qui présente les meilleures capacités de solubilisation des composés à extraire.

❖ Le Soxhlet permet :

✚ Le lavage d'un composé solide par un solvant dans lequel il est totalement insoluble. Les impuretés sont extraites vers le ballon et le solide pur est récupéré dans la cartouche.

✚ La recristallisation d'un composé par un solvant dans lequel il est modérément soluble. Les impuretés insolubles restent dans la cartouche tandis que le composé cristallise dans le ballon récepteur par refroidissement lorsque la solution est assez concentrée.



1-Source de chaleur (chauffe-ballon), 2-Solvant (s), 3-Cartouche poreuse: produit à extraire, 4-Siphon d'évacuation de l'extrait, 5-Extracteur, 6-Réfrigérant.

Figure n°17 : Schéma d'un montage de Soxhlet.

IV-3-1-2-Procédé de l'extraction

- 30 grammes de broyat (graines de *C.pepo*) sont pesés dans une cartouche d'extraction et disposée dans l'appareil d'extraction (extracteur Soxhlet).

- L'extracteur Soxhlet est placé sur un ballon en verre pyrex contenant 400 ml de solvant d'hexaneil est ajouté de pierres de ponce (ou de billes de verre) pour éviter une élévation de la température sans ébullition. La quantité totale du solvant ajoutée doit être de une et demi à deux fois la capacité du réservoir à siphon d'extraction de l'appareil.

- L'ensemble est porté à l'ébullition grâce à un chauffe-ballon.

- Le solvant est chauffé au reflux. La vapeur de solvant se déplace jusqu'à une distillationbras, et inonde dans la chambre contenant la cosse de solide. Le condenseur garantit que toute vapeur de solvant se refroidit et s'égouttela chambre logeant le matériau solide.

- La chambre contenant le matériau solide se remplit lentement de solvant chaud.

Une partie du composé désiré va ensuite se dissoudre dans le solvant chaud.

Lorsque lachambreSoxhlet est presque pleine, la chambre est automatiquementvidée par un bras latéral de siphonavec le solvant redescendant auballon de distillation.

Ce cycle peut être répété plusieurs fois, plusdeheures ou jours (figure n°18).

- ✚ L'avantage dans ce procédé est que le solvant condensé s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entrainant la substance dissoute (**Haidara, 1996**).

- Les extractions se sont déroulées sur quatre heures, à la température de 69°C et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la matière initiale après pesée d'un ballon, préalablement taré, ayant subi une évaporation du solvant.

- ✚ L'inconvénient dans cette méthode est qu'elle est longue et peu économique en solvant.



Figure n°18 : Photographie de l'extraction de l'huile de *Cucurbita pepo* par Soxhlet.

IV-3-1-3-Elimination du solvant organique

Le solvant de la phase organique est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le principe de cet appareil est basé sur l'abaissement du point d'ébullition sous pression réduite (figure n°19)

- L'élimination du solvant se fait selon les étapes suivantes :
- Placer la solution contenant le solvant à évaporer dans le ballon et le placer sur l'évaporateur rotatif à l'aide d'un raccord.
- Placer le ballon de récupération du solvant à l'aide d'un deuxième raccord.
- Faire plonger le ballon dans le bain marie réglé probablement à la température d'évaporation du solvant.
- Mettre le ballon en rotation.
- Mettre en marche la circulation d'eau froide dans le réfrigérant.
- Après disparition complète du solvant du ballon, récupérer les H.V, les pesées puis les mettre dans des flacons en verre.



Figure n°19 : Photographie de séparation de l'H.V par Evaporateur rotatif (Rotavapor)

IV-3-1-4-Conservation de l'huile végétale extraite

La conservation de l'huile végétale, extraite des graines de la citrouille, nécessite certaines précautions indispensables (**Burt, 2004**). Pour cela, cette huile a été conservée, à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre stérile fermé hermétiquement couvert de papier d'Aluminium pour la préserver de l'air et de la lumière.

IV-3-1-5-Détermination des rendements d'extraction des huiles végétales

Le volume de l'huile végétale extraite des graines de la plante *Curcubitapepo* (ou Citrouille), séparée de l'hexane, a été apprécié et mesuré en millilitres dans le but de déterminer sa masse en gramme. Pour cela on s'est référé à l'utilisation de la masse volumique (ou densité) de l'huile

Partie expérimentale

végétale extraite qui est de 0,91 (MarijaSrbinoska et al., 2011) afin de déduire la masse en grammes de l'huile végétale utilisée tout en sachant déjà son volume à chaque extraction réalisée.

La formule de la masse volumique est :

$$\mu = \frac{m}{v} \quad m = v \times \mu$$

$$\mu = 0,91 \text{ g / ml}$$

$$v = 32.4 \text{ mL}$$

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (R_{HE}), est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile végétale obtenue après extraction (M_{HE}) et la masse de la matière végétale utilisée (M_s). Le rendement est déterminé par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = \text{MHE} / \text{MS} \times 100$$

RHE: Rendement de l'huile végétale de *cucurbitapepo* %

MHE: Masse de l'huile végétale obtenue en gramme

Ms: Masse en gramme de la matière végétale sèche

❖ **Rendement moyen :**

$$\text{RHE} = (\text{RHE1} + \text{RHE2} + \text{RHE3} + \dots + \text{Ri}) / \text{n}$$

n: nombre des extractions

IV-3-1-6- Caractérisation des huiles végétales

IV-3-1-6-1- Caractérisations organoleptique et physique

Chaque huile végétale est caractérisée par ses propriétés organoleptiques tels que : l'odeur, l'aspect physique et la couleur (Bentchicou, 1999; Hameurlaine, 2009).

- **Aspect physique :** l'aspect d'une huile végétale dépend des produits qui la constituent, elle pourrait apparaître sous forme liquide, solide ou bien semi solide.

- **Odeur :** L'odorat est un sens chimique très sensible et les parfumeurs sont habilités à classer et caractériser des substances chimiques parvenant ainsi à doser les produits naturels et leur perception.

L'appréciation de l'odeur de nos huiles a été faite par nous-mêmes et par l'enseignant encadreur.

- **Couleur** : la coloration d'une huile végétale dépend des produits qui la constituent, donc la couleur change d'une huile végétale à l'autre ; elle peut être déterminée à l'œil nu.

IV-3-1-6-2-Propriétés physico-chimiques

IV-3-1-6-2-1-Propriétés physiques

*pH

Le pH, exprimé par une valeur numérique, indique si une solution est acide ou basique, il représente aussi la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse (**Mèlet et Benchabane, 1997**). Le pH est déterminé à l'aide d'un papier pH.

IV-3-1-6-2-2-Propriétés chimiques

➤ Analyse des propriétés chimiques

Dans le but de caractériser l'huile extraite préparée à partir des graines de *cucurbita pepo*, des analyses qualitatives ont été effectuées.

➤ Analyse qualitative au GPC (chromatographie en phase gazeuse)

L'analyse chimique des huiles végétales permet d'identifier et de quantifier ses constituants. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de composés. En effet, la CPG est la méthode de référence utilisée pour analyser les huiles essentielles (**Lehotay et al., 2002**), elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées (**Arpino et al., 1995**).

➤ Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée pour l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du millilitre voire du microlitre. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs à ionisation de flamme (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles (**Paolini, 2005**). Chaque constituant est caractérisé par un indice calculé à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters

méthyliques linéaires, dans les mêmes conditions d'analyse des échantillons (indice de Kováts) (**Kováts E., 1965**) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Van Den Dool et al., 1963**).

Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes (**Paolini , 2005**)

Cette étude permet de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimique (acides gras, phytostérols) dans notre huile. L'analyse qualitative des constituants chimiques (acides gras et phytosterols) des huiles végétales a été réalisée par un appareil de chromatographie en phase gazeuse de marque GPC (Vrian CP-3800) avec un détecteur à ionisation de flamme (CPG /FID).

La détermination de la composition chimique (acides gras et phytosterols) de l'huile végétale de *C.pepo* par chromatographie ont été effectuées dans le laboratoire d'analyses chimique et biologique « AFAK » de la ville d'Oran, Algérie.

IV-3-1-6-2-2-1-Dosage des Acides Gras d'une huile végétale par chromatographie enphase gazeuses avec un détecteur à ionisation de flamme (C P G / F I D)

➤ 1^{er} étape : Méthylation ou trans-estérification des acides gras de l'huile végétale :

La technique utilisée est celle de **Metcalfé et al.,en 1966**,qui consiste en une méthylation de l'huile végétale purifiée c'est-à-dire transformer les acides gras en esters méthyliques d'acides gras qui constitue la partie saponifiable.

Unepartie de l'extrait lipidique (ou huile végétale) a été évaporée à sec dans un tube de méthylation, auquel on a ajouté 5 ml de soude méthanoïque (soude NaOH + méthanol CH₃OH)de normalité 0,5N puis les tubes étaient fermés hermétiquement.

Le mélange a été incubé dans un bain marie à 65°C durant 15 min. Cette opération permet la saponification rapide des acides gras.

Un volume de 3 ml de trifluorure de bore BF₃ 14% étaient ajoutés au mélange et les tubes étaient replacés de nouveau au bain marie pendant 5 min à 65°C.

Après refroidissement des tubes à l'eau courante, 2 ml d'eau distillées et 5 ml d'hexane sont ajoutés.

Après agitation du mélange et centrifugation, la phase organique supérieure contenant les esters méthyliques d'acides gras est prélevée pour être filtrée par une colonne de Na₂SO₄ ensuite analysée en Chromatographie en phase gazeuse.

➤ 2^e étape : Analyse des esters méthyliques des acides gras par CPG

La méthode la plus répandue de détection des acides gras est la détection à ionisation de flamme.

Partie expérimentale

En fin de colonne du chromatographe, une flamme obtenue par combustion d'un mélange d'hydrogène et d'air reconstitué va ioniser les composés organiques. Ces ions ainsi formés seront collectés par deux électrodes créant ainsi une différence de potentiel. Il en résulte un courant électrique recueilli par un électromètre qui le transforme en tension mesurable.

Pour les composés organiques, l'intensité du signal est sensible au débit massique de l'échantillon. L'aire du pic reflète donc la masse du composé élué. Cette détection possède donc l'avantage d'être quantitative et l'identification est basée sur le temps de rétention de chaque composé.

Les esters méthyliques des acides gras ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode officielle de l'AOAC(1995).

➤ 3^e étape : Identification des acides gras

L'identification des acides gras est réalisée par comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux d'étalons.

La quantification des acides gras est réalisée à partir des courbes de calibrations déterminées pour les esters méthyliques d'acides gras de standards injectés dans les mêmes conditions que les échantillons standards d'esters méthyliques d'acides gras «SUPELCO».

PUFA2 : Acides gras d'origine animale (14 acides gras).

PUFA3 : Acides gras de l'huile de menhaden (19 acides)

➤ Conditions chromatographiques choisies :

Ce dispositif instrumental obéit à certaines conditions précises qui permettent le bon fonctionnement de la chromatographie Varian CP-3800, sont mentionnées ci-dessous :

- Colonne capillaire Innowax : 0,25 mmx30m.
- Epaisseur : 0,25 µm.
- Température de la colonne : Programmée : De 160° à 250°C avec un gradient de 1°C/min pendant les 20 première minutes et de 2°C pour les dernières 35 min.
- Gazvecteur : Hydrogène.
- Débit du gaz vecteur : 1ml/min.
- Volume injecté: 0.4µL.
- Température de l'injecteur : 220°C.
- Température du détecteur : 250°C.

IV-3-1-6-2-2-2-Dosage des phytostérols D'une huile végétale par chromatographie en phase gazeuses avec un détecteur à ionisation de flamme (C P G / F I D)

La méthode décrit le procédé de détermination du contenu en stérols des matières grasses.

➤ **Méthode utilisée**

La matière grasse, additionnée de bétuline comme étalon interne, est saponifiée avec l'hydroxyde de potassium en solution éthanolique, puis l'insaponifiable est extrait avec de l'éther-diéthylique. La fraction stérolique est séparée de l'extrait insaponifiable à l'aide d'une colonne d'oxyde d'aluminium. Les stérols récupérés sont transformés en triméthyl silyethers est analysés par chromatographie en phase gazeuses sur colonne capillaire.

➤ **Analyses suivies**

• **Analyse des phytostérols**

La détermination de la teneur en phytostérols de l'huile a été réalisée selon la norme iso 1228/1999. La séparation complète des différents phytostérols a été obtenue par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Varian CP 3800), le principe de l'analyse des phytosterols est basé sur un isolement de l'insaponifiable puis une silylation de la fraction insaponifiable avant injection directe en chromatographie en phase gazeuse (CPG).

• **Saponification**

Dans un ballon FP de 50ml, on introduit 250 mg d'huile puis 1mg de bétuline 1 ml d'acétone (bétuline : étalon interne) et 5ml d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH /0,5m). Le mélange est porté à ébullition sous reflux pendant 15 minutes.

Immédiatement après l'arrêt de la saponification, 5ml d'éthanol sont ajoutés au mélange chaud.

• **Extraction des stérols**

Pour isoler la fraction insaponifiable, 5ml de la solution sont versés dans une colonne d'oxyde d'aluminium. Cette colonne en verre (diamètre : 30 mm) est préalablement préparée et remplie de 10 g d'oxyde d'aluminium (neutre pH : 7,5, 50, 100 µm) hydratés avec de l'éthanol.

La substance résultant de la première élution n'est pas récupérée. On place dans un entonnoir un filtre Whatmann (papier N°41) sur un deuxième ballon a fin de retenir les particules d'alumine contenues dans l'éluât, l'insaponifiable est extrait par 5ml d'éthanol, puis par 30ml d'éther diéthylique.

Les solvants sont évaporés sous vide à l'aide d'un rotavapor. Le dépôt présent sur les parois est décollé avec 2ml d'éther diéthylique et récupéré dans un tube à hémolyse. L'éther diéthylique est ensuite évaporé.

- **identification des stérols**

100µl de réactifs silylant (95µL de N-méthyl-N-(Triméthylsilyl-heptafluorobutyramide) et 5µL de 1-méthyle imidazol sont ajoutés dans un tubes à hémolyse. Contenant les stérols isolés. Le tube est ensuite chauffé pendant 15 min à 105 °C dans un bain d'huile préchauffé. 1µl a été injecté manuellement avec une micro-seringue sur une colonne capillaire.

Les différents phytostérols sont quantifiés par un détecteur à ionisation de flamme à 310°C avec un débit 1,0ml/min chaque phytostérols est identifié à partir de son temps de rétention à l'aide de mélanges d'étalons standards sitostérols :

- | | | |
|--------------------------|---------------|--------------------|
| ▪ 7α-hydroxycholestérol | ▪ Choléstanol | ▪ Campesterol |
| ▪ d5 Epicholéstanol (IS) | | ▪ 4-cholesténone |
| ▪ 7- Brassicastérols | | ▪ Stigmastérol |
| ▪ Desmostérol | | ▪ Lanastérol |
| ▪ Lathostérol | | ▪ β-sistostérol |
| ▪ d4 -lathostérol (IS) | | ▪ d7-β-sistostérol |

➤ **Conditions chromatographiques choisies :**

- Colonne : Rxi[®]-5ms, 30m, 0,25m DI, 0,25µm.
- Echantillon : Extrait insaponifiable (plasma lipidique sous forme de dérivés triméthylsilyliques).
- Volume injection: 1µL.
- Température de l'injection : 310°C.
- Température du four : 250°C (maintenir 1min) à 320°C à 30°C/min (maintenir 1,6min).
- Gazvecteur : He, Flux constant.
- Debit: 1.0 ml/min.
- Détecteur : M M E.
- Mode : S I M.
- Mode d'ionisation : I E.

IV-3-2-Etude de l'activité antibactérienne

C'est une méthode in-vitro du pouvoir antibactérien des composés. La technique que nous avons utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de nos produits (huile végétale extraite des graines de *C.pepo* et huile commercial de la même plante) est : l'aromatogramme ou la méthode de diffusion en milieu gélosé en utilisant des disques stériles.

Cette méthode utilisée par certains auteurs (**Bekhechi C.et al., 2008**)est la technique que nous avons utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice de nos produits (d'huile végétale).

Le test antibiotique a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose. La gélose Muller-Hinton a été utilisée pour le test de sensibilité des différentes souches (**Bijondi, 1993**).

IV-3-2-1-Isolement et purification

Les souches étaient repiquées sur le bouillon nutritif et mises à l'étuve à 37°C / 24 heures puis ensemencées dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné ; la gélose nutritive pour *klebsiella* et *Pseudomonas aeruginosa*, le milieu de culture hectoene pour *Escherichia coli*, et le milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus*. Toutes ces cultures bactériennes ont été incubées à 37° pendant 24 heures.

La purification a été suivie par l'étape d'identification par un examen de la morphologie, la coloration de Gram et les tests biochimiques.

IV-3-2-2-Identification

Après une culture de 24 h à 37 °C sur milieu sélectifs, la pureté des souches a été vérifiée par une série des tests préliminaires (examen microscopique) et tests biochimiques.

➤ Examen microscopique

▪ Coloration de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie et permet de rechercher l'affinité tinctoriale des bactéries, leurs morphologies et leurs modes de regroupement. Elle permet une classification des bactéries selon leur structure.

➤ Principe

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en : Bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Denis et al., 2007**).

Partie expérimentale

En effet quand les bactéries sont mises au contact du violet de gentiane puis soumises à l'action du Lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet tout la couche en peptidoglycane de la membrane des bactéries. Cependant, lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules celles à Gram négatif (présence membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la Fushine. Les bactéries Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent colorées en violet.

➤ Les étapes

- Réaliser un frottis ou un étalement : A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on dépose une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Ensuite on prélève une colonie bien isolée avec la pipette Pasteur boutonnée et dissociée dans la goutte.
- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- Puis on recouvre totalement la lame de violet de gentiane pendant 1 min.
- Rincer à l'eau en transvasant les lames.
- On recouvre le frottis par le Lugol pendant 2 min.
- Laver à nouveau à l'eau ;
- Puis on ajoute l'alcool jusqu'à la disparition de la couleur violette pendant une dizaine de secondes et on lave rapidement à l'eau.
- Puis on colore à nouveau avec la solution de fuchsine diluée pendant 1 min.
- On Lave à l'eau et sécher à l'air.
- A la fin on Observe à l'objectif X100, à l'aide d'huile d'immersion.

➤ Identification biochimique

▪ Galeries classiques

L'identification des souches est réalisée par l'étude de quelques tests biochimique et métabolique, qui sont présentés dans le tableau 18

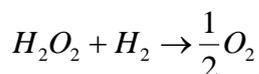
▪ Préparation de l'inoculum

Une colonie bactérienne est prélevée, à partir d'une culture jeune de 18-24 h.

Partie expérimentale

➤ Test de catalase

La catalase, ou ferro-porphyrine de poids moléculaire élevé, a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne.



➤ Test de Citrate de Simmons

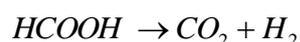
Le but de ce test est de savoir si la bactérie utilise le citrate comme source de carbone. La transformation du triacide (acide citrique) en diacide par décarboxylation oxydative donne élévation du pH qui se traduit par un virage au bleu (Une réaction positive se traduit par une alcalinisation du milieu).

➤ Test sur de Monnitol-Mobilité

Ce milieu étudie deux caractères qui sont :

– La fermentation du mannitol se fait avec production d'acide.

Exp : l'acide formique qui peut être décomposé par l'hydrogenolyse suivante :



– Le virage du milieu rouge au jaune indique la positivité de la réaction.

– La mobilité exprimée en jaune indique la positivité de la réaction

– La mobilité s'exprime par l'apparition d'un trouble au milieu dû à la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement.

La série des milieux utilisés est motionnée dans le tableau avec leurs modes d'ensemencement

L'incubation se fait à 37° C pendant 24 h.

Tableau 18: Identification biochimique à l'aide de la galerie classique.

Tests	Milieux de culture	Ensemencement
Recherche de la catalase		Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l' H2O2 (à 10 volumes). la lecture est immédiate.
Utilisation de Citrate	Le milieu citrate de Simmons	Ensemencement par des stries le long de la pente à l'aide de la pipette pasteur, incubation à 37°c pendant 24 h.
Utilisation de mannitol et test de mobilité	Le milieu mannitol mobilité	Ensemencement par pique centrale à l'aide d'une pipette pasteur, incubation à 37°c pendant 24 h.

IV-3-2-3-Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles extraites des graines de *C. pepo* et des huiles commerciales

IV-3-2-3-1-Préparation des précultures

Les souches bactériennes, à tester, ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive et incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune de bactéries et des colonies isolées.

IV-3-2-3-2-Préparation de l'inoculum (suspensions bactériennes)

Les espèces cibles (souches bactériennes choisies) ont été revivifiées et repiquées dans la gélose nutritive, puis incubées à des températures optimales de développements (37°C) pendant 18 heures pour l'obtention d'une culture jeune. Par la suite, des suspensions troubles de ces souches seront réalisées en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques. Elles étaient déposées dans 5 ml d'eau physiologique stérile (0.9 % Na Cl) puis agitées dans le vortex (appareil sert à bien mélanger la suspension bactérienne).

Les concentrations bactériennes de l'inoculum sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO) à la longueur d'onde 625 nm sur un spectrophotomètre (standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999). Une DO de 0.08 à 0.1 correspond à une concentration de 10^8 UFC /mL (CA-SFM, 2013).

✚ Ajuster l'inoculum, soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible (moins de bactéries) ou l'eau physiologique stérile, s'il est trop fort (forte densité de bactéries)

✚ La suspension bactérienne est bien homogénéisée et laisser sur la paillasse pendant 30 minute (OMS, 2005).

Les conditions de stérilisation doivent être respectées, à savoir : ne pas dépasser les 20 cm du bec bunsen et utiliser du matériel stérile (Duraffourd et al., 1990).

❖ Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir du papier wattman N°3 de 6 mm de diamètre, ensuite ils sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

IV-3-2-3-3-Préparation d'une série de dilutions

Il a été établi, pour cette étude, une gamme de dilution à partir d'une solution mère de concentration initiale de 12.5 mg /ml d'huile végétale extraites des graines de *C.pepo* et d'une huile commerciale, ensuite une gamme dilutions a été réalisée. La gamme de concentration de l'huile végétale extraite à été préparée dans tubes à essai par la méthode de dilution de deux en deux (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) (Ossou *et al.*, 2004)(figure n°20).

Le solvant diméthylsulfoxyde (DMSO) a été utilisé pour préparer des dilutions d'huiles végétales.

Il a été démontré qu'il ne possède pas d'activité antibactérienne, puis sélectionné comme un bon agent pour la dilution des huiles végétales (Gachkar *et al.*, 2007).

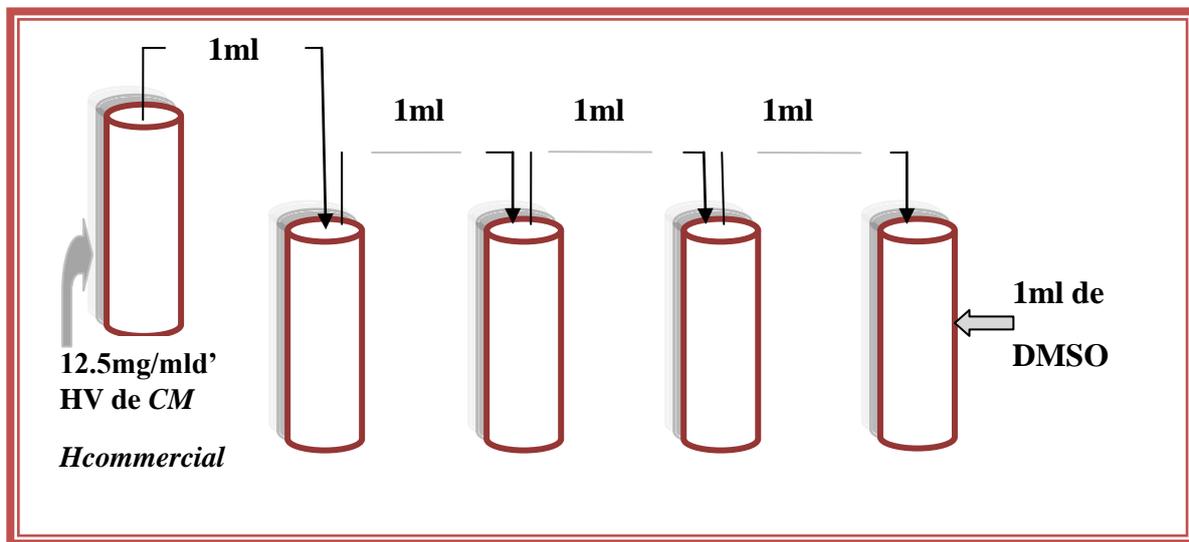


Figure n°20 : Préparation des dilutions de l'huile végétale de *C.pepo*

IV-3-2-3-4-Tests antibactériens

Deux méthodes différentes étaient utilisées pour l'évaluation de l'effet antibactérien de l'huile végétale des graines de *Cucurbita pepo* et huile commerciale de la citrouille, à savoir: la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne à différentes concentrations de l'huile et la méthode des microdilutions qui a pour objectif la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture.

D'après Ponce *et al.* (2003), la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

- Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm ;
- Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ;

- Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm ;
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm.

IV-3-2-3-4-1-Méthode de diffusion à partir d'un disque solide (l'aromatogramme)

➤ Principe

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide dans un boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition (**Hellal, 2011**).

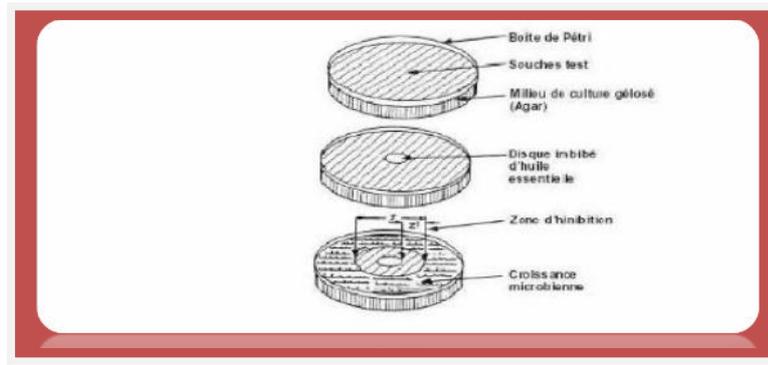


Figure n°21: Illustration de la méthode des aromatochromes sur boîte de Pétri (**Zaika, 1988**)

➤ Ensemencement

- La gélose M-H, préalablement fondue au bain marie pour obtenir un bouillon.
- Couler aseptiquement le milieu de culture MH en surfusion dans les boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier sur la paillasse en laissant le couvercle des boîtes de pétri légèrement ouvert.
- Chaque suspension de culture bactérienne est ensemencée par inondation sur des boîtes de pétri contenant le milieu Muller – Hinton.
- L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Pour chaque souche testée, 12 boîtes de Pétri, (2 boîtes pour chaque dilution plus 2 boîtes pour les témoins positif et négatif), sont écouvillonnées par le même écouvillon à la condition d'être rechargé pour chacune d'elles.

Partie expérimentale

▪ Des disques de papiers Whatman stérile de 6 mm de diamètre , préalablement stérilisés sont déposés à la surface de gélose ensemencée après avoir été chargé de 20 µl d'huile végétale de *C.pepo* ou l'huile commercial de la citrouille diluée dans du DMSO (dimethylsulfoxide) à 1/2, 1/4, 1/8 ,1/16 et 1/32 (v/v). D'autres disques, chargés de 20µl de DMSO sont utilisés comme témoins. Des antibiogrammes sont effectués en parallèle avec les aromagrammes. Le choix des antibiotiques pour chaque souche microbienne est basé sur les directives du National Commitee for ClinicalLaboratoryStandars (NCCLS). le test est répété deux fois pour avoir des résultats fiables. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré (Figure n°22).

➤ Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de nos huiles brutes. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même Protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait.

On a utilisé trois antibiotiques différents : Cefoxitine (FOX30), Gentamycine (CN10) et Erythromycine (E15). Le choix a été fait en fonction de la disponibilité.



Figure n°22 : Photographie de dépôt des disques

IV-3-2-3-4-2-Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration des extraits qui inhibe les bactéries testées. Elle a été réalisée sur milieux liquide.

➤ Principe

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle, aucune croissance visible à l'œil nu n'est **observée** (Skandamis et Nycha ; 2001).

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait dilué dans le DMSO. Ce choix a été fait, parce que, le DMSO est le solvant préconisé par la majorité des auteurs, notamment, **Gachkaret al.,(2006)** qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

➤ Application

- La gamme de concentration des huiles végétaux (H.C.P et H.C) a été préparé dans tubes à essai par la méthode de dilution de deux en deux (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32,) (**Ossou et al., 2004**), à partir d'une solution mère.

- La détermination de la CMI est réalisée par la technique de dilution en milieu liquide, en utilisant une microplaque stérile de 96 puits (8 × 12 puits) (figure n°23).
- Déposer, stérilement, 100 µl du bouillon Mueller-Hinton dans les puits d'une même ligne.
- Ensuite, rajouter 100 µl de l'huile à tester diluée dans le DMSO, dans le 1er puits, bien mélanger le contenu du puits.
- Transférer ensuite 100 µl de puits en puits, pour obtenir des dilutions au facteur 1/2.
- Enfin, déposer 100 µl de l'inoculum préalablement dilué (environ 10⁸ UFC/ml) dans chaque puits.

- Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif.

- Tous les tests ont été réalisés deux fois.

- La microplaque est couverte et incubée à 37 °C pendant 24 h.

▪ Lecture des résultats

La CMI représente la plus faible concentration d'huile inhibant toute croissance visible à l'œil nu à laquelle aucun trouble n'est observé. Par ailleurs, la CMB représente la plus faible concentration d'huile inhibant toute croissance visible à l'oeil nu après 24 d'incubation (l'arrêt totale de la croissance bactérienne ou la mort des bactéries) à 37°C (**Mayachiew et Devahastin, 2008**).

➤ Détermination de la CMB

La CMB est déterminée à partir de la CMI. Les puits ne présentant aucune croissance visible à l'œil nu après incubation sont vides et les contenus sont repiqués sur de la gélose coulée dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre. La lecture est faite après une incubation à 37 °C pendant 24 heures. La plus petite concentration qui ne laisse que 0.01 % de bactéries survivantes correspond à la CMB (Michae-lbriand, 1986).



Figure n°23 : Photographie de la détermination de la CMI sur une microplaque

IV-3-2-3- Etude de l'activité antimicrobienne in vitro des herbicides (Linuron et Metribuzine)

➤ Préparation des solutions d'herbicides (Linuron et Metribuzine)

Une quantité de 15 g de chaque herbicide, en poudre, est placée directement dans une fiole remplie de 50 ml d'eau distillée, puis le tout a été mélangé jusqu'à dissolution et obtenir une solution mère. Une gamme des dilutions a été préparée à partir de la solution mère dans des tubes à essai par la méthode de dilution de deux en deux (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32).

➤ Technique par contact direct

- Les différentes concentrations des deux herbicides ont été dissoutes et diluées dans l'eau distillée stérile.
- La gélose appropriée a été coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre et inoculée avec une suspension bactérienne pure fraîchement préparée. Deux boîtes ont été utilisées pour chaque souche.
- Un disque de papier Wattman stérile de 6 mm de diamètre a été imbibé de 20 µl de chaque herbicide (reconstitué selon la concentration voulue) puis déposé à la surface de la gélose ensemencée, l'ensemble a été incubé pendant 24 heures à 34°C.

▪ Dès l'application des disques imprégnés d'herbicides, les échantillons diffusent de manière uniforme. Après 24 heures d'incubation, il a été observé des zones d'inhibition autour des disques où il n'y a pas eu de croissance de bactéries qui dénote ainsi la sensibilité de ceux-ci à Linuron et Metribuzine. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible. Le screening, ou les essais, antibactérien a été effectué avec 5 types de concentrations pour chaque herbicide.

IV-4-Analyse statistique

Les analyses statistiques des données et des résultats englobant les tableaux, les histogrammes et les courbes ont été traité par le logiciel Excel 2007 Windows 7.



Résultats et discussion :

1^{er} partie : Préparation et analyses physico-chimiques d'huile végétale des graines de cucurbita pepo :

1-Rendements des huiles extraites

La première quantification à faire est celle du rendement en huile végétale obtenue par la technique de soxhlet. L'huile végétale extraite des graines de citrouille, par la technique Soxhlet, a subi une rota-évaporation pour séparer le solvant « hexane ». L'utilisation du solvant hexane est le meilleur moyen pour séparer les huiles végétales et il permet d'obtenir un bon rendement d'extraction.

Ce rendement est calculé à partir du poids de l'huile végétale par rapport au poids sec de la masse végétale utilisée dans l'extraction.

Le rendement d'extraction des huiles végétales des graines de *Cucurbita pepo* (ou citrouille) était de 26,86 %.

La densité (ou masse volumique) de l'huile est de 0,91.

L'utilisation de la densité a permis de convertir le volume de l'huile (ml) en masse (g).

Les rendements en huile végétale sont représentés sur tableau 19 :

Tableau 19 : Rendement en H.V de *Cucurbita pepo*

Extraction n°	Poids des graines en poudre (g)	Poids des huiles végétales (g)	Rendements (%)
1	20	4.81	24.05
2	30	8.37	27.90
3	30	8.05	26.84
4	30	8.64	28.80
Moyenne			26.86

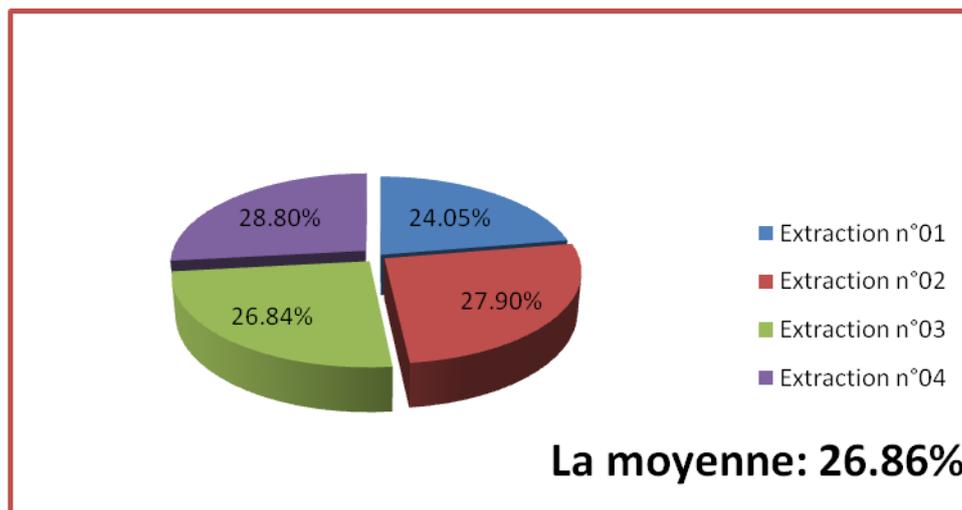


Figure n° 24 : Différents rendements de plusieurs extractions de H.V de *C. pepo*

2- Caractérisation des huiles végétale

2-1- Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des huiles végétales extraites (Figure n°25) sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 20 : Caractéristiques organoleptiques des huiles végétales

L'odeur	La couleur	L'aspect physique
Aromatique, caractéristique de la matière végétale	Marron brun	Liquide huileuse



Figure n°25 : Huile extraite à partir des graines de *Cucurbita pepo*

2-3-Propriétés physico-chimiques

2-3-1-Propriétés physiques

*pH : Le pH obtenu indique que notre HE est légèrement acide et le pH était entre 5 et 6

2-3-2-Propriétés chimiques

2-3-2-1-Composition chimique des huiles végétales des graines de Cucurbita pepo déterminée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

2-3-2-1-1-Composition en acides gras des huiles végétales extraites des graines de Cucurbita pepo

Les résultats de la composition en acides gras des huiles de graines de citrouille peuvent être utilisés pour évaluer la stabilité et la qualité nutritionnelle. Un degré d'insaturation de l'huile plus élevé le rend plus sensible à la dégradation par oxydation.

La composition en acides gras varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment la variété, zone de culture, le climat et la maturité des graines (**BenAlia, 2016**).

L'analyse par Chromatographie en phase gazeuse (Figure n° 26) a montré que les acides gras dominants trouvés dans les huiles étudiées sont, pour les acides gras saturés ; l'acide palmitique C16 : 0 (13,1 %), l'acide myristique C14 : 0 (8,8 %) alors pour les acides gras insaturés ; il y'a l'acide linoléique C18:2 (45 %) et l'acide oléique C18:1 (19,6 %). La composition en acides gras des huit échantillons des graines de citrouille étudiées sont regroupés dans le (tableau 21) Ce profil des acides gras est confirmé par d'autres études (**Bagepalli et al., 2010**).

Les huiles de graines de citrouille étudiées contiennent une proportion totale en acides gras saturés (AGS) qui est de l'ordre de 28 % dont l'acide palmitique est le majoritaire (plus de 10 %) suivi par l'acide myristique (plus de 7 %), par contre la somme des acides gras mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) représente un total de 70,1 % de la totalité des acides gras. Ce pourcentage élevé en acides gras insaturés est aussi trouvé dans d'autres études dans les espèces de Cucurbitacées (**Bagepalli et al., 2010**). Les acides gras majoritaires sont l'acide linoléique suivi par l'acide oléique avec des proportions différentes.

Résultats et discussion

Dans d'autres études menées sur la composition en acides gras de *Cucurbita pepo* (El-Adawy et Taha., 2001), les pourcentages de l'acide linoléique (43,1-55,6%) sont plus élevés par rapport aux résultats trouvés dans la présente étude.

Ces résultats montrent que les huiles des graines de *Cucurbita pepo* sont une source riche en acide linoléique et en acide oléique suggérant que ces huiles peuvent être utilisées comme des huiles alimentaires. Les faibles proportions enregistrées pour les autres acides gras sont aussi en accord avec d'autres résultats rapportés dans la littérature (BenAlia, 2016).

Tableau 21 : Analyses par CPG-SM de la composition en acides gras des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo* (citrouille).

Composants identifiés d'acide gras	Concentration (%)	Temps de Retention RT (min)
Acide Myristique (C14:0)	8,80	8,915
myristoléique (C14:1)	N.d	9,115
Acide Palmitique (C16:0)	13,10	9,320
Acide Palmitoléique (C16:1)	0,50	9,650
Acide Stéarique (C18:0)	3,00	9,850
Acide Oléique (C18:1)	19,60	10,510
Acide Linoléique « oméga 6 » (C18:2)	45,00	11,130
Acide Linoléique « oméga 3 » (C18:3)	4,10	11,370
Acide Arachidique (C20:0)	1,70	11,565
Acide béhénique (C22:0)	1,40	12,150
Acide érucique (C22:1)	0,90	12,355
Total identifiant		98,10

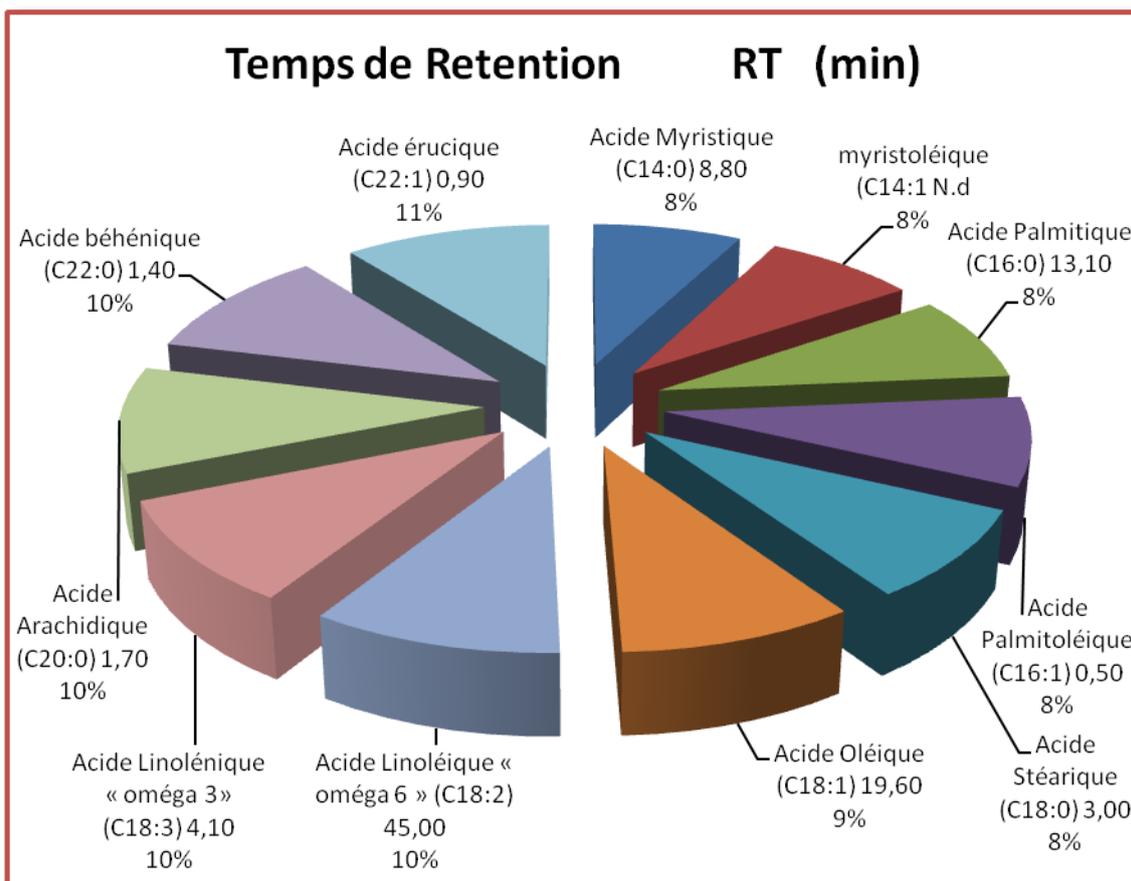
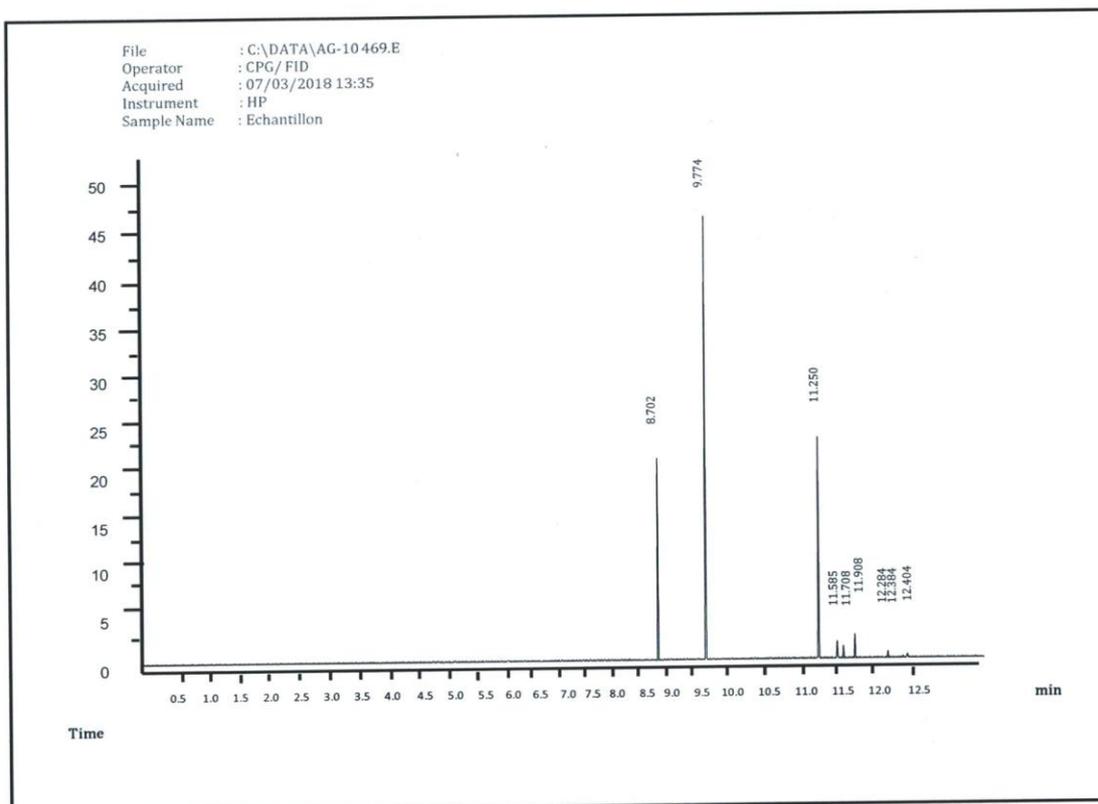


Figure n°26: représentation graphique Composition en acides gras de H.V extraites des graines de Cucurbita pepo

Les valeurs des ratios (ou quotients), AGI / AGS, varient entre 0,75 et 1,75 (tableau 22). Toutefois, les quotients sont moins élevés que ceux trouvés dans les graines de l'huile de l'Arganier (2,1) (Yousfi et al., 2009) et l'huile de fruits de Pistachier de l'Atlas algérien (2,7) (Yousfi et al., 2005) et moins élevés encore que ceux des huiles des graines de Sorgho en Algérie (plus de 5,7) (Hadbaoui et al., 2010).

Tableau 22 : Proportions des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et insaturés (AGPI) présents dans les huiles végétales des graines de Cucurbita pepo (Citrouille)

Catégories d'acides gras & Ratio	Concentrations (en %)
AGS	28,00
AGMI	21,00
AGPI	49,10
AGMI / AGS	0,75
AGPI / AGS	1,75



Chromatogramme CPG /FID
varian 3800

Figure 27: Chromatogramme de la composition en acides gras des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo* (ou Citrouille)

2-3-2-1-1-Composition en phytostérols des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo*

Cependant, la stabilité des huiles et leur résistance au processus d'oxydation dépendent non seulement de la composition en acides gras, mais aussi de la présence de composants mineurs pouvant avoir des effets antioxydants.

Le pouvoir antioxydant d'une huile végétale est basé sur l'élimination des radicaux libres. Ainsi, les antioxydants peuvent empêcher les réactions d'oxydation et d'altération en chaîne et ainsi l'accumulation de radicaux libres et par conséquent prévenir les dommages induits par la peroxydation des lipides membranaires.

La partie insaponifiable des huiles de cette présente étude, analysée par CPG-SM, a montré que les phytostérols à savoir β -sistostérol (47 %), stigmastérol (23,6 %) et campestérol (21,5 %) sont majoritaires (Tableau 23) (Figure n°28).

Résultats et discussion

Ces composés, dont la structure chimique ressemble beaucoup à celle du cholestérol, sont spécifiques des huiles végétales extraites des graines de la citrouille. Les phytostérols sont supposés conférer à cette huile des effets bénéfiques dans le traitement et la prophylaxie des dysfonctionnement de la glande prostatique et de la vessie (El Masri, 2015).

Le phytostérol, β -sistostérol, est également un marqueur des huiles de graines de citrouille (*Cucurbita maxima*) et des huiles de graines du melon amer. Sa teneur varie de 75,7 à 87,3 % (BenAlia, 2016).

Les autres phytostérols, qui étaient à de faibles teneurs (en %) dans cette présente étude, à savoir ; Brassicastérol (1,9 %), β -sitostanol (1,4 %), lanastérol (2,6 %), desmostérol (0,8 %) , choléstanal (0,3 %) et lathostérol (0,5 %) sont considérés comme des composés bioactifs importants même s'ils sont faiblement représentés (Tableau 23) (figure n°29).

Ces différences de concentrations (en %) des phytostérols, détectés dans l'huile végétale, peuvent être attribuées aux stades de maturité des graines ou à la nature du solvant utilisé dans la méthode ou la procédure d'extraction.

Tableau 23 : Analyses par CPG-SM de la composition en phytostérols des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo* (ou Citrouille).

Composés	Formule	Concentration (%)	RT(min)
Campestérol	$C_{28}H_{48}O$	21,50	8,702
β eta sistostérol	$C_{29}H_{50}O$	47,00	9,774
Stigmastérol	$C_{29}H_{48}O$	23,60	11,250
Brassicastérol	$C_{28}H_{46}O$	1,90	11,585
β eta sitostanol	$C_{29}H_{50}O$	1,40	11,708
Lanastérol	$C_{29}H_{50}O$	2,60	11,908
Desmostérol	$C_{27}H_{44}O$	0,80	12,284
Choléstanal	$C_{27}H_{48}O$	0,30	12,384
Lathostérol	$C_{27}H_{46}O$	0,50	12,404
Total identifiant			99,60

Résultats et discussion

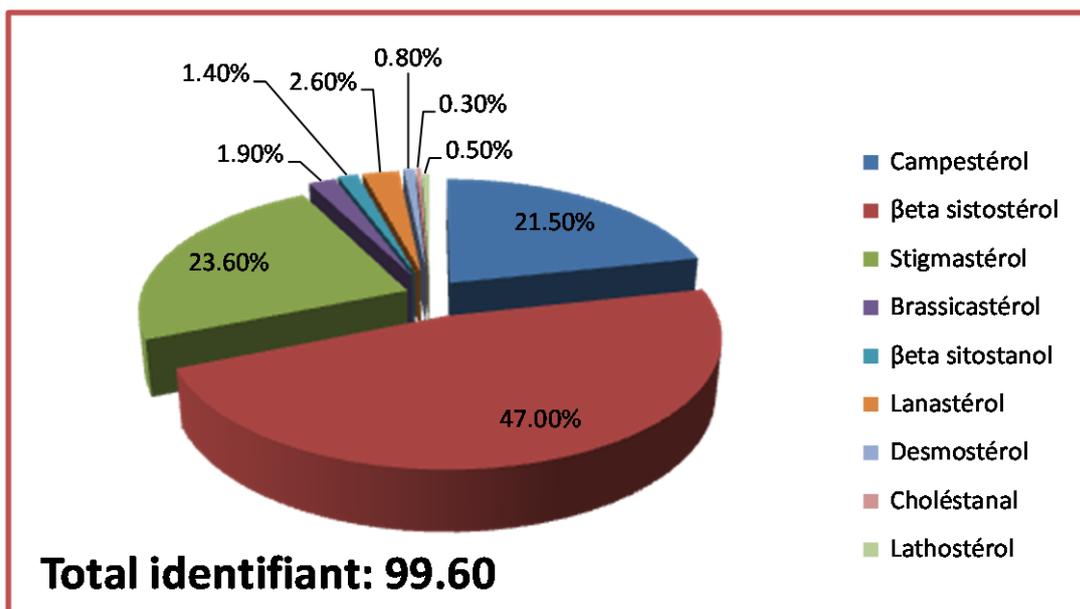


Figure n°28 : Composition en phytostérols des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo*

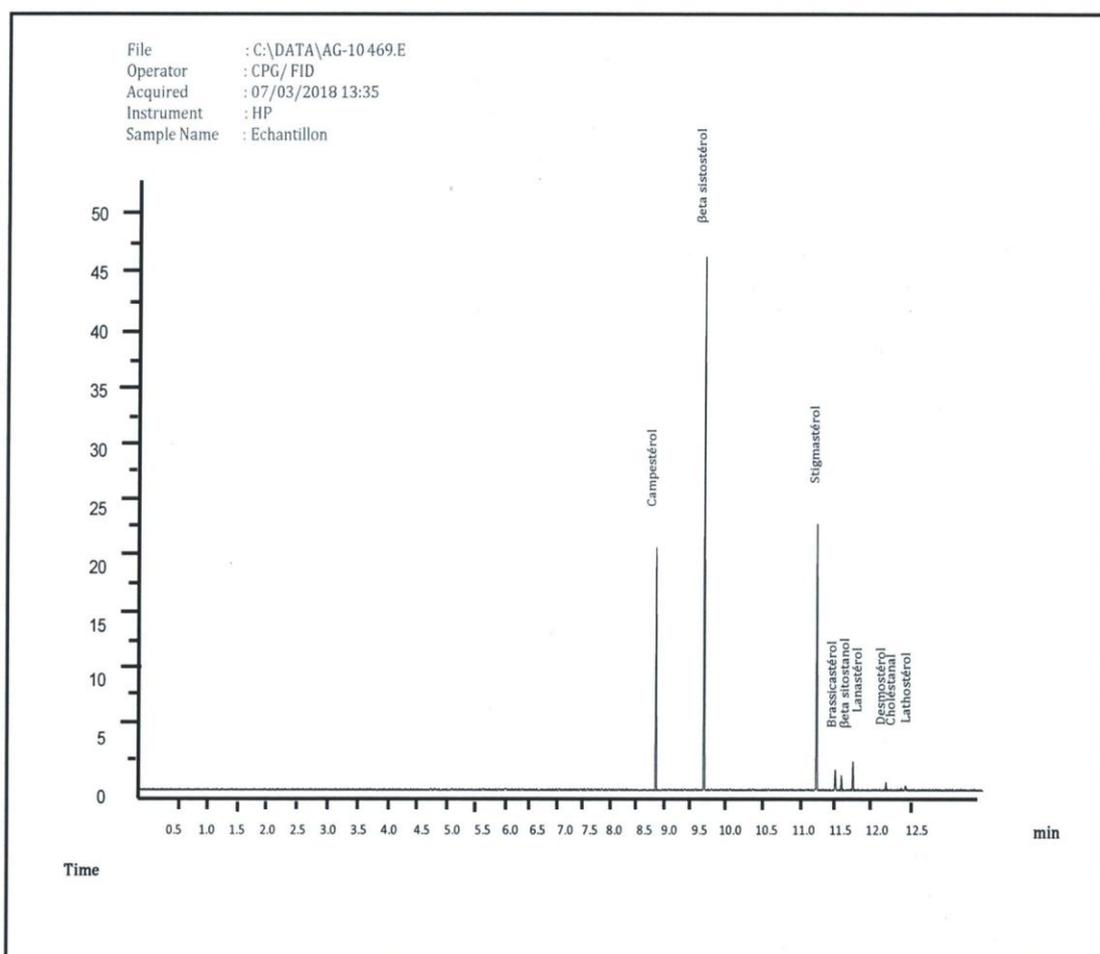


Figure n°29 : Chromatogramme de la composition en phytostérols des huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo* (ou Citrouille).

2^{eme} partie : Activité antibactérienne

IV-2-1- Caractérisation microscopique des souches étudiées

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif et celle colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif (figure n°30). Le tableau 34 présente les observations microscopiques des souches étudiées.

Tableau 24 : Observations microscopiques

Bactérie	Gram	Forme
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	Coccobacille
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	Coccu en grappe de raisin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	Bacille
<i>klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	Bacille

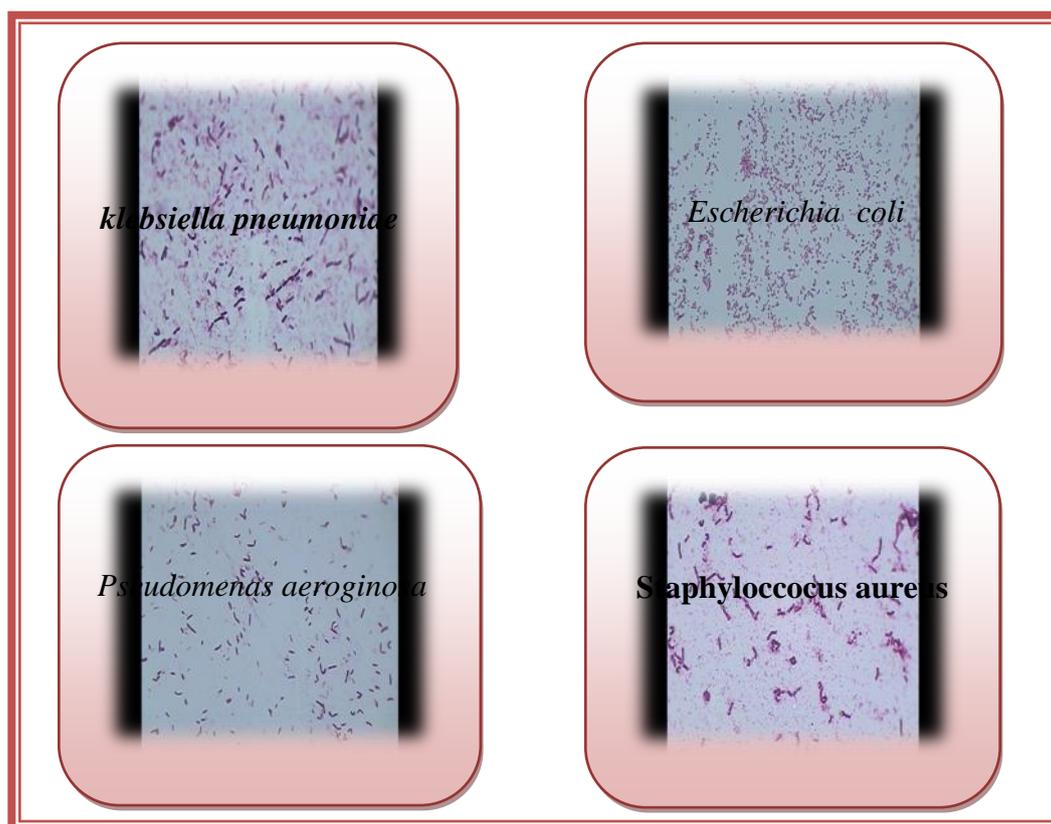


Figure n°30 : Observations microscopiques des souches utilisées G:x100

IV-2-2- Caractérisation biochimique

Tableau 25 : Identification biochimique (galerie classique)

Souches testées	Test de la catalase	Test de Citrate de Simmons	Test de Mannitol-Mobilité
E coli (ATCC 25922)	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	+	/	+
<i>pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853),	+	+	+
<i>klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	+	+	-

IV-2-3- Activité antibactérienne

IV-2-3-1-Aromatogramme

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence les pouvoirs antibactériens de l'huile végétale extraite des graines de *Cucurbita pepo*, de l'huile végétale commerciale de la citrouille et des herbicides (Metribuzine et Linuron) à différentes dilutions vis-à-vis de quatre (4) espèces bactériennes de référence à Gram positif et à Gram négatif. D'après la classification de Ponce et al. (2003), les zones d'inhibitions, variant entre 8 et 25 mm, indiquent que toutes les souches étudiées présentent des degrés de sensibilité différentes vis-à-vis des différents dilutions de l'huile végétale extraite des graines de *Cucurbita pepo* (figures n°31,32). Cependant, les souches bactériennes étudiées ont développé une résistance à l'encontre de divers dilutions de l'huile commerciale pour *E. coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923), alors qu'un profil antibactérien a été observé contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) avec des zones d'inhibitions de 13,11 et 11 mm et de 25, 21 et 20 mm respectivement aux concentrations diluées aux facteurs 1/2, 1/4 et 1/8 (v/v). Les résultats obtenus de l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile végétale extraite des graines de *Cucurbita pepo* et de celle de l'huile commerciale de la citrouille sont présentés dans le tableau 26.

L'examen des différentes boîtes de Pétri n'a révélé la présence d'aucun halo d'inhibition autour des disques imbibés par les différentes dilutions de Linuron pour les deux souches testées ; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

Résultats et discussion

Par contre, les autres observations ont montré une activité antibactérienne contre les deux souches ; *E. coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (figure n°38). Cependant, la Metribuzine s'est révélé active vis-à-vis des souches bactériennes étudiées avec des zones d'inhibition variant de 13 à 15 mm. Alors que l'activité la plus faible a été montrée avec la Metribuzine de 10, 09 et 07 mm de diamètre des zones d'inhibition contre *Pseudomonas aeruginosa* (figure n°37).

Les résultats du test de sensibilité microbienne à la Metribuzine et Linuron sont regroupés dans le tableau 37.

Le témoin négatif utilisé est le DMSO n'a pas exercé aucune inhibition sur les souches testées (tableau 26)

Tableau 26 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'huile végétale extrait des grains de *Cucurbita pepo* et huile commerciale.

Huile/ Les souches bactériennes à tester	Témoin négatif	Zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations (H.V de <i>cucurbita pepo</i>)					Zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations (de l'huile commerciale)				
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E. coli</i> ATCC 25922	06	25	23	17	09	09	06	06	06	06	06
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	06	21	20	15	09	09	06	06	06	06	06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	06	10	10	10	09	09	13	13	13	11	11
<i>Klebsilla pneumonie</i> ATCC 700603	06	17	15	15	10	10	25	25	21	20	18

Résultats et discussion

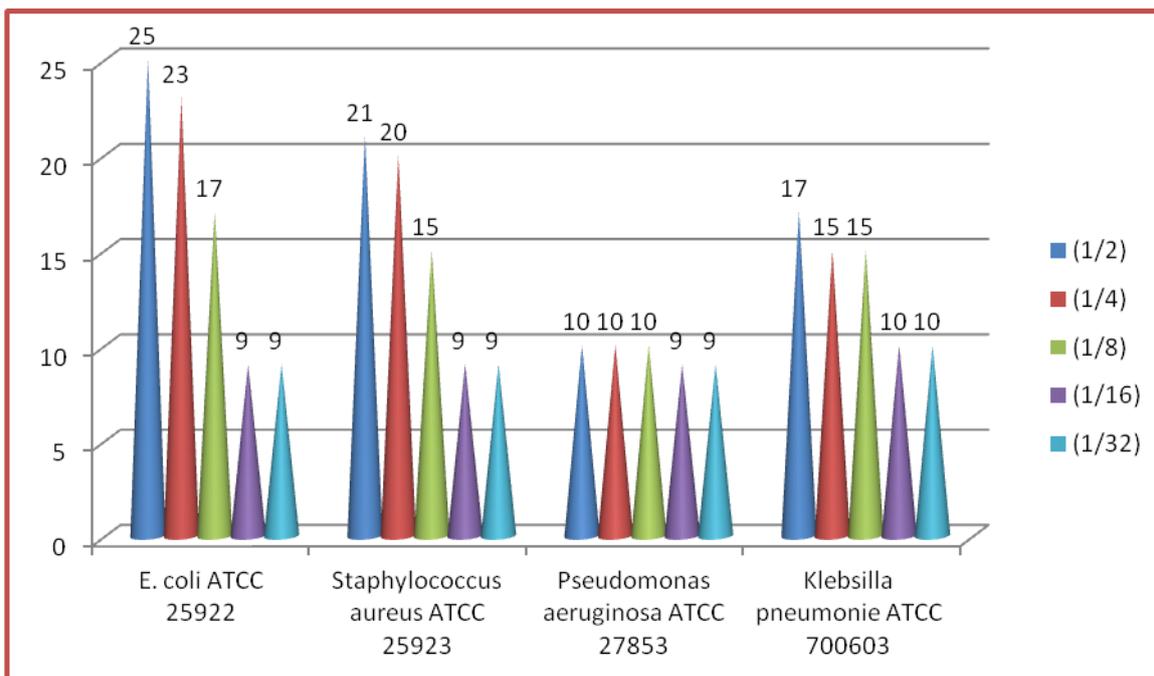


Figure n°31 : Profil des zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations des huiles extraites des graines de *Cucurbita pepo*

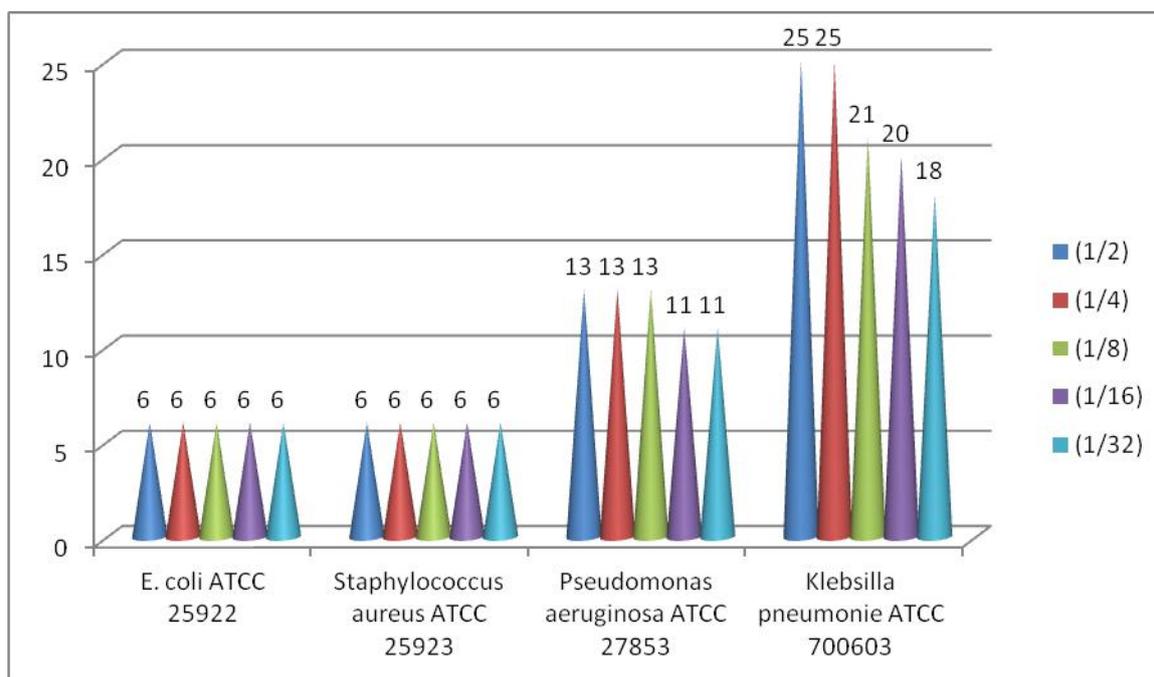


Figure n°32 : Profil des zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations des huiles commerciales de la citrouille

La résistance des bactéries testées à l'encontre de l'huile extraite des graines de *Cucurbita pepo* est représentée dans la figure n°33 :

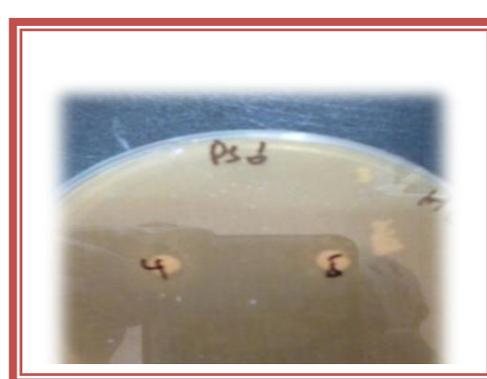
Résultats et discussion



a) *E. coli* ATCC 25922



b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



d) *Klebsilla pneumoniae* ATCC 700603

Figure n°33: Expression de l'activité de l'H.V des graines de *Cucurbita pepo* sur les souches bactériennes testées

Résultats et discussion

La sensibilité des micro-organismes testés à l'encontre des pesticides (Metribuzine et Linuron) est représentée dans le tableau 27 et les figure n° 34,35.

Tableau 27 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition pesticides (Metribuzine et Linuron)

Pesticides/ Les souches bactériennes à tester	Zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations (Metribuzine)					Zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations (Linuron)				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15	13	11	07	07	20	19	18	15	15
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 25923	15	15	14	09	06	17	15	14	14	07
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	10	09	07	06	06	09	09	07	06	06
<i>Klebsilla</i> <i>pneumonie</i> ATCC 700603	15	15	12	06	06	06	06	06	06	06

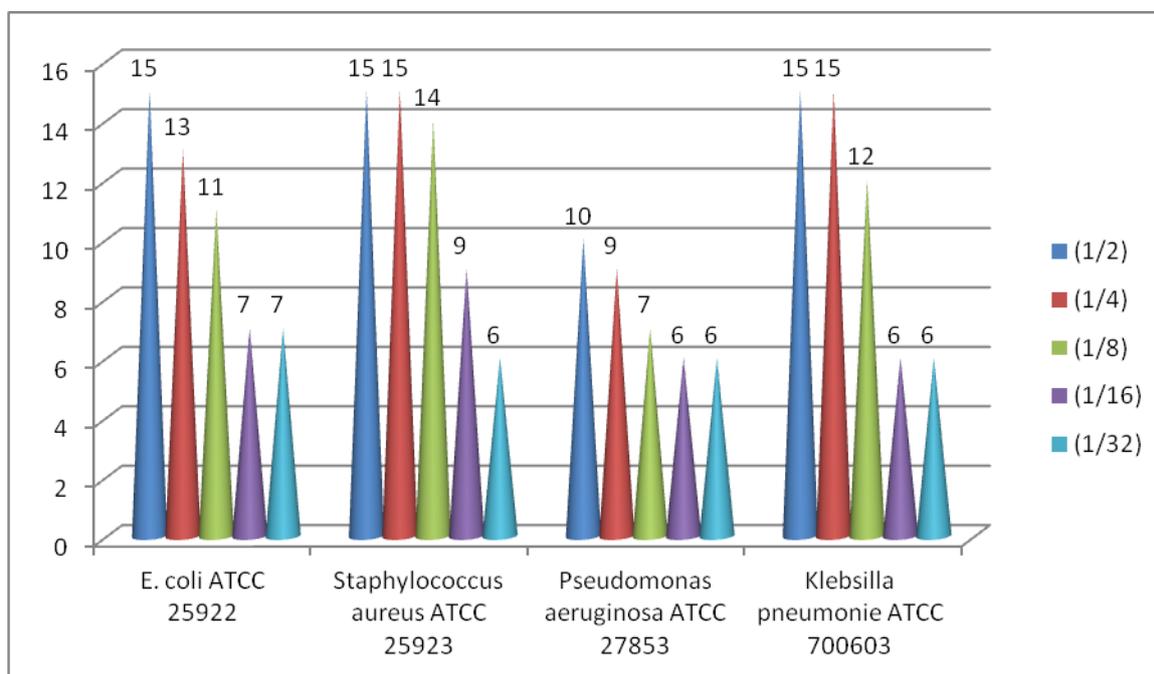


Figure n°34 : Profil des zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations du Métribuzine

Résultats et discussion

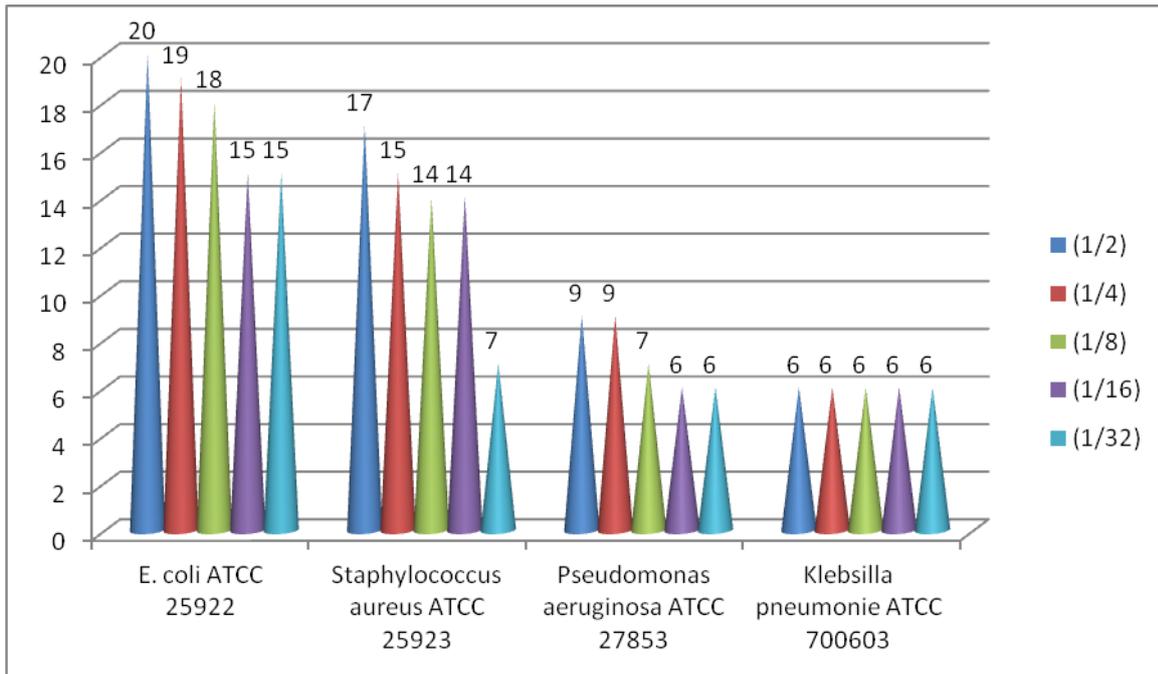


Figure n°35 : Profile des zones d'inhibition (mm) de différentes concentrations de Linuron



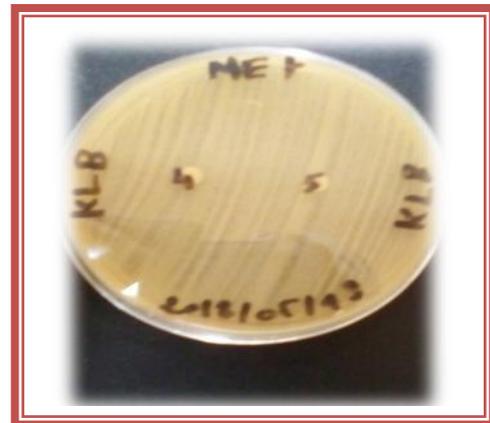
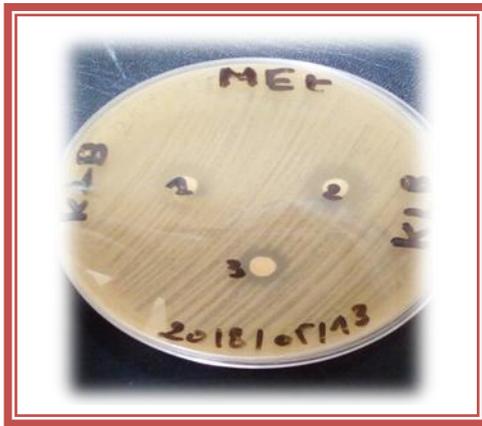
a) *E. coli* ATCC 25922



Staphylococcus aureus ATCC 25923



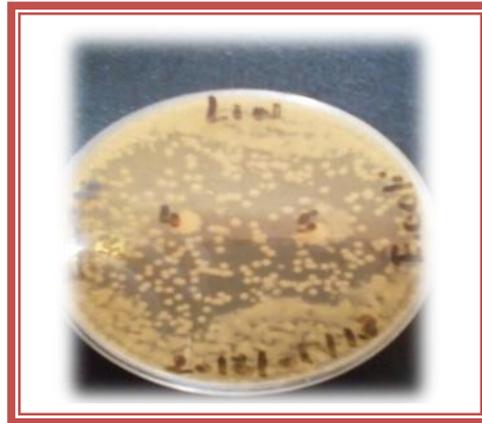
c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



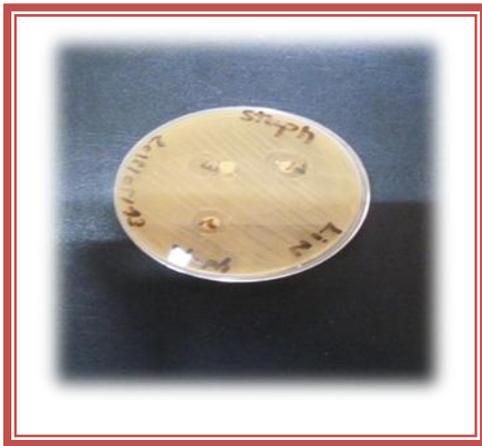
d) *Klebsilla pneumonie* ATCC 700603

Figure n°36 : Expression de l'activité de Metribuzine

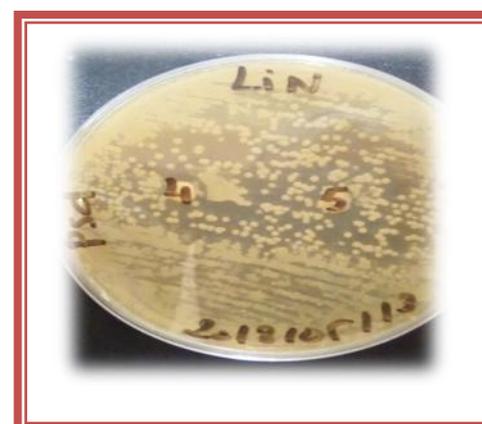
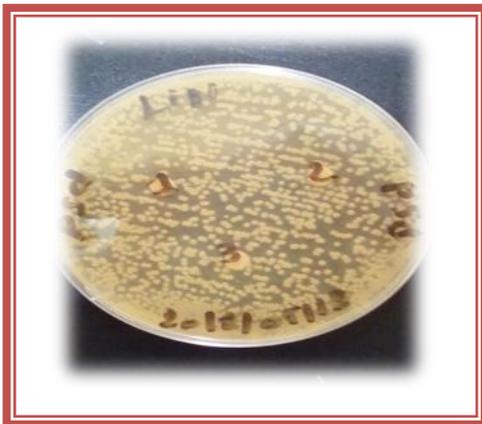
Résultats et discussion



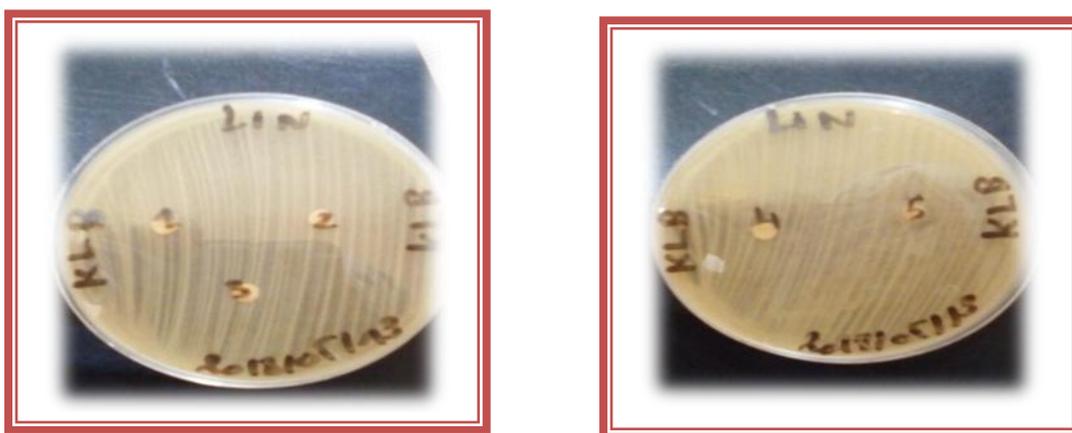
a) *E. coli* ATCC 25922



b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



d) *Klebsilla pneumonie* ATCC 700603

Figure n°37 : Expression de l'activité de Linuron

IV-2-3-2-Antibiogramme : Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques.

les antibiotiques se sont révélés très actifs vis-à-vis des souches bactériennes de référence avec des diamètres d'inhibition variant de 22 à 50 mm, cependant, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Klebsilla pneumonie* ATCC 700603 ont développées une résistance à l'encontre de l'Erytromycine E15. (Figure n° 38). Le tableau ci-dessous reporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions atteintes avec les différentes souches étudiées.

Tableau 28 : Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents Antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

ATB	FOX	CN	E15
Souches			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	19	48	45
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	31	06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	23	35	25
<i>Klebsilla pneumonie</i> ATCC 700603	30	30	06

Résultats et discussion

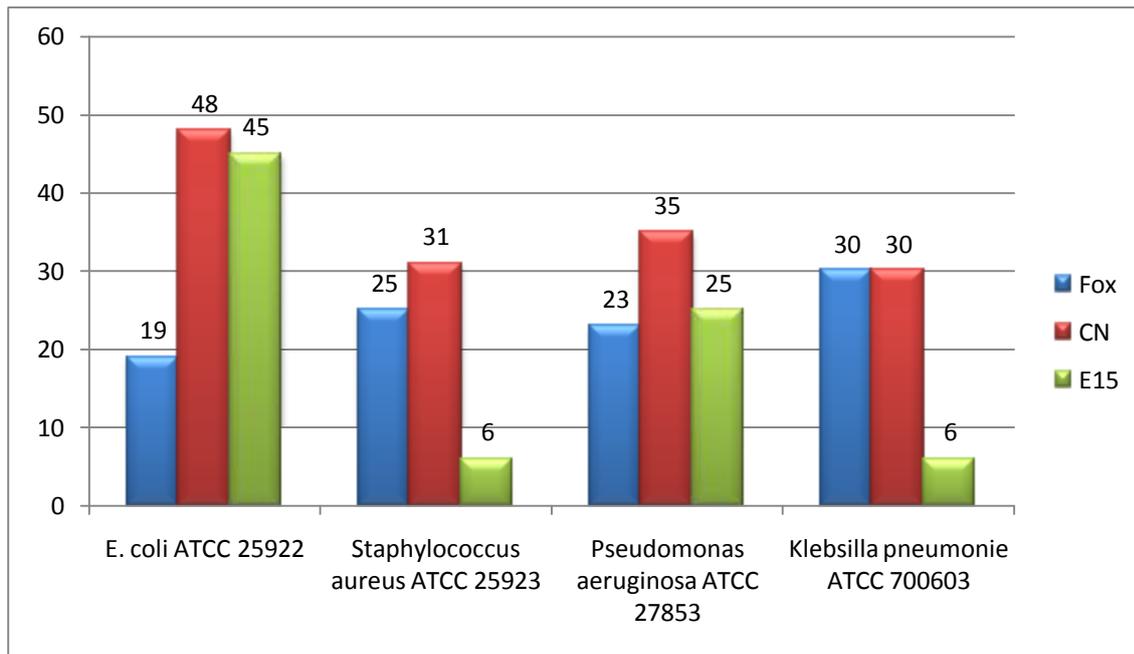
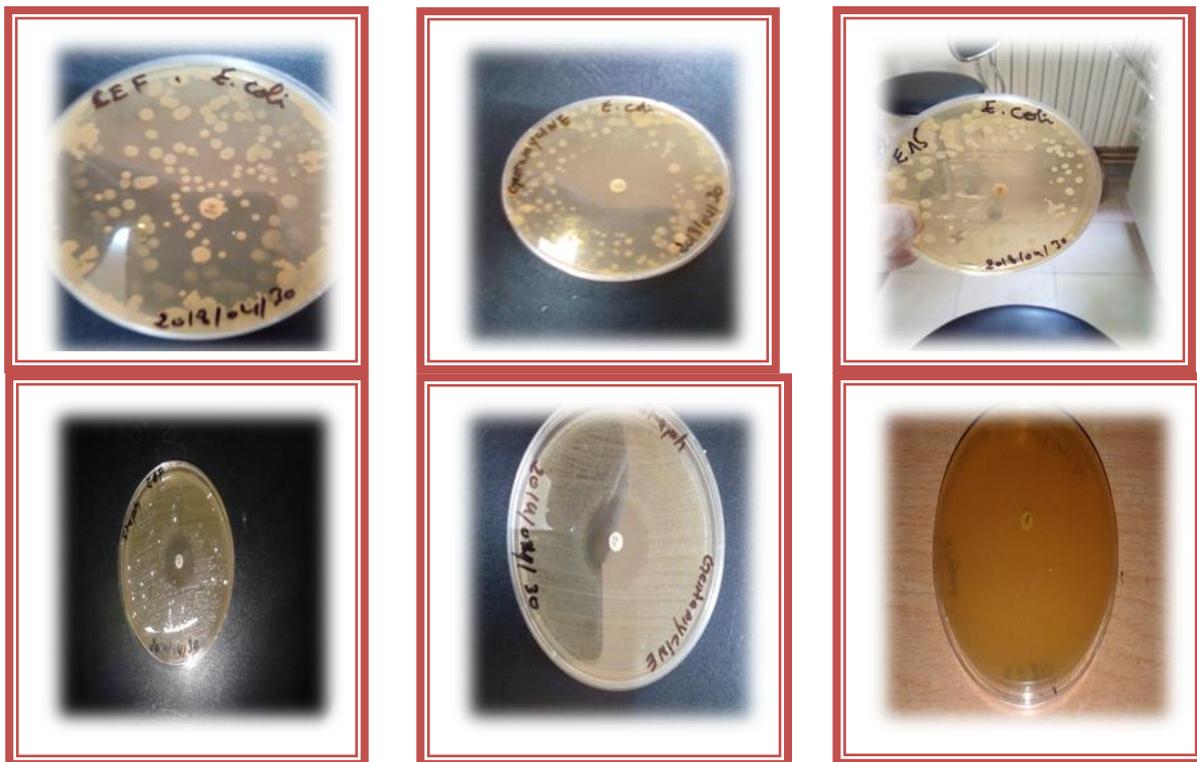


Figure n°38 : profile antibiogramme des germes étudiés en présence des différents Antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

Résultats et discussion

La sensibilité ainsi que la résistance des bactéries testées aux différents antibiotiques sont représentées dans la figure n°39



b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

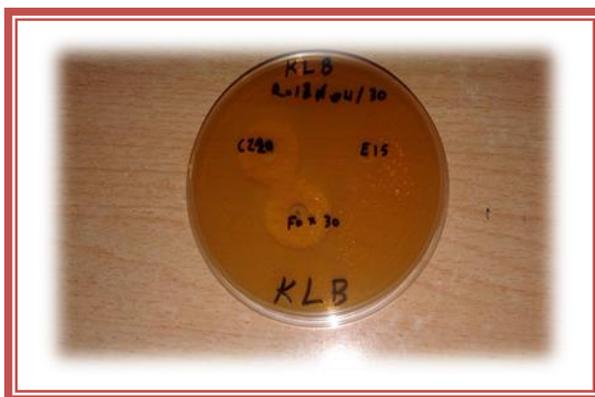


Figure n° 39 : Sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques testés

D'après le tableau 26 , les résultats de l'activité antimicrobienne des deux huiles végétales ; celle extraite des graines de *Cucurbita pepo* et celle achetée ou huile commercial , testées à différentes concentrations (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) ont montré que l'huile extraite de graines de *Cucurbita pepo* , à la concentration de 1/2, 1/4, 1/8, présente l'activité antibactérienne la plus importante, vis-à-vis de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* avec des diamètres de (25, 23, 17mm),(21,20,15mm) et (17, 15,15 mm), respectivement. Cette activité importante est due à la richesse de l'huile végétale de graines de *Cucurbita pepo* en phytostérols et vitamines (Gohari et al., 2011).

Par contre, cette même huile a présenté une activité faible vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (10,10 et 10 mm). Tandis que huile commercial de la citrouille n'a présenté aucun effet antibactérien contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Par ailleurs, *Klebsiella pneumoniae* s'est révélé plus sensible à cette huile avec des zones d'inhibitions de (25, 25, 21, 20 et 18 mm) respectivement aux concentrations de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 (v/v). *Pseudomonas aeruginosa* a révélé la présence d'une sensibilité en vers l'huile commercial de la citrouille avec des zones d'inhibitions de (13, 13 et 11 mm) respectivement à la concentration de 1/2, 1/4 et 1/8.

Toutes les souches bactériennes ont montré une concentration de zones d'inhibition de manière dépendante, à savoir la zone d'inhibition diminue avec la diminution de concentration (dilutions) de l'huile végétale et huile commercial de la citrouille sauf *P. aeruginosa*. C'est intéressant de noter que *P. aeruginosa* a montré la plus forte ZOI de 10 mm à la plus faible concentration de 1/32 pour l'huile végétale de *Cucurbita pepo*.

La plus grande surface d'inhibition est enregistrée avec *Escherichia coli* (25, 23, 17, 09 et 09 mm), suivi par *Staphylococcus aureus* (21, 20, 15, 09 et 09 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (17, 15, 15, 10 et 10 mm). Ces trois espèces sont donc les plus sensibles à l'huile végétale de *Cucurbita pepo*. En revanche, *P. aeruginosa* est légèrement sensible à cette H.V.

Les activités antibactériennes de l'huile de *C. pepo* ont montré une zone de inhibition (60 %) envers *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*.

Dans une autre étude, il a été noté que la teneur en huile (acide linoléique et acide oléique) a montré une bonne activité antimicrobienne contre *S. aureus* avec zone d'inhibition de 15 mm. En plus de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* se sont révélés sensibles aux extraits alcooliques du fruit (ou pulpe de citrouille) avec des concentrations de 10, 50, 100, 200, 500 et 1000 µg / ml par contre ils se sont révélés efficaces contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Adnan et Gul, 2017).

L'huile commerciale de la citrouille étudiée ne possède pas d'activité antibactérienne pour *E.coli* et *Staphylococcus aureus*. Par contre, l'huile commerciale de la citrouille a montré une activité modérée vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

Concernant les deux huiles : l'huile de *C. pepo* et l'huile commerciale de la citrouille, il a été observé des différences de résultats. L'huile commerciale de la citrouille n'a décelé aucune activité antibactérienne envers *E.coli* et *Staphylococcus aureus*, et ce dans l'intervalle de cinq concentrations testées. Tandis que l'huile végétale de *C. pepo* a montré une activité significative contre les deux bactéries mentionnée ci-dessus.

L'inactivité antibactérienne de l'huile commerciale, observée dans cette étude, est due probablement à plusieurs facteurs (Fruhwith, 2007), parmi lesquels on peut citer:

- le procédé et les conditions d'extraction
- la nature du matériel d'extraction (risque d'oxydation)
- les conditions de conservation, de stockage et de transport
- la concentration en huiles utilisée
- la diffusion des huiles à travers la gélose
- l'état physiologique de la bactérie.

En effet, les différences des résultats pourraient être attribuées à la nature même de la composition chimique de l'huile de *C. pepo* et huile commercial de la citrouille.

Autre fait, l'absence d'activité antimicrobienne pourrait s'expliquer par la résistance développée par un nombre important de souches et qui réagissent différemment aux divers types d'huiles. Parmi les souches étudiées, *E.coli* et *Staphylococcus aureus* qui se sont montrées résistantes à l'huile commerciale. En faite, ces deux bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Ces dernières sont composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes.

Nos résultats sont meilleurs que ceux trouvés par Ethiraj et Balasundaram, en 2016, qui ont étudié l'activité antibactérienne à partir d'extraits de graines de *cucurbita pepo* et de *Cucurbita maxima*, et ont trouvé des diamètres d'inhibition variables en fonction des souches avec zones d'inhibitions contre *S. aureus* (13,0 mm), *E. coli* (-) et *p. aeruginosa* (14 mm). Ces memes auteurs ont conclu que les extraits acétoniques de graines de *Cucurbita pepo* en poudre sèche présentaient un niveau d'activité antimicrobienne supérieur.

Le puissant effet antibactérien est attribué à la plus grande quantité de composé de phytostérols dans les extraits acétonique de graines de *Cucurbita pepo* .

Abdulrhem et AL-Ghazal, 2012, ont étudié l'effet antibactérien des extraits de *Cucurbita pepo* sur des souches bactériennes de résistance multi-antibiotique isolées à partir de l'homme, avaient trouvé que l'huile de *Cucurbita pepo* présentait une activité antibactérienne moyenne avec ZOI contre *S. aureus* (16,0 mm), *E. coli* (10mm) et *Klebsiella pneumoniae* (2 mm) et ont montré que l'huile extraite de *Cucurbita pepo* a produit une zone d'inhibition supérieure de 60 % sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

La comparaison quantitative des résultats des huiles et des antibiotiques est difficile, car la nature de l'activité et la composition des molécules ne sont pas comparable (Billerbeck, 2002).

A partir de la **figure n°39**, il a été constaté que les effets des antibiotiques et des huiles sont différents sur la plupart des souches bactériennes étudiées.

Nos huiles ont une activité inférieure à celle de la gentamycine (CN10) et cefoxitine (FOX30) avec la totalité des espèces. Ils sont globalement meilleurs que l'érythromycine (E15) concernant *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* qui ont développé une résistance à l'encontre de cet ATB à l'exception pour la bactérie *E.coli*, *P. aeruginosa* qui se sont révélés plus sensibles.

Pour la cefoxitine (FOX30), l'activité antibactérienne est très similaire à celle de notre huile végétale vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*, avec une primauté notable concernant la souche *E.coli*.

L'activité antibactérienne des H.V, peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés de l'H.V. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antimicrobienne de cette huile végétale (Giordani et al., 2008).

La présence de phytostérols et leurs dérivés dans l'huile extraite de graines de *Cucurbita pepo* peut donc être responsable des activités antibactériennes. Plusieurs mécanismes de l'action antimicrobienne des molécules bioactives ont été suggéré par différents chercheurs, reconnaissant que ces composés peuvent agir soit en inhibant la croissance ou en induisant des perturbations de la membrane cellulaire ou par interférence avec certains processus métabolites microbiens, ainsi que la modulation de la transduction du signal ou les voies d'expression des gènes (kris-Etherton et al,2002).

Cette différence entre nos résultats et ceux des autres travaux en ce qui concerne l'huile des graines de *Cucurbita pepo* réside probablement dans le fait que dans cette présente étude on a testé une huile végétale extraite par l'hexane, alors que les autres huiles de la citrouille

Résultats et discussion

testées dans d'autres travaux sont pour la plupart des huiles extraites par d'autres méthodes et d'autres solvants.

❖ Détermination des CMI :

Le test antibactérien préliminaire montre que l'huile extraite des graines de *Cucurbita pepo* et l'huile commerciale de la citrouille présentaient un effet antibactérien. Donc, le test suivant a pour objectif de déterminer la concentration minimale inhibitrice ou CMI. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Tableau 29 : Résultats des CMI des huiles de *C.pepo* et huile commerciale de la citrouille

Huiles	Dilution (µg/ml)	E .coli	S. aureus	P .a	K. p
Huile de <i>C.pepo</i>	0.5	-	-	-	-
	0.25	-	-	-	-
	0.12	-	-	+	-
	0.062	-	-	+	+
	0.03	+	+	+	+
Huile commerciale	0.5	+	+	-	-
	0.25	+	+	+	-
	0.12	+	+	+	+
	0.062	+	+	+	+
	0.03	+	+	+	+

+ : présence de croissance

- : absence de croissance

Les analyses des résultats montrent que l'huile de *C.pepo* présente une forte activité antibactérienne. En effet, pour les quatre souches étudiées, la gamme des CMI et CMB de nos huiles extraites des graines de *C.pepo* varie de 0.5 à 0.06 µg /ml.

Ainsi, les bactéries n'ont montré aucune croissance en présence des solutions mères de l'huile de *C. pepo*. Cette concentration est donc inhibitrice pour l'ensemble des souches.

Selon le tableau 29 et la figure n°41, il a été révélé que l'huile est bactéricide sur *Staphylococcus aureus*, *P.aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, par ailleurs des CMI élevées ont été observées sur *E. coli*.

Contrairement, l'huile commerciale de la citrouille présente une faible activité bactéricide et paraît moins active avec des CMI et CMB supérieures ou égales à 0.25 sur *Klebsiella pneumoniae* et *P.aeruginosa*. Tandis que *E. coli* et *Staphylococcus aureus* étaient résistantes. L'huile de la citrouille possède un faible pouvoir d'inhibiteur puisque l'inhibition de la croissance a été constatée avec une forte concentration (0,5%) (tableau 29).

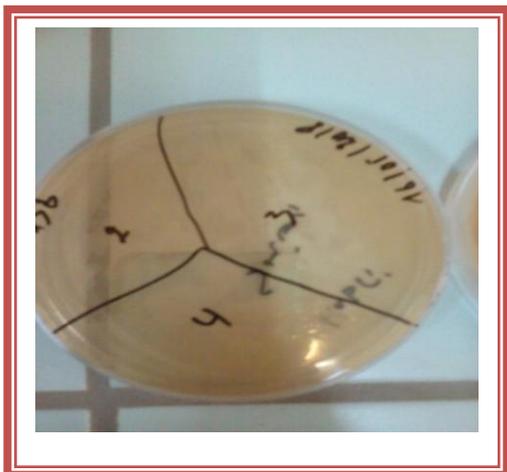
Résultats et discussion

D'autres travaux ont été menés sur les substances actives présentes dans les extraits alcooliques obtenus à partir de graines de *Cucurbita maxima*. Les dosages phytochimiques des extraits ont révélé la présence de glucides, stéroïdes, protéines et acides aminés. La présence de ces constituants bioactifs est associée à l'activité antimicrobienne de la plante. **(Ravishankar et al., 2012).**

L'extrait de graines de *Cucurbita maxima* dissous dans l'éthanol a montré le spectre d'inhibition sur *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus wernerii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *pneumonie* à *Klebsiella* et *Escherichia coli*. Les observations ont révélé une zone d'inhibition importante et des activités antibactériennes **(Ravishankar et al., 2012).**

Les résultats présentés dans la figure n°40 montrent qu'au sein des boîtes aucune nouvelle colonie ne s'est développée. Les boîtes restent totalement translucides, même après plusieurs jours d'incubation sauf *E. coli* qu'est développé quelque colonie.

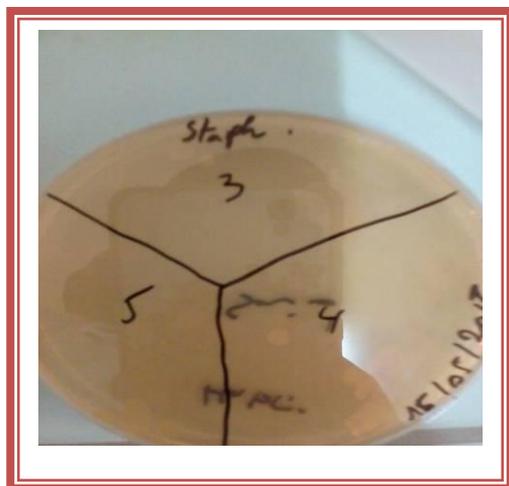
Un prélèvement sur la surface de la gélose ne montre aucun développement lorsqu'il est repiqué. Nous déduisons que la zone est stérile et que l'effet de cette huile végétale de *C. pepo* sur *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *P.aeruginosa* est bactéricides, mais possède un effet bactériostatique sur *E. coli*.



a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



b) *Klebsilla pneumonie* ATCC 700603



c) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

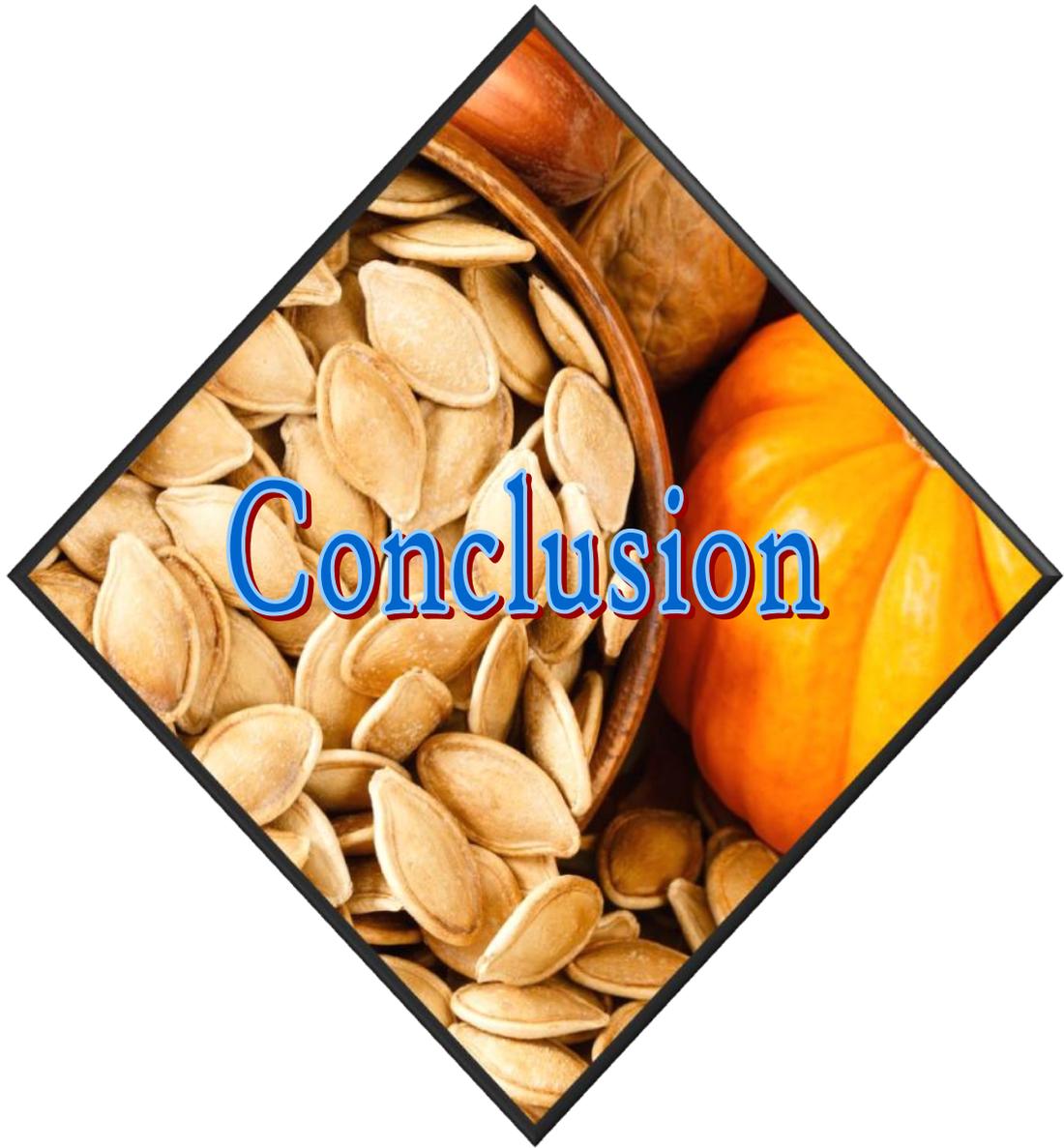


d) *E. coli* ATCC 25922

Figure n°40 : Concentrations minimales inhibitrices des solutions testées (CMB).

Concernant les pesticides et selon la bibliographie disponible, il n'existe pas des travaux déjà réalisés sur l'activité antimicrobienne des pesticides, pour cela, les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus pour l'huile végétale extrait de *C.pepo*.

Donc selon les résultats obtenu dans le tableau 27, figure n°39 -40 on remarque que les deux pesticides Metribuzine et Linuron présentent une activité antimicrobienne acceptable contre les différents souches étudiées.



Conclusion :

Notre projet a porté sur l'étude de l'activité antibactérienne de plusieurs échantillons à savoir ; les huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo*, les huiles végétales commerciales de la citrouille et les herbicides (Metribuzine et Linuron).

A travers les résultats obtenus; plusieurs conclusions ont été tirées:

L'hexane s'est montré le solvant organique convenable pour l'extraction des huiles végétales à partir des graines de la citrouille. Il a permis l'obtention d'un bon rendement d'extraction qui était de l'ordre de 27 %.

L'analyse chimique des huiles extraites par la méthode de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis l'identification des acides gras saturés (acide palmitique et acide myristique) et insaturés (acide linoléique et acide oléique). Leur teneur est d'un apport nutritionnel pour la santé humaine. Ces analyses ont montré la présence d'autres composants bioactifs d'une importance cruciale qui sont les phytostérols. Parmi ces molécules, β -sistostérol (47 %), stigmastérol (23,6 %) et campestérol (21,5 %) étaient majoritaires.

L'activité antimicrobienne des huiles végétales des graines de *Cucurbita pepo* (ou citrouille) a été évaluée.

L'huile végétale extraite a révélé une activité antibactérienne efficace contre la croissance de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) avec des diamètres d'inhibitions de (25, 23, 17, 09 et 09 mm), (21, 20, 15,09 et 09 mm) et (17, 15, 15, 10 et 10 mm) respectivement aux différentes concentrations alors que cette même huile a été de faible activité antibactérienne contre la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853.

L'huile commerciale de la citrouille n'a présenté aucune activité antibactérienne décelable (6,0 mm \varnothing ; 6,25 à plus de 12,5 $\mu\text{g/ml}$) contre *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 était moyennement sensible avec un diamètre d'inhibition de 13 mm. Par contre, *klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) était la souche la plus sensible.

Les huiles végétales extraites des graines de *Cucurbita pepo* ont montré une activité antibactérienne potentiel et plus élevée que celle des huiles commerciales des graines. Cela se traduisant par des valeurs de CMI et CMB (1,56 et 12,5 mg/ml). Ceci est dû probablement à

Conclusion

la richesse de cette huile en acide linoléique, acide oléique et de phytostérols dotés de propriétés antibactériennes.

L'appréciation des activités antibactériennes de l'herbicide, Metribuzine, a montré une activité moyenne sur la croissance des souches bactériennes étudiées avec un diamètre d'inhibition variant de 13 à 15 mm, alors que *Pseudomonas aeruginosa* présentait une résistance avec des diamètres des zones d'inhibitions de 10, 09, 07, 06 et 06 mm aux différentes concentrations utilisées.

En revanche, l'herbicide Linuron n'a révélé aucune activité antibactérienne décelable contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

D'un autre côté, *E. coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) étaient les souches les plus sensibles.

A la lumière des résultats obtenus, et vu l'effet important de l'huile végétale extraite des graines de la plante médicinale « *Cucurbita pepo* », il est donc indéniable d'entamer d'autres études sur d'autres espèces appartenant au genre *Cucurbita* » afin de mettre en évidence d'autres activités préventives et antioxydantes et de les tester sur d'autres microorganismes.



Références
bibliographiques



Référence bibliographique :

1. Ouvrages :

- 🍷 **Abdulrhem T. AL-Ghazal(2011)** : Evaluation of Antibacterial Effect of *Cucurbita pepo* (Yakten) Extracts on Multi-antibiotic Resistance Bacterial Strains Isolated From Human Urinary Tract Infections; *Department of Biology College of Science University of Mosul* .Raf. J. Sci., Vol. 23, No.2 pp 1-7, 2012
- 🍷 **AFNOR, 1986**, Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR, Paris, p.57.
- 🍷 **Ahamat –Silaye O. (1981)**. Etude de la composition chimique et de la valeur nutritive de quelques aliments du Sénégal .Rapport de stage, ORSTOM –Nutrition.
- 🍷 **ALfawaz MA. (2004)**. Chemical Composition and Oil Characteristics of Pumpkin (*Cucurbita Maxima*) Seed Kernels. *Food Sci Agric Res.* (Center, King Saud Univ., Res. Bult). Vol 129: 5-18.
- 🍷 **Alpas H, Berkowicz SM, Ermakova I, (2011)**: Environmental Security and Ecoterrorism. Ed. Springer Science & Business Media, Russia. 187p.
- 🍷 **AOUATI HANANE.(2009)** : Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. 107 / Mag : 006 / SN.P-10.
- 🍷 **Arpino P, Prévôt A, Serpinet J, Tranchant J, Vergnol A, Wittier P. 1995.** - Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson, Paris.
- 🍷 **Assous M.T.M., Soheir Saad E.M. et Dyab A.S. (2014)**: Enhancement of quality attributes of canned pumpkin and pineapple. *Annals of Agricultural Science*, 59(1): 9-15.
- 🍷 **Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H. (2000)** : Bactériologie clinique, Ellipses, Paris. 2^{ème} édition : 171-211.
- 🍷 **Aydin E. et Gocmen D. (2015)**: The influences of drying method and metabisulfite pre-treatment on the color, functional properties and phenolic acids contents and bioaccessibility of pumpkin flour. *Food Science and Technology*, 60: 385-392.
- 🍷 **Bachmann Janet., Adam Katherine. (2010)**: Organic Pumpkin and Winter Squash Marketing and Production. Publish organization: ATTRA.
- 🍷 **Badr, SE, Shaaban, M, Elkholy, YM, Helal, MH, Hamza, AS, Masoud, MS, El Safty, MM. (2011)**: Chemical composition and biological activity of ripe pumpkin fruits (*Cucurbita pepo* L.) cultivated in Egyptian habitats, *Nat Prod Res, Formerly Natural Product Letters*; 25(16): 1524-1539.
- 🍷 **Badr, SE, Shaaban, M, Elkholy, YM, Helal, MH, Hamza, AS, Masoud, (2011)**: Chemical composition and biological activity of ripe pumpkin fruits (*Cucurbita pepo* L.) cultivated in Egyptian habitats, *Nat Prod Res, Formerly Natural Product Letters*; 25(16): 1524-1539.
- 🍷 **Baerwolf S, Geffers C, Behnke M. (2002)**: Correlation between transmissions and the
- 🍷 **Bagepalli Srinivas Ashok Kumar., Vontoor Byrappa Narayana et al.,(2010)**. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Chitrakadi Vati, a Ayurvedic Formulation. *Internet J of Food Saf.* Vol 12:158-164.
- 🍷 **Bagepalli Srinivas Ashok Kumar., Vontoor Byrappa Narayana Swamy., Peresandra Avalakondarayappa Arun Kumar and SaleemullaKhan. (2010)**: Evaluation of

Antioxydant and Antimicrobial Activities of Chitrakadi Vati, a Ayurvedic Formulation. Internet J of Food Saf. Vol 12:158-164.

🍷 **Bauer, E.R.S., Daxenberger, A., Petri, T., Sauerwein, H., Meyer, H.H.D., (2001):** Characterization of the affinity of different anabolic and synthetic hormones to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progesterin receptor. APMIS 108, 838–846.

🍷 **Bedoui H ; Benhammedi Z et Nacer N (2005-2006):** Projet de résistance de Staphylococcus aureus aux antibiotiques ou secteur sanitaire de Ghardaïa. Diplôme supérieur en Microbiologie université de Kasdi Merbah Ouargla P03.

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

🍷 **Ben messaoud Kawthar Oumel kheir (2004-2005),** l'otite moyenne chronique ; Diplôme supérieur en Microbiologie université de Kasdi Merbah Ouargla PP 18-32.

🍷 **BENTCHICOU A., (1999).** Extraction, caractérisation et analyse de l'huile essentielle de thym d'Algérie par chromatographie en phase gazeuse (CPG); Thèse d'ingénieur ; Univ. Médéa.

🍷 **Bérard Laurence ., Barrau Jacques ., Marchenay Philippe . (2000):** Polenta, cassoulet et piperade, l'introduction des plantes du Nouveau Monde dans les cuisines régionales. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*. Vol 42 (42) : 65-80.

🍷 **Berrah Awatef. (2011).** Etude sur les pesticides. Université de Tébessa Algérie-Master 2 en toxicologie appliquée.

🍷 **Bielecki, P., Glik, J., Kawecki, M. & Martins dos Santos, V. A. (2008).** Towards understanding Pseudomonas aeruginosa burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* 30, 777-790.

🍷 **Bijondi D., Cianci P., Geraci C et Ruberto G., (1993):** " Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants ", *Flavour and fragrance journal*, Vol 8, pp 331-377.

🍷 **BILLERBECK G, (2002).** Les contaminations biologiques des biens culturels : Essai d'utilisation d'huile essentielle en traitement de l'aire. Ed : Elsevier.357-365

🍷 **Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983).** Infections caused by Pseudomonas aeruginosa. *Rev Infect Dis* 5, 279-313.

🍷 **Botineau M. (2010):** Partie 5 : Eu-dicotylédones moyennes ou rosides in *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Edition TEC & DOC. Lavoisier, Paris. pp. 722-729.

🍷 **Boullard B. (2001):** Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. Edition ESTEM. Paris.pp. 172-173.

🍷 **Branski, L. K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M. G., Sanford, A. P. & Herndon, D. N. (2009).** Emerging Infections in Burns. *Surg Infect (Larchmt)* 10, 389-397.

🍷 **Breche P., Gaillard J. and Simonet M. (1988).** Collection de la biologie à la clinique. *Bactériologie“ Bactéries des infections humaines”* Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 267-277.

- 🍷 **Brucher, H., (1989):** Useful plants of neotropical origine:and their wild relatives. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, ISBN-13:97803871433, page:296.
- 🍷 **BRUN Y. ET BES M. (1990) :** Méthodes diagnostiques des Staphylocoques coagulase négatifs Med. Mal. Inf. hors série Mars : 16-23.
- 🍷 **Bureau of National Affairs (1988).** Environmental group considering challenge to EPA position on cancer risk from lin uron. Chem. Ref (ul. Rep. 12, 774-800).
- 🍷 **Burrows, George E.; Tyrl, Ronald J. (2013):** Toxic Plants of North America. Oxford: Wiley-Blackwell; 389–391.
- 🍷 **Burt S., (2004):** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: areview, International Journal of Food Microbiology, p.223-253.
- 🍷 by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Med Microbiol **49**: 115-119.
- 🍷 **C. Lilet ; J Bourdon ; B Toma ; N Marchal et C. Balbastre (1983) ;** Bactériologie médicale et vétérinaire- systématique bactérienne ; Edition DOIN. PP 150-190.
- 🍷 **Caili F., Huan S., Quanhong L. (2006) :** A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. Plant Foods *Hum Nutr.* 61(2) PP: 73-80.
- 🍷 **Caili F., Huan S.et Quanhong L.(2006) :**A review on pharmacological activities and
- 🍷 **Calvet R, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, Charnay MP et Coquet Y. (2005) :** Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. Ed. France Agricole Editions, France. 637p.
- 🍷 **Carbin B.E., Larsson B., Lindahl O., (1990):** Treatment of benign prostatic hyperplasia with phytosterols, Br. J. Urol. 66, 6, 639-41.
- 🍷 **Carek, P. J., Dickerson, L. M. & Sack, J. L. (2001).** Diagnosis and management of osteomyelitis. Am Fam Physician 63, 2413-20.
- 🍷 CA-SFM. 2013. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>
- 🍷 **Castilho GC, Aparecida MM, Kimura M (2007):** Kinetics of osmotic dehydration and air-drying of pumpkins (*Cucurbita moschata*). Journal of Food Engineering. 82 (3): 284–291.
- 🍷 **Chiali FZ (2013) :** Effets métaboliques d'un régime à base de purée de pomme de terre contaminée par les pesticides chez le rat wistar. Thèse doctorat Physiologie et Biochimie de la Nutrition. Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 205p.
- 🍷 **Chigwe CB, Saka VW. Zim. J. Agric. Res. (1994)** Collection and Characterization of Malawi Pumpkin Germplasm 32(2):139-149.
- 🍷 **Chung K.I, Lim T.H, Koh Y, Song J.H, KimW.S, Choi J, Mand Aush Y.H. (1992):** Nosocomial pneumonialin medico-surgical intensive care unit. J Korean Med Sci **7**:241-251.
- 🍷 **Chung K.T., Lu Z., Chou M.W. (1998):** Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food Chem Toxicol, 36:1053–60.
- 🍷 **CISSE H.A., (2006) :** Evaluation du rôle de *Staphylococcus aureus* dans les infections bactériennes invasives à partir des liquides biologiques examinés au laboratoire de l'hôpital Gabriel Touré, Thèse Pharm, N° 06-M-84, Bamako (Mali).
- 🍷 **Cohen PR. (2007):** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. In J Dermatol; 46:1–11. doi:10.1111/j.1365-4632.2007.03215.x.
- 🍷 **Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y.(2003):** Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-

susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*;36:53–9. doi:10.1086/345476.

- 🍷 **Council of Europe, (1992):** Documents. Ed. Council of Europe, Germany. 208p.
- 🍷 **Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010):** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–39. doi: 10.1038/nrmicro2265.
- 🍷 **Cruz1, C.D. Meurer1, E.J. Silva1, C. Schaefer1, A.R.S. Santos2, A. Bella Cruz1, and V. Cechinel Filho1.(2006) :** Toxicity Evaluation of Cucurbita maxima Seed Extract in Mice, Vol. 44, No. 4, pp. 301–303.
- 🍷 **Cunningham R, Cockayne A, (1996):** Humphreys H. Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. *J Med Microbiol*; 44:157–64.
- 🍷 **D'ARGENIO DA., GALLAGHER LA., BERG CA., MANOIL C., DROSOPHILA .(2001):**as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol*; 183 : 1466-71.
- 🍷 **Das S. et Banerjee S. (2015) :** Production of pumpkin powder and its utilization in bakery products development: a review. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 4: 478-481.
- 🍷 **Das, R. (2010):** Potentiative Activity Of *Cucurbita Maxima* Seed Extract With *Beta Vulgaris* & *Smilax Regalii* Root Extract To Reduce Extra Fats From The Body. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*; 1:57-62.
- 🍷 **DELARRAS C.(2007) :Microbiologie** pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.Lavoisier, Paris .P476.
- 🍷 **Deleage E, (2013) :** Agricultures à l'épreuve de la modernisation. Ed. Editions Quae, Paris. 95p.
- 🍷 **Denis F., Ploy M-C., Martin C., et al.(2007) :** Bactériologie médicale. 2èmeEdition. Ellipses. Paris.573p.
- 🍷 **Duraffourd C., Dhervicourt L. et Laparaz J.C., 1990,** Examen de laboratoire galémique, Eléments thérapeutiques synergiques, T.1.2ème édition, Masson, Paris, p.10
- 🍷 **Durante M., Lenucci M. S. et Mita G. (2014):** Supercritical Carbon Dioxide Extraction of arotenoids from Pumpkin (*Cucurbita spp.*). *International Journal of Molecular Sciences*, 15:6725-6740.
- 🍷 Edition TEC et DOC. Lavoisier. Chapitre 2. P: 28-31.
- 🍷 **EFSA SCIENTIFIC REPORT, (2006):** Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance metribuzin. *EFSA Scientific Report*. Vol. (88): 1-74.
- 🍷 **El Masri SA (2015).** Effect of pumpkin oil and vitamin e on lead induced testicular toxicity in male rats. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(1): Page : 72-77.
- 🍷 **El-Adawy TA., Taha KM. (2001).** Characteristics and Composition of Water melon, Pumpkin, and Paprika Seed Oils and Flours. *J Agri Food Chem*. Vol 49(3) : 1253-1259.
- 🍷 **El-Adawy TA., Taha KM. (2001):** Characteristics and Composition of Water melon, Pumpkin, and Paprika Seed Oils and Flours. *J Agri Food Chem*. Vol 49(3) : 1253-1259.
- 🍷 entérobactéries d'actualité. *Press .Med.*, 42: 68-75.
- 🍷 **Essawi T and Srour M.(2000):** Screening of some palestnian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*;70:343 – 349.

- 🍌 **Eykin SJ. (1996):** Staphylococci. In: DJ Weatherall, JG Ledingham eds. Oxford text book of medicine. Oxford medical publications. 533-542.
- 🍌 **Fasquelle R. (1974) :** Eléments de bactériologie médicale 9ème édition. Flammarion, Paris. 27-36.
- 🍌 **Fauchere J.L. and Avril J.L. (2002).** Bactériologie générale et médicale. ellipses, Paris. 213-217.
- 🍌 **Fedha M. S., Mwasaru M. A., Njoroge C. K., Ojijo N. O. et Ouma G. O. (2010).** Effect of drying on selected proximate composition of fresh and processed fruits and seeds of two pumpkin species. Agriculture and Biology Journal of North America, 1(6): 1299-1302.
- 🍌 **Figueredo, A. J. (2000).** Commentary on chapters 10–14: Genetic influences on sexuality, marriage, and reproduction. In J. L. Rodgers, D. C. Rowe, & W. B. Miller (Eds.), Genetic influences on human fertility and sexuality: Theoretical and empirical contributions from the biological and behavioral sciences (pp. 317–323). Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers
- 🍌 **Filbrandt et Katelyn R. (2012):** Effect of Pumpkin Seed Oil Cake on the Textural and
- 🍌 **FLANDROIS J-P.(1997) :** Bactériologie médicale. Presse universitaire de Lyon, Lyon. P207.
- 🍌 **FLAUDROIS JP.(2004) :** Bactériologie /croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médicale DCEM1UFR Médecine Lyon Sud-Laboratoire de biométrie.P :1-3-10.
- 🍌 **Freedman B., (1995):** Environmental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Other Stresses. Ed. Academic Press, America. 606p.
- 🍌 **Freney J, R. F., Hansen W, and Bollet TC. (2000):** Précis de bactériologie clinique.
- 🍌 **Fruhworth G.O. et Hermetter A. (2007):** Seeds and oil of the styrian Oil pumpkin: components and biological activities. European Journal of Lipid Science and Technology, 109:1128-1140.
- 🍌 **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. et Rasooli I.,**
- 🍌 **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. et Rasooli I.,**
- 🍌 **Gemrot F., Barouh N., Vieu JP., Pioch D., Montet D. (2006):** Effect of roasting on tocopherols of gourd seeds (*Cucurbita pepo*). *Grasas y aceites*. Vol 57(4): 409-414.
- 🍌 **Gessard, C. (1984):** Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. *Rev. Infect Dis.* 6 Suppl 3: 775-776.
- 🍌 **Ghedira K. et Goetz P. (2013) :** *Cucurbita pepo* L. (Cucurbitaceae) : Graine de courge ou citrouille. *Phytothérapie*, 11: 46-51.
- 🍌 **Gilbert O. Fruhwirth Albin Hermetter,(2007) :** Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin:Components and biological activities *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109.1128–1140.
- 🍌 **GIORDANI R., HADEF Y., KALOUSTIAN J. 2008.** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* ,79 : pp199-203.
- 🍌 **Gohari Ardabili1. A., Farhoosh. R., and Haddad Khodaparast. M. H (2011):** Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaca*)Grown in Iran ; *J. Agr. Sci. Tech.* (2011) Vol. 13: 1053-1063
- 🍌 **Gohari, Ardabili, A., Farhoosh, R., Haddad, Khodaparast, M., H., (2011).** Chemical composition and physicochemical properties of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*, Subsp. *pepo* *Styriaca*) grown in Iranian *Journal of Agriculture and Science Technology*, 13, 1053-163.

- 🍷 **Gordon, D. M., and A. Cowling. (2003):** The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*. 149 (12):3575-3586.
- 🍷 **Gouali M., Xavier Weill F., 2013.** Les *Escherichia coli* entérohémorragiques: des
- 🍷 **Hadbaoui Z. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de Sorgho et de Mil de Ain Saleh. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en chimie. Université kasdi merbah- Ouargla. Algerie.
- 🍷 **Haidara A. O., (1996) :** Valorisation d'une huile de végétale tropicale : L'Huile de Pourghère. *Mémoire, Sherbrooke, Canada*. P 47-61.
- 🍷 **HELLAL Z., (2011) :** Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. pp1-8-45-78.
- 🍷 **Hennequin C., Forestier C. (2007)** Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology* 158(2007) 339-347.
- 🍷 **Hill LR. (1981):** Taxonomy of the staphylococci. *The staphylococci*. Aberdeen University Press.
- 🍷 **Hill, R. N., Erdeich. L. S. Paynter, O. E., Roberts. P. A., Rosenthal, S. L., and Wilkinson, C. F. (1989):** Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fund.am. Appl. Toxicol.* 12, 629-697.
- 🍷 **Hirsch KS, Adams ER, Hoffman DG, Markham JK, Owen NV. (1986):** Studies to elucidate the mechanism of fenarimol-induced infertility in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986; 86(3):391-9.
- 🍷 **Hodge, H. C., Downs. W. L., Smith, D. W., Maynard, E. A., Clayton, J. W., Jr., and Pease, H. L. (1968):** Oral toxicity of flinuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea) in rats and dogs. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 6, 171 - 183.
- 🍷 **Hogardt, M. & Heesemann, J. (2010).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300, 557-562.
- 🍷 **Hussain Dar, SA Sofi, Shafiya rafiq. (2017):** Pumpkin the functional and therapeutic ingredient: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition* ISSN: 2455-4898 ; Volume 2; Issue 6; November 2017; Page No. 165-170
- 🍷 **Hutton Mark G and. Robinson R.W.(2014):** "Gene List for *Cucurbita* spp.". Retrieved, 16 November 2014.
- 🍷 **ISO 16654:2001.** Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.
- 🍷 **ISO;** International Standard Organisation, 279, 1981.
- 🍷 **Issop L, Rone MB, and Papadopoulos V (2013):** Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis. *Mol Cell Endocrinol* 371(1-2):34-46.
- 🍷 **Jesse Uneke C., (2007):** Integrated Pest Management for Developing Countries: A Systemic Overview. Ed. Nova Publishers, New York. 203p.
- 🍷 **Johnson AP. (2011):** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J Antimicrob Chemother*;66 Suppl 4:iv43-8. doi:10.1093/jac/dkr076.
- 🍷 **Joly B., Reynaud A., (2002).** Entérobactéries: systématique et méthodes de diagnostic.

- 🍷 **Kariuki S, Corkill J.E, Revathi G, Musoke R, Hart A, Keynan Y, Rubinstein E.** (2007): The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. International journal of Antimicrobiol Agents **6**: 2474-2479
- 🍷 **Kern Benaibout M. (2006)**: *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme: Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'Homme par la contamination de l'environnement. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse 7ENVV.
- 🍷 **King, L. A., E. Loukiadis, P. Mariani-Kurkdjian, S. Haeghebaert, F. X. Weill, C. Balie, S. Ganet, M. Gouali, V. Vaillant, N. Pihier, H. Callon, R. (2014)**: Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* 150 O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical Microbiology and Infection*. 20 (12):O1136-1144.
- 🍷 **Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R, et al.(2006)**: Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*;42:389–91. doi:10.1086/499367.
- 🍷 **KLOOS W. E. AND LAMBE JR. D. W. (1981)**: *Staphylococcus* In manual of clinical microbiology, 4th ed Am. Soc. For Microbiology : 222-235.
- 🍷 **KLOOS W. E.; AND BANNERMAN T. L.(1994)**: Update on clinical significance of coagulase negative *Staphylococci* J. Clin. Microbiol-Rev, 7 (1): 117-140.
- 🍷 **KONE Koumba DIALLO, (2010)** : Frequence d'isolement des klebsiella au laboratoire de bacteriologie cvd du chu gabriel toure de 2002 à 2007 p24-25.
- 🍷 **Kopp BJ, Nix DE, Armstrong EP.(2004)**: Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Ann Pharmacother*;38:1377–82. doi:10.1345/aph.1E028.
- 🍷 **KOVATS, E. SZ. (1965)**. in "Advances in Chromatography ",1,229-247.
- 🍷 **Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., (2002)**: Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*, 113:71S–88S.
- 🍷 **Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y,(2007)** : *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*;315:1130–3. doi:10.1126/science.1137165.
- 🍷 **Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM.(1999)**: Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev*;12:224–42.
- 🍷 **Lambright, C., Ostby, J., Bobseine, K., Wilson, V., Hotchkiss, A.K., Mann, P.C., Gray Jr., L.E., (2000)**: Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol. Sci.* 56, 389–399.
- 🍷 **Le Loir Y, Baron F, Gautier M.(2003)**: *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res GMR*; 2:63–76.
- 🍷 **Le Minor L. and Veron M. (1990)**. Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*» J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.
- 🍷 **Le Minor, Michel Veron,(1989)** : Bactériologie Médicale 2ème Edition Paris, 396-795p.

- 🍷 **Lehotay, S.J. (2002)** J. AOAC Int. 85, 1177–1180
- 🍷 **LEPERLIER C. PARIS I. M. ; DESMETTES J. F. (1996)** : Résistance bactérienne L'objectif médical.
- 🍷 **Levario-carillo M, Amato D, Ostrosky-wefman P, Gonzales-horta C, Corona Y, Sanin LH, (2004)**: Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. Chemosphere. Vol. (55): 1421-1427.
- 🍷 **Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. (2009)**. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev 22, 582-610.
- 🍷 **Lowy F. (1998)**. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. **339**: 520–532.
- 🍷 **Lowy F.D. (2003)**. Antimicrobiol resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. **111**: 1265-1273
- 🍷 **Lyon BR, Skurray R. (1987)**: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol Rev;51:88–134.
- 🍷 **Marija Srbinoska¹, Nataša Hrabovski², Vesna Rafajlovska³, (2011)**: characterization of the seed and seed extracts of the pumpkins *cucurbita maxima* d. and *cucurbita pepo* l. from macedonia macedonian journal of chemistry and chemical engineering, vol. **31**, no. 1, pp. 65–78 (2012).
- 🍷 **Matsuo K, Huang X, Hirose K, Wakai K, Ito H, Xiang J, Takezaki T, Tajima K. (2004)**: Comparison of Lifestyle Risk Factors by Family History for Gastric, Breast, Lung and Colorectal Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*. Vol 5(4): 419-427
- 🍷 **Mayachiew P. & Devahastin S., (2008)**: Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. Food Science and Technology 41; pp. 1153-1159.
- 🍷 **McFarland JE, Burnside OC, Lebaron H. M., (2011)**: The Triazine Herbicides. Ed. Elsevier, Hungary. 600p.
- 🍷 **McMahon T. F., (1993)**: Metribuzin: Review of Toxicology Data Submitted under FIFRA section 6(a) (2) by the Registrant. Ed. United States Environmental Protection Agency, Washington. 30p.
- 🍷 **MELET I. ET BENCHABANE N., (1997)**. Contribution a l'extraction et l'étude de l'huile essentielle d'eucalyptus ; *Thèse d'ingénieur d'état*; Univ. Médéa
- 🍷 **MESAROS N., P NORDMANN., P PLESIAT., M ROUSSEL-DELVALLEZ., J (2007)**. *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutique à l'aube du deuxième millénaire. ANTIBIOTIQUES. P.189-198.
- 🍷 **Metcalf L D, Schmitz AA, Pelka JR, (1966)**: Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem.,1966 (38): 514-515.
- 🍷 **Michel-Briand Y (1986)** : Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques. Macrolides. Masson, Paris, 205-209
- 🍷 **Minchella A, Molinari L, Alonso S, Bouziges N, Sotto A, Lavigne J-P. (2010)**. évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006. Pathologie Biologie. 58 : 1-6.
- 🍷 **Mitra, P., Ramaswamy S. H., Chang S.K. (2009)**: Pumpkin (*Cucurbita maximus*) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil. Journal of food engineering; 95:208-213.

- 🍷 **Mohamed BenAlia (2016)**: Thèse de doctorat. Etude de la fraction lipidique de quelques graines de cucurbitacées. Université Kasi Merbah, Ouargla, soutenue en Octobre 2016.
- 🍷 **Monaco TJ, Weller SC, Ashton FM. 2002** Weed Science: Principles and Practices. Ed: 4. John Wiley & Sons, Canada. 688p.
- 🍷 **Morgan J. (2001)**: Evidence On The Developmental And Reproductive Toxicity Of Metribuzin. Ed. DRAFT, California. 65p.
- 🍷 **Mr Sid Ahmed REBIAHI,(2012)** : Caracterisation de souches de *Staphylococcus aureus* et etude de Leur antibioresistance au niveau du Centre hospitalo-universitaire de Tlemcen p4
- 🍷 **Muhammad Adnan.A, Sidra Gul , Sidra Batool, Bibi Fatima,et al.,(2017)**:The Journal of Phytopharmacology ; 6(2): 133-139.
- 🍷 **Mythili Md Mythili Md., Siddha .K. Md. (2017)** : Vue d'ensemble sur Cucurbita Maxima Seed Revue IOSR des sciences dentaires et médicales (IOSR-JDMS) E-ISSN: 2279-0853, p-ISSN: 2279-0861. Volume 16, Issue 3 Ver. XIII PP 29- 33
- 🍷 **Nair R, Kalariya T and Chanda S. Antibacterial (2005)**: activity of some selected Indian medicinal flora. Turk J Biol.; 29:41 – 47.
- 🍷 **Nakic S., Rade D., Skevin D., Strucelj D., Mokrovcak Z. et Bartolic M. (2006)**: Chemical characteristics of oils from naked and husk seeds of Cucurbita pepo L. European Journal of Lipid Science and Technology. 108: 963-943.
- 🍷 **Napier T. (2009)**: Pumpkin production. Primefact for Profitable and sustainable primary industries, 964: 1-8.
- 🍷 **Nauciel C. (2000)** : Bctériologie médicale. P 55-64 .Ed Masson.
- 🍷 **NIKAIDO D., S HARAYAMA.(1991)**: Identification and caractérisation of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. The journal of biological chemistry P770-779.
- 🍷 **Nkang, A, Omokaro, D, Egbe, A, Amanke, G. (2004)**: Variations in fatty acid proportions during desiccation of Telfairia occidentalis seeds harvested at physiological and agronomic maturity. African Journal of Biotechnology; 2(2): 33- 39.
- 🍷 nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. SHEA 216.
- 🍷 **NOVICK R. P. (1990)**: Staphylococci in Microbiology, 4th ed: 539-560.
- 🍷 **Novick RP, Subedi A.(2007)**: The SaPIs: mobile pathogenicity islands of Staphylococcus. Chem Immunol Allergy;93:42–57. doi:10.1159/0000100857.
- 🍷 **Obiakor-Okeke P. N., Oly-Alawuba N. (2014)**: Evaluation of tannin, phytate and mineral composition of different indigenous dishes based on pumpkin (*Cucurbita pepo*). International Journal of Nutrition and Food Sciences, 3(6): 493-496.
- 🍷 **OECD., (1999)** : Indicateurs environnementaux pour l'agriculture Concepts et cadre d'analyse Volume 1: Concepts et cadre d'analyse. Ed. OECD Publishing, France. 52p.
- 🍷 officinalis essential oils, Food Chem., p: 898-904.
- 🍷 **Okada, M. Ed. Newly Revised, (2002)**: Illustrated Medicinal Plants of World; Hokuryukan Publishing Co., Ltd.: Tokyo, Japan, , p. 514.
- 🍷 **Oussou, K.R., Kanko, C., G. N., Yolou, S., K, G., Dosso, M., Guessan (2004)**. « Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. C. R. Chimie. 7 1081 -1086 »
- 🍷 **PAGES J M. (2004)** : Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. Médecine/Sciences P.51-346.

- 🍷 **Paolini J. (2005)** :Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE ET IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux astéracée endémiques de corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*, Thèse de doctorat, Université de Corse, p.26, 38.
- 🍷 **Paynter, O. E., Burin, G. J., J aeger, R . B., and Gregario, C. A . (1988)**: Goitrogens and thyroid follicular cell neoplasia. Evidence for a threshold process. Regul. Toxicol. Pharmacol. 8, 1 02- 1 1 9.
- 🍷 **Pelletier E, Campbell PGC, Denizeau F, (2004)** : Écotoxicologie Moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement. Ed. PUQ, Canada. 502p.
- 🍷 **Petersen G, Rasmussen D, et al. (2007)**: Study on enhancing the endocrine Disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals, DHI: 252.
- 🍷 **Pier, G. B. and R. Ramphal, Eds. (2005)**: *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone Inc.
- 🍷 **Pimentel D., (2002)**: Encyclopedia of Pest Management. Ed. CRC Press, France. 931p.
- 🍷 **Podschun R, Fischer A, Ullman U. 2000**. Expression of putative virulence factors
- 🍷 **Pohanish R. P., (2012)**: Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens. Volume 1. Ed: 6. Elsevier, USA. 3040p.
- 🍷 **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. et Roura S.I., (2003)**, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, Lebensm.-Wiss.u.- Technol.36, p.679-684.
- 🍷 **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. et Roura S.I., 2003**, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, Lebensm.-Wiss.u.- Technol.36, p.679-684.
- 🍷 **Ponka R., Bouba A.A., Fokou L., Tambe S.T., Beaucher E., Piot M., Leonil J. et Gaucheron F. (2015)** :Protein, mineral and amino acid content of some Cameroonian traditional dishes prepared from pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.).Journal of Food Composition and Analysis, 43: 169–174.
- 🍷 **Prescott L.M, Harley J.P, Klein D.(2010)** : Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université 2010.
- 🍷 **Rahme, L., Stevens, E., Wolfort, S., Shao, J., Tompkins, R., Ausubel, F.M.; 1995**. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science. 268: 1899-1902.
- 🍷 **Rakcejeva T., Galoburda R., Cude L. et Strautniece E. (2011)**: Use of dried pumpkins in wheat bread production. Procedia Food Science, 1: 441-447.
- 🍷 **Ravishankar.K. GVN. Kiranmayi, GV. Appa Reddy, VVL. Sowjanya, V. (2012)** : preliminary phytochemical screening and In-vitro antibacterial activity of cucurbita Maxima seed extract IJRPC 2012, 2(1)
- 🍷 **Richa bajpai, Nidhi Jain AK Pathak,(2012)**: Journal of applied pharmaceutical science 02(08); 92-95.
- 🍷 **RICHARD Cl. et GRIMONT F.(1992)** : Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia, In : LE MINOR (L). Bactériologie médicale, Paris : Flammarion, 1992 427-31p.
- 🍷 **Rosenthal, V. D., Udawadia, F. E., Muñoz, H. J., Erben, N., Higuera, F., Abidi, K., Medeiros, E. A., Fernández Maldonado, E., Kanj, S. S., Gikas, A., Barnett, A. G. (2011)**.

Time-dependent analysis of extra length of stay and mortality due to ventilator-associated pneumonia in intensive-care units of ten limited-resources countries: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *Epidemiol Infect* 15, 1-7.

🍷 **SADOFF J C., M S ARTENSTEIN. (1974):** The outer cell-wall membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *The journal of infectious diseases* P81-93.

🍷 **Sahly H, Ancken H, Benedi V.J, Forestier C, Fussing V, Hansen D.S, Ofek I, Podshun R. (2004):** Impairment of Respiratory Burst in polymorphonuclear Leukocytes by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 20-26.

🍷 **Santos V.R., Gomes R.T., Oliveira R.R., Cortes M.E., Brandao M.G.L.(2009):** Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimao). *Int J Dent*, 8:1–5.

🍷 **Sarvesh Dhar Dubey (2012):** Overview On Cucurbita Maxima. *International Journal of Phytopharmacy*. Vol. 2 (3), pp.68-71, May-Jun 2012.

🍷 **Schilcher J, Koeppen V, Ranstam J, Skripitz R, Michaëlsson K, Aspenberg P. (2013):** Atypical femoral fractures are a separate entity, characterized by highly specific radiographic features. A comparison of 59 cases and 218 controls. *Bone*;52(1):389–92.[PubMed]

🍷 **Sensory Properties of White Wheat Bread.** MS Food & Nutritional Sciences .American Psychological Association, 6ème Edition.

🍷 **Seo, J.S., Burrib, B.J., Quana, Z., Neidlinger, T.R., 2005.** Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *J. Chromatogr. A* 1073, 371–375.

🍷 **SKANDAMIS P.N. ET NYCHAS G.J.E., (2001).** Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres; *J. Applied Microbiol*; Vol.91: 1011-1022.

🍷 **Smati, M., O. Clermont, A. Bleibtreu, F. Fourreau, A. David, A.-S. Daubie, C. Hignard, O. Loison, B. Picard., (2015):** Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *MicrobiologyOpen*. 4 (4):604-615.

🍷 **Soetan K.O., Oyekunle M.A., Aiyelaagbe O.O., Fafunso M.A. ,(2006).** Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Afr J Biotechnol*, 5:2405–7

🍷 **SOULEY LIE MOUSTAPHA F S. (2002) :** Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G .Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P95.

🍷 **Spicer W.J. (2003) :** Pratique clinique en bactériologie mycologie et parasitologie Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 28-29.

🍷 **Storgaard L, Bonde JP, and Olsen J (2006):** Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure: A review of published epidemiological studies. *Repro Toxicol* 21(1):4-15.

🍷 **Sumathi Ethiraj and Janarthanam Balasundaram(2016):** Phytochemical and Biological Activity of Cucurbita Seed Extract National Centre for Nanosciences & Nanotechnology, University of Madras,Guindy Campus, Chennai – 600 025, Tamil Nadu, India.

- 🍂 **Taylor, SL, Eller, FJ, Jackson, MA et Stevenson, DG.(2006):** Pressurized fluid extraction of pumpkin seed and pumpkin seed pressed cake. New crops and processing technology, Pittsburgh Conference, pp: 1220– 1225.
- 🍂 **Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010):** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 207–217
- 🍂 **Tsai, YS, Tong, Y, Cheng, J, Lee, C. (2006):** Pumpkin seed oil and phytosterol-F can block testosterone/prazosin-induced prostate growth in rats. *Urologia Internationalis*;77(3): 269-274.
- 🍂 utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition.* 73-80.Chait J.
- 🍂 **Van Den Dool H., Kratz P.D., (1963):** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.*, 1963, 11, 463-471.
- 🍂 **Vincent C, Panneton B, Fleurat-Lessard F., (2000) :** La lutte physique en phytoprotection. Ed. Editions Quae, Paris. 347p.
- 🍂 **Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. (2005):** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*;5(12):751–62.
- 🍂 **Whitaker, T.W. and G.N. Davis (1962),** Cucurbits: Botany, Cultivation, and Utilization. Interscience Publishers, New York. 250 pp.
- 🍂 **Wilson VS, Lambright CR, Furr JR, Howdeshell KL, and Earl GLJ (2009):** The herbicide linuron reduces testosterone production from the fetal rat testis during both in utero and in vitro exposures. *Toxicol Lett* 186(2):73-77. doi:10.1016/j.toxlet.2008.12.017.
- 🍂 **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.(2004):** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*; 39:309–17. Doi: 10.1086/421946.
- 🍂 **Wolf C Jr, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J, Gray LE Jr.(1999):** Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health*; 15 (1-2):94-118
- 🍂 **Xavier, D. E., Picaõ, R. C., Girardello, R., Fehlberg, L. C. & Gales, A. C. (2010).** Efflux pumps expression and its association with porin downregulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol* 10, 217–223.
- 🍂 **YETERIAN E.(2010) :** Base moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université Strasbourg Thèse de doctorat p.11.
- 🍂 **Younis, YMH, Ghirmay, S, Al-Shihry, SS. (2000):** African *Cucurbita pepo*L: Properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry*; 54:71–75.
- 🍂 **Yousfi M (2005).** Caractérisation de molécules lipidiques et phénoliques de pistachier de l'Atlas "*Pistacia atlantica*". Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en chimie. Université Saad Dahleb- Blida. Algérie.

- 🍷 **Yousfi M, Bombarda I, Hamia C, Djeridane A, Stocker P and Gaydou E (2009).** Fatty acid, triglyceride and tocopherol composition of Algerian Argan (*Argania spinosa*) fruit seed lipids. *Mediterr J Nutr Metab.* Vol 2:197–203.
- 🍷 **ZAIKA, L. L. (1988):** "Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination" *Journal of Food Safety*, pp97-118.
- 🍷 **Zdunić , Nebojša R. Menković , Milka B. Jadranin , Miroslav M. (2015):** Phenolic compounds and carotenoids in pumpkin fruit and related traditional products *SCIENTIFIC PAPER UDC 635.621:664:54 Hem. Ind.* 70 (4) 429–433.
- 🍷 **Zhang, Y. E.; Parsons, C. M., (1994):** Effects of overprocessing on the nutritional quality of sunflower meal. *Poult. Sci.*, 73 (3): 436-442.
- 🍷 **Zhou T., Kong Q., Huang J., Dai R. et Li Q. (2007):** Characterization of nutritional components and utilization of pumpkin. *Food global science books.* 1(2): 313-321.

2. Sitographie :

- 🌐 <http://www.microbeedu.org/.../imgburk/gram3.jpg>
- 🌐 <http://www.visoflora.com>
- 🌐 <http://tr.123rf.com>
- 🌐 <http://yoan-sourisse.fr>
- 🌐 <http://www.gettyimages.fr/photos/klebsiella-pneumoniae.sort>
- 🌐 http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9e/Klebsiella_pneumoniae_01.png.



Annexe : 01

Antalgique : ou **analgésiques** sont des médicaments utilisés en médecine dans le traitement de la douleur.

Antihypertenseurs : **Hypotenseurs** sont une classe de médicaments qui sont administrés pour réduire l'hypertension artérielle.

Cultivar : Variété de plante obtenue en culture, généralement par sélection, pour ses caractéristiques réputées uniques

Diurétique : substance qui entraîne une augmentation de la sécrétion urinaire

Gastrite : Maladie inflammatoire de la paroi de l'estomac.

Hypertension artérielle : (HTA) est une pathologie cardiovasculaire définie par une pression artérielle trop élevée (augmentation anormale de la pression du sang sur la paroi des artères).

Hypoglycémiant : Substance qui provoque l'hypoglycémie, qui abaisse le taux de glucose contenu dans le sang

Immunomodulateur : Substance qui modifie le déroulement des réactions immunitaires.

Ostéoporose : Maladie généralisée du squelette caractérisée par une diminution de leur Densité Minérale Osseuse qui entraîne des modifications de l'organisation structurelle de l'os et augmente sa fragilité

Ténicide : Médicament qui détruit le ténia.

Vermifuges : médicament antiparasitaire qui permet d'éradiquer les parasites gastrointestinaux de son hôte.

Antibiotique : substance chimique qui tue les bactéries ou inhibe leur croissance en intervenant dans les processus de transcription ou traduction.

CMI : concentration minimal inhibitrice, c'est la concentration la plus petite d'un antibiotique qui empêche les bactéries de se multiplier.

Annexe : 02

Composition chimique des milieux de culture utilisés.

Gélose nutritive : pH= 7.2

❖ extrait de viande de boeuf	01g
❖ extrait de levure	02g
❖ peptone	05g
❖ chlorure de sodium	05g
❖ agar	15g

Milieu citrate de SIMMONS

❖ sulfate de magnésium	0.2g
❖ milieu urée indole	01g
❖ milieu mannitol mobilité	01g

Milieu mannitol mobilité pH =7.6-7.8

❖ Peptone trypsine de viande	20g
❖ Agar	04g
❖ Nitrate de potassium	01g
❖ Rouge de phénol à 1%	04ml

Hektoen pH= 7.6

❖ Proteose peptone	12g
❖ Extrait de levure	03g
❖ Chlorure de sodium	05g
❖ Thiosulfate de sodium	05g
❖ Sels biliaires	09g
❖ Citrate de fer ammoniacal	1.5g
❖ Salicine	02g
❖ lactose	02g
❖ Saccharose	12g
❖ Fuschine acide	0.1g
❖ Bleu de bromothymol	05mg
❖ Gélose	13g

Milieu de Mueller- Hinton:

❖ Infusion de viande de bœuf	300g
❖ Hydrolysate de caséine	17,5g
❖ Amidon	1,5g
❖ Gélose	17,5g
❖ pH final	7,4 g
❖ Peptone	10,0 g

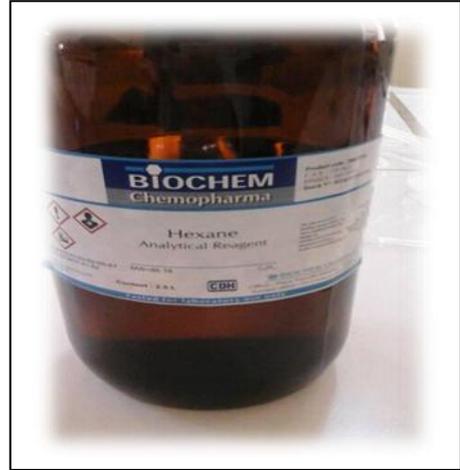
Milieu de chapman :

❖ Extrait de viande de bœuf	1,0 g
❖ Chlorure de sodium	75,0 g
❖ Mannitol	10,0 g
❖ Rouge de phénol	0,025 g
❖ Agar-Agar	15,0 g
❖ Eau distillée	qsp 1 Litre
❖ pH = 7,4	

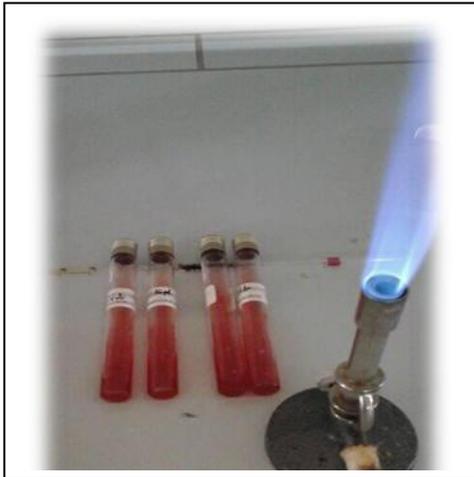
Annexe : 03



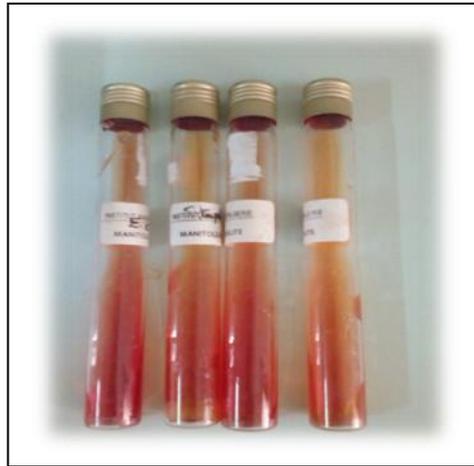
**Broyeur à mortier type 4in1 juicer /blender ;
SJB-309**



Solvant organique (hexane)



Test du mannitol de mobilité



Test de la catalase



Préparation des dilutions