

EDITIONS **SARAHMED**

***CURRENT ALGERIAN  
RESEARCH TOPICS  
IN MICROBIOLOGY***



**SARAHMED Editions**  
Route de Trgua Ouzemmour, Bejaia, Algérie

**978-9931-9910-1-4**  
**Octobre 2022**



## TABLE DES MATIERES

<b>BOUKHALFA S, BENAMMAR S, KOUDA S, MEZOUARY, ADDOUDA A, BOUZIANE F, BENMEHIDI F.</b> CARACTERISATION MOLECULAIRE DES RESISTANCES AUX CARBAPENEMES CHEZ LES ENTEROBACTERIES ISOLEES AU CHU DE BATNA, ANNEE 2021.	1 - 5
<b>SOUNA D, GRIBI H, SEBAIHIA M.</b> RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF GRAM-NEGATIVE BACILLI ISOLATES FROM THE CHLEF COMMUNITY.	6 - 14
<b>KARA TERKI I, HASSAINE H, KARA TERKI A, BELLIFA S.</b> EFFET DE CERTAINS DESINFECTANTS ET ANTIBIOTIQUES SUR LE BIOFILM A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES DE DISPOSITIFS MEDICAUX AU CHU DE SIDI BEL ABBES.	15 - 22
<b>KIOUANI A, AZZAG N, TENNAH S, GHALMI F.</b> REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR BABESIOSE CANINE.	23 - 30
<b>MACHOU F, AOUED L, KHAASSANI D.</b> EFFET DU TRAITEMENT PARODONTAL SUR LA COMPOSITION DE LA FLORE BUCCALE CHEZ L'ENFANT.	31 - 36
<b>AZZOUNI I, RABAH A, HENAOUI L.</b> ISOLEMENT DES ESPECES <i>CANDIDA</i> CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE STOMATITE PROTHETIQUE.	37 - 43
<b>ZATLA I, BOUBLENZ A L.</b> COVID-19 PANDEMIC: A SURVEY STUDY ANALYSIS,	44 - 49
<b>BENAMARA RN, BENAMARA N, BENAÏSSA FZ, BENKRAMA K, BENFRÉHA-BENYELLES M.</b> STUDY OF THE QUALITY ASSURANCE AND TRACEABILITY OF KEBAB MARKETED IN MASCARA.	50 - 59
<b>BENBELKHIR FZ, BENABDALLAH N, MESSAOUDI O.</b> ISOLATION AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MYXOBACTERIA FROM ALGERIAN SOIL.	60 - 66
<b>MAOUGAL RT, KECHID M, DJEKOUN A.</b> SELECTION DE BACTERIES PGPR POUR AMELIORER ET AUGMENTER LA PRODUCTIVITE DE LA FEVE.	67 - 75
<b>BOUOUDEN FZ, AKROUM S.</b> UTILISATION DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>NIGELLA SATIVA</i> POUR INHIBER LES DERMATOPHYTES.	76 - 82
<b>FETNI S, BERTELLA N.</b> VALORISATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE CERTAINES ESPECES VEGETALES SAHARIENNES SUD-EST ALGERIEN	83 - 92
<b>MOUALEK I, BARIZ K, SEBBAN H, MSELA A, HOUALI K.</b> ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE QUELQUES EXTRAITS AQUEUX DE PLANTES MEDICINALES	93 - 97
<b>DJAABOUB S, GOURI S, ABDELAZIZ S, FELLAH K.</b> PHYTOCHEMICAL SCREENING AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> FOX BEHATAM OF TAMANRASSET PROVINCE OF SOUTH ALGERIA	98 - 106
<b>ZIRI S, REGUIEG K, ABDI Y, MADANI N.</b> ESSAI IN VITRO DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>THYMUS VULGARIS</i> ET DE L'EXTRAIT DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i> VIS-A-VIS D' <i>ERWINIA AMYLOVORA</i> AGENT CAUSAL DU FEU BACTERIEN DU POIRIER ET <i>PSEUDOMONAS SAVASTANOI</i> AGENT CAUSAL DE TUBERCULOSE DE L'OLIVIER.	107 - 112
<b>TERBECHE R, GHARBI, RAHLI F, KHALFA A, BERREBBAH ALIOUA A.</b> EFFET DE QUELQUES SUBSTANCES BIOLOGIQUES SUR QUELQUES SOUCHES BACTERIENNES ET FONGIQUES.	112 - 120



# CARACTERISATION MOLECULAIRE DES RESISTANCES AUX CARBAPENEMES CHEZ LES ENTEROBACTERIES ISOLEES AU CHU DE BATNA, ANNEE 2021

Sana BOUKHALFA<sup>1\*</sup>, Sonia BENAMMAR<sup>1</sup>, Sarah KOUDA<sup>1</sup>, Younes MEZOUAR<sup>1</sup>, Abir ADDOUDA<sup>1</sup>, Faiza BOUZIANE<sup>1</sup>, Messaoud BENMEHIDI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie, CHU Batna, Université Batna 2, Algérie.

\*auteur correspondant: [Sboukhalfa@yahoo.fr](mailto:Sboukhalfa@yahoo.fr).

## RESUME

**Introduction :** L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence des EPC isolées au laboratoire de bactériologie du CHU de Batna et de réaliser la caractérisation moléculaire de ces souches.

**Matériel et méthodes :** Il s'agit d'une étude descriptive et prospective, menée au sein du laboratoire de microbiologie du CHU de Batna, durant une période de 8 mois allant du 1er décembre 2020 au 31 juillet 2021. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon les recommandations de CLSI 2020. L'étude moléculaire a permis la recherche des gènes codant pour les différentes carbapénémases (OXA-48, NDM, VIM, IMP) par l'utilisation de la PCR en point final.

**Résultats et Discussion :** Notre étude a montré que, sur un total de 475 souches d'entérobactéries, 13 sont productrices de carbapénémase soit une prévalence globale de 2,74%. Parmi les 13 souches testées, six étaient porteuses du gène OXA-48, cinq étaient porteuses du gène NDM, aucune souche n'était positive aux gènes VIM et IMP et deux souches étaient négatives aux quatre gènes testés.

Seule l'approche moléculaire apportera la certitude diagnostique de présence de carbapénémase chez les isolats cliniques d'entérobactéries.

**Conclusion :** A la lumière de ces résultats, il paraît nécessaire de renforcer les mesures de prévention de la diffusion des bactéries hautement résistantes (BHRe) dans les différentes unités de soins hospitaliers.

**Mots clés :** Entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC), OXA-48, NDM, BHRe.

## 1. INTRODUCTION

Les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) émergent actuellement au niveau mondial et constituent un problème majeur de santé publique avec une morbi-mortalité et des coûts élevés.<sup>1-2</sup> Les objectifs de cette étude étaient de:

- Evaluer la prévalence de résistance aux  $\beta$ -lactamines par production de carbapénémases chez les différentes souches d'entérobactéries isolées au laboratoire de bactériologie du CHU de Batna à partir des différents prélèvements à visée diagnostique.
- Réaliser la caractérisation moléculaire des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases isolées au CHU Batna par l'utilisation de la PCR en point final.

## 2. MATERIEL ET METHODES

L'étude est descriptive et prospective, menée au sein du laboratoire de microbiologie du CHU de Batna, durant une période de 8 mois allant du 1<sup>er</sup> décembre 2020 au 31 juillet 2021.

Les souches bactériennes étudiées sont les souches d'entérobactéries isolées des différents prélèvements à visée diagnostic parvenus au laboratoire de bactériologie CHU Batna durant la période d'étude et provenant des patients hospitalisés ou consultant à titre externe.

Les souches d'entérobactéries présentant une diminution de la sensibilité aux carbapénèmes au test de diffusion sur milieu gélosé (antibiogramme) étaient incluses dans l'étude. Les souches isolées d'un même malade au niveau du même site anatomique et dont le profil de sensibilité est identique ont été considérées comme doublons et ont été exclues.

L'isolement et l'identification des souches bactériennes ont été réalisés selon les méthodes conventionnelles. Le choix des antibiotiques et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux des recommandations du (CLSI 2020). L'algorithme phénotypique du CLSI 2020 a permis un premier

criblage des EPC)<sup>3</sup>. Le test immunochromatographique de détection des carbapénémases OXA-48, NDM, KPC, IMP, VIM (Coris BioConcept) a été réalisé et a été confronté aux résultats de l'étude moléculaire. Les gènes codant pour les carbapénémases (*blaOXA-48*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP*) ont été caractérisés par PCR en point final. Après extraction de l'ADN total, l'identification des gènes a été réalisée en utilisant des couples d'amorces spécifiques.

### 3. RESULTATS

Sur un total de 475 souches d'entérobactéries isolées, 13 étaient résistantes aux carbapénémases soit une prévalence globale de 2,74%, dont sept souches de *Klebsiella pneumoniae*, quatre souches d'*Escherichia coli*, un *Enterobacter cloacae* et un *Citrobacter freundii*. La moitié des souches provenaient des services de chirurgie (Tableau 1).

L'étude moléculaire a permis de caractériser 11 souches d'EPC sur les 13 testées avec six souches porteuses du gène *blaOXA-48* (quatre *Klebsiella pneumoniae* et deux *Escherichia coli*), cinq souches porteuses du gène *blaNDM* (trois *Klebsiella pneumoniae*, un *Enterobacter cloacae* et un *Citrobacter freundii*), aucune souche n'était positive aux gènes *blaVIM* et *blaIMP*, aucune souche n'a présenté les deux gènes *blaOXA-48* et *blaNDM* à la fois et deux souches étaient négatives aux quatre gènes testés (Figure 1).

Les résultats du test immunochromatographique de détection des carbapénémases (Coris BioConcept) concordent avec les résultats de la PCR.

### 4. DISCUSSION

A l'échelle régionale, plusieurs études ont signalé l'émergence des EPC surtout au niveau du pourtour méditerranéen (Israël, Grèce, Tunisie, Maroc, France)<sup>4-7</sup>. En Algérie, Bien que la diffusion des EPC soit encore limitée, leur émergence et leur rapidité de diffusion est alarmante.

Sur un total de 475 souches d'entérobactéries isolées entre décembre 2020 et juillet 2021, 13 souches ont présenté une sensibilité diminuée aux carbapénèmes, ce qui correspond à une prévalence de 2,74%. Ce taux est équivalent à celui rapporté par une étude réalisée en 2017 dans le même laboratoire (2,88%)<sup>8</sup> et reste inférieur à celui rapporté par une étude menée à Marrakech réalisée en 2019 (5%)<sup>9</sup> et à l'ouest algérien en 2017<sup>10</sup>.

Notre étude montre bien que *Klebsiella pneumoniae* est le germe le plus isolé au CHU de Batna avec sept souches (7/13) sur l'ensemble des EPC, suivi d'*Escherichia coli* avec quatre souches (4/13) puis d'*Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* (avec une seule souche pour chaque espèce bactérienne). La plupart des études dans la littérature rapporte que *Klebsiella pneumoniae* est le germe le plus isolé sur l'ensemble des EPC, l'*Escherichia coli* occupe le 2<sup>ème</sup> rang et l'*Enterobacter cloacae* partage la 3<sup>ème</sup> position<sup>9-15</sup>.

Selon la nature du prélèvement, notre étude montre une prédominance des EPC au niveau des pus ; parmi 277 prélèvements, neuf contenaient des EPC avec une prévalence de 2,45%, suivie par les urines 1,8% (deux sur 111 contenaient des EPC), de ce fait les services de chirurgies du CHU de Batna sont les plus pourvoyeurs de ces bactéries hautement résistantes. Selon une étude menée en Belgique, les prélèvements de dépistage démontraient un pourcentage de 88% d'EPC à partir des frottis rectaux, suivi des urines avec un pourcentage de 3,36%. Dans les prélèvements à visée diagnostique, 61% des souches d'EPC provenaient des urines, suivi par les prélèvements respiratoires (20%)<sup>9</sup>. Selon une autre étude menée chez des patients hospitalisés dans le service de réanimation des brûlés entre janvier 2017 et juin 2017 en Tunisie, toutes les EPC ont été isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique; prélèvements cutanés (17), de cathéters (14), d'hémocultures (10), de prélèvements respiratoires (4) et d'ECBU (2)<sup>16</sup>.

La réaction de la PCR en temps final nous a permis de caractériser 11 souches d'entérobactéries comme porteuses des gènes codant pour des carbapénémases sur les 13 souches testées. Nous avons identifié le gène *blaOXA-48* chez six isolats, avec une prédominance de *Klebsiella pneumoniae* (n = 4) qui reflète la forte prévalence de *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 au pourtour méditerranéen. Le gène *blaNDM* a été caractérisé chez cinq isolats. Une étude réalisée au Maroc a détecté les gènes codant pour



des carbapénémases *bla*NDM, *bla*VIM et *bla*OXA-48 avec les taux d'isolement suivants: 35%, 35% et 30% respectivement<sup>17</sup>. Comme le montre notre étude, malgré le faible nombre de souches EPC détectées, le gène *bla*NDM est en train de prendre de la place dans notre pays à côté du gène OXA-48. Deux souches d'entérobactéries étaient négatives à l'étude moléculaire; d'autres mécanismes moléculaires sont probablement en cause (Autres gènes codant pour des carbapénémases, hyperproduction de la céphalosporinase, imperméabilité, mécanismes d'efflux et modification des protéines liant la Pénicilline). Selon notre étude, aucune souche n'a présenté les deux gènes *bla*OXA-48 et *bla*NDM à la fois. Une étude réalisée au Maroc a identifié deux gènes chez trois souches bactériennes et trois gènes chez une souche bactérienne, l'acquisition de plusieurs gènes peut procurer à la souche un haut niveau de résistance vis-à-vis d'un antibiotique donné, des cas semblables ont été rapporté par la littérature<sup>17</sup>.

Les résultats du test immunochromatographique de détection des carbapénémases (Coris BioConcept) concordaient avec les résultats de la PCR.

## 5. CONCLUSION

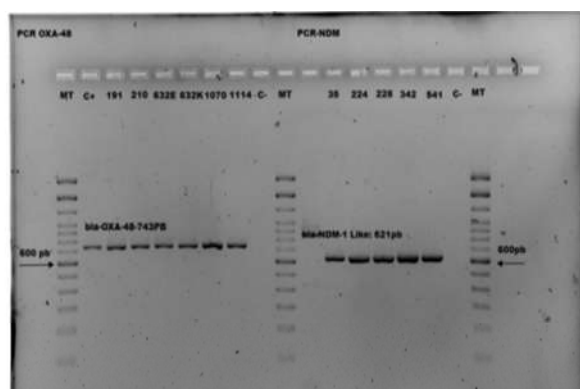
Nous avons entrepris cette étude dans le cadre de la surveillance de la résistance des entérobactéries aux carbapénèmes au CHU Batna. La prévalence d'isolement des EPC était de 2,74% durant la période d'étude. Les entérobactéries productrices de carbapénémases représentent une nouvelle menace pour la santé publique. Ces souches nécessitent d'être rapidement et efficacement détectées afin de prendre au plus vite les mesures préventives et thérapeutiques appropriées vis à vis des patients qui les hébergent. Dans notre étude, les services de chirurgies étaient les plus pourvoyeurs d'EPC. Ce constat implique une application plus poussée des mesures d'hygiène et l'utilisation raisonnée des antibiotiques.

Dans notre étude, on a identifié les gènes *bla*OXA-48 et *bla*NDM chez 11 souches parmi les 13 isolées. Une caractérisation moléculaire ciblant d'autres gènes ou mécanismes de résistance aux carbapénèmes s'avère intéressante pour compléter le diagnostic des EPC isolées au CHU Batna. Ainsi, le nombre limité des souches testées ne nous permettaient pas de définir une épidémiologie moléculaire locale des EPC. Dans le futur, la spectrométrie de masse, technique en plein essor en bactériologie, pourrait permettre la détection rapide et à moindre coût de ces enzymes.

## RÉFÉRENCES

1. Nordmann P. Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems. *Medicine/Sciences*. 2010; 26(11):950-959. doi:10.1051/medsci/20102611950.
2. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791-1798. doi:10.3201/eid1710.110655.
3. Rahal K et al. Standardisation de L'Antibiogramme à L'Echelle Nationale, 8ème Edition 2020.
4. Zerouali K, Chems M, Yaqini K. Entérobactéries productrices de carbapénémases. Published online 2017.
5. Ali A, Salabi E, Chouchani C. Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacteria in Tunisia : History of Thirteen Years of Challenge. Published online 2020.
6. Goren MG, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid-encoded OXA-48 carbapenemase in *Escherichia coli* from Israel. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):672-673. doi:10.1093/jac/dkq467.
7. Les entérobactéries productrices de carbapénémases : étude prospective. Diplôme DU, Published online 2013.
8. Benammar S, Benmehidi M, Courcol R, et al. Résistance des entérobactéries aux carbapénèmes dans notre établissement (2014–2016). *Médecine Mal Infect*. 2017;47(4):S29. doi:10.1016/j.medmal.2017.03.069.
9. Tidrarine S. Epidémiologie des entérobactéries multirésistantes productrices de carbapénémase à l'HIT. Thèse de Doctorat en Médecine. Faculté de Médecine et de pharmacie Marrakech. Published online 2019.

10. Larouci M, Benbounegab Z, Touati A. Prévalence des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases isolées des infections communautaires et nosocomiales dans l'ouest algérien. Diplôme de Master. Université A. MIRA-Bejaia. Published online 2017.
11. Bourafa N, Chaalal W, Bakour S, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates in Algeria. *Infection and Drug Resistance* 2018;11 735–742.
12. Dortet L, Gauthier L, Naas T. Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase. Note technique. CNR résistance aux antibiotiques. Published online 2018:1-35.
13. Jans B, Catry B, Glupczynski Y. Surveillance microbiologique et épidémiologique des Entérobactéries productrices de carbapénèmases en Belgique. Published online 2012.
14. Holman A. Étude épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénémase à La Réunion de 2010 à 2015. *Médecine humaine et pathologie*. 2016. dumas-01452602.
15. Dziri O, Alonso CA, Dziri R, et al. Metallo- $\beta$ -lactamases and class D carbapenemases in south-east Tunisia: Implication of mobile genetic elements in their dissemination. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52(6):871-877. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.06.002.
16. Maamar B, Messadi AA, Thabet L. Profil Moléculaire Et Résistance Aux Antibiotiques. 2019; XXXII(September):203-209.
17. Sakalli HEB, Touhami KO, Katfy K, Zerouali K, Belabbes H. Apport de l'algorithme d'EUCAST dans le criblage des carbapénèmase: Expérience du laboratoire de microbiologie au CHU Ibn Rochd Casablanca. *Int J Innov Appl Stud*. 2019; 25(4):1290-1296.



**Figure 1: Caractérisation moléculaire par PCR des gènes *blaOXA-48* et *blaNDM* chez les entérobactéries isolées au CHU Batna, Algérie (2021)**

**Tableau 1: Présentation des différentes souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, N= 13.**

Numéro	Date d'isolement	Espèce bactérienne	Service d'origine	Nature du prélèvement
1070	19/12/2020	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Chirurgie homme	Pus
1114	01/01/2021	<i>Escherichia coli</i>	Chirurgie femme	Pus
24	07/01/2021	<i>Escherichia coli</i>	Médecine interne femme	Pus
35	11/01/2021	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pédiatrie	Pus
191	09/03/2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Réa-médicale	Prélèvement distal protégé
210	14/03/2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Chirurgie femme	Pus
228	18/03/2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brûlés	Pus
224	26/03/2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ambulatoire	Urine
388	02/05/2021	<i>Escherichia coli</i>	Chirurgie femme	Liquide gastrique
342	08/06/2021	<i>Citrobacter freundii</i>	Néphrologie	Urine
541	17/06/2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brûlés	Pus
632	25/07/2021	<i>Escherichia coli</i>	Orthopédie traumatologie	Pus
632	25/07/2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orthopédie traumatologie	Pus

# RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF GRAM-NEGATIVE BACILLI ISOLATES FROM THE CHLEF COMMUNITY

Djahida SOUNA<sup>1,2\*</sup>, Hayet GRIBI<sup>3</sup>, Mohammed SEBAIHIA<sup>1,2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Hassiba Benbouali of Chlef, 66GR+4W3, N19, Ouled Fares, Chlef, Algeria

2. Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics, Chlef, Algeria

3. Microbiology unit, El Wikaya medical laboratory, Chlef, Algeria

\* Corresponding author: [d.souna@univ-chlef.dz](mailto:d.souna@univ-chlef.dz)

## ABSTRACT

Antibiotic resistance has become a major public health problem in Algeria. Few studies have addressed this issue in the community. The present work was conducted to estimate the antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli (GNB) isolates from the Chlef community, between February and May 2018.

56 strains were isolated from 469 clinical specimens conducted in the hygiene laboratory of Chlef. 50 strains of *Enterobacteriaceae* were isolated, with predominance of *Serratia adorifera* and *Escherichia coli*. The non-fermenting GNB accounted for 1.27% frequency of isolation. Antibiogram assay showed that most of the isolates confirmed higher sensitivities rates for antibiotics. Imipenem remains the most active  $\beta$ -lactam molecule with total sensitivity. The analysis of resistance phenotypes to  $\beta$ -lactams of *Enterobacteriaceae* showed the predominance of wild type. One strain of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* exhibit the multiresistant phenotype. PCR analysis showed the *bla<sub>TEM</sub>* type was detected in two enterobacterial strains, whereas a single strain expresses the *bla<sub>SHV</sub>* gene. Only the *bla<sub>TEM</sub>* gene could be identified in the multiresistant strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Regular surveillance of antibiotic resistance in the Algerian population is essential to monitor the evolution of bacterial epidemiology and guide first-line treatments.

**Key words:** Gram negative bacilli; Chlef; Community; Resistance; Antibiotics

## 1. INTRODUCTION

Antibiotic resistance is currently a major topic of interest for researchers and physicians. In particular, the rise of multi-drug resistance in Gram-negative bacilli (GNB) is now a serious challenge encountered by healthcare professionals<sup>1</sup>.

Antibiotic resistance has become a major public health problem in Algeria. Indeed the past decade, we have seen a significant increase in resistance to antibiotics especially in Gram-negative bacilli<sup>2</sup>. Several studies addressing antibiotic resistance in Algerian hospitals settings have been conducted<sup>3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</sup>. However, very few studies have addressed this issue in the community. The present work was conducted to estimate the antimicrobial resistance of GNB isolates from the Chlef community.

## 2. MATERIALS AND METHODS

From February to May 2018, 56 non-duplicate GNB strains were isolated from samples includes urine, vaginal discharge and sputum, received in the Chlef Hygiene Laboratory, Algeria, for routinely control.

Total 469 clinical specimens were collected by microbiologist controlling from outpatient located in different geographic areas of Chlef wilaya. The 469 clinical specimens were collected from 469 different patients. All 469 clinical samples were initially screened on routine media such as Nutritive agar, Mac Conkey agar, BCP and blood agar for separation non fermenter and fermenter organisms.

The *Enterobacteriaceae* and non-fermentative Gram negative rods isolates were identified biochemically by using the API 20E and API 20NE system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) respectively.

Standard paper disks containing antibiotics used in Algeria (table 1) were laid on Mueller-Hinton medium (Pasteur institute, Algeria). The plates were incubated for 24 h at 37 °C and the diameter of inhibition zones was interpreted by referring to the reading table of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, and *Acinetobacter spp.* (Non-*Enterobacteriaceae*) recommended by the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology<sup>10</sup>. Total DNA was extracted by boiling as described previously<sup>11</sup>. *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>* were detected by PCR using specific primers (Table 2).

### 3. RESULTS

A total of 56 GNBs were obtained from 469 clinical specimens. Identification of these GNBs using conventional microbiological tests showed that *Enterobacteriaceae* represent 89.28% of the strains (n=50) and non-fermentative isolates represent 10.71% of the strains (n=6), including *Pseudomonas aeruginosa* (66.66%; n=4) and *Acinetobacter baumannii* (33.33%; n=2). The frequency of isolation of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* in community infections is 10.66%, 0.85 %, and 0.42 % respectively.

The analysis of the species identified concerning all the strains of enterobacteria isolated showed a predominance of *Serratia adorifera* and *Escherichia coli* (12 strains, 24% for each), followed by *Enterobacter cloacae* (07 strains, 14%), *Klebsiella oxytoca* (6 strains, 12%), *Klebsiella pneumoniae* (5 strains, 10%), *Proteus mirabilis* (3 strains, 6%), *Serratia marcescens* (2 strains, 4%), *Citrobacter freundii* (2 strains, 4%) and *Enterobacter aerogene* (1 strain, 2%).

*Enterobacteriaceae* strains isolated from the urine area were the most representative. All *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from the urine also. No GNB strains were isolated from sputum (Table 3).

Antimicrobial resistance patterns according to species are shown in figure 1 and Table 4. Antibiogram assay showed that most of the *Enterobacteriaceae* isolates confirmed decreased susceptibilities to ampicillin (88%), amoxicillin-clavulanate (92%), ticarcillin-clavulanate (56%), cephalothin (52%) and cephazolin (68%). However, the strains have lower levels of resistance to ceftazidime (24%) and cefotaxime (14%). The imipenem was found to be the most active  $\beta$ -lactams on the isolates. Other antibiotics tested (aminoglycosides, fluoroquinolones, and colistin) retain good activity.

Antibiogram results revealed, in addition, that most of the strains were susceptible to tobramycin (6%), gentamicin (6%), amikacin (10%), ciprofloxacin (22%), levofloxacin (12%) and colistin (2%).

In addition, resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics has been observed by several phenotypes, with the dominance of wild type (46%). This phenotype is more expressed in *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, and *Enterobacter aerogenes* (Table 4).

Our study shows that two *Pseudomonas aeruginosa* strains present resistance to piperacillin, ticarcillin-clavulanate and ceftazidime. Imipenem, tobramycin, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, levofloxacin, and colistin remain the most active antibiotics with 100% sensitive strains.

For *Acinetobacter baumannii*, one strain showed resistance to piperacillin, ticarcillin-clavulanate, ceftazidime, ciprofloxacin, and levofloxacin. Both strains tested were sensitive to imipenem, tobramycin, gentamicin, amikacin, and colistin.

The analysis of  $\beta$ -lactam resistance phenotypes showed that one strain of *Acinetobacter baumannii* and two strains of *Pseudomonas aeruginosa* exhibit the Hyper-produced cephalosporinase phenotype. However, one strain of *Acinetobacter baumannii* and two strains of *Pseudomonas aeruginosa* were wild types (Table 5).

Seven GNB isolates (four *Enterobacteriaceae*, two *Pseudomonas aeruginosa*, and one *Acinetobacter baumannii*) suspected to be multiresistant were subjected to a PCR assay for the detection of TEM and SHV encoding genes. Two *Enterobacteriaceae* isolates expressed a *bla<sub>TEM</sub>* enzyme. PCR experiments showed the presence of additional  $\beta$ -lactamases *bla<sub>SHV</sub>* enzyme at one strain.

Only the *bla<sub>TEM</sub>* was detected in all *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains tested. None of these clinical isolates produced *bla<sub>SHV</sub>* in this study.

#### 4. DISCUSSION

The increase and spread of multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria especially *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter* (E.P.A) species have become a major concern worldwide<sup>8</sup>. 56 strains of GNB were isolated from 469 clinical specimens. Members of the *Enterobacteriaceae* family (50 strains) were much more commonly isolated in these studies than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*. This high prevalence has been demonstrated by previous surveillance studies<sup>12, 13</sup>. Enterobacteria are Gram-negative bacilli found in the normal intestinal flora of humans and animals. Among these bacteria, identified human pathogens are responsible for various infections (urinary tract infections, septicemia, pneumonia, hepatogastric infections, and meningitis ...). Consequently, enterobacteria are the most common human pathogens isolated in a bacteriology laboratory, in community and hospital setting<sup>14</sup>. *Escherichia coli* and *Serratia adorifera* are among the commonest representatives of this family found with 24% for each. These isolates are often responsible for nosocomial infections but during the last 5 years, their dissemination in the community (*Escherichia coli*) has been increasingly reported<sup>15</sup>. On the other hand, the non-fermenting GNB accounted for a 1.27% frequency of isolation with 4 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and 2 strains of *Acinetobacter baumannii*. All of the work and results obtained have confirmed the theoretical data on the involvement of this species much more in nosocomial infections than community infections.

Urine specimens were the main isolation site for *Enterobacteriaceae* and non-fermenting GNB strains during the study. Urinary tract infection is a common pathology in daily practice, with a higher frequency (10.87%). The main bacterial species involved in this infection is *Escherichia coli* and represents 50 to 80% of the agents involved<sup>16, 17, 18</sup>.

Antibiotic resistance is a growing problem everywhere<sup>19</sup>. The study of the sensitivity to  $\beta$ -lactams showed high rates of acquired resistance for most molecules tested. Unfortunately, in both hospital and outpatient settings, the prescription of broad-spectrum antibiotics is often inappropriate or unnecessary<sup>20</sup>. Antibiogram assay showed that most of the isolates confirmed higher sensitivity rates for aminoglycosides, fluoroquinolones, and colistin antibiotics. The resistance rates determined in this study were similar to those found in other studies<sup>21, 22</sup>.

The use of carbapenems has been crucial for more than 30 years in preventing and treating infections caused by GNB-producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and AmpC  $\beta$ -lactamases<sup>23</sup>. In Algeria, carbapenem resistance has become a major concern for health services owing to a significant increase in resistance, especially in GNB<sup>2</sup>. Fortunately in our study, the imipenem was found to be the most active  $\beta$ -lactams on the GNB isolates with total sensitivity. Similar results were obtained in Algeria<sup>24</sup> and *Ivory Coast*<sup>25</sup>.

The analysis of resistance phenotypes to  $\beta$ -lactams of *Enterobacteriaceae* showed the predominance of wild type (46%). These results differ from the results of Piéboji<sup>26</sup> with a frequency of 17.9%. It's revealed also, no strain expressing the ESBL phenotype. The high-level penicillinase (PASE) phenotype is represented by 30% of isolated strains, which is consistent with the results of Piéboji<sup>26</sup> with 29.4%.

One strain of *Acinetobacter baumannii* and two strains of *Pseudomonas aeruginosa* exhibit the high-level cephalosporinase phenotype that may be due to mutations or gene acquisitions. This phenotype is frequently observed in non-fermenter GNB<sup>26</sup>.

PCR molecular analysis showed the *bla*<sub>TEM</sub> type was detected in two enterobacterial strains, whereas a single strain expresses the *bla*<sub>SHV</sub> gene. Sequencing of these two genes is necessary for the determination of exact variants. These two enzymes had already been detected in Algeria in several strains of enterobacteria. The "old"  $\beta$ -lactamases of the TEM or VHS family seem to decrease compared with CTX-M ESBLs<sup>27</sup>.

Only, the *bla*<sub>TEM</sub> gene could be identified in the strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. TEM-type  $\beta$ -lactamases have been described since the early 1980s with the identification of penicillinase TEM-1<sup>28</sup> and then the TEM-2 variant<sup>29</sup>. A broad range of penicillinases, including narrow-spectrum (TEM-1, TEM-2), and extended-spectrum (TEM-92, TEM-116) variants has

been identified primarily in *Acinetobacter baumannii*, but also among other *Acinetobacter* species<sup>30, 31, 32</sup>. This class of  $\beta$ -lactamase is generally considered to be less widespread in *Acinetobacter* compared to *Enterobacteriaceae* species.

In Algeria, this resistance gene was also detected with the *bla*<sub>TEM-1</sub> variant. Strains producing only *bla*<sub>TEM-1</sub> were resistant to all  $\beta$ -lactams except carbapenems<sup>33</sup>. Between 1992 and 1998, several strains of *Pseudomonas aeruginosa*-producing TEM were isolated in France: TEM-42, TEM-4, TEM-21, and TEM-24<sup>34, 35, 36, 37</sup>. Enzymatic resistance is related only to the production of an acquired  $\beta$ -lactamase of penicillinase type TEM-110 and TEM-1 in Oran<sup>6</sup> and TEM-110 in Tlemcen<sup>38</sup>.

## 5. CONCLUSION

The spread of GNB in the community setting re-emphasizes the need for rigorous surveillance and strict infection control measures to prevent further dissemination of this group to monitor the evolution of bacterial epidemiology and guide first-line treatments.

In this study, the good sensitivity to  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, and colistin antibiotics suggests the use of these antibiotics with or without combination as a first-line probabilistic treatment for GNB infections. While imipenem and colistin can be used for targeted treatment of multidrug-resistant GNB.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank all the staff of the Faculty of Science, University of Hassiba Ben BoualiChlef, for their financial contribution. We would also like to thank the members of the Elwikaya laboratory in Chlef, Algeria.

## REFERENCES

1. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant gram-negative bacteria. *GMS Hyg. Infect. Control.* 2017; 12 (05). doi: 10.3205/dgkh000290
2. Baba Ahmed-KaziTani Z, Arlet G. News of antibiotic resistance among Gram negative bacilli in Algeria. *PatholBiol (Paris)* 2014; 62 (3): 169-178
3. Souna D, Drissi D, Almahmoud I, Maurin M. *Enterobacter cloacae* Complex and CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in Algeria. *Microb Drug Resist.* 2022; 28(3): 346-354. doi: 10.1089/mdr.2020.0535.
4. Boudjemaa H, Allem R, Fonkou D M, Zouagui S Khennouchi NCE, Kerkoud M, Rolain JM. Molecular drivers of emerging multidrug resistance in *Proteus mirabilis* clinical isolates from Algeria. *Journal of Global AntimicrobialResistance* 2019 ; 18: 249-256. doi: 10.1016/j.jgar.2019.01.030.
5. Ayad A, Drissi M, Curraize C, Dupont C, Hartmann A, Solanas S, Siebor E, Amoureux L, Neuwirth C. Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Producing *Escherichia coli* in Algerian Hospitals. *Front Microbiol.* 2016; 7:1409.
6. Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain JM. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist.* 2014 ; 20(2):156-61. doi: 10.1089/mdr.2013.0161.
7. Souna D, Amir AS, Bekhoucha SN, Berrazeg M, Drissi M. Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2  $\beta$ -lactamases in *Enterobacter cloacae* strains isolated in patients and their hospital environment in the west. *Medecine et maladies infectieuses.* 2014; 44 (4), 146-152
8. Berrazeg M, Drissi M, Medjahed L, Rolain JM. Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Journal of MedicalMicrobiology.* 2013; 62(6):864-874

9. Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekhoucha S, Rolain JM . Prevalence of carbapenemase encoding genes including New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013; 17(9): 739-43
10. CA-SFM. 2018. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>.
11. Szabo D, Bonomo RA, Silveira F, William Pasculle A, Baxter C, Linden PK, et al. SHV-type extended-spectrum ( $\beta$ -lactamase production is associated with reduced cefepime susceptibility in *Enterobacter cloacae*). *J Clin Microbiol*. 2005; 43(10):5058–64.
12. Bourafa N, Chaalal N, Bakour S, Lalaoui R, Boutefnouchet N, Diene SM, Rolain JM. Molecular characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates in Algeria. *Infect Drug Resist*. 2018; 11: 735–742.
13. Grosso A, Famiglietti A, Luna CM. Community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacteria. *Community aquir infect*. 2015; 2(4): 117-122
14. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Epidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénémases. *Feuillets de Biologie*. 2013; 312
15. Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 340–344
16. Farrell DJ, Morissey I, De Rubeis D. 2003. A UK multicentre study and the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. *J Infect*. 2003; 46(2): 94–100.
17. Zhanel GG, Hisanaga TL, Laing NM, DeCorby MR, Nichol KA, Weshnoweski B, Johnson J, Noreddin A, Low DE, Karlowsky JA; NAUTICA Group, Hoban DJ. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27(6): 468-75.
18. Bouzenoune F, Boudersa F, Bensaad A, Harkat F, Siad N. Urinary tract infections in Ain M'lila (Algeria). Antibiotic resistance of 239 strains isolated between 2006 and 2007. *Med Mal Infect*. 2009; 39(2): 142-3. doi: 10.1016/j.medmal.2008.11.008.
19. Ahmed SH., Daef EA., Badary MS., Mahmoud MA., Abd-Elsayed AA. Nosocomial blood stream infection in intensive care units at Assiut University Hospitals (Upper Egypt) with special reference to extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing organisms. *BMC. Res. Notes*. 2009; 6 (76).
20. Fanelli U, Chine' V, Pappalardo M, Gismondi P, Esposito S. Improving the Quality of Hospital Antibiotic Use: Impact on Multidrug-Resistant Bacterial Infections in Children. *Front. Pharmacol*. 2020; 11:745. doi: 10.3389/fphar.2020.00745.
21. Zhanel G, Hisanaga TL, Laing NM, DeCorby MR, Nichol KA, Palatnik LP, Johnson J, Noreddin A, Harding GKM, Nicolle LE, Hoban DJ, NAUTICA Group. Antibiotic resistance in outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 26(5): 380-388. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.08.003.
22. Akhavadegan H, Hosamirudsari H, Pirroti H, Akbarpour S. Antibiotic resistance: a comparison between inpatient and outpatient uropathogens. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2021; 27 (2): 124-130.
23. Cantôn R, Akôva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18: 413–31
24. Sekhri-Arafa N, Smati F, Scheftel JM, Meunier O. Marqueurs épidémiologiques de souches de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* isolées au CHU de Constantine (ALGERIE). *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*. 2010; 4(1): 82-98.
25. Guessennnd N, Bremont S, Gbonon V, Kacou- N'Douba A, Ekaza E, Lambert T, Dosso M, Courvalin P. Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie*. 2008; 56: 439-446.



26. Piéboji JG, Koulla-Shiro S, Ngassam P, Adiogo D, Njine T, Ndumbe P. Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolates from inpatients and outpatients at Yaounde Central Hospital, Cameroon. *Int J Infect Dis.* 2004; 8(3): 147-54. doi: 10.1016/j.ijid.2004.01.001.
27. Giraud-Morin C, Fosse T. Évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005–2007). *Pathologie Biologie.* 2008; 56: 417-423.
28. Goldstein FW, Labigne-Roussel A, Gerbaud G, Carlier C, Collatz E, Courvalin P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid.* 1983; 10:138-47.
29. Devaud M, Kayser FH, Bachi B. Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982; 22: 323-9.
30. Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernards AT, Nemec A, Towner KJ. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter spp.* in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect.* 2005 ; 11:329-32.
31. Park YK, Choi JY, Jung SI, Park KH, Lee H, Jung DS, Heo ST, Kim SW, Chang HH, Cheong HS . Two distinct clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 64(4): 389-395.
32. Endimiani A, Luzzaro F, Migliavacca R, Mantengoli E, Hujer AM, Hujer KM, Pagani L, Bonomo RA, Rossolini GM, Toniolo A. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended spectrum betalactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 2211-4.
33. Ramoul A, Hammami S, Dekhil M, Aimiri S, Slim A, Boutiba-Ben Boubaker I. Phenotypic and genotypic characterization of clinical multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* from Algerian intensive care units. *African Journal of Microbiology Research.* 2013; 7(10): 868-874
34. Mugnier P, Dubrous P, Casin I. A TEM-derived extended spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2488-2493.
35. Poirel L, Ronco E, Naas T. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 1999; 5: 651-652.
36. Marchandin H, Jean-Pierre H. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 213-216.
37. Dubois V, Arpin C, Noury P. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a *bla*<sub>(TEM-21)</sub> gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 3624-3626.
38. Drissi M, Baba Ahmed Z, Dehecq B. Antibiotic susceptibility and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: first report in Algeria. *Med Mal Infect.* 2008; 38: 187-191.

**Table 1: The antimicrobial agents used for the *Enterobacteriaceae* and the Non-*Enterobacteriaceae* isolates**

<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Non-Enterobacteriaceae</i>
Ampicillin	Ticarcillin/clavulanic acid
Amoxicillin/clavulanic acid	Ceftazidime
Ticarcillin/clavulanic acid	Piperacillin
Cephalothin	Imipenem
Cefazolin	Gentamicin
Cefoxitine	Tobramycin
Cefotaxime	Ciprofloxacin
Imipenem	Levofloxacin
Gentamicin	Colistin
Tobramycin	
Amikacin	
Ciprofloxacin	
Levofloxacin	
Colistin	

**Table 2: Primers used for amplification of *bla<sub>TEM5</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>***

Target genes	Primer	Sequence	Amplicon size (bp)
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM-F	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCGTG-3'	840
	TEM-R	5'-TTACCAATGCTTAATCAGTGAG-3'	
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV-F	5'-TTTATGGCGTTACCTTTGACC-3'	1051
	SHV-R	5'-ATTTGTCGCTTCTTTACTCG-3'	

**Table 3: Distribution of strains depending on the type of sample**

Samples	<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>P. aeruginosa</i> <sup>a</sup>		<i>A. baumannii</i> <sup>b</sup>		Total
	S.N. <sup>c</sup>	F.I. <sup>d</sup>	S.N.	F.I.	S.N.	F.I.	
Urine	47	47/435 (10.80%)	4	4/435 (0.91%)	1	1/435 (0.23%)	52/435 (11.95%)
Vaginal discharge	3	3/29 (10.34%)	0	0/29 (0%)	1	1/29 (3.45%)	4/29 (13.79%)
Sputum	0	0/5 (0%)	0	0/5 (0%)	0	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Total	50	50/469 (10.66%)	4	4/469 (0.85%)	2	2/469 (0.43%)	56/469 (11.94%)

<sup>a</sup>*Pseudomonas aeruginosa*

<sup>b</sup>*Acinetobacter baumannii*

<sup>c</sup> Strains number

<sup>d</sup> Frequency of isolation

**Table 4: Phenotypes to  $\beta$ -lactams characterization of *Enterobacteriaceae* strains according to species**

Species	Wild-type		High level penicillinase		Penicillinae resistant inhibitors		High level cephalosporinase		Total	
	Count	Percentage	Count	Percentage	Count	Percentage	Count	Percentage	Count	Percentage
<i>Escherichia coli</i>	3	25%	7	58.33%	2	16.66%	0	0%	12	24%
<i>Serratia odorifira</i>	6	50%	4	33.33%	0	0%	2	16.66%	12	24%
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	85.71	0	0%	0	0%	1	14.28%	7	14%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0%	1	16.66%	5	83.33%	0	0%	6	12%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	20%	2	40%	1	20%	1	20%	5	10%
<i>Proteus mirabilis</i>	2	66.66	1	33.33	0	0%	0	0%	3	6%
<i>Serratia marcescens</i>	2	100%	0	0%	0	0%	0	0%	2	4%
<i>Citrobacter freundii</i>	2	100%	0	0%	0	0%	0	0%	2	4%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	1	2%
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>46%</b>	<b>15</b>	<b>30%</b>	<b>8</b>	<b>16%</b>	<b>4</b>	<b>8%</b>	<b>50</b>	<b>100%</b>

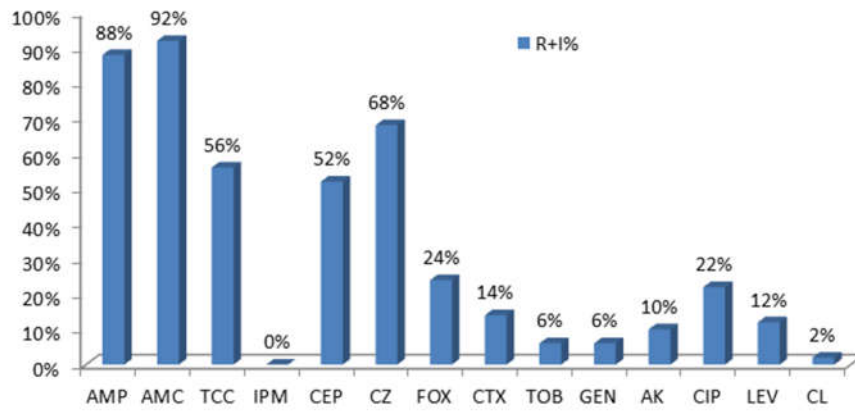
**Table 5: Antimicrobial resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii***

Strains	PIP	TCC	IPM	CAZ	TOB	GEN	AK	CIP	LEV	CL	Phenotypes
1- <i>P.a</i> <sup>a</sup>	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	High level cephalosporinase
2- <i>P.a</i> <sup>b</sup>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	High level cephalosporinase
3- <i>P.a</i> <sup>c</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Wild-type
4- <i>P.a</i> <sup>d</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Wild-type
1- <i>A.b</i> <sup>e</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Wild-type
2- <i>A.b</i> <sup>f</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	High level cephalosporinase

<sup>a, b, c, d</sup> *Pseudomonas aeruginosa* strains

<sup>e, f</sup> *Acinetobacter baumannii* strains

PIP: Piperacillin; TCC: Ticarcillin/clavulanic acid; CAZ: Ceftazidime; IMP: Imipenem; GEN: Gentamicin; TOB: Tobramycin; AK: Amikacin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; CL : Colistin



**Figure 1: Antibiotics resistance rate of *Enterobacteriaceae* strains**

R+I%: Resistant + intermediate strains; Ampicillin : AMP; Amoxicillin/clavulanic acid : AMC; Ticarcillin/clavulanic acid: TCC; Cephalothin: CEP; Cefazolin : CZ; Cefoxitin: FOX; Cefotaxim: CTX; Imipenem: IMP; Gentamicin: GEN; Tobramycin: TOB; Amikacin: AK; Ciprofloxacin: CIP; Levofloxacin: LEV; Colistin: CL

# EFFET DE CERTAINS DESINFECTANTS ET ANTIBIOTIQUES SUR LE BIOFILM A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLEES DE DISPOSITIFS MEDICAUX AU CHU DE SIDI BEL ABBES

Ibtissem KARA TERKI<sup>1,2,\*</sup>, Hafida HASSAINE<sup>1,3</sup>, Assia KARA TERKI<sup>3</sup>, Samia BELLIFA<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Food, Biomedical and Environmental Microbiology (LAMAABE),

<sup>2</sup>University of Djilali lyabes Sidi Bel Abbes

<sup>3</sup>University Abou Bekr Belkaid. Tlemcen

\*Auteur correspondant : [ibti.kara@yahoo.com](mailto:ibti.kara@yahoo.com)

## RESUME

**Introduction:** *staphylococcus aureus* est parmi les espèces les plus fréquemment isolée d'infections sur dispositifs médicaux. La capacité à produire un biofilm et une étape importante dans la pathogénèse de ces staphylocoques et dépendent fortement des conditions environnementales tels que les antibiotiques et les désinfectants.

**Méthode :** dans cette étude, 28 *staphylococcus aureus* isolés de dispositifs médicaux au centre hospitalo-universitaire de Sidi bel abbes (nord West de l'Algérie) ont été analysés pour détecter la formation de biofilm par culture sur le milieu rouge congo (RCA), la technique en tubes (TM), et la technique de culture sur microplaque (TCP) qui a aussi été utilisée pour étudier l'effet de la pénicilline, l'éthanol et la Bétadine sur le biofilm préformé.

**Résultats :** 19 souches produisent un slime bactérien sur le milieu rouge congo, 7 souches produisent un biofilm par la technique TM dont 2 sont fortement productrices et 9 produisent un biofilm sur les microplaques en polystyrène, ce nombre augmente en présence de pénicilline et éthanol avec 19 et 11 souches productrices de biofilm par contre aucune souche ne forme de biofilm en présence de Bétadine.

**Conclusion :** il est essentiel d'étudier la réponse des biofilms suite à une contrainte extérieure imposée tels que les désinfectants et les antibiotiques, afin d'orienter le développement de stratégies de lutte contre les biofilms mais aussi la maîtrise de leur formation.

**Mots Clés :** *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Antibiotiques, Désinfectants.

## 1. INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* est l'une des causes majeures des infections communautaires et nosocomiales. Ce germe est responsable des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité à adhérer sur les implants médicaux et à former un biofilm [1]. Le biofilm est reconnu comme la forme de développement majoritaire des bactéries dans la nature. Ce sont des communautés complexes de microorganismes, enchâssées dans une matrice auto-sécrétée de substances polymériques extracellulaires ou EPS [2]. Les biofilms se forment à la surface de la plupart des matériaux, qu'ils soient de nature biologique ou non. D'après le Center for Disease Control and Prevention (CDC), 65% des infections bactériennes sont dues à la présence des biofilms. En outre, les infections associées aux biofilms constituent un problème majeur en clinique et sont la cause de l'augmentation de la mortalité et du coût de traitement [3], [4].

La mise en place des biofilms dépend fortement des conditions environnementales dans lesquelles ils sont formés, c'est-à-dire des différents paramètres auxquels ils sont soumis. Tout changement de l'un de ces paramètres est en général perçu comme un stress et peut déclencher une réponse particulière au sein d'un biofilm [5]. Il est par conséquent essentiel d'étudier la réponse des biofilms suite à une contrainte extérieure imposée tels que les désinfectants et les antibiotiques, afin d'orienter le développement de stratégies de lutte contre les biofilms mais aussi la maîtrise de leur formation.

Dans ce contexte plus particulièrement le but de notre étude est d'isoler les Staphylocoques à partir de dispositifs médicaux dans quelques services du CHU de Sidi Bel Abbes, d'évaluer la capacité des souches isolées à adhérer et à former un biofilm et d'étudier l'influence de quelques désinfectants et antibiotiques sur la formation de biofilms à staphylocoque.

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Souches bactériennes**

Les souches retenues dans cette étude ont été isolés de dispositifs médicaux obtenu des services de Réanimation, urologie et médecine interne du centre hospitalo- universitaire (CHU) de Sidi Bel Abbes ville qui se situes au Nord ouest de l'Algérie.

### **2.2. Identification**

L'analyse microbiologique, après ablation de dispositifs a été réalisée par la technique de « Brun-Buisson » [6] , consistant à rincer la lumière du cathéter par du sérum physiologique et à vortexer son extrémité intravasculaire avant la mise en culture sur un milieu gélosé Chapman qui permet la sélection des staphylocoques.

L'identification bactérienne a été réalisée par les méthodes conventionnelles : morphologie des colonies, coloration de Gram, production de catalase, test de coagulase et par le système API 20 STAPH (BioMérieux®).

### **2.3. Détection de la formation de biofilm**

#### **2.3.1. Méthode du rouge Congo agar (RCA)**

La caractérisation phénotypique de la production de biofilm a été réalisée par culture des isolats staphylococciques sur le milieu RCA. Cette technique proposée par *Freeman et al.*, [7] requiert l'utilisation d'un milieu solide composé de BHIB (37 gms/L), saccharose (50 gms/L), agar no.1 (10 gms/L) et rouge congo (0.8 gms/L). Le Rouge Congo a été préparé séparément des autres constituants du milieu en solution aqueuse concentrée et autoclave à 121°C pendant 15 minutes, et a ensuite été ajouté lorsque l'agar-agar a refroidi à 55 °C. Le milieu est ensuiteensemencé et incubé à 37° de 24h à 48h.

Le colorant rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides, formant des complexes colorés ainsi les souches productrices de slime produisent des colonies noires sur milieu CRA et les souches non productrices des colonies rouges.

#### **2.3.2. Méthode en tube**

C'est une technique décrite en 1982 par *Christensen et al.*, [8] qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm. A partir d'une culture jeune de 24h, une colonie estensemencée dans 10mL de bouillon BHIB supplémenté de 2% de saccharose. Après incubation à 37°C pendant 24h les tubes sont lavés avec du PBS (pH 7,3) puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré avec du cristal violet (0,1%) pendant 5 minutes. Une fois le colorant supprimé, les tubes sont lavés avec de l'eau distillée et laissés sécher. La formation du biofilm est considérée positive quand un film visible double la paroi et le fond du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm .

#### **2.3.3. Méthode de Plaque de culture de tissus (TCP)**

La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits a été réalisée selon les recommandations de Christensen et al. Avec des modifications dans la durée d'incubation qui a été prolongé à 48h. Après culture des souches bactériennes dans le milieu BHIB et une incubation de 18h à 37° On effectue une dilution au 1/100 avec du milieu (BHIB) frais et on remplit les puits d'une plaque à 96 puits avec 0.2ml de cette dilution et on l'incube à 37°. Les puits des microplaques sont ensuite lavés 3 fois avec de l'eau distillée, séché dans la position inversée, et colorées avec une solution de cristal violet à 0,5% (p: v).

Les cellules adhérentes sont remises en suspension dans une solution d'éthanol à 95% et l'absorbance est mesurée à 540 nm en utilisant un lecteur ELISA AutoReader (modèle 680, Biorad, Royaume-Uni). Les isolats ont été classés en trois catégories: a) non adhérente, la densité optique inférieure à 0,120; b) faiblement adhérente, la densité optique supérieure à 0,120 ou égale ou inférieure à 0,240; c) fortement adhère la densité optique supérieure à 0,240.

## **2.4. Effet de certains antiseptiques et antibiotique sur la formation de biofilm par la technique TCP**

### **2.4.1 Antiseptiques et antibiotique étudiés**

Les principaux antiseptiques utilisés au CHU de Sidi Bel abbes sont la polyvidone iodée (PVPI), et l'alcool éthylique à 70° pour les antibiotiques la pénicilline G est de loin l'antibiotique le plus utilisés au CHU.

La polyvidone iodée Elle est commercialisée sous le nom de Bétadine® à 10 % (laboratoire Laprophan), L'alcool éthylique à 70° est préparé aux laboratoires de la pharmacie hospitalière du CHU par dilution de l'alcool à 90°, et La pénicilline G (1million) est commercialisée par les laboratoires saidale.

### **2.4.2 Étude de quelques facteurs sur le détachement du biofilm**

Après formation d'un biofilm jeune de 48 h par la technique TCP (décrite précédemment), les microplaques de 96 puits sont rincées 3 fois par l'eau distillé et séchée et on ajoute la Pénicilline G (1million U.I), la Bétadine 10% (un dérivé iodé) et l'alcool éthylique 70° sur le biofilm formé ensuite on incube la microplaque pendant 15 min

Après incubation les puits de la microplaque sont soigneusement rincés, séchés et colorés avec du cristal violet suivant la technique standard. La DO est mesuré à 490 nm par le lecteur ELISA.

## **3. RESULTATS**

### **3.1. Prélèvements**

Un total de 42 prélèvements ont été effectués aux Chu de Sidi Bel Abbes à partir des qu'elle 28 souches ont été retenues, après identification biochimiques par galerie api 20 staph et le test de la coagulase toutes les souches ont été des *staphylococcus aureus*.

### **3.2. Résultats de la technique RCA**

La recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo a révélé que 19 souches sur 28 isolées des dispositifs médicaux sont productrices de slime et présentent des colonies noires avec un cristallin de consistance sèche sur Gélose Rouge Congo. Cet aspect est dû à la production des exo-polysaccharides qui réagissent avec le rouge Congo. Tandis que 09 souches étaient non productrices de slime et présentent des colonies rouges sur le même milieu. Les résultats sont illustrés par la figure 1.

### **3.3. Résultat de la TCP**

La détermination quantitative de la formation de biofilm chez toutes nos souches a été réalisée par la technique sur microplaques TCP. En utilisant le milieu de croissance BHIB, seulement 9 souches sont productrices de biofilm avec 7 faiblement productrice et 2 fortement productrice (**tableau1**).

### **3.4. Résultats de la technique TM**

Les résultats obtenus par la techniques TM (**Tableau1**) diffèrent de ceux obtenus par la technique TCP, 7 souches sont productrices de biofilm par cette technique dont 2 fortement productrice.

### **3.5. Effet de l'éthanol, pénicilline et Bétadine sur le biofilm**

Pour évaluer l'impact des conditions environnementales sur le biofilm à *Staphylococcus*. On a ajouté les trois facteurs après un développement de 48h. Il en résulte une augmentation en nombre de souches capables de former un biofilm par la technique TCP avec 11 souches produisant un biofilm en présence d'éthanol et 19 souches productrices de biofilm en présence de pénicilline. La pénicilline semble stimuler plus la formation du biofilm où 8 sont de bonnes productrices et 11 forment modérément le biofilm. En présence d'éthanol seules 3 souches sont fortement productrices de biofilm et 11 sont modérées. Par contre aucune souche n'a formé de biofilm en présence de Bétadine (**Tableau 1**).

## **4. DISCUSSION**

*Staphylococcus aureus* est l'un des germes les plus fréquemment responsables d'infection sur corps étrangers tel que les cathéters, les valves cardiaques et les sondes urinaires. Leurs facteurs de virulence majeur est la capacité à produire une matrice extracellulaire et constituer un biofilm ; ce qui rend extrêmement difficile le traitement clinique [9].

La détection précoce des biofilm à staphylocoques peut être l'une des étapes essentielles pour la prévention et la gestion des infections urinaires nosocomiales sur sondes [10].

Dans cet article nous avons voulu dans un premier temps évaluer la formation de biofilm par les *staphylococcus aureus* isolés de sondes urinaires au CHU de Sidi Bel Abbès par les techniques RCA, TM et TCP.

Les résultats révèlent que 19/28 souches sont productrices de slime par culture sur milieu rouge Congo, Nos résultats concordent avec ceux retrouvés par Arciola *et al.*, (2001) [11] où la production de slime est importante chez les *S.aureus* (60,8%) .

La production de slime est révélée par l'apparition de colonies noires sur le milieu rouge Congo, Cet aspect est dû à la production des exo-polysaccharides (PIA) qui réagissent avec le milieu de culture ; Décrite la première fois chez *S. epidermidis* par Mack *et al.* [12] la PIA est principalement localisée à la surface de la cellule. Elle est codée par le locus *ica* qui joue un rôle important dans l'adhésion intercellulaire et de ce fait a été reconnue comme un facteur crucial dans la colonisation de matériel médical par les staphylocoques [13], [10], [9].

Les résultats obtenus par la technique TCP révèlent que seulement 9/28 souches produisent un biofilm dans le milieu BHIB ; ces résultats sont en accord avec les observations d'autres auteurs qui montrent que peu de souches sont formatrices de biofilms dans un milieu de croissance sans supplément (sucre, antibiotiques ou NaCl) [14], [15], [16].

Johannes *et al.*, (2002) [15] ont montré dans leur étude qu'en utilisant un milieu de base, 4 souches seulement des 128 *S.aureus* isolées formaient un biofilm. De même Mathur *et al.*, [16] dans les mêmes conditions trouvent 7 souches formatrices de biofilm sur un total de 152.

Dans notre étude 7/28 souches produisent un biofilm par la technique en tube et présentait une bonne corrélation avec la technique TCP pour les souches fortement productrices de biofilm (Tableau 1). Par conséquent, une grande variabilité a été observée quant à la classification en biofilm positif et négatif par la méthode en tube. De même, il était difficile de différencier entre les souches faiblement productrices de biofilm et non productrices. Nous confirmons l'hypothèse déjà formulée par plusieurs auteurs dont Mathur *et al.*, que la technique en tube ne peut pas être recommandée en routine [16].

Par conséquent, la technique TCP est plus largement utilisée et est considérée comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm. Cette méthode a été rapportée comme étant la plus sensible, précise et reproductible pour la détermination de la formation de biofilm à staphylocoques. Elle permet une détermination quantitative pour comparer l'adhésion des différentes souches et aussi examiner un grand nombre d'isolats simultanément [17].

C'est une technique quantitative pratique et économique pour l'identification des facteurs et des conditions de cultures optimales pour la formation de biofilm [18].

En effet, La formation de biofilm est un phénomène complexe sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels: le milieu environnant [19]. A fin d'étudier l'influence de certains facteurs utilisés au CHU de Sidi Bel Abbès sur le biofilm de *staphylococcus aureus* nous avons utilisé la technique TCP décrite précédemment. On a remarqué qu'après l'ajout de la pénicilline et de l'éthanol le nombre de souches formatrices de biofilm augmente à 11 souches formatrices de biofilm en présence d'éthanol et 19 souches formatrices de biofilm en présence de pénicilline. Ces observations sont en accord avec d'autres études qui suggèrent une forte dépendance entre les conditions de croissance et la formation de biofilm chez les staphylocoques [16].

Luther *et al.*, [20] ont montré que l'éthanol augmente la formation de biofilm chez toutes les souches étudiées de même el Banna *et al.*, en 2010 [21] ont montré que les antibiotiques augmentent aussi la formation de biofilm chez les staphylocoques isolées au CHU d'Alexandrie (Egypte).

Selon nos résultats obtenus en 2013 [2], et ceux trouvés dans la littérature, l'expression de l'opéron *ica* qui est responsable de la production des polysaccharides extracellulaires ou PIA chez *staphylococcus aureus* dépend des conditions environnementales telle que la composition du milieu de croissance, la température, l'osmolarité, la présence d'oxygène et des concentrations sous-inhibitrices en antibiotiques



ainsi que des concentrations importantes en NaCl augmentent la formation de biofilm et induisent l'expression d'*ica* chez les *staphylocoques*. La présence de cations divalents tels que le calcium et le magnésium accroît la production de polysaccharides conduisant à une amplification de la formation de biofilms. Chez les staphylocoques, l'expression des gènes *ica ADBC* peut aussi être influencée par d'autres conditions environnementales telles que l'acide oléique et la limitation en fer [22], [23], [9].

D'autre part La résistance des bactéries incluses dans les biofilm vis-à-vis des antibiotiques et des désinfectants est bien connu, cette résistance est attribuée selon certains auteurs à certains facteurs (physiologie des bactéries, pouvoir des matrices ...). Les travaux scientifiques sur le sujet montrent un lien étroit, qu'il soit direct ou indirect, entre l'architecture de l'édifice biologique et sa résistance à l'action des antimicrobiens [24]. En effet, la multiplication des cellules adhérentes et la production d'une matrice extracellulaire conduisent au développement d'une structure complexe dans laquelle les biocides et antibiotiques peuvent rencontrer des problèmes de diffusion ce qui limite leur efficacité. Cette structure gouverne la mise en place de gradients en nutriments, en oxygène et en produits métabolites qui entraînent l'apparition d'une hétérogénéité chimique et nutritionnelle dans le biofilm [25]. En réponse à leur microenvironnement local, les cellules peuvent alors évoluer vers des phénotypes de tolérance par des modifications physiologiques et/ou l'expression de gènes spécifiques. La résistance globale de la communauté bactérienne apparaît donc être un processus multifactoriel structure-dépendant qui implique des phénomènes locaux [26]. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette plus grande résistance:

La matrice polymérique qui agit comme une barrière réduisant ou empêchant la diffusion aux agents antimicrobiens, et la faible concentration de certains éléments nutritifs et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante. Ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms [27], [28]. L'exposition répétée à des concentrations du désinfectant peut générer certaines adaptations physiologiques qui repoussent encore plus loin la tolérance ultérieure du biofilm. Quand une communauté de cellules bactériennes adhérentes est soumise aux antibiotiques et désinfectants, seules quelques unes sont capables de résister [29].

Par contre en présence de la bétadine (La polyvidone iodée) la densité optique diminue chez toutes les souches et aucune souche ne forme de biofilm.

Nous confirmons nos résultats par l'étude de *Essayagh et al.*, [30] qui révèle que la PVPI est le meilleur des antiseptiques étudiés. En effet, sur les 130 souches testées, seules six souches (4,6 %) étaient résistantes à la PVPI prélevée au niveau de la pharmacie, alors que 40 (30,7 %) étaient résistantes à l'alcool iodé et 20 (15,4 %) à l'alcool à 70°.

Ces résultats sont en parfait accord avec la revue de littérature qui confirme que la PVPI est un bon antiseptique vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif [2], [5] L'analyse chimique confirme cette donnée. En effet, la PVPI est une molécule stable constituée d'un complexe entre l'iode et un agent organique hydrosoluble qui transporte et libère lentement l'iode. Cette structure rend la PVPI moins irritante, moins allergisante et plus stable dans le temps [6], tandis que l'alcool iodé et l'alcool éthylique à 70° ne sont stables respectivement que quinze jours et un mois après la date de leur préparation [31], [32].

## 5. CONCLUSION

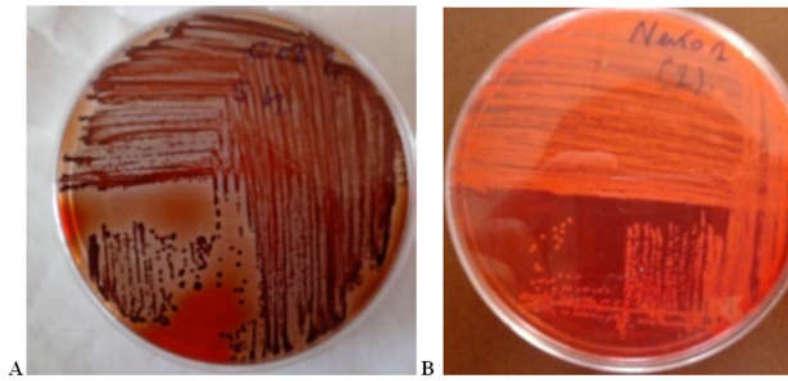
Bien que les biofilms soient à présent pris en charge, les recours actuels contre leur développement sont encore limités. Cependant, les données récentes de la recherche fondamentale ont mis en évidence des mécanismes ou des voies de régulation qui constituent autant d'axes thérapeutiques potentiels, il est cependant probable que la multiplicité des processus qu'utilisent les biofilms pour établir leur tolérance vis-à-vis des agents anti-infectieux et désinfectants imposera le recours à des stratégies multiples.

## RÉFÉRENCES

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

- 2 :Kara Terki, I., H. Hassaine, S. Oufri, S. Bellifa and I. Mhamedi *et al.*, 2013. Detection of ICAA and ICA D genes and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from urinary catheters at the University Hospital of TLEMCEM (Algeria). *African J. Microbiol. Res.*, 7: 5350-5357. DOI: 10.5897/JMR2013.5873.
- 3: Bellifa, S., H. Hassaine, I. Kara Terki and W. Didi *et al.*, 2016. Study of biofilm production and antimicrobial resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary catheter at the university hospital of Tlemcen. *Am. J. Microbiol. Biotechnol.*, 3: 13-17. <http://www.aascit.org/journal/ajmb>.
- 4 :Chessa, D., G. Ganau, L. Spiga, A. Bulla and V. Mazzarello *et al.*, 2016. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence strains as causative agents of persistent infections in breast implants. *PLOS ONE*, 11: e0146668-e0146668. DOI: 10.1371/journal.pone.0146668
- 5 : Ouchar Mahamat, O., A. Tidjani, A. Savadogo, A. Abakabir Mahamat and M.K. Somda *et al.*, 2013. Isolation and characterization of bacteria producing biofilms from food products. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 7: 187-210. <https://www.researchgate.net/publication/304625545>
- 6 : Brun-Buisson, C., 1994. Critical Analysis of Diagnostic Methods of Catheter-Related Infection on Removed Equipment. *Réan Urg.*, 3: 343-6.
- 7: **Freeman**, D.J., F.R. Falkner and C.T. Keane, 1989. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, 42: 872-874. DOI: 10.1136/JCP.42.8.872
- 8 :Christensen, G.D., W.A. Simpson, J.J. Yonger, L.M. Baddor and F.F. Barrett *et al.*, 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.*, 22: 996-1006. PMID: PMC271866.
- 9 : Derek, E., K. Moormeier and w. Bayles, 2017. *Staphylococcus aureus*, biofilm: A complex developmental organism. *Molecular Microbiol.*, 104: 365-376. DOI: 10.1111/mmi.13634.
- 10 : Martín-López, J.V., E. Pérez-Roth, F.C.M.O. Díez Gil, N. Batista and M. Morales *et al.*, 2002. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the ICA Gene cluster needed for biofilm establishment. *J. Clinical Microbiol.*, 40: 1569-1570. DOI: 10.1128/JCM.40.4.1569-1570.2002.
- 11 :Arciola, C.R., L. Baldassarri and L. Montanaro, 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 2151-2156. DOI: 10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001.
- 12 : Mack, D., N. Siemssen and R. Laufs, 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for functional relation to intercell
- 13 : Cramton, S.E., M. Ulrich and F. Gotz, 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection Immunol.*, 69: 4079-4085. DOI:10.1128/IAI.69.6.4079-4085.2001
- 14 : Cho, S., K. Naber, J. Hacker and W. Ziebuhr, 2002. Detection of the *ica* ADBC gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *Int. J. Antimicrobial Agent.*, 19: 570-575. DOI: 10.1016/S0924-8579(02)00101-2.
- 15 : Johannes, K.M., M.A. Knobloch, H. Horstkotte and M. Dietrich, 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 191: 101-106. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.09.017.
- 16 : Mathur, T., S. Singhal, S. Khan, D.J. Upadhyay and T. Fatma *et al.*, 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. *Indian J. Med. Microbiol.*, 24: 25-29. DOI: 10.4103/0255-0857.19890.
- 17 : Racha, A.N., H.M. Abu Shady and H.S. Hussein, 2012. Biofilm formation and presence of ICAAD gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian J. Medica. Human Genetic*, 13: 269-274. DOI: 10.1016/J.EJMHG.2012.04.007.

- 18** :Castro Melo, P., L.M. Ferreira, A.N. Filho, L.F. Zafalon and H.I. Godoy Vicente *et al.*, 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Brazilian J. Microbiol., 44: 1517-8382. DOI: 10.1590/S1517-83822013005000031
- 19** : Branger, A., M.M. Richer and S. Roustel, 2007. Some microbial system: biofilms. In: Microbio chemistry and food. Educagri Edition, Dijon, pp: 131-164.
- 20** :Luther, M.K., S. Bilida, A. Leonard, I. Merme and L. Kerry, 2015. Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *staphylococcus aureus* and staphylococcus epidermidis. Infect Dis Ther., 4: 219-226. DOI: 10.1007/s40121-015-0065-y
- 21** :El-Banna, T., A. Abd El-Aziz, A. Abo-Kamar, A. Ghazal and R. Abo Zahra, 2010. In vitro activities of three kinds of antibiotics against Staphylococcal biofilm and planktonic cultures. African J. Microbiol. Res., 4: 2275-2282. <http://www.academicjournals.org/ajmr>.
- 22** :Gotz, F., 2002. Staphylococcus and biofilms. Molecular Microbiol., 43: 1367-1378. DOI: 10.1046/J.1365-2958.2002.02827.X
- 23** : Chaieb, K., K. Mahdouania and A. Bakhrouf, 2005. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. J. Hospital Infect., 61: 225-230. DOI: 10.1016/j.jhin.2005.05.014
- 24** :Olsen, I., 2015. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis., 34: 877-886. DOI: 10.1007/s10096-015-2323-z
- 25** :Abdel Halim, R.M., N.N. Kassem and B.S. Mahmoud, 2018. Detection of biofilm producing staphylococci among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. Macedonian J. Med. Sci., 20: 1335-1341. DOI: 10.3889/oamjms.2018.246.
- 26** :Stewart, P., 2015. Antimicrobial tolerance in biofilms. Microbiol. Spectr., 3: 10.1128. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014
- 27** : Wojtyczka, R., K. Orlewska, M. Kępa, D. Idzik and A. Dziędzi *et al.*, 2014. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment. Int. J. Environ Res. Public Health, 11: 4619-4633. DOI: 10.3390/ijerph110504619
- 28** :Thien-Fah, C., M. George and A. O'Toole, 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. TRENDS Microbiol., 9: 1-1 DOI:10.1016/S0966-842X(00)01913-2
- 29** : Amiyare, R., A. Esmail, Y. Ghanmi and M. Ouhssine, 2015. Evaluation de L'effet d'un désinfectant à base de Glutaraldehydeà 2 %sur le biofilm d'Acinetobacter baumannii. J. Mater. Environ. Sci., 6: 3168-3173.
- 30** :Essayagh, T., A. Elameri, A. Zohoun, M. Miloudi and S. Elhamzaoui, 2010. Activité antibactérienne des antiseptiques utilisés à l'Hôpital militaire d'instruction Mohamed V de Rabat. Ann. Biol. Clin., 68: 421-7. DOI: 10.1684/abc.2010.0447
- 31** : Clevenot, D., S. Robert, B. Debaene and O. Mimosz, 2003. Analyse critique de la littérature sur l'utilisation comparée de deux antiseptiques lors du cathétérisme vasculaire ou rachidien. Ann Fr Anesth., 22: 787-97.
- 32** :Vaillant, L., 2005. Les antiseptiques, ce n'est pas automatique. Annal Dermatol., 132: 942-52.



**Figure1 : Production de slime chez les staphylocoques isolés sur milieu rouge congo**

**A** : formatrice de slime, **B** : non formatrice de slime

**Tableau1 : Résultats de la formation de biofilm par les Staphylocoques isolées de dispositifs médicaux**

Nombre de souches isolées	Formation de biofilm	Technique TCP				Technique TM
		BHIB	BHIB+ éthanol	BHIB+ Pénicilline	BHIB+ Bétadine	
N=28	<b>Fort</b>	2	3	8	0	2
	<b>Modéré</b>	7	8	11	0	5
	<b>Absente</b>	19	17	9	28	21

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR BABESIOSE CANINE

Amel KIOUANI<sup>1</sup>, Naouelle AZZAG<sup>1</sup>, Safia TENNAH<sup>1</sup> et Farida GHALMI<sup>1</sup>

*1 Laboratoire de Recherche Gestion des Ressources Animales Locales (GRAL), Ecole Nationale Supérieure  
Vétérinaire d'Alger, Algérie*

*Auteur correspondant: kiouani\_amel@hotmail.com*

## RESUME

La babesiose canine est une maladie vectorielle transmise par les tiques de la famille des Ixodidés, elle est causée par un protozoaire intra-érythrocytaire du genre *Babesia* affectant le chien à travers le monde. L'infection chez le chien, peut varier d'une forme simple subclinique à une forme sévère et parfois même mortelle. Elle est caractérisée par un important polymorphisme de symptômes qui peut varier d'une anorexie transitoire à un syndrome complexe où plusieurs organes sont affectés. Cette diversité est principalement liée à l'espèce de *Babesia* impliquée, à l'âge de l'animal, à son statut immunitaire et physiologique et à l'abondance des tiques infectées. Le diagnostic de cette affection n'est pas aisé car le tableau clinique n'est pas spécifique. Il repose sur l'association d'éléments épidémiologiques aux signes cliniques. L'établissement d'un diagnostic de certitude fait appel au laboratoire pour la réalisation de méthodes de diagnostic direct telles que l'identification microscopique du pathogène et/ou la détection de leurs ADN et des anticorps chez l'hôte infecté. Plusieurs molécules anticoccidiens sont utilisées et le dipropionate d'imidocarb est considéré comme le traitement de référence. Les mesures prophylactiques sont aussi importantes et l'étape primordiale est la lutte contre les tiques.

**Mots clés :** babesiose, chien, tique, maladie vectorielle

## 1. INTRODUCTION

La babesiose est une hemoprotozoose transmise par les tiques de la famille des *Ixodidae*, elle est due à la multiplication intra érythrocytaire d'un *Apicomplexa* du genre *Babesia* 1 ; C'est une des infections les plus communes de nombreux vertébrés : amphibiens, reptiles, oiseaux, mammifères dont l'homme 2, 3. Chez les chiens, au départ la babesiose était considérée comme une maladie tropicale et subtropicale et depuis, elle a connu une fréquence croissante dans les régions tempérées du monde 4. La présentation clinique de la babesiose canine est diverse et variée d'une anorexie transitoire à un syndrome complexe où plusieurs organes seront affectés 5. Elle se caractérise par l'association d'un syndrome fébrile à un syndrome hémolytique et parfois évolue vers une insuffisance rénale sévère ou même à un choc fatal 6. Parmi les facteurs qui jouent un rôle dans cette diversité ; l'abondance des tiques, le pourcentage des tiques infectées et les espèces de *Babesia* impliquées 5. Les protozoaires de genre *Babesia* responsables de la babesiose canine appartiennent à l'embranchement des *Apicomplexa* et l'ordre *Piroplasmida*, ils sont classés selon leurs tailles en deux sous-genres : *Piroplasma* et *Microbabesia* 2, 5, 7, 8. Les espèces de *Babesia* peuvent prendre plusieurs aspects selon les stades de cycle biologique, ils ont soit un aspect en poire généralement groupés par deux éléments formant un angle obtus pour les *Microbabesia* ou aigu pour les *piroplasma* ou un aspect annulaire capable de mouvement amiboïde 2.

## 2. HISTORIQUE

Vector Babes (1888), un scientifique roumain, a été le premier à découvrir des microorganismes à l'intérieur des érythrocytes des bovins qui présentaient un syndrome hémolytique sévère, qu'il a appelé *Haematococcus bovis*. Quatre ans plus tard, il a observé un micro-organisme similaire dans le sang des moutons 9, 10, 11. Un an plus tard aux États-Unis, Smith et Kilbourne ont constaté que la fièvre des bovins du Texas n'est pas causée par une bactérie mais par la présence d'un parasite intra érythrocytaire transmis par les tiques, cette maladie a longtemps frappé les éleveurs de bétail dans le Sud des États-Unis américains 12. En 1895, Pina et galli-valeno décrivent *Piroplasma canis* responsable de fièvre ictérique chez les chiens de chasse de Lombardie 10, 11, Onze ans plus tard (1906), la multiplication sexuée des *Babesia* chez la tique a été suspectée par Koch qui a observé des « strahlenkoper » ou corps rayonnés

dans l'intestin d'une tique infectée et il les a assimilés à des gamètes de *Babesia* ; Cette suspicion a été démontrée jusqu'aux années quatre-vingt par Mehlhorn et collaborateurs 13.

### 3. TAXONOMIE ET PHYLOGENIE

Les protozoaires du genre *Babesia* appartiennent à l'embranchement des *Apicomplexa*, à la classe des *Aconoidasida*, ordre des *Piroplasmida*, sous-ordre des *Piroplasmidora* et à la famille des *Babesiidae*, 14,15. Ils constituent un genre important chez les mammifères, décliné en une centaine d'espèce dont seules certaines sont pathogènes, responsables de la babesiose 2. C'est une maladie à distribution mondiale, elle est caractérisée par la destruction des érythrocytes qui cause des manifestations cliniques systémiques modérées à sévères 16. Historiquement, l'identification de l'infection à *Babesia* chez le chien a été basée sur l'apparence morphologique du parasite dans les érythrocytes 17. Toutes les formes larges de *Babesia* (2.5-5.0µm) ont été désignées par *Babesia canis*, tandis que toutes les formes petites (1.0-2.5µm) ont été considérées comme *Babesia gibsoni* 5-8. Leur taxonomie a été basée sur leurs caractéristiques morphologiques, la distribution géographique et leur cycle évolutif 4, 5, 18. Cependant, ces méthodes traditionnelles ont été progressivement remplacées par des méthodes moléculaires qui sont basées sur la caractérisation génomique de la sous unité de l'ARN ribosomal (18S rDNA) qui a montré la présence de plusieurs espèces de piroplasmide qui infectent le chien 11, 16. En plus de ce qui a été décrit initialement, *Babesia canis*, *Babesia rossi*, et *Babesia vogeli* sont considérées comme des sous espèces de *Babesia canis* et sont identiques morphologiquement mais montrent une grande diversité de distribution géographique, de spécificité de vecteur et des signes cliniques qu'elles engendrent chez le chien, et elles sont donc actuellement considérées comme des espèces bien différenciées 19-21.

### 4. CYCLE BIOLOGIQUE

La transmission des *Babesia* se fait principalement par les morsures de tiques mais pour quelques espèces comme *Babesia gibsoni* la transmission directe était observée en absence de tique compétente aux États unis et en Europe et cela à travers des combats entre chien ou par la transmission congénitale transplacentaire 8, 10.

Durant l'engorgement de la tique, les sporozoïtes sont injectés dans l'hôte via la salive et infectent directement les érythrocytes 7, 22. Ce phénomène sépare les *Babesia spp.* des *Theileria spp.* où les sporozoïtes infectent initialement les lymphocytes ou macrophages dans lesquels le développement vers les schizontes prend place 14, 23. Tous les stades de développement des sporozoïtes se déroulent dans les érythrocytes, chaque sporozoïte se transforme en trophozoïte « forme arrondi » et produit deux mérozoïtes par fission binaire « Mérogonie » 1, 10, possédant chacune un noyau, un cytoplasme et un complexe apical. Il peut y avoir des divisions multiples au sein de l'hématie qui peut alors contenir 4, 8 ou 16 mérozoïtes 22.

Après la lyse des hématies, chaque mérozoïte libéré infecte une nouvelle hématie, cette multiplication est asynchronisée dans les différents stades de division du parasite et peut être observée en même temps sur un frottis sanguin 1. La multiplication asexuée peut se produire indéfiniment jusqu'à ce que les réactions immunitaires de l'hôte viennent contrôler le parasite, Il apparaît ensuite d'autres formes comme des formes annulaires, amiboïdes et également des formes plus au moins ovalaires qui vont cesser toutes divisions et qui sont l'équivalent de pro-gamétocytes 1, 22.

La tique ingère les hématies infestées au cours de prise d'un repas sanguin sur le chien, toutes les formes de *Babesia* sont détruites dans l'intestin moyen à l'exception des pro-gamétocytes, qui vont pénétrer dans les cellules de l'épithélium intestinal ou se transforme en gamétocytes « corps étoilés » 1, 2, 10. Les gamètes fusionnent « Gametogonie » et forment des zygotes d'abord sphérique puis allongé et mobile « ookinète », elles reprennent leurs multiplications « Sporogonie » et envahissent différents organes de la tique en particulier les glandes salivaires dans lesquelles se forme des milliers de petits sporozoïtes qui sont infestants pour le chien 22.

À l'exception de *Babesia microti-like*, le développements des espèces de *Babesia* dans les ovaires de la tique permet « la transmission transovarienne » 10, 14, 23, elles sont transmises de la larve à la nymphe puis de la nymphe à l'adulte c'est « la transmission transtadiale » 1, 2, 10, 23.

## 5. PATHOGENIE ET SIGNES CLINIQUES

La période d'incubation du parasite varie en fonction de l'espèce de *Babesia* : 7 à 28 jours pour *Babesia gibsoni*, 10 à 21 jours pour *Babesia. canis* 24, 25. La babesiose canine est caractérisée par une présentation clinique variable, cette diversité est principalement liée à l'agent pathogène responsable, à l'âge et au statut immunitaire et physiologique de l'animal et des infections intercurrentes avec d'autres agents pathogènes 10, 16, 26. La forme classique « aigüe » est caractérisée par un syndrome fébrile (fugace, une hyperthermie au minimum 40°C ; anorexie, dépression) et un syndrome hémolytique (anémie, bilirubinurie) 6, 23, 27. Ces symptômes sont consécutifs à une hémolyse intravasculaire et extravasculaire qui est induite par la rupture des hématies suite à la multiplication parasitaire intra érythrocytaire et au complexes immuns qui se déposent sur les hématies parasitées ou non pour l'hémolyse intravasculaire et la phagocytose d'hématies dans la rate, le foie et par les monocytes pour l'hémolyse extravasculaire 7, 16, 22. En absence de traitement spécifique, ce syndrome ne peut se résoudre spontanément que rarement, suivie d'une période de convalescence très longue, ou peut aboutir à un état de choc, l'ictère et à une insuffisance rénale voire mortelle 6, 22.

De nombreuses formes atypiques de la maladie posant problème au cours du diagnostic étiologique sont consécutives à l'activation du système de coagulation par l'hémolyse. Il s'agit notamment des symptômes locomoteurs, cérébraux, oculaires, gastro-intestinaux et vasculaires (nécrose des extrémités) 7, 28. La " forme chronique " souvent décrite dans la littérature n'a pas été formellement démontrée, comme le parasite n'est jamais observé dans le sang périphérique. Cette forme pourrait correspondre à une convalescence prolongée caractérisée par une anémie modérée et de la dépression 6, 7. La forme subclinique : est observée lors d'infection par plusieurs espèces babesienne, les chiens infectés subcliniquement ne manifestent jamais des signes cliniques, par contre la maladie peut être précipitée par le stress ou par le traitement aux glucocorticoïdes 7, 22.

## 6. LA REPOSE IMMUNITAIRE :

L'injection des formes sporozoïtes de *Babesia* par la tique et la multiplication intra érythrocytaires des mérozoïtes induisent une réaction du système immunitaire de l'hôte. L'expression clinique de la babesiose est fortement liée au statut individuel de l'animal (race, âge). Quelques races de chiens (Beagle, Fox terrier, Porcelaine, Teckel, Mongrels) sont plus résistantes à *Babesia canis* que d'autres (Spaniel, Cocker spaniel, Griffon, Yorkshire terrier, Doberman, Pekinese) 1.

La plupart des connaissances sur la réponse immunitaire contre l'infection à *Babesia* provient des études in vitro sur des souris ou in vivo sur des animaux de bétail 14. Cependant, seule la réponse immunitaire humorale qui est étudiée pour *Babesia canis* et *Babesia gibsoni* 1.

La phase aigüe de l'infection est caractérisée par le développement des mécanismes de la réponse immunitaire innée, les cellules présentatrices d'antigènes s'activent en reconnaissant des babesies et des hématies infestées, et produisent IL12 et IL18 qui vont stimuler les naturels killers NK à produire un taux élevé d'interféron gamma INF- $\gamma$  qui induit la production de NO (Nitric Oxyde) par les macrophages, cette phase permet une clearance partielle du parasite 1.

Aguilar-Delfin et ses collaborateurs ont remarqué que l'immunité innée peut jouer un rôle important dans la résistance des souches de souris à l'infection à *Babesia microti* et que les facteurs génétiques et les facteurs liés au sexe peuvent influencer l'efficacité de la réponse protectrice 27.

Durant l'infection chronique, la lyse des globules rouges infestés est principalement induite par le NO qui est produit par les macrophages de la rate activée par l'INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ . Ce mécanisme est régulé par les cytokines produites par les cellules TH 1 et inhibé par IL4 et IL10 1. De plus, Igarashi et ses collaborateurs ont pu démontrer le rôle de l'immunité à médiation cellulaire T dans la protection

immunitaire contre la réinfection sur des souches de souris réinfectées à *Babesia microti*, par l'intervention des lymphocytes TCD4 et d'INF- $\gamma$  dans le développement de l'immunité protectrice 30.

La réponse immunitaire humorale ne permet l'élimination totale du parasite (clearance), les isotypes IgM et IgG1,2 spécifiques de *Babesia* sont produits simultanément, par contre l'IgG persiste plus longtemps où ils sont dirigés contre les protéines de surface des érythrocytes infestés 31. Plusieurs mécanismes interviennent à contrôler la parasitémie : une action cellulaire cytotoxique anticorps-dépendante induite par l'IgG1, l'opsonisation par l'IgG2, une neutralisation de l'adhésion des mérozoïtes libres aux cellules érythrocytaires et l'activation du complément induite par l'IgG1 et l'IgG2 et donc le parasite peut persister pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, à un niveau très bas de parasitémie 1, 31. La production d'anticorps chez le chien commence 7 jours post infection et persiste durant plusieurs mois 32, 33. La durée de l'immunité protectrice contre l'infection à *Babesia canis* est située entre 5 et 8 mois 32.

Le contrôle de la parasitémie est connu sous le nom de l'immunité de « prémunition », elle permet de protéger l'animal contre les réinfections par le maintien des cellules mémoire suite au contact continu de parasite avec les mécanismes de l'immunité 1, 33, 34. Cependant, l'immunité stérilisante a été démontrée chez les chiens infectés par *Babesia canis*, mais ne se produit que chez certaines porteurs asymptomatiques 1.

## 7. MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT IMMUNITAIRE

Les espèces de *Babesia* ont développé des stratégies pour éviter ou limiter les effets de la réponse immunitaire qui leur permettent de persister à l'intérieur de l'hôte.

La diversité des souches *Babesia canis* pourrait expliquer le tableau clinique variable observé chez les chiens. Certaines souches de *Babesia* ont pu exprimer leurs molécules antigéniques à la surface des érythrocytes infectés et peuvent donc adhérer aux cellules endothéliales vasculaires, conduisant à leur séquestration dans les capillaires 26. Cela permet aux *Babésies* à persister dans l'hôte en empêchant leur passage dans la rate et donc leur phagocytose, ce phénomène pourrait également améliorer la transmission du *Babesia* lorsque la séquestration est proche des sites de piqûres de tiques 1, 5.

Les *Babesia* intra érythrocytaires sont partiellement protégées de la réponse immunitaire de l'hôte, alors que les mérozoïtes libres sont exposés aux mécanismes de l'immunité que pour une courte période. La surface des mérozoïtes libres est recouverte des protéines appelées « Glycosyl Phosphatidyl Anchored Proteins », elles sont impliquées dans l'attachement à la surface des érythrocytes hôtes et sont des cibles immunodominantes pour les Anticorps. Ces protéines de surface sont caractérisées par un polymorphisme antigénique qui permet aux mérozoïtes libres de s'échapper au système immunitaire 1.

En se basant sur les différences d'une partie du gène de l'ARN ribosomal 18S, des isolats de *Babesia canis* pourraient être séparés en deux groupes génétiquement différents : A et B où leurs virulences est bien différentes. La diversité antigénique peut être liée à la diversité allélique, dont différents clones de parasites expriment des protéines particulières, tels que les antigènes de surface, des mérozoïtes MSA-1 et MSA-2. Une telle diversité est probablement induite par des mécanismes moléculaires telle la recombinaison produite au cours de stades sexués chez la tique 5.

## 8. DIAGNOSTIC

La suspicion d'une babesiose canine est parfois basée sur l'examen clinique de l'animal et son historique, principalement dans la phase aigüe de la maladie ; Cependant, les infections asymptomatiques sont beaucoup plus difficiles à détecter 27. Au cours de la phase aigüe, le diagnostic peut être confirmé avec une grande sensibilité par l'examen microscopique d'un frottis sanguin après coloration 7.

La confirmation du diagnostic de la babesiose canine se fait par la mise en évidence du parasite soit par la recherche du parasite « frottis sanguin », soit par la recherche de ces anticorps « sérologie ». Pendant la parasitémie, les inclusions intra-érythrocytaires de *Babesia* sont facilement trouvées dans des frottis de sang périphérique colorés. Cette méthode est très répandue dans le domaine de la Médecine Vétérinaire en raison de ses nombreux avantages, tels la simplicité, la haute spécificité et le faible coût



7, 27. En revanche, dans les cas chroniques ou subcliniques où la parasitémie est très faible (0,001% de parasitémie) ou intermittente, la confirmation parasitologique de l'infection n'est pas facilement réalisée et donc il a une sensibilité relativement faible 16, 25, 27. Le diagnostic microscopique chez les chiens porteurs chroniques peut être difficile du fait d'une parasitémie basse et souvent intermittente 25, 27.

En raison des difficultés dans la détection des parasites *Babesia*, en particulier chez les porteurs chroniques, les immunodiagnostic peuvent être utilisés pour cribler des hôtes infectés. Les sérodiagnostics ont été révélés fiables comme des méthodes indirectes de dépistage des parasites 7. Il est important de noter, que même après chimiostérilisation, les chiens peuvent rester séropositifs pendant de longues périodes 27.

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFAT) est le plus utilisé pour le diagnostic de la babesiose canine 16, il est considéré comme la méthode la plus spécifique pour la documentation de l'infection et le diagnostic des babesioses occultes 7, 22. Cependant le test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est plus utilisée pour les études séro-épidémiologiques que pour le diagnostic clinique 22. Pourtant, il existe peu de tests ELISA pour la détection d'anticorps anti- *Babesia* disponibles sur le marché 8.

Un autre test immunologique très pratique par sa simplicité d'exécution et de lecture est le test immunochromatographique (ICT) 35. Cependant les ICT ne sont pas encore disponibles sur le marché dans aucun pays 36.

La PCR a été également utilisée pour l'identification des espèces de *Babesia* en utilisant des amorces spécifiques, du gène codant pour le gène de l'ARNr 18S 10, ce gène permet la détection et la différenciation de *Babesia gibsoni* et *Babesia canis* dans le sang. De nombreux tests de PCR différents ont été publiés pour l'identification et la différenciation des infections à *Babesia*. L'identification des espèces peut alors être réalisée par séquençage d'ADN ou par l'utilisation des essais de PCR spécifiques à l'espèce 8.

Le désavantage de la PCR est l'indispensabilité de la présence d'équipement de laboratoire spécialisé et un personnel de laboratoire bien formé, ce qui a conduit plusieurs pays à limiter l'utilisation de cette méthode à la recherche seulement 27.

## 9. TRAITEMENT

La thérapeutique de la babesiose comprend deux volets ; un traitement étiologique par l'utilisation des molécules spécifique destinées à éliminer le parasite et un traitement symptomatique afin de soutenir l'état général de l'animal. Le pronostic est généralement bon lorsque le traitement implique des médicaments anti-Babésie spécifiques appliqués après un diagnostic précoce de la maladie. Les chiens présentent généralement une amélioration clinique dans les 24 à 72 heures de traitement, mais certains animaux peuvent prendre jusqu'à 7 jours pour répondre au traitement 26. Peu de médicaments sont efficaces pour éliminer les parasites et la plupart des chiens survivent au syndrome hémolytique aigu en développant une prémunition dans laquelle un équilibre délicat existe entre leur réponse immunitaire et la persistance du parasite 22.

Beaucoup de médicaments ont été utilisés pour traiter l'infection à *Babesia sp.* Le dipropionate d'imidocarb est considéré comme le traitement de référence. Au cours de la babesiose aiguë, la réponse est rapide, avec une augmentation de la production de cellules sanguines dans les 12-24 h. Il est efficace contre *Babesia canis* et *Babesia vogeli* mais pas contre *Babesia gibsoni* 26, 37. Ce médicament peut également éliminer l'infection par *Babesia canis* chez les tiques qui s'engorgent sur des chiens traités pendant 4 semaines post-traitement et empêche la réinfection du chien jusqu'à six semaines après une seule injection. Cependant, L'imidocarbe ne supprime pas les infections à *Babesia gibsoni* mais il réduit la morbidité et la mortalité 8.

L'acéturate de diminazène est le médicament le plus couramment utilisé dans le monde entier. Il est efficace lorsqu'il est administré par voie intramusculaire (IM), bien que la clairance de l'infection soit incohérente même à des doses plus élevées 22, 37. Les infections à *Babesia gibsoni* sont moins sensibles au diminazène que les infections à *Babesia canis* et *Babesia vogeli* 37. Les chiens sont plus sensibles aux

effets toxiques de ce médicament que les autres espèces. Les effets secondaires comprennent la douleur et l'enflure au site d'injection, l'irritation gastro-intestinale et les manifestations neurologiques 7, 26, 27.

Le bleu de trypan peut également être utilisé en intraveineuse (IV) car il est irritant pour les tissus. Il est efficace dans le traitement des chiens avec des signes cliniques légers à modérés 26.

La combinaison de l'atovaquone et azithromycine est le traitement le plus efficace contre les infections à *Babesia gibsoni* et *Babesia conradae*, il permet la clearance de l'infection ou la diminution de la parasitémie ; dans le cas où cette combinaison n'est pas efficace contre *Babesia gibsoni* une autre combinaison de clindamycine, metronidazole doxycycline peut être utilisé mais pour une longue durée de traitement au minimum 3 mois 8, 25.

## 10. MESURES PROPHYLACTIQUE

L'étape primordiale de la de la prophylaxie de la babesiose est la lutte contre les tiques par l'inspection visuelle de l'animal dont l'identification et le retrait précoce des tiques est important car elles peuvent transmettre les babesies au minimum 2 à 3 jours après leur fixation sur l'animal, l'utilisation des acaricides topiques est également efficace 8, 25.

Bien que le traitement par l'imidocarbe puisse avoir un effet prophylactique post-thérapeutique pendant une période allant jusqu'à 6 semaines, cependant, les résultats sont variables et donc ce médicament n'est actuellement pas recommandé pour la prophylaxie. De plus, la stérilisation complète peut ne pas être conseillée dans certaines zones endémiques, puisque la prémunition confère une certaine immunité 7.

La vaccination est également un moyen important pour contrôler la babesiose, les chiens doivent être vaccinés pendant les périodes à faible activité des tiques afin d'éviter des infections par immunisation primaire. Elle permet d'atténuer de manière considérable la gravité des symptômes cliniques et la sévérité de l'anémie et la splénomégalie. Les vaccins peuvent limiter la parasitémie. Cependant, elles ne peuvent empêcher qu'une tique infestante d'injecter les *Babesia* dans le sang du chien vacciné 8. Des vaccins vivants atténués ont été produits en premier mais le risque d'induire la babesiose vaccinale a conduit au développement de vaccins inactivés. Chez le chien seuls deux vaccins contre l'infection à *Babesia canis* sont disponibles sur le marché, ils contiennent des antigènes de parasites solubles (SPA) des parasites *Babesia* homologues 26. Des vaccins contre d'autres espèces de *Babesia* comme *Babesia gibsoni* sont actuellement en cours de développement, y compris des vaccins à antigènes et ADN recombinants. Bien que les chiens puissent être vaccinés, le niveau de protection est très variable, ce qui pourrait être dû à la diversité génétique des souches de *Babesia sp.* 25.

## REFERENCES

1. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L, 2009. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. Vet. Res. 40:37.
2. Euzéby J, 2008. Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. LAVOISIER. p. 832. ISBN/ 978-2-7430-1044-7.
3. Hamel D, Shukullari E, Rapti D, Silaghi C, Pfister K, Rehbein S, 2016. Parasites and vector-borne pathogens in client-owned dogs in Albania. Blood pathogens and seroprevalences of parasitic and other infectious agents. Parasitol Res.115(2) : 489-99.
4. Irwin PJ, 2005. Babesiosis and cytauxzoonosis. In: Shaw SE., Day MJ, Arthropod-borne infectious disease of the dog and cat. Manson Publishing Ltd, London, p. 63-77.
5. Matijatko V, Torti M, Schettlers TP, 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases?. Trends Parasitol. 28:(3) 99-105
6. Bourdoiseau G, 2006. Canine babesiosis in France. Vet Parasitol, 138(1-2):118–125.
7. Ayoob AL, Hackner SG, Prittie J, 2010. Clinical management of canine babesiosis. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 20(1) p. 77–89.
8. Birkenheuer A.J., 2014. Babesiosis. J. Infect. Dis. 75(1):727–738.

9. Babes V, 1892. The etiology of an enzootic disease of sheep, called Carceag, in Romania. C. R. Hebd. Acad. Sci. 115, 359–361.
10. Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. 2012. *Babesia*: A world emerging. Infect Genet Evol 12(8) :1788-809.
11. Penzhorn BL, 2020. Don't let sleeping dogs lie: unravelling the identity and taxonomy of *Babesia canis*, *Babesia rossi* and *Babesia vogeli*. Parasit Vectors. 13: 184.
12. Smith T, Kilbourne FL, 1893. Investigations into the Nature, Causation, and Prevention of Texas or Southern Cattle Fever, Book; (<http://texashistory.unt.edu/ark:/67531/metaph143538/>: accessed January 23, 2015), p. 51-114.
13. Mehlhorn H, Schein E, Voigt WP, 1980. Light and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of the tick *Dermacentor reticulatus*. J Parasitol. 66(2):220-8.
14. Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS, 2008. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. Int J Parasitol. 38 ,1219–1237.
15. Dantas-Torres F, Figueredo L.A, 2006. Canine babesiosis:A Brazilian perspective. Vet. Parasitol.141(3-4):197–203
16. Solano-Gallego L, Baneth G., 2011. Babesiosis in dogs and cats-expanding parasitological and clinical spectra. Vet. Parasitol. 181(1), 48-60.
17. Solano-Gallego L, Sainz Á, Roura X, Estrada-Peña A, Miró G, 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. Parasit Vectors. 9, 336.
18. Cardoso L, Costa A, Tuna J, Vieira L, Eyal O, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G, 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. Vet Parasit. 156, 199–204
19. Nalubamba KS, Hankanga C, Mudenda NB, Masuku M, 2011. The epidemiology of canine *Babesia* infections in Zambia. Prev Vet Med. 99(2-4) :240-4.
20. Wang J, Liu J, Yang J, Liu Z, Wang X, Li Y, Luo J, Guan G, Yin H, 2019. Molecular detection and genetic diversity of *Babesia canis canis* in pet dogs in Henan Province, China. Parasitol Int, 71: 37-40.
21. Vishwakarma P, Nandini MK, 2019. Overview of Canine Babesiosis, Veterinary Medicine and Pharmaceuticals, Samuel Oppong Bekoe, Mani Saravanan Reimmel Kwame Adosraku and P K Ramkumar, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.82243.Available from :[https://www.intechopen.com/books/veterinary -medicineandpharmaceuticals/overview- of-canine-babesiosis](https://www.intechopen.com/books/veterinary-medicineandpharmaceuticals/overview-of-canine-babesiosis).
22. Taboada J, Lobetti R. 2006. Babesiosis, chapitre77 In: Greene, C.E. Infectious Diseases Of The Dog and Cat. Georgia : ELSEVIER. 3 :1-29. ISBN-10 : 1-4160-3600-8.
23. Alvarado-rybak M, Solano-gallego L, Millan J, 2016. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation Parasit Vectors. 9: 538.
24. Boozer AL, Macintire DK, 2003. Canine babesiosis. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 33(4) :885-904.
25. Maggi RG, Krämer F, 2019. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. Parasit Vectors. 12(1):145.
26. Beugnet F., Moreau Y., 2015. Babesiosis. Rev. Sci. Tech., 34(2) : 627-639.
27. Dantas-torres F, Figuerdo LA, 2006. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. Vet. Parasitol. 141, 197–203.
28. Schettters T, 2019. Mechanisms Involved in the Persistence of *Babesia canis* infection in Dogs. Pathogens. 8(3): 94.
29. Aguilar-delfin I, Homer MJ, Wettstein PJ, Persing DH, 2001. Innate Resistance to *Babesia* Infection Is Influenced by Genetic Background and Gender. Infect. Immun. 69 (12) : 7955–7958.

30. Igarashi I, Suzuki R, Waki S, Tagawa YI, Seng S, Tum S, Omata Y, Saito A, Nagasawa H, Iwakuro Y, Suzuki N, Mikami T, Toyoda Y, 1999. Roles of CD41 T Cells and Gamma Interferon in Protective Immunity against *Babesia microti* Infection in Mice. *Infect. Immun.* 67(8) : 4143–4148.
31. Masake R., Musoke A, 1998. Maladies hémoparasitaires et réponses immunitaires spécifiques. International Livestock Research Institute. *Oie.* 27-41.
32. Vercammen F, De Deken R, Maes L, 1997. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. *Vet. Parasitol.* 68, 51-55.
33. Brandão LP, Hagiwara MK, Myiashiro SI, 2003. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Vet. Parasitol,* 114, 253–265.
34. Lewis BD, Penzhorn BL, Lopez Rebollar LM, 1995. Immune responses to South African *Babesia canis* and the development of a preliminary vaccine. *S.Afr,vet.Ass.* 66(2):61-65.
35. Aubry P, Gäüzere BA, 2018. Tests de diagnostic rapide par immunochromatographie en zones tropicales. *Med Sante Trop.*7.
36. Mosqueda J, Olvera-ramirez A., Aguilar-Tipacamu G., CANTÓ GJ., 2012. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Curr Med Chem.* 19(10):1504-18.
37. Baneth G, 2018. Antiprotozoal treatment of canine babesiosis *Vet Parasitol.* 254:58-63.

# EFFET DU TRAITEMENT PARODONTAL SUR LA COMPOSITION DE LA FLORE BUCCALE CHEZ L'ENFANT

Faiza MACHOU<sup>1</sup>, Linda AOUED<sup>1</sup>, Djamila KHAASSANI<sup>2</sup>

*1 Faculté de médecine de Sidi Bel Abbes*

*2 Faculté de médecine d'Oran*

*Auteur correspondant : [Faiza.riadh@yahoo.fr](mailto:Faiza.riadh@yahoo.fr)*

## RESUME

La maladie parodontale résulte de l'exacerbation d'un processus inflammatoire, face à un agent infectieux bactérien, modulé par certains facteurs locaux ou généraux.

Une étude avant et après était réalisée chez 1000 enfants scolarisés dans la wilaya de Sidi Bel Abbes, dont l'objectif était d'identifier les facteurs associés à l'apparition maladies parodontales chez l'enfant, d'origine bactérienne ; pour cela une étude de la flore buccale était menée avant et après traitement parodontal.

La comparaison des résultats a montré une diminution des *Streptococcus* de 17.5%, les *Actinomyces* de 24%, les *Neisseria* de 41.8%, les *Lactobacillus* de 23.4%, les *Monococci* de 18.8%, tandis que, le *Candida Albicans*, *Capnocytophaga*, l'*Agregabacter Actinomycetemcomitans*, *Campilobacter*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Eikenella*, les *Spirochètes* et les levures) ont disparu après traitement parodontal.

De même que, la présence des Gram négatifs est significative avec l'âge (P= 0.031) et les besoins en traitement ( $p= 10^{-3}$ ).

En effet, les bactéries impliquées dans la maladie parodontale, doivent être bien décrites, sous forme d'une liste de micro-organismes et non pas de manière individuelle. Car, leur fonction ne provient pas du même microbe chez l'ensemble des individus.

**Mots clés :** maladie parodontale, enfant, flore buccale, traitement parodontal, bactérie.

## 1. INTRODUCTION

La maladie parodontale est l'une des principales maladies inflammatoires chroniques de l'humanité et affecte environ 743 millions de personnes dans le monde. [1]

Il s'agit d'une affection destructive des tissus de soutien de la dent dont l'incidence augmente avec l'âge. [2]

Les deux formes principales de la maladie parodontale (gingivite et parodontite) résultent de l'exacerbation d'un processus inflammatoire, face à un agent infectieux bactérien, modulé par certains facteurs locaux ou généraux. [3]

En Algérie, des études épidémiologiques sur la santé bucco-dentaire chez les enfants et adolescents scolarisés ont été menées. [3, 4, 2, 5, 6, 7] En revanche, aucune étude nationale n'a mis le point sur la composition de la flore buccale incriminée dans l'apparition des maladies parodontales chez l'enfant.

Il est apparu nécessaire de réaliser ce travail dont l'objectif est de d'identifier les bactéries incriminées dans la maladie parodontale chez les enfants scolarisés âgés de six à 15 ans au cours de l'année scolaire 2015-2016 dans la wilaya de Sidi Bel Abbes.

## 2. MATERIEL ET METHODE

### 2.1. Type d'étude

Il s'agit d'une intervention avant et après réalisée durant 30 mois (du mois d'octobre 2015 au mois de mars 2018) : 06 mois était la durée de recueil des données au sein des UDS (unité de dépistages et suivi), implantés dans certaines écoles et 24 mois était la durée de prise en charge des enfants au niveau de l'unité de parodontologie du service de médecine dentaire de Sidi Bel Abbes.

La population cible était représentée par 1000 enfants scolarisés, présentant une maladie parodontale et âgés de : 06, 12 et 15 ans.

Les objectifs de l'organisation mondiale de la santé en matière de santé bucco-dentaire ont été élaborés à certains âges de références. [1] Les âges retenus dans notre étude sont liés au phénomène de dentition.

Une autorisation a été délivrée par l'académie de Sidi Bel Abbes afin d'accéder aux différentes écoles et par la direction de la santé afin d'identifier les enfants présentant une maladie parodontale. Pour chaque enfant inclus, une autorisation des parents était demandée au début de l'étude.

## 2.2. Prélèvement de la flore

Après examen clinique, un prélèvement de la flore buccale été réalisé le jour de la première consultation, puis 24 mois après traitement parodontal.

- **Le transfère:** était réalisé par l'intermédiaire des écouvillons.
- **L'étude microbiologique:** à l'état frais et par coloration de Gram était menée par un microbiologiste.

## 3. RESULTATS

### 3.1. Description de la population d'étude

La proportion des garçons est très légèrement plus élevée que les filles avec un sexe ratio = 1.01. Néanmoins on note un écart important entre l'âge pré-pubertaire (40.2%) et l'âge pubertaire (59.8%). (Tableau I)

### 3.2. Les habitudes d'hygiène bucco-dentaire et la maladie parodontale :

Une hygiène bucco-dentaire rigoureuse impliquant un brossage dentaire régulier constitue le meilleur moyen de désorganisation du biofilm bactérien qui déclenche la maladie parodontale. Le tableau II montre une relation très significative entre l'absence du brossage dentaire et l'apparition de la maladie parodontale ( $p=0,001$ ).

### 3.3. Etude de la flore buccale avant et après traitement parodontal

#### ➤ A l'état frais, dans la gingivite

On note que, le taux du *streptococcus* et l'*actinomyces* a baissé du 1/3, tandis que le taux du *neisseria* et *monococci* a fortement diminué, avec disparition du *candida albicans*. On pourra conclure que, ces dernières bactéries sont plus impliquées dans les gingivopathies. Le taux des bactéries après traitement de la gingivite reste supérieur à celui de l'état sain. Cela peut être lié à plusieurs facteurs, principalement, au respect d'une hygiène bucco-dentaire rigoureuse. Le tableau III montre la diminution de la proportion des bactéries après traitement parodontal.

#### ➤ A l'état frais dans la parodontite

A la différence de la gingivite, on constate la présence des *Spirochètes* dans 30% des cas et le *Candida Albicans* 9.2%, mais ces espèces disparaissent après traitement parodontal (figure 1).

### 3.3. Caractéristique de la flore: aérobie/ anaérobie dans la maladie parodontale

La flore buccale des parodontites se caractérise par une forte proportion d'anaérobies dans 90% des cas (figure 2).

On note que les bactéries à gram négatif sont présentes dans 1/4 des cas. Les bactéries mobiles dont 30% sont des *spirochètes* (figure 3).

## 4. DISCUSSION

Dans notre population d'étude, on note une très légère prédominance masculine avec un sexe ratio de 1.01. Cette différence est expliquée par une moins bonne hygiène buccale, résultant en une plus grande quantité de plaque et de tartre chez les garçons.

La prédominance masculine était retrouvée dans plusieurs études, notamment, L'étude d'A. Kaddach en 2006, F.Z BENAÏSSA en 2011, F. HAMCHAOUÏ en 2016. [9, 6, 10]. Ainsi, l'âge pubertaire prédomine dans 58.9%, ceci concorde avec l'institut national de santé publique en 2013, le nombre de gingivites est élevé et augmente avec l'âge. [11]

Les changements hormonaux liés à la puberté peuvent influencer la composition de flore déclenchant la maladie parodontale.

L'absence du brossage dentaire est fortement liée à l'apparition des maladies parodontales induites par la présence de la plaque bactérienne. Comme cela a été démontré dans nos résultats ainsi que d'autres études, tel : l'institut national de santé publique en 2013, A. Cherifi en 2014. [11, 12]

La comparaison entre les bactéries à Gram négatif et les classes d'âges a montré une relation significative ( $p= 0.031$ ), par contre la comparaison avec les Gram positif n'a pas montré de relation avec l'âge.

La comparaison entre les bactéries à Gram négatif et les besoins en traitement montre qu'il existe une relation très significative ( $p= 10^{-3}$ ).

La comparaison entre les bactéries Gram positif et Gram négatif avec le diagnostic, montre une relation très significative avec ( $p= 10^{-3}$ ).

Les études sur l'agrégation entre *Streptococcus* et *Actinomyces* ont révélé que l'adhésion inter-bactérienne entre ces deux souches favorise le développement du biofilm dentaire. [13] De plus, Les *Lactobacillus* et les *Streptococcus* (principalement *Streptococcus mutans*) sont parmi les principales bactéries cariogènes [14].

L'étude de YACOUBI A en 2011 a observé que la flore des parodontites agressives est une flore où les morphotypes mobiles et Gram négatif sont dominants. [13] Ceci rejoint nos résultats.

D'après le Département of préventive dentistry, microbiology and endodontology and periodontology, les résultats sont : *Prevotella* 6.1%, *Fusobacterium* 4.2%, *Capnocytophaga* 3.4%, *Eikenella* 0.5%, *Actinomycètes* 13%, les *Streptocoques* 24%, les *Spirochètes* 10% et autres 67%. [15]

Ces résultats diffèrent par rapport aux nôtres. Ceci peut être lié à l'hygiène bucco-dentaire et aux habitudes alimentaires.

## 5. CONCLUSION

Ce travail à la fois clinique et microbiologique montre que, dans notre population infantile, les bactéries Gram négatif (*Neisseria*, *Lactobacillus*) sont les plus impliqués dans la maladie parodontale. Mais peuvent être combattus par une hygiène bucco-dentaire rigoureuse et un traitement parodontal adéquat.

Le manque d'informations sur l'effet néfaste de l'hygiène insuffisante sur la santé bucco-dentaire et générale de nos enfants. Le manque d'études et de données chez l'enfant restent un frein au dépistage de certaines pathologies encore peu connues à ce jour. Les pathologies touchant le parodonte chez l'enfant sont largement sous-évaluées et trop souvent associées à un diagnostic tardif. Ce retard pourra être compensé par une étude microbiologique qui en identifiant les bactéries composant la flore buccale permettra une prise en charge précoce et donc un pronostic meilleur.

## REFERENCES

1. POUL ERIK PETERSEN. Organisation mondiale de la santé. Rapport sur la santé bucco-dentaire dans le monde 2003. 36 p.
2. MEDDAD M. contribution à l'étude des thérapeutiques parodontales chez l'enfant et l'adolescent. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université d'Alger1. 2009.
3. BRIHOUM S. contribution à l'étude de la gingivite chez l'enfant en Algérie. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université d'Alger1. 1996.
4. NEZZAL M. les atteintes parodontales et leur prise en charge chez le sujet diabétique jeune à Constantine. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université de Constantine. 2003
5. ZAGHEZ M. profil parodontal de la population scolarisée (6-19ans) d'Annaba mesuré par l'indice parodontal communautaire de l'OMS. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université d'Annaba. 2011.
6. BENAÏSSA F.Z. la santé bucco-dentaire en milieu scolaire dans la wilaya de Sidi Bel Abbes : étude épidémiologique et perspectives thérapeutiques. Université de Sidi Bel Abbes. 2011.
7. CHERIFI A. Enquête épidémiologique sur l'état bucco-dentaire des enfants scolarisés de 6, 9 et 12 ans dans la wilaya de Annaba. Université d'Annaba. 2014.

8. **KHALDI T.E.M.** Habitudes alimentaires et hygiène bucco-dentaire chez les étudiants Algériens- proposition d'un protocole d'étude avec pré-enquête sur 125 étudiants. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magistère en sciences alimentaires, option : ALIMENTATION, NUTRITION et SANTE. 2011. P : 26-30
9. **KADDACHE. C-A.** état de santé de l'adolescent dans la daïra de Blida. Thèse de Doctorat en sciences médicales. Université d'Alger 1. 2006.
10. **HAMCHAOUI F.** besoins de santé et comportements à risques des adolescents scolarisés dans la wilaya d'Alger. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université Alger1. 2016.
11. **INSTITUT NATIONAL DE SANTE PUBLIQUE.** Etat de santé bucco-dentaire de l'enfant Algérien : 6ans, 12ans et 15 ans. Algérie. 2013. P : 12-14.
12. **CHERIFI A.** Enquête épidémiologique sur l'état bucco-dentaire des enfants scolarisés de 6, 9 et 12 ans dans la wilaya de Annaba. Université d'Annaba.2014.
13. **YAKOUBI A.** biofilm buccal : parodontites et maladies générales. Thèse de doctorat en microbiologie. Université d'Oran1. 2011.
14. **BRUCE L PIHLSTROM, BRYAN S MICHALOWICZ, NEWELL W JOHNSON.** Periodontal diseases. Elsevier 2005 Nov 19; 366(9499):1809-20.
15. **P.D. MARSH, IGIJA ZAURA.** Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. J Clin Periodontal 2017; 44 (suppl. 18): S12- S22.



**Tableau I : description des enfants selon le sexe et la tranche d'âge**

	Masculin		Féminin		Total	
	n	%	n	%	n	%
5 - 10 ans	225	22,5	177	17,7	402	40,2
11 - 15 ans	279	27,9	319	31,9	598	59,8
Total	504	50,4	496	49,6	1000	100

**Tableau II : description de l'état parodontal en fonction de la fréquence du brossage.**

	Absence		1 fois par jour		2 fois par jour		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Sain	364	36,4	225	22,5	172	17,2	761	76,1
Gingivite	143	14,3	46	4,6	39	3,9	228	22,8
Parodontite	5	0,5	5	0,5	1	0,1	11	1,1
Total	512	51,2	276	27,6	212	21,2	1000	100

**Tableau III : modification de la flore buccale dans la gingivite**

l'espèce bactérienne	Santé gingivale et parodontale	La gingivite avant traitement parodontal	La gingivite après traitement parodontal
<i>Streptococcus</i>	42.0%	82%	65%
<i>Actinomyces</i>	39.7%	73%	48%
<i>Neisseria</i>	00.1%	54%	06%
<i>Lactobacillus</i>	02.6%	48%	24%
<i>Monococci</i>	13.8%	24%	05%
<i>Candida Albican</i>	00.0%	08%	00%

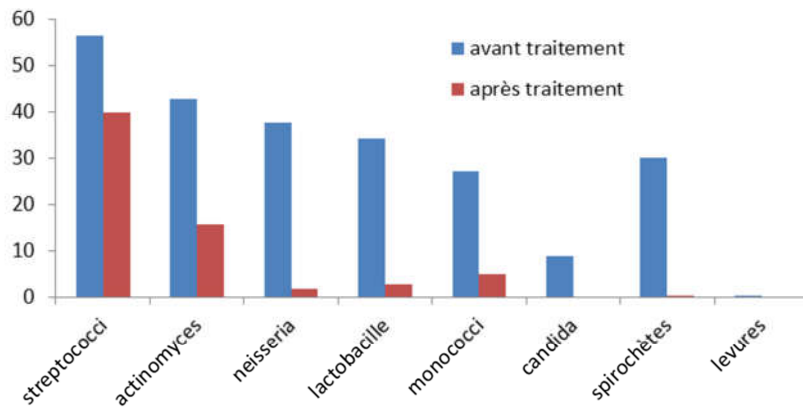


Figure 1 : Répartition des bactéries dans la parodontite (avant et après traitement)

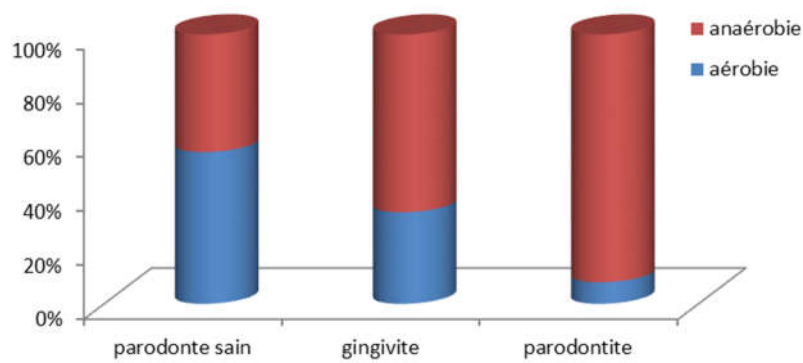


Figure 2 : répartition des bactéries aérobies et anaérobies dans la maladie parodontale.  
Coloration de Gram

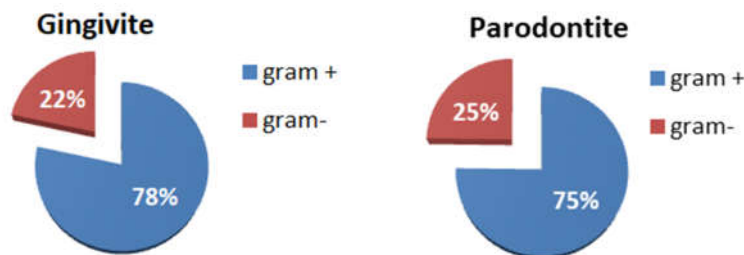


Figure 3 : répartition des bactéries dans la maladie parodontale selon la coloration de Gram

# ISOLEMENT DES ESPECES *CANDIDA* CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE STOMATITE PROTHETIQUE

Imane AZZOUNI<sup>1,2\*</sup>, Abdenasser RABAH<sup>3</sup>, Latifa HENAOUI<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Service Prothèse Dentaire Tlemcen

<sup>2</sup> Faculté de médecine – Université de Tlemcen, Algérie

<sup>3</sup> Centre Hospitalo Universitaire Tlemcen, Algérie

<sup>4</sup> Service d'Epidémiologie Tlemcen

Auteur correspondant : [azzounimene@gamil.com](mailto:azzounimene@gamil.com)

## RESUME

**Introduction** : La stomatite prothétique SP est une infection fréquente de la cavité buccale des sujets porteurs de prothèses dentaires, dont l'agent responsable serait le *Candida albicans*. L'étude avait pour but d'identifier les espèces *Candida* de la cavité buccale des patients appareillés atteints de la SP, du service de Prothèse Dentaire CHU Tlemcen.

**Méthodes** : La présente étude était descriptive, un total de 78 sujets atteints de SP, porteurs de prothèses complètes étaient sélectionnés. Un examen intra-buccal de tous les patients était réalisé. Les échantillons microbiologiques étaient prélevés des prothèses supérieures. Ensuite, ils étaient cultivés dans des milieux gélosés chromogéniques pour *Candida* pendant 24h à 30°C, pour être identifiés sur galerie Auxacolor.

**Résultats** : *Candida spp* étaient isolés dans 91 % des cas. *C. albicans* était l'espèce la plus retrouvée à 59%, suivi de *C. tropicalis* et de *C. glabrata*, en mono-espèce. L'association la plus fréquente était celle du *C. albicans*- *C. glabrata* à 14,1%.

**Conclusion** : Nos résultats ont démontré une fréquence élevée des espèces *Candida* chez les personnes appareillés qui souffraient de SP, avec une présence élevée du *Candida albicans*.

**Mots clés** : *Candida spp* - *Candida albicans* - Stomatite prothétique – Prothèse dentaire amovible.

## 1. INTRODUCTION

Rares sont les patients porteurs de prothèses dentaires amovibles qui rapportent des douleurs liées à la stomatite prothétique (SP), pourtant il s'agit d'une lésion sous prothétique courante chez les sujets appareillés, définit comme une pathologie liée au port prothétique se manifestant par un érythème et un œdème de la muqueuse sous prothétique, siégeant surtout au maxillaire supérieur. Elle peut se présenter selon 3 grades : localisé, généralisé et étendue. Elle peut aussi évoluer vers les voies oro-pharyngées et devient particulièrement dangereuse chez l'immunodéprimé. Son étiologie est multifactorielle, elle comprend des facteurs locaux et systémiques liés à l'hôte. Les causes d'une apparition de la SP sont dues : à une agression traumatique des prothèses dentaires, à un port prothétique continu, à une hygiène bucco-prothétique déficiente, et à la présence d'un biofilm prothétique. Celui-ci est représenté par une communauté de microorganismes mono ou pluri-espèces, structurée et complexe, encapsulée dans une matrice polysaccharidique attachée à une surface biotique vivante ou inerte abiotique formant des structures tridimensionnelles [1-3].

Depuis longtemps, les levures *Candida* sont associées à la SP, puisqu'elles sont isolées dans 70 à 90% chez des patients diagnostiqués [4-8]. D'après Loster, toute prothèse insérée en bouche est colonisée par *Candida spp* [9]. Les espèces *Candida* sont des levures naturellement présentes, en faible quantité, dans la microflore commensale de la sphère oro pharyngée, et sont considérées comme les seuls espèces fongiques résidant dans la cavité buccale humaine [10], sous forme de blastospores (*Candida albicans* est retrouvé dans 30% des cas sur une muqueuse saine), cellules rondes bourgeonnantes de plus ou moins 4 µm de diamètre [11, 12]. Cependant, en présence d'un déséquilibre de la flore microbienne (hygiène insuffisante, pH acide) ou d'un affaiblissement du système immunitaire, il se produit une multiplication des blastospores, en quantité plus importante.

Le *Candida albicans*, levure invasive, est l'espèce la plus communément isolée des prothèses et du palais des patients atteints de SP [7, 13-15], de ce fait, elle est reconnue comme facteur étiologique majeur de la SP [2], même si diverses études ont isolé d'autres espèces de *Candida*, comme *C.*

*dublinskiensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et surtout *C. glabrata* [5, 6, 14, 16]. Le *C. albicans* produit plus de biofilm avec une architecture plus complexe comparé aux autres espèces *Candida*, moins de 10% des souches *albicans* en produisent contre 80% des souches *non albicans* [11].

## 2. MATERIELS ET METHODES

Notre étude descriptive avait pour objectif l'identification des espèces *Candida* présentes à la surface des prothèses dentaires appartenant à 78 patients édentés complets bi maxillaires atteints de stomatite prothétique, venant consultés au service de Prothèse Dentaire CHU de Tlemcen.

### a. Ecouvillonnage de l'intrados de la prothèse maxillaire

Après retrait de la prothèse supérieure en dehors de la bouche, un triple écouvillonnage de l'intrados prothétique était réalisé contre la surface interne de la prothèse, en regard du palais supérieur, en effectuant un mouvement d'un tour de 360° pour chaque zone (Figure 1). L'écouvillon était acheminé instantanément au laboratoire de Mycologie Médicale CHU Tlemcen pour être traité dans les 30 minutes suivant la collecte.

### b. Examen du Prélèvement au laboratoire de Mycologie

Une suspension était préparée pour chaque échantillon de frottis, en trempant l'écouvillon contaminé dans 1ml d'eau physiologique, pour être soumis à 1000 tours/min pendant 30 secondes afin de décharger le contenu microbien et de maximiser l'homogénéité de la suspension.

#### – Culture des levures sur milieu chromogène

100µl était étalée sur milieu de culture chromogène pour levures dans une boîte de Pétri. La lecture des résultats s'effectuait après incubation de 48h à 37°C. La culture était déclarée positive, s'il y avait croissance de 10 colonies de levures et plus. Le *Candida* étant un commensal de la bouche, il était possible de retrouver quelques colonies.

#### – Pré identification des souches *Candida*

Le milieu chromogène permet une coloration variée des colonies à la suite de leur dégradation par des enzymes spécifiques aux espèces. Les évaluations microbiologiques qualitatives ont pu identifier certaines espèces *Candida* en enregistrant la couleur et les caractéristiques morphologiques des colonies (Figure 2).

Ce milieu chromogène avait permis :

- Un isolement sélectif des colonies, indiquant la présence d'une ou de plusieurs espèces
- Une identification directe du *Candida albicans*
- Et une identification présomptive (orientation) des autres espèces non-albicans

#### – Identification des souches *Candida non-albicans* par test complémentaire

Les identifications des espèces non-albicans étaient confirmées par une méthode conventionnelle grâce aux tests biochimiques. Des colonies distinctes étaient repiquées sur gélose Sabouraud/Chloramphénicol et incubées pendant 48 h à 37°C. Les morphotypes uniques étaient identifiés à l'aide d'un panel de tests biochimiques de la galerie AUXACOLOR.

Une suspension de chaque culture était préparée avec l'eau physiologique, et amenée à une absorbance de 1,5 MacFarland. 100µl de l'inoculum était distribuée dans chaque puits de la galerie. Après incubation de 48h à 37°C, la lecture des résultats aboutissait à l'obtention d'un code à cinq chiffres, dont la correspondance était représentée sur une base de données des levures.

## 3. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans 91 % de nos examens mycologiques (71 prothèses) (Figure 3), *Candida spp* était identifié comme un organisme responsable de la SP cela rejoint l'avis de beaucoup d'auteurs [13, 17]. En effet, une fréquence élevée des espèces *Candida* était retrouvée chez les porteurs de prothèses dentaires atteints de SP [18, 19]. De nombreux chercheurs ont signalé une augmentation significative de la prévalence et de la densité des espèces *Candida*, ainsi que la présence d'hyphes candidales indiquant une infection

fongique chez les patients atteints de SP par rapport aux patients témoins porteurs de prothèses dentaires qui n'en souffrent pas [20, 21].

Nous relevons aussi que 07 de nos prothèses maxillaires (9%) (Figure 3) ne comportaient aucune croissance de levures, de même pour Figueiral et al 2007 [13] qui enregistra 05 prothèses sans croissance fongique, a contrario Naggal et al 2014 [22] a pu isoler les *Candida* chez 100% des patients diagnostiqués avec une SP. En effet, les microorganismes oraux changent après le port de la prothèse dentaire et cette condition favorise la croissance des organismes responsables de la SP [21].

Dans notre étude, l'infection par *Candida* montrait majoritairement une implication fongique par mono- espèce dans 73% des cas, où la contamination était purement due à une espèce unique rapportée comme prédominante dans plusieurs études mycologiques [1, 6, 13, 23, 24] (Figure 4).

A l'inverse, l'infection peut résulter de plusieurs espèces en association, on évoque ici la participation de deux et parfois trois espèces différentes faisant participer *Candida albicans*+ *Candida glabrata*, *C.albicans* + *C. tropicalis*, *C.glabrata*+ *C. tropicalis*, ou *C.albicans* + *C.tropicalis* +*C.glabrata* [6, 24] (Figure 5). Ce résultat sans certitude statistique annonce que *Candida albicans* n'est pas le seul agent infectieux de la SP contrairement à ce qui est classiquement décrit dans ce contexte.

Dans notre étude les espèces *Candida* prédominantes identifiées, dans un ordre décroissant, étaient *Candida albicans* 59,1% (n=42), suivi de *Candida tropicalis* 9,9% (n=7), *Candida glabrata* 4,2% (n=3) (Figure 5). A ce titre, toutes ces espèces sont citées par d'innombrables études sur la SP [1, 6, 17, 25-28]. *Candida albicans* était l'espèce la plus fréquemment isolée dans notre enquête, et cette constatation s'est confirmée par d'autres études mycologiques, qui rapportent une prévalence de 40 à 60% [24, 29-32]. Grâce à leur constatation significative, les enquêteurs ont pu conclure l'existence d'une relation avérée entre le taux de *Candida albicans* et la SP, faisant de cette levure un facteur important dans le développement de la lésion. *Candida tropicalis* était la deuxième espèce à être détectée par notre analyse, ceci rejoint les résultats de Pereira et al [32], et diffère des résultats précédents puisque le *Candida glabrata* était cité en deuxième place après le *Candida albicans* [1, 6, 25-28].

Parmi nos résultats, l'association la plus fréquente impliquait deux types d'espèces : *Candida albicans* et *Candida glabrata* retrouvées dans 14,1%. *Candida albicans* et *Candida tropicalis* étaient isolées dans 5,6%, et *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* étaient identifiées dans 5,6%. Une contamination par une association de trois espèces *C.albicans*, *C.glabrata* et *C.tropicalis* résultait de cette étude à 5,6% (Figure 5). Coco et al avait remarqué une virulence de cette association *Candida albicans* et *Candida glabrata* et avait noté une fréquence entre 20 à 80% selon le grade de la lésion [6]. Les chercheurs s'accordent pour approuver la présence d'un agent étiologique microbien, mettant en cause une origine fongique confirmée [22, 33] et une participation bactérienne par le biais d'un biofilm prothétique [13, 20, 25, 34-37]. *Candida albicans* et l'interaction bactérienne se sont révélés être des facteurs importants contribuant à l'apparition de la stomatite liée à la prothèse dentaire. Selon certains chercheurs, le biofilm prothétique se compose de microorganismes bactérien et fongique [25, 38, 39]. A J2 (à deux jours de l'insertion en bouche d'une nouvelle prothèse), Merdes [25] a démontré un résultat fongique négatif qui est dû à une colonisation d'abord bactérienne par des *Streptocoques* surtout *Streptococcus mutans*, indispensable à la fixation des autres bactéries et du *Candida albicans* sur la surface acrylique, en revanche dès le 7<sup>em</sup> jour de l'insertion une forte dynamique des microorganismes sur les prothèses était constaté.

La capacité élevée des espèces *Candida* à adhérer aux muqueuses serait accrue grâce à la transition des blastospores en hyphes, caractéristique spécifique au *C. albicans* En effet, cette espèce est connue pour avoir un « phenotypic switching » élevé, qui lui permet de changer de morphologie dans des conditions inhabituelles au commensalisme, en se transformant en pseudo-filaments et filaments mycéliens compatibles avec l'invasion de la muqueuse buccale.

Pereira et al[32] a comparé les facteurs de virulence de la souche *Candida albicans*, et a pu conclure qu'elle : Était la seule espèce capable de sécréter toutes les enzymes ensemble, formait un biofilm et produisait plus de facteurs de virulence.

En Résumé, cette étude rejoint les études faites sur la SP et vient encore appuyer le rôle important des levures dans la genèse de la lésion notamment du *Candida albicans* et précise qu'elle ne peut être la seule responsable. Elle montre clairement que les associations de levures sont non négligeables et peuvent laisser penser à un rôle synergique qui ne peut être confirmé dans ce travail.

#### 4. CONCLUSION

Les prothèses dentaires amovibles ne sont pas des dispositifs inoffensifs, le succès d'un traitement prothétique exige de la part du praticien une compréhension des changements pathologiques possibles qui risquent de survenir après l'insertion en bouche.

Nos résultats ont démontré une fréquence élevée de *Candida spp* chez les personnes appareillées qui souffraient de stomatite prothétique, avec une forte présence du *Candida albicans*, qui nous interpelle 59%, et une participation par plusieurs espèces qui n'est pas écartée, pourtant ce problème n'attire pas trop l'attention des professionnels, puisqu'il n'existe pas un consensus sur la prise en charge ou sur la prévention de cette lésion candidosique souvent récidivante. Voilà pourquoi il est du devoir du praticien de sensibiliser davantage les patients au suivi du traitement prothétique par les visites périodiques.

#### REMERCIEMENTS

Au service de prothèse dentaire CHU Tlemcen

Au service de Mycologie Parasitologie CHU Tlemcen

#### REFERENCES

1. Sebaa, S., *Inhibition des biofilms à Candida albicans : recherche de nouvelles approches thérapeutiques*, in Thèse. 2017.
2. Gendreau, L. and Z.G. Loewy, *Epidemiology and etiology of denture stomatitis*. J Prosthodont, 2011. **20**(4): p. 251-60.
3. Von Fraunhofer, J.A. and Z.G. Loewy, *Factors involved in microbial colonization of oral prostheses*. Gen Dent, 2009. **57**(2): p. 136-43; quiz 144-5.
4. Pires, F.R., et al., *Denture stomatitis and salivary Candida in Brazilian edentulous patients*. J Oral Rehabil, 2002. **29**(11): p. 1115-9.
5. Salerno, C., et al., *Candida-associated denture stomatitis*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2011. **16**(2): p. e139-43.
6. Coco, B.J., et al., *Mixed Candida albicans and Candida glabrata populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis*. Oral Microbiology and Immunology, 2008. **23**(5): p. 377-383.
7. Gade, J., P. Vinay singh, and S. Nikita, *Review on Denture Stomatitis Classification, clinical features and treatment*. Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS) 2015.
8. Webb, B.C., et al., *Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity*. Aust Dent J, 1998. **43**(1): p. 45-50.
9. Loster, B.W., et al., *Mycological analysis of the oral cavity of patients using acrylic removable dentures*. Gastroenterology Research and Practice, 2012(1687-630X (Electronic)).
10. Amanlou, M., et al., *Miconazole gel compared with Zataria multiflora Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis*. Phytother Res, 2006. **20**(11): p. 966-9.
11. Ahariz, M., I. Loeb, and P. Courtois, *Candidoses orales et prothèses dentaires*. Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale, 2010. **111**(2): p. 74-78.
12. Maret, D., et al., *Prélèvements buccaux en pratique clinique*. EMC - Odontologie, 2012.
13. Figueiral, M.H., et al., *Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort*. J Oral Rehabil, 2007. **34**(6): p. 448-55.
14. Hoshing, C.D., Santosh; Mootha, Ajay; Diwan, Nikhil. , *Role of Candida albicans in Denture Stomatitis*. Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology 2011. **Vol. 23, N° 4**: p. 617-619.
15. Budtz-Jorgensen, E., et al., *Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility*. Community Dent Oral Epidemiol, 2000. **28**(2): p. 141-9.
16. Petrović, M., et al., *Therapeutic alternatives of natural compounds in treatment of Candida-associated denture stomatitis*. Acta medica Medianae, 2014. **vol. 53, br. 1, str. 73-79**

17. Sivaramakrishnan, G. and K. Sridharan, *Alternatives to antifungal therapy for denture stomatitis: A systematic review and meta-analysis*. Saudi Journal of Oral Sciences, 2017.
18. Gauch, L.M.R., et al., *Isolation of Candida spp. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil*. Brazilian Journal of Microbiology, 2018. **49**(1): p. 148-151.
19. Aoun, G. and A. Cassia, *Evaluation of Denture - Related Factors Predisposing to Denture Stomatitis in a Lebanese Population* Materia socio-medica, 2016. **28**(5): p. 392-396.
20. Karthikeyan, S., T. Fernandez, and P. Deepthi, *Denture Stomatitis: A Brief Review*. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 2016.
21. Naik, A.V. and R.C. Pai, *A study of factors contributing to denture stomatitis in a north Indian community*. Int J Dent, 2011. **2011**: p. 589064.
22. Nagaral, S., R.G. Desai, and A.K. Patil, *Isolation of Candida species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers*. The journal of contemporary dental practice, 2014.
23. Emami, E., *Relation entre la commutation phénotypique de Candida albicans et la stomatite prothétique*, in *Département de dentisterie de restauration -Faculté de médecine dentaire*. 2005, Mémoire pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences biomédicales -Option réhabilitation prosthodontique- Université de Montréal.
24. Barbeau, J., et al., *Reassessing the presence of Candida albicans in denture-related stomatitis*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2003. **95**(1): p. 51-59.
25. Merdes, L., *DYNAMIQUE DE COLONISATION MICROBIENNE DES PROTHESES ADJOINTES COMPLETES :étude comparative de deux protocoles d'hygiène chez des sujets édentés complets appareillés*, in *Département de Chirurgie Dentaire - Faculté de ANNABA*. 2009, Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Université BADJI MOKHTAR ANNABA. p. 255.
26. Bilhan, H., et al., *The role of Candida albicans hyphae and Lactobacillus in denture-related stomatitis*. Clin Oral Investig, 2009. **13**(4): p. 363-8.
27. Darwazeh, A.M., S. Al-Refai, and S. Al-Mojaiwel, *Isolation of Candida species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers*. J Prosthet Dent, 2001. **86**(4): p. 420-3.
28. Zomorodian, K., et al., *Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers*. Medical Mycology, 2011. **49**(2): p. 208-211.
29. Savignac, K., *Stomatite prothétique, candidose orale et leur évolution dans le temps*, in *Departement de dentisterie de restauration 2011*, Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en médecine dentaire -Université de Montréal
30. Pereira-Cenci, T., et al., *Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights*. Journal of Applied Oral Science, 2008. **16**: p. 86-94.
31. Di Stasio, D., et al., *Management of denture stomatitis: a narrative review*. J Biol Regul Homeost Agents, 2018. **32**(2 Suppl. 1): p. 113-116.
32. Pereira, C.A., et al., *Production of virulence factors in Candida strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016. **85**(1): p. 66-72.
33. Kulak-Ozkan, Y., E. Kazazoglu, and A. Arikan, *Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people*. J Oral Rehabil, 2002. **29**(3): p. 300-304.
34. Čanković, M., et al., *Prevalence and possible predictors of the occurrence of denture stomatitis in patients older than 60 years*. VOJNOSANITETSKI PREGLED, 2017: p. 311.
35. Khare, P., et al., *Assessment of denture stomatitis in removable denture wearers and its correlation with variable factors such as age, gender, length of denture use and nocturnal dental care*. Indian Journal of Anatomy and Surgery of Head, 2017.
36. Abduljabbar, T., et al., *Efficacy of photodynamic therapy in the inactivation of oral fungal colonization among cigarette smokers and non-smokers with denture stomatitis*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017. **18**: p. 50-53.
37. Altarawneh, S., et al., *Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of Candida albicans, salivary flow, and dry mouth*. Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists, 2013. **22**(1): p. 13-22.
38. Saadat, M., *Candida species and inflammation mediators in denture stomatitis: detection in biological samples*. 2017, Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences . Université de Montréal.
39. Chopde, N., et al., *Microbial colonization and their relation with potential cofactors in patients with denture stomatitis*. Journal of Contemporary Dental Practice, 2012. **13**(4): p. 456-459.

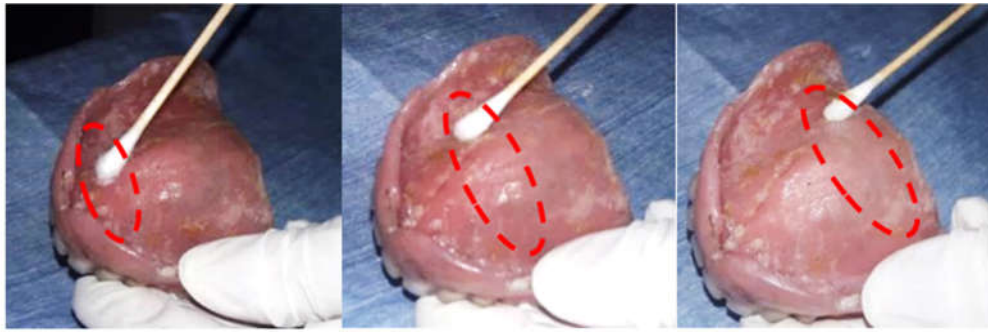


Figure 1: Prélèvement prothétique sur trois zones (ligne rouge en pointillé) : antérieure, moyenne et postérieure du palais

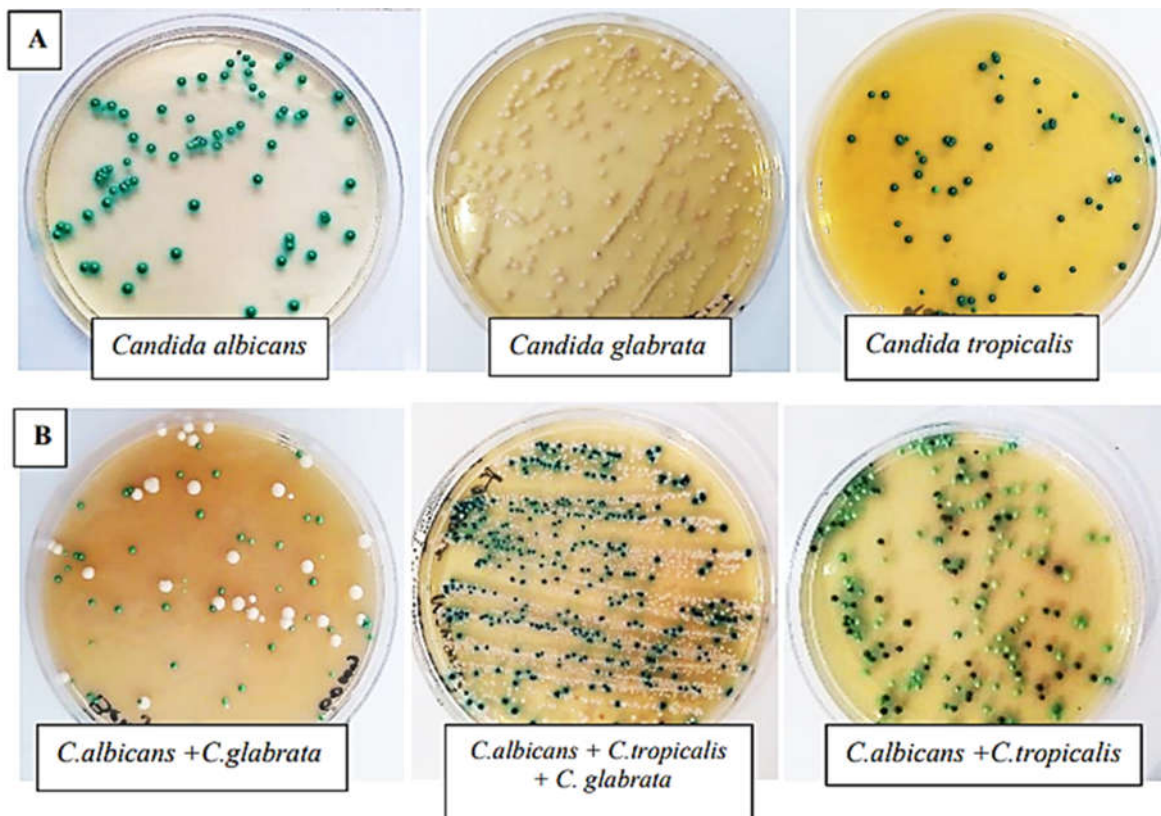


Figure 2 : *Candida* sur milieu chromogène :(A) mono-espèce, (B) pluri espèces



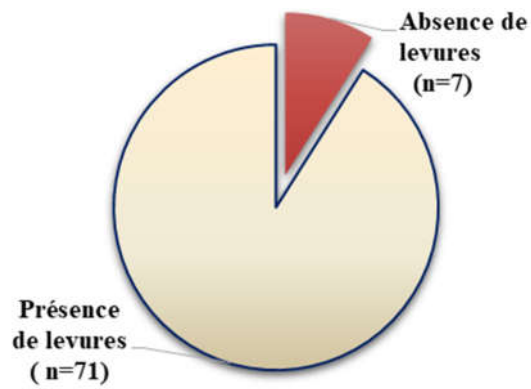


Figure 3 : Isolement des *Candida* spp. n=78

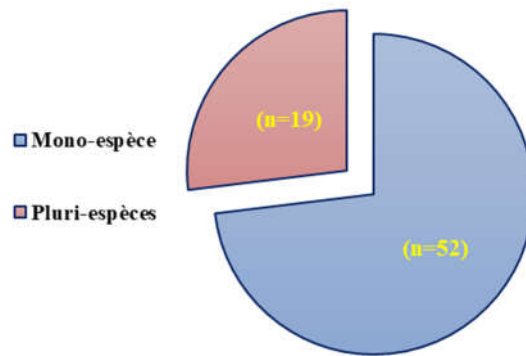


Figure 4: *Candida* spp isolées des prothèses maxillaires. n= 71



Figure 5: Fréquence des *Candida* spp sur les prothèses dentaires. n= 71

# COVID-19 PANDEMIC: A SURVEY STUDY ANALYSIS

Ilyes ZATLA<sup>1\*</sup> & Lamia BOUBLENZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Microbiology applied to the Food industry, Biomedical and the Environment, Faculty of Natural and Life Sciences, Earth and Universe Sciences. Department of Biology. University of Tlemcen, Algeria.*

\* *Author for correspondence: [ilyes.zatla@univ-tlemcen.dz](mailto:ilyes.zatla@univ-tlemcen.dz)*

## ABSTRACT

### Background

SARS-CoV-2 is a highly pathogenic and transmissible respiratory virus that causes COVID-19 disease, with rising cases and deaths worldwide, unknown long-term consequences after infection, and a hopeful array of available vaccines. The COVID-19 pandemic has affected both our physical and mental health, leaving scarred lesions on both, and the aim of our study was to assess the impact of this virus and its disease on individuals' social behavioral status and the acceptability of its impact evaluate.

### Methods

A survey was conducted with 48 chained questions disseminated online on Google Forms platform and data collected and analyzed with SPSS version 23.

### Results

The results obtained showed that most of the participants followed the procedures to prevent the infection, only a few of them were or have been infected. Few confirmed infection with COVID-19 tests and most of them noticed symptoms after infection. Also, the majority of the participants believed in the virus, but few of them were vaccinated, and others completely refused any vaccination.

### Conclusion

This pandemic has had many negative effects on our normal being, the disease and its sequelae, rumors about the virus or COVID-19 vaccines keep affecting our mental health, and returning to normal would be even more difficult.

**Key-Words:** COVID-19, SARS-CoV-2, Impact, Pandemic, Survey.

## 1. INTRODUCTION

The SARS-CoV-2 virus has spread rapidly around the world, resulting in many infected individuals and numerous deaths [1], with multiple healthcare systems around the world facing insufficient resources [2]. We are in the midst of an acute health crisis brought on by COVID-19, with the precious resources of even the advanced economies being stretched to the limit. For the same reason, understanding the potential long-term complications of this novel virus is of paramount importance so that healthcare systems are prepared to face such challenges in the not-too-distant future [3].

It was a remarkable chapter in vaccine development with far-reaching collaboration and partnership in the race against the virus [4]. Despite this, it is also known that psychological factors play an important role in compliance with public health measures such as vaccination and how people cope with the threat of infection and the resulting casualties [5].

## 2. METHODS

A survey of 48 self-administered questions was designed on the Google Forms platform, aimed at an investigation of the COVID-19 pandemic, containing questions on sociodemographic characteristics, the novel human coronavirus SARS-CoV-2, its transmission and symptoms, and the preventive measures taken during the pandemic and also some others related to the treatments and vaccinations used. Most of the questions consisted of closed-ended questions, where participants had a predetermined set of answers to choose from (binary answer, list of single/multiple answer options) and open-ended questions, where they could answer in their own words.

The survey was shared via social media with a brief introduction to encourage participation, gain speed and reach benefits, and achieve automation for different age groups, different educational levels,

and different population groups around the world, the data was collected and analyzed with SPSS over a 3 year period months since the survey started on June 15th and closed on September 15th, 2021.

### **3. RESULTS**

#### **1.1. According to gender and age**

516 people responded to our survey investigating the COVID-19 pandemic, 38.8% male and 61.2% female, ranging in age from 20-30 (43.2%) to 70-80 (1%) .

#### **3.2. According to weight and chronic diseases**

Only 27.7% of the participants were overweight and 21.1% had chronic diseases, usually asthma or heart disease.

#### **3.3. According to virus knowledge**

Out of the totality of our respondents, most (93.6%) believed in the SARS-CoV-2 virus, 61.9% of women versus 38.1% of men and 35.3% of respondents decided it is one natural pathogen, 22.6% consider it a laboratory-made one and surprisingly 42.1% consider it a mixture of the two, referring to a natural laboratory-engineered virus. 4% of applicants opted for the coronavirus to be transmitted sexually, 10.5% opted for blood transmission, most of them (92.2%) opted for oral or aerosol transmission and 45%, 46 5% chose transmission through surfaces and hand contamination, but only 11.8% chose transmission through feces.

#### **3.4. According to prevention**

78.3% of the candidates have taken preventive measures against the virus to reduce the risk of infection and 16.8% of them have sometimes taken them, such as mask (91.9%) or the hygiene measures (88.3%) such as washing hands (96.9%), applying hydroalcoholic gel (77.7%) or cleaning surfaces and shopping (65.7% and 48.8% respectively).

#### **3.5. According to prevention using face masks**

In our survey, 58.9% of members believed that a mask could prevent the virus from entering the airways and 20.7% were unsure and had doubts, but 20.3% denied its function against delaying or preventing the intrusion of the virus. Also, 34.3% didn't notice or had no idea if wearing the mask was associated with more or less infection, and 20.4% of participants said it increased the risk of infection, while 45.4% of participants said it did they increase the risk of infection. 3% said it limited or reduced the risk of other respiratory diseases. In addition, 84.3% of the participants chose not to have had any other respiratory illness other than COVID-19 since the start of the pandemic, with 39.1% correlating this with previous preventive hygiene measures, while 31.1% had no idea and 29, 7% of them denied this connection.

#### **3.6. According to infection rate, testing, and symptoms**

Most of the respondents, 61.6%, did not contract the virus, 12.6% had doubts and 25.8% got it, confirmed by the symptoms they got or the tests they took to have; 42.9% could be tested with tests such as RT-PCR 54.5%, serological tests 26.6%, rapid test kit 27.9%, antigen tests 24.7% or chest CT 8.4%. 25.8% of the respondents were confirmed infected, most had mild fever-like symptoms and a loss of smell and taste (48.9% and 46.3% respectively), some also had vomiting and diarrhea symptoms (20.7%) while surprisingly 13.3% had an asymptomatic infection and unfortunately 14.4% had severe symptoms including pneumonia.

#### **3.7. According to treatments**

Only 31.2% of respondents used treatments, with 52% of people using them in a preventive way, 29.6% in a curative way and 25.1% in both cases; 68.9% of them used drugs such as vitamin supplements (83.5%), antibiotics (35.1%), mainly Zithromax, antipyretics (26.8) and corticosteroids (11.3%), while 62.1% used natural herbs used and various essential oils.

#### **3.8. According to vaccines**

More than half of our participants did not receive a COVID-19 vaccine (59.3%) and the rest of the subject 30.6% wished to get vaccinated in the future, with vaccines like Pfizer being the leading choice (60th .9%), followed by Moderna with (28.8%) and AstraZeneca in third place with (16.1%) answers, or

others like Sputnik V, Sinovac and Novavax and Janssen (Johnson and Johnson); and 32.6% chose not to be vaccinated during this period, but 36.8% refused a COVID-19 vaccine outright, while 40.7% were vaccinated.

### **3.9. According to the impact of the pandemic**

In the final open-ended question, 72.3% of respondents agreed to changing their social or hygiene habits, practicing more distancing than usual, or washing their hands more frequently, but 27.7% said it had no impact on their Habits have been alive since the pandemic began.

## **4. DISCUSSION**

As shown by our gender results, 38.8% are men and 61.2% are women. This analysis supports several studies suggesting that women typically respond more frequently than men [6], and that women typically tend to respond in greater numbers [7].

The sad truth about every health disaster is accompanied by a deluge of misinformation and conspiracy theories, and sadly this novel coronavirus pandemic is no exception [8] and previous research shows that the proliferation of conspiracy theories during a pandemic is not a new phenomenon [5], and disinformation about science, technology and health is neither new nor unique to COVID-19. A study analysis suggests that misinformation about COVID-19 comes in many different forms from many different sources and makes many different claims [9]. While many people downplayed the danger of COVID-19, calling it no worse than the flu or the effects of the 5G network, others claimed it was intentionally manufactured and distributed as a bioweapon to reduce population or gain political and economic benefits, and 42.1% consider it a mixture of both, referring to a natural, laboratory-engineered virus.

To contain this pandemic infection rate of COVID-19, preparedness would play an important role [10]. There is evidence that people who think they have had COVID-19 are less likely to adhere to protective behaviors, as those who thought they had COVID-19 were also more likely to believe they had some immunity to it had virus [11]. Hopefully our results show that more than 3/4 of our participants took the necessary preventive measures against the virus, as minimizing personal contact and hand disinfection are mandatory to limit the spread of viral diseases in the community [12].

In the event of an emerging infectious respiratory disease outbreak, face masks and respirators can be the ultimate protection in the absence of medical intervention [13]. These masks would provide a physical barrier and reduce penetration of aerosolized virus molecules by incoming droplets and aerosols from infected individuals [14], and several laboratory studies have already shown that surgical and homemade masks are reasonably effective at limiting exhaled particles and preventing inhalation of particles from others to protect [15]. 58.9% of our survey participants agreed with these studies and believed in the effectiveness of the face mask in preventing the virus from entering, although there were many conflicting opinions about it. Regarding the use of face masks, the physical barrier can also prevent contact transmission such as hand to face, mouth or nose [13].

Hospitalized patients with asthma, heart, lung and kidney disease, malignancy and dementia, cardiovascular disease, hypertension, diabetes, respiratory disease and cancer have been linked to an increased risk of death from COVID-19 in a large Chinese study the degree of obesity [16] showing a correlation between being overweight and having a chronic disease with death from COVID-19, while in our survey a very low percentage of 27.7% of the participants were overweight and 21.1% had chronic diseases, which perhaps explains the low mortality rate.

The symptoms of patients infected with SARS-CoV-2 range from minimal symptoms to severe respiratory and/or multiple organ failure airways and lungs as well as heart, kidneys, intestines and others [17, 18]. It is now generally accepted that the respiratory symptoms of COVID-19 are extremely heterogeneous, ranging from mild symptoms to significant hypoxia in ARDS, in addition to headache, dizziness, generalized weakness, vomiting and diarrhea. 9% and 46.3% respectively) and some also had vomiting and diarrhea (20.7%), while surprisingly 13.3% had asymptomatic infection and unfortunately 14.4% had severe symptoms including pneumonia.

Long covid, is a term used to describe illnesses in people who have either recovered from COVID-19 but are still reporting lingering effects of the infection or have had the usual symptoms for much longer than expected [19].

Recent data suggest that many patients have persistent respiratory symptoms months after their initial illness, and other studies have examined the long-term effects of ARDS [20]. It is hypothesized that, in the long term, a significant number of patients with COVID-19 will suffer from lung dysfunction, residual lung parenchymal abnormalities, decreased exercise capacity, loss of muscle mass, anxiety, depression, cognitive deficits, post-traumatic stress disorder, fatigue and poor health [21].

Physicians and patients around the world are currently discussing the potential value of many other drugs and treatment options, but the evidence for most remains thin and often anecdotal, with the result that many have not progressed to large national or international treatment studies [22]. In our survey, 68.9% of participants were taking medications, particularly vitamin supplements (83.5%), where a study showed that among the whole vitamins, the role of vitamins A, C, D, and E is more clearly defined and potentially more effective acts on the immune system and emphasizes the importance of vitamins in the prevention of viral infections, including COVID-19 [23]. Or antibiotics (35.1%) such as azithromycin, although there is no clear evidence that it exerts beneficial effects in COVID-19 beyond antibacterial activity in bacterial superinfection [24].

The COVID-19 vaccines are divided into four main categories using different platforms: whole virus vaccines, protein-based vaccines, viral vector vaccines and nucleic acid vaccines [25]. Several factors must be considered before a vaccine becomes widely available to ensure vaccine safety and efficacy and to produce sufficient doses to achieve herd immunity [26]. Both the willingness and the reluctance to be vaccinated are increasing in individual societies. According to a survey result, there is considerable social resistance to the COVID-19 vaccination; fueled by widespread misinformation, vaccination hesitancy has quickly become one of the most important global health issues of our time [27], and conspiracy beliefs only reduce vaccination intentions [28] as more than half of our survey participants did not get vaccinated (59.3%), while 40.7% were.

## **5. CONCLUSION**

Living with COVID-19 has become our new normal, acting and reacting to information about the virus, its illness and how to prevent it has become an obsession. For this survey, most of the participants believed in this novel coronavirus and followed the necessary implications of the hygiene measures to prevent the virus from spreading and protect one from infection, only a few of them confirmed their infection with the SARS-CoV-2 virus and most of them have been left with scars on both their physical and mental health due to long covid. However, most of them did not receive COVID-19 vaccine due to much confusion and fear of false social media reports.

The SARS-CoV-2 virus exists and so does its COVID-19 disease, it surrounds us and everywhere, we should all be vigilant of the infection, far from the rumors of its nature or origin. Crucial global data on vaccination, post-vaccination and long Covid status is needed everywhere for people to understand how to act at the heart of a major health crisis.

## **ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE**

All respondents have read and approved this phrase on top of the survey that was approved by the Scientific committee of the University of Tlemcen: "Once you respond to this survey, you are consenting to have your survey responses included in this research, without a trace back to the individual."

## **REFERENCES**

1. Usher K, Durkin J, Bhullar N. The COVID-19 pandemic and mental health impacts. *Int. J. Mental Health Nurs.* 2020; 29(3):315–8.

2. Filip R, Anchidin-Norocel L, Gheorghita R, Savage WK, Dimian M. Changes in Dietary Patterns and Clinical Health Outcomes in Different Countries during the SARS-CoV-2 Pandemic. *Nutrients*. 2021; 13(10):3612.
3. Dasgupta A, Kalhan A, Kalra S. Long term complications and rehabilitation of COVID-19 patients. *J. Pak. Med. Assoc.* 2020; 1.
4. Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, Flight KE, Higham SL, Lemm N-M, et al. Vaccines for COVID-19. *Clin. Exp. Immunol.* 2020; 202(2):162–92.
5. Cullen W, Gulati G, Kelly BD. Mental health in the COVID-19 pandemic. *QJM*. 2020; 113(5):311–2.
6. Porter SR, Whitcomb ME. Non-response in student surveys: The Role of Demographics, Engagement and Personality. *Res. High. Educ.* 2005; 46(2):127–52.
7. Kanuk L, Berenson C. Mail Surveys and Response Rates: A Literature Review. *J. Mark. Res.* 1975; 12(4):440.
8. Aiyewumi O, Okeke MI. The myth that Nigerians are immune to SARS-CoV-2 and that COVID-19 is a hoax are putting lives at risk. *J. Glob. Health.* 2020; 10(2).
9. Imhoff R, Lamberty P. A Bioweapon or a Hoax? The Link Between Distinct Conspiracy Beliefs About the Coronavirus Disease (COVID-19) Outbreak and Pandemic Behavior. *Soc. Psychol. Personal. Sci.* 2020;11(8):1110–8.
10. Brennen JS, Simon FM, Nielsen RK. Beyond (Mis)Representation: Visuals in COVID-19 Misinformation. *Int. J. Press Polit.* 2021; 26(1):277–99.
11. Pradhan D, Biswasroy P, Kumar Naik P, Ghosh G, Rath G. A Review of Current Interventions for COVID-19 Prevention. *Arch. Med. Res.* 2020; 51(5):363–74.
12. Smith LE, Mottershaw AL, Egan M, Waller J, Marteau TM, Rubin GJ. The impact of believing you have had COVID-19 on self-reported behaviour: Cross-sectional survey. *PLoS ONE*. 2020; 15(11):e0240399.
13. Lakshmi Priyadarsini S, Suresh M. Factors influencing the epidemiological characteristics of pandemic COVID 19: A TISM approach. *Int. J. Healthc. Manag.* 2020; 13(2):89–98.
14. MacIntyre CR, Chughtai AA. Facemasks for the prevention of infection in healthcare and community settings. *BMJ*. 2015; 350:h694–h694.
15. Zatlá I, Boublenza L, Hassaine H. Therapeutic and preventive approaches against COVID-19: a review. *RRJoMV*. 2021; 11(3):26-33.
16. The OpenSAFELY collaborative, Williamson E, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, et al. OpenSAFELY: factors associated with COVID-19-related hospital death in the linked electronic health records of 17 million adult NHS patients. *Nature*, 2020; 584(7821): 430–436
17. Zatlá I, Boublenza L, Hassaine H. Infection and viral pathogenesis of SARS-CoV-2: a review. *RRJoMV*. 2022; 12(2):17-23.
18. Higgins V, Sohaei D, Diamandis EP, Prassas I. COVID-19: from an acute to chronic disease? Potential long-term health consequences. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2021; 58(5):297–310.
19. Mahase E. Covid-19: What do we know about “long covid”? *BMJ*. 2020; m2815.
20. Fraser E. Long term respiratory complications of covid-19. *BMJ*. 2020; m3001.
21. van den Borst B, Peters JB, Brink M, Schoon Y, Bleeker-Rovers CP, Schers H, et al. Comprehensive Health Assessment 3 Months After Recovery From Acute Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 2021; 73(5):e1089–98.
22. Baraniuk C. Where are we with drug treatments for covid-19? *BMJ*. 2021; n1109.
23. Jadhao AG, Magar VB. Various Symptoms, Prevention and Treatments of Corona-virus (Covid-19). *AJPRD*. 2021; 9(6):90–7.
24. Sultana J, Cutroneo PM, Crisafulli S, Puglisi G, Caramori G, Trifirò G. Azithromycin in COVID-19 Patients: Pharmacological Mechanism, Clinical Evidence and Prescribing Guidelines. *Drug Saf.* 2020; 43(8):691–8.
25. Dai L, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21(2):73–82.

26. Ndwandwe D, Wiysonge CS. COVID-19 vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2021; 71:111–6.
27. Feleszko W, Lewulis P, Czarnecki A, Waszkiewicz P. Flattening the Curve of COVID-19 Vaccine Rejection—An International Overview. *Vaccines.* 2021; 9(1):44.
28. Bruder M, Kunert L. The conspiracy hoax? Testing key hypotheses about the correlates of generic beliefs in conspiracy theories during the COVID -19 pandemic. *Int. J. Psychol.* 2021.

# STUDY OF THE QUALITY ASSURANCE AND TRACEABILITY OF KEBAB MARKETED IN MASCARA

Rym Nouria BENAMARA<sup>1,2</sup>, Nasria BENAMARA<sup>3</sup>, Fatima Zohra BENAÏSSA<sup>1</sup>, Kheira BENKRAMA<sup>1</sup>, Mirvette BENFRÉHA-BENYELLES<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Faculty of Natural and Life Sciences, Mustapha Stambouli University, Mascara, Algeria

<sup>2</sup> Laboratory of Research of Microbiology Applied to Agro-food, Biomedical and Environment (LAMAABE), Faculty of SNV/STU, University of, Tlemcen, Algeria.

<sup>3</sup> Laboratory of Valorisation of Natural Biological Resources / VRBN. Université Farhat Abbas Sétif 1

Corresponding author: [nouriabenamara@univ-mascara.dz](mailto:nouriabenamara@univ-mascara.dz)

## ABSTRACT

Meat and its derivatives occupy a place of choice in our diet due to the nutritional quality of its proteins. Among the processed meat products, the Kebab.

The objective of our study was to evaluate the hygienic quality of the kebab marketed in Mascara, to analyze on the physicochemical and microbiological plan of the various samples in the 3 stages of production of kebab (white meat, marinade and cooked dish of kebab). Thus to initiate to the traceability by the application of Ishikawa diagram (5M).

To this end, six samples of kebab representing three stages of its manufacture were studied. All samples were evaluated from a microbiological point of view (total aerobic mesophilic flora, total coliforms, *Staphylococcus spp.*, Clostridium sulphite-reducer, Salmonella, yeasts and moulds, *Escherichia coli*, Campylobacter) and from a physicochemical point of view (pH, total dry extract, ash).

The results obtained reveal that microbiologically the Kebab marketed at the point of sale studied is contaminated by a high rate of total aerobic mesophilic flora and by some pathogenic bacteria such as: *Campylobacter hyointestinalis*, *C. coli* and *C. jejuni*, so the quality of the kebab is not considered to be in accordance with the approved standards. However, from a physicochemical point of view, all the parameters studied are satisfactory. As far as traceability is concerned, we consider it to be satisfactory because the history of our product is known, especially as regards the labelling of the white meat used. Consequently, it is strongly recommended that increased surveillance be carried out through rigorous and regular control of this sensitive material throughout the year.

**Key words:** Kebab, microbiological analysis, Campylobacter, Meat, poultry.

## 1. INTRODUCTION

Until today, meat has been an important part of the human diet due to the nutritional quality of its proteins. Later on, meat had an even more important place in human society, qualified as the food of the masters and the hierarchical parties [1]. In particular, poultry meat processed into products sold in fast-food markets has rapidly gained popularity. In the preparation of fast food, there are several cooking methods and/or different types of spice treatments used during processing [2]. Among the processed meat products, the Kebab. The word "Kebab", is Turkish, simply means "grilled meat" [3].

Kebab is a traditional Turkish meat dish, it is produced from marinated and/or flattened whole or minced meat (mutton, beef and chicken) and animal fat, seasoned and moulded vertically around a skewer to form a cone shape [4]. Commonly used meats are mutton, beef and chicken [5]. To produce kebab, different animal species of meat are used such as mutton, beef, chicken and turkey but the use of chicken breast and turkey meat in kebab production has become very popular, because this product is more digestible, cheaper [6]. And even though kebab is popular in many places, it has some problems related to its microbiological quality and formulation [7].

The stages of kebab preparation include: steak preparation, steak seasoning, steak thermal stabilisation and finally obtaining the ready-to-eat kebab. This last step consists of the gradual cooking of the meats, their cutting into thin slices on a collection tray from which a certain amount of kebab slices is served to the customer either in a dish or in bread like sandwiches with other herbs, salad or sauce with different taste [4,8]. The microbiological quality of kebabs depends largely on the following factors:



initial quality of raw meat and/or other ingredients, inefficient cooking process, inappropriate sanitary practices for staff, and kitchen utensils [9].

The aim of this study is both to assess the physicochemical and microbiological quality of Kebab marketed in Mascara with evaluation of intermediate products (chicken and marinade). Thus to identify the main sources of microbiological contamination. It is within this framework that the initiation to traceability by the application of the Ishikawa diagram (5M) appears.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Materials used:**

Six samples of kebab representing three stages of its manufacture were bought at the same point of sale in Mascara (360 km west of Algiers) in an interval of one week. The three stages of production are fresh chicken (E1), marinade (E2) and the cooked kebab dish (E3). To initiate traceability, we moved to the chicken slaughterhouse located in Khessibia, Mascara, where we applied the 5M.

### **2.2. Physical and chemical analysis:**

To measure the pH, the samples were first diluted 1:10 in Tryptone Salt, from which the pH was measured. The total dry extract (TDE) was determined by oven drying at  $103\pm 2^\circ\text{C}$ , for 3 hours [10]. The ash content was determined by incinerating the fresh Klila sample in a muffle furnace at  $525\pm 25^\circ\text{C}$ . The incineration was continued until whitish ash was obtained [11].

### **2.3. Microbiological analyses**

The enumeration of total aerobic mesophilic flora (FMAT) was carried out on Plat Count Agar (PCA) ( $30^\circ\text{C}$ , 48 to 72h, aerobic conditions, Biokar), in accordance with the standard NF EN ISO 4833-1: 10-2013 [12]. Total coliform enumeration was performed on bright green lactose broth (VBL) using three tubes per dilution. Incubation at  $37^\circ\text{C}$  for 24 to 48 hours [13]. According to the most probable number method. *E. coli* were detected and enumerated on Hektoen agar. Incubation is done aerobically for 18 to 24 hours at  $35$  to  $37^\circ\text{C}$ . For the enumeration of Clostridium Sulfito-Reductor spores, "VF" meat liver agar was used [14]. The search for and enumeration of yeasts and moulds is carried out according to the method described by ISO-21527-2/2008 [15], for which the medium used is OGA (Oxytetracycline Glucose Agar). Incubation is done at  $25^\circ\text{C}$  for 5 days.

*Staphylococcus spp.* were tested on Giolitti-Cantoni broth and Chapman medium. Incubation at  $37^\circ\text{C}$  for 24 to 48 hours [16]. Salmonella spp. were tested on two selective media, cysteine selenite and Rappaport-Vassiliadis broth at  $37^\circ\text{C}$  and  $42^\circ\text{C}$  for 24 hours respectively, as well as on Hektoen agar in accordance with the international standard ISO 6579-1:2017 [17]. The search for bacteria of the genus Campylobacter was carried out on 25g of product analysed diluted in 225 mL of Preston broth. These suspensions and agar culture media (Columbia media) inoculated with the base suspensions were incubated in micro-aerobic conditions at  $37^\circ\text{C}$  for at least 48 hours for a first enrichment. The 2<sup>nd</sup> enrichment on Preston broth and incubation in micro-aerobiosis at  $42^\circ\text{C}$  for 24 to 48 hours. And a 3<sup>rd</sup> enrichment sometimes it was carried out from the 2<sup>nd</sup> enrichment according to the same modalities NF ISO 10272 V08-026 [18]. The identification of the genus Campylobacter was carried out according to the macroscopic and microscopic aspects of the colonies and the research of catalase and oxidase activities. The identification of species was based on biochemical tests (Api Campy).

### **2.4 Introduction to the application of the Ishikawa diagram**

This tool was applied at the level of the point of sale and at the collective chicken slaughterhouse in Mascara, from which we brought our raw material by applying traceability. For this we determined some sources of contamination at these two levels using the "5M" quality management tool.

## **3. RESULTS**

### **3.1. Physicochemical analyses**

The pH values obtained are in the order of 6.5 and 6.68 in the fresh white meat taken during the first and second week respectively. The pH values shown for the marinated white meat are in the order of 5.45 and 5.2 from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> week respectively. The pH values obtained for the Kebab are in the order of

5.78 and 5.8 for the 1st and 2nd week respectively. The results obtained in the fresh white meat show a percentage of dry matter that is around 23.34% and 24.18% (Table 1). The results obtained for the total dry extract for the sample of marinade are 29.51% for the sample of the first week and 26.4% for the sample of the second week (Table 1). For the Kebab, the results obtained show a percentage of dry matter that is around 44.34% for the first week and 49.34% for the second week respectively (Table 1). For the ash rate, it is observed that it is of the order of 1 and 1.9% in the first and second week respectively. The results obtained show that the total ash percentage of marinated meat is about 2.4% for the first week and 3.5% for the second week respectively (Table 1). For the Kebab we observe that the ash rate is 3% and 1.6% in the first and second week respectively.

## 2. Microbiological analyses

The number of total aerobic mesophilic germs obtained in the fresh chicken meat "E1" is around  $1.2 \times 10^6$  CFU/g in the first week and  $1.14 \times 10^6$  CFU/g in the second week. In the "E2" marinade, the total aerobic mesophilic germ rate obtained indicates values of  $1.12 \times 10^6$  CFU/g for the first week and  $1.41 \times 10^6$  CFU/g for the second week. The total aerobic mesophilic counts obtained in Kebab "E3" were:  $1.34 \times 10^6$  CFU/g and  $8.7 \times 10^5$  CFU/g in the first and second week respectively. The enumeration of total coliforms was carried out only in the fresh chicken meat and the Kebab. The total coliform levels obtained were  $3 \times 10^1$  CFU/g in the first week's sample and  $1.04 \times 10^2$  CFU/g in the second week's sample. While the total coliform count obtained in the cooked ready-to-eat kebab was  $8.51 \times 10^1$  CFU/g and  $3.01 \times 10^1$  CFU/g for the first and second week consecutively. The enumeration of *E. coli* makes it possible to monitor the hygiene of meat handlers throughout the economic cycle. This germ was only sought in the marinade. The values obtained for *Escherichia Coli* were  $5.75 \times 10^5$  CFU/g and  $4.16 \times 10^5$  CFU/g in the first and second week respectively. The results indicate that sulphite-reducing Clostridium is only present in the white meat sample taken during the second week. This presence is reflected by a blackening of the tubes. On the other hand, total absence was observed for the other samples studied, which shows the conformity of these samples. *Staphylococcus spp.* and *Salmonella spp.* were not found either in the fresh white meat or in the Kebab near consumption. Yeasts and moulds were only found in the marinade. They are responsible for food contamination and are often well known species that cause undesirable changes in products. The levels of yeast and moulds obtained were of the order of  $6.6 \times 10^3$  CFU/g in the first sample during the first week and a value of  $1 \times 10^4$  CFU/g in the second sample during the second week.

*Campylobacter* was found in all three samples studied (fresh white meat, marinade and kebab). Macroscopic and microscopic examination (Figure 1) showed the presence of characteristic *Campylobacter* colonies. After full identification, which was obtained by searching for biochemical characteristics using the Api Campy gallery (Table 2). The results revealed two species including *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in fresh and marinated white meat respectively. *Campylobacter Hyaintestinalis* in the Kebab during the first week and the second week.

### 3.3. Ishikawa diagram (5M)

The results of the introduction to the traceability application with the quality management tool known as the Ishikawa diagram (cause and effect diagram) applied during our study are summarised in Figures 2 and 3 below.

## 4. DISCUSSION

The pH values found in fresh white meat agree with the work of Yoksek *et al.* [19], who recommend a pH ranging from 5.8 to 6.8 with an average value of pH=6. For the pH of marinade, the values obtained are in agreement with the values reported by Todd *et al.* [20], who give pH values ranging from 4.5 to 5.4. While the pH values of Kebab are in agreement with the values reported by Kayahan and Welz [21] which give pH values ranging from 5.44 to 6.28. While they are lower than the value quoted by Vazgecer *et al.* [4]: 6.03. It is concluded that pH is a good indicator of chicken resistance to a predominant microbial flora. The pH gives an appreciation of the capacity of retention and hydration of proteins, the pH value directly influences the rate of masking of salts and acts on the stability of meat.

The total dry matter content in fresh chicken meat is lower than the value found by Plemyashov *et al.* [22] who gave a value of 32% in the framework of broiler meat quality assessment. The dry matter values of the marinade are in agreement with the values quoted by Gruger, [23], who gave dry matter values ranging from 12.6 to 32.3%. For the results obtained from the total dry extract of Kebab, it is noticed that they are similar to those reported by Kayışoğlu *et al.*, [3] which give dry matter values ranging from 38.72 to 48.33%. While they are lower than the value found by Vazgecer *et al.* [4]: 52.7%.

The ash content in fresh white meat is higher than the content reported by Kayışoğlu *et al.* [3] While the ash rate in the Kebab near to consumption varying between 1.6 and 3 %. The first value obtained in the first week is similar to the value obtained by Ali *et al.* [24]: 1.7%, while in the second week it is highly superior to the same value given by the same authors when determining some changes in the chemical, physical and sensory properties of the kebab during its use,

The results of total aerobic mesophilic germs recorded in fresh chicken are lower than the results given by Yoksek *et al.* [19], which are of the order of  $3.7 \times 10^6$  FAMT in fresh chicken. So in comparison with the results of Abdelrahman *et al.* [25], which give values of  $2 \times 10^4$  UFC/g, our results are higher for fresh chicken meat. Similarly, for the results obtained in the context of studying the quality of the bacteriological value of chicken meat produced under different processing conditions by Usman Hamidu [26]:  $5.78 \times 10^4$  CFU/g. Concerning the marinade "E2", Yoksek *et al.* [19], recorded a value of:  $5.3 \times 10^7$  CFU/g total germs. This is higher than what we found during the two weeks.

For Kebab, Kayışoğlu *et al.* [27] reported that the rate of total flora counted is less than 7 Log CFU/g, this is in agreement with the values obtained in our work. Thus our results are in agreement with the results obtained by Nichols *et al.* [28] and Williamson *et al.*, [29] who gave the same value of FAMT in chicken kebab in Turkey with a load of 6 Log UFC/g. While they are slightly higher than the value found by Yoksek *et al.* [19]:  $5.7 \times 10^4$  CFU/g in ready-to-eat Kebab. Similarly, for the value recorded by Abdelrahman *et al.* [25]:  $1 \times 10^4$  CFU/g. While a total germ rate of  $3.6 \times 10^7$  CFU/g in Kebab was found in the evaluation of microbiological characteristics of Shawarma from different restaurants in Khartoum State and hygiene awareness of workers [30].

The obtained level of total coliforms in fresh chicken meat is lower overall for both weeks compared to the value quoted by Yoksek *et al.* [19]:  $7.1 \times 10^4$  CFU/g. Thus compared to the value found by Abdelrahman *et al.* [25]:  $2 \times 10^2$  CFU/g. Thus the results are satisfactory for fresh white meat. This can be explained by the respect of hygiene rules during the collection of the sample or its proper handling during storage. While the rate of this germ in the Kebab in the first week is higher than the value found by Yoksek *et al.* [19]:  $3.2 \times 10^1$  CFU/g, the same value is similar in comparison to the rate in the second week. This rate is lower in comparison with the value given by Abdelrahman *et al.* [25] in the "Shawarma" Kebab in the framework of the evaluation of the bacteriological and safety profile of broiler meat cuts which is in the order of  $8 \times 10^2$  CFU/g. Generally, a high coliform count indicates poor hygienic quality of the meat [31].

The *E. coli* levels obtained are higher than the levels found by Yoksek *et al.* [19], for chicken marinade:  $1.7 \times 10^3$  CFU/g. They are thus higher than the maximum value recommended by the decree on microbiological criteria [32] in skinless poultry cuts, which is around  $10^4$  CFU/g. For *E. coli*, the count in fresh white meat was  $9 \times 10^1$  CFU/g and  $1 \times 10^1$  CFU/g in Kebab according to Abdelrahman *et al.* [25].

The results of the search for and enumeration of sulphite-reducing Clostridium agree with the results found by Lopašovský *et al.* [33] who recommend a level of  $< 10$  CFU/g in the Kebab and total absence in the fresh meat, which is incompatible with our result of fresh meat in the second week.

In the framework of evaluation of microbiological characteristics of Shawarma from different restaurants in Khartoum State and hygiene awareness of workers Abdalla [30] found a level of  $7.07 \times 10^3$  CFU/g of moulds. Thus to study the microbiological quality of ready-to-eat foods in Slovakia the level of yeast found in Kebab is  $< 10 - 5.0 \times 10^2$  CFU/g [33]. These levels are lower than the values obtained during our study. While it falls within the range found by Cagri-Mehmetoglu [34] in the assessment of the food

safety challenge associated with traditional foods of Turkey, whose count of yeasts and moulds in doner kebab in Turkey gives a value of between  $10^2$  and  $10^6$  CFU/g.

The results of the *Staphylococcus spp.* test are in accordance with the standards which recommend a maximum threshold of  $5 \times 10^3$  CFU/g for skinless poultry cuts and poultry products intended for cooked consumption [32]. Our results are lower than the results obtained by Yoksek *et al.* [19] who gave values of  $2.2 \times 10^2$ ,  $4.7 \times 10^1$ ,  $6.2 \times 10^2$  for white meat, Marinade and Kebab respectively. Similarly for the value recorded by Abdalla [30]:  $1.12 \times 10^5$  CFU/g. Abdelrahman *et al.* [25] on the other hand found that the average value of *Staphylococcus aureus* in fresh chicken meat was  $2 \times 10^2$  CFU/g and  $2 \times 10^2$  in kebab.

*Salmonella Spp.* are among the main bacteria responsible for human food poisoning. The contamination of food with these micro-organisms can be caused by a lack of personal hygiene. According to the interministerial decree fixing the microbiological criteria for foodstuffs, the rate of this type of germ must result in the total absence of these germs in 10g of poultry cuts without skin and in 25g in poultry products intended for cooked consumption [32]. Therefore, our products studied meet the Algerian approved standards. This was obtained by Rizkiana Fitri [35] who showed that the studied kebab meat did not contain the presence of *Salmonella sp.* and that the hygiene at the traders was less.

After 2 to 5 days of incubation, a carpet of whitish colonies is observed, which is characteristic of *Compylobacter spp.* In this case our results are not in accordance with the results obtained from biochemical identification show that they are similar to the work of Refregier-Petton *et al.* [36]. The results obtained from biochemical identification show that they are similar to the work of Refregier-Petton *et al.* [36] who confirmed that *C. jejuni* is the species most commonly isolated from chickens. This was confirmed by Andrzejewska *et al* [37] who reported that 41.6% of the samples studied in their work were positive for *Campylobacter spp.* and that *Campylobacter jejuni* was predominant in this study. Thus *C. coli* was rather dominant in poultry according to Cardinale *et al.* [38]. This bacterium is the leading cause of human bacterial diarrhoeal disease worldwide, and poultry meat products account for the majority of human cases [39].

For the traceability part and according to the findings at the different locations studied (Slaughterhouse and Kebab outlet). Some recommendations should be taken into account. For M1. Raw materials, workers must be made aware of hygiene regulations and good hygiene and manufacturing practices, and they must respect hygiene rules in everything concerning raw materials to avoid any possible source of contamination, based on Executive Decree No. 17-140 laying down the hygiene and health conditions during the process of releasing foodstuffs for human consumption [40]. Clandestine slaughter is prohibited. This was observed in our work. This presents an infringement according to the same decree cited before [40].

According to the new executive decree for M2. Equipment, the equipment and materials must be suitable for complete cleaning and easy and satisfactory maintenance. Maintenance and cleaning products for equipment or utensils in contact with foodstuffs must meet the specifications set by the regulations in force [40]. While at the slaughterhouse level, there is no adequate cleaning and disinfection plan and the cleanliness of equipment is unacceptable.

Employees must ensure compliance with the legislative and regulatory provisions in force relating to the prevention of hazards to avoid contamination from the air, soil, water, insects, rodents, feed, handling and disposal of waste [40]. Our results for the M3 environment of the slaughterhouse comply with these standards.

For the M4 corresponds to the Method, it was noticed a bad handling in the slaughterhouse and even in the Kebab outlet due to lack of training of the staff in GHP and GMP. In noting the causes of the fifth M5 of Labour, which is the most important M in this diagram. Poor staff hygiene was noted.

## 5. CONCLUSION

Following the recurrent health crises, the regulatory and commercial requirements in terms of traceability have been considerably strengthened on an international scale, obliging all the actors in the food chain to equip themselves with the means to ensure the traceability of the foodstuffs they place on

the market and also to study good hygiene practices at the level of slaughterhouses and kebab sales outlets. The kebab has occupied an important place in the rations of the Algerian population due to its richness in nutrients, particularly essential amino acids and vitamins, and its consumption by the majority of this population. This implies close microbiological and physicochemical monitoring and the study of 5M (good hygiene practices and good manufacturing practices). The results showed that the processing techniques applied, the type of packaging, the poultry slaughterhouses and the environment of the farm require an effective procedure to produce safe broiler meat cuts.

Through this study, we contributed to clarify the traceability aspect especially of kebab marketed in Mascara at the restaurant located in Sidi Said. This characterization has focused on different aspects and has led to the following conclusions:

At the end of our study we can affirm that the chickens sold on our markets are contaminated by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*; species mainly found in chickens, and responsible for serious cases of gastroenteritis in the world were the only two species identified.

Concerning the Kebab, from a microbiological point of view, and according to the results obtained, it was found that the said product marketed at the point of sale studied is contaminated by a high rate of total aerobic mesophilic flora and by some pathogenic bacteria such as: *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Therefore, it can be judged that the quality of the kebab is not really satisfactory.

The results obtained show that there is a total absence of *Salmonella spp.* and *Staphylococcus spp.* in all our samples studied.

On the physico-chemical level we found that the pH level, and the percentages of dry matter and total ash of the three samples (Kebab, marinade and broiler) are satisfied according to the work of the authors.

In terms of traceability, the first link is at the level of the slaughtering and processing unit of the white meat, passing through the marinated meat and ending with the kebab marketed in Mascara (Sidi Saïd) is satisfactory because the history of our product is known, especially from the point of view of labelling of the white meat used. Therefore, it is necessary to adopt good hygiene practices during the processing and handling of the chickens.

## REFERENCES

- [1] Lecerf, J. M. (2014). La place de la viande dans la nutrition humaine. Viandes et produits carnés., 30, 6-5.
- [2] Boudechicha, H. R., Sellama, M., Lamri, M., Boudjellal, A., & Gagaoua, M. (2018). Produits carnés traditionnels des pays d'Afrique du Nord. La revue française de la recherche en viandes et produits carnés, 34(3-8), 1-19.
- [3] Kayışoğlu, S., Yılmaz, İ., Demirci, M., & Yetim, H. (2002). Tekirdağ piyasasında tüketime sunulan çiğ ve pişmiş dönerlerin kimyasal bileşimi ve mikrobiyolojik kalitesi, Türkiye 7. Gıda Kongresi, 22-24.
- [4] Vazgecer, B., Ulu, H., & Oztan, A. (2004). Microbiological and chemical qualities of chicken döner kebab retailed on the Turkish restaurants. Food Control, 15(4), 261-264.
- [5] Al-Khusaibi, M. (2019). Arab traditional foods: Preparation, processing and nutrition. In Traditional Foods (pp. 9-35). Springer, Cham.
- [6] Gök, İ., Askın, O. O., Özer, C. O., & Kılıç, B. (2012). Effect of textured soy protein and tomato pulp on chemical, physical and sensory properties of ground chicken döner kebab. African Journal of Biotechnology, 11(25), 6730-6738.
- [7] Ergönül, B., Tosun, H., Obuz, E., & Kundakçı, A. (2012). Several quality attributes of beef and turkey meat doner kebabs produced by traditional or continuous process. Journal of food science and technology, 49(4), 515-518.
- [8] Kayaardi, S., Kundakci, A., Kayacier, A., & Gok, V. (2006). Sensory and chemical analysis of doner kebab made from turkey meat. Journal of Muscle Foods, 17(2), 165-173.

- [9] Todd, E. (2020). Food-borne disease prevention and risk assessment. *International journal of environmental research and public health*, 17(14), 5129.
- [10] Norme Algérienne: NA N°10.96.25: Méthode d'analyse pour détermination de la teneur en eau (méthode par étuvage). Ministère du commerce, CACQE (IDAQUALITEC).
- [11] Norme Algérienne: NA N°10.96.03: Méthode d'analyse pour détermination des cendres. Ministère du commerce, CACQE (IDAQUALITEC).
- [12] NF EN ISO 4833-1: 10-2013: Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes-technique de comptage des colonies à 30°C par la technique d'ensemencement en profondeur.
- [13] NF V08-060-04-2009: Microbiologie des aliments-Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C.
- [14] Dennaï N., Kharrati B., El Yachioui M. (2001). Appréciation de la qualité microbiologique des carcasses de bovins fraîchement abattus. *Médecine Vétérinaire*, 145, 270-274p.
- [15] ISO 21527-2:2008 (fr). Microbiologie des aliments -Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures - Partie 2: Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau inférieure ou égale à 0,95.
- [16] Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Technique at Ingénierie. Agro-alimentaire. ISBN. 2100036661, 9782100036660. Dunod.652 Pages.
- [17] ISO 6579-1:2017(fr). Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des Salmonella - Partie 1: Recherche des *Salmonella spp.*
- [18] NF ISO 10272 V08-026 (1996). Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter spp.* - Partie 2 : technique par comptage des colonies
- [19] Yuksek, N., Evrensel, S. S., Temelli, S., & Sahsene, A. N. A. R. (2009). A Microbiological Evaluation On The Ready-To-Eat Red Meat And Chicken Donair Kebabs From A Local Catering Company In Bursa. *Journal Of Biological And Environmental Sciences*, 3(7).
- [20] Todd, E. C., Szabo, R., & Spiring, F. (1986). Donairs (Gyros)-potential hazards and control. *Journal of Food Protection*, 49(5), 369-377.
- [21] Kayahan, M., & Welz, W. (1992). Zur üblichkeit des spezialität, döner kebab: erhebungen in bremen. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 43(6), 143-144.
- [22] Plemiyashov, K., Aristov, A., Semenov, S., Kudinova, N. Y., Anipchenko, P., Nikitin, G., Anatoly Stekolnikov A. & Ladanova, M. (2019). PSV-35 Broiler chicken meat quality. *Journal of Animal Science*, 97(Supplement\_3), 294-294.
- [23] Gruger Kayisoglu, Yilmaz, I., Demirci, M., et Yetim, H. (2002). Tekirdag Piyasasinda Tuketime Yuksek, N., Evrensel, S. S., Temelli, S., & Sahsene, A. N. A. R. (2009). A microbiological evaluation on the ready-to-eat red meat and chicken donair kebabs from a local catering company in Bursa. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 3(7).
- [24] Ali B. A. M., Hassan K. I. & Mohammed N. A. (2018). Determination of Some Changes in Chemical, Physical and Sensory Properties of Kebab when admixed with Chicken Breast Meat. *Journal homepage www.jzs.univsul.edu.iq. Journal of Zankoy Sulaimani Part-A- (Pure and Applied Sciences). JZS. Special Issue, 2ndInt. Conference of Agricultural Sciences*
- [25] Abdelrahman, H. A., Ismail, T. H., Saleh, N. G. E., & Ahmed, N. I. H. (2022). Bacteriological Profile and Safety of Chicken Broiler Meat Cuts. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 12(4), 399-403.
- [26] Usman Hamidu, I. M., Kawu, F. A., & Isa, (2022). A. Bacteriological Quality of Chicken Meat Produced Under Different Processing Conditions. *International Academic Research Consortium Journals (IARCJ) International Journal of Agricultural Science and Technology*. ISSN: 2360-9888. Volume 9, Number 5. Pages 113-118 (July, 2022). [www.arcnjournals.org](http://www.arcnjournals.org)
- [27] Kayışoğlu, S., Yilmaz, I., Demirci, M., & Yetim, H. (2003). Chemical composition and microbiological quality of the doner kebabs sold in Tekirdag market. *Food Control*, 14(7), 469-474.

- [28] Nichols, G., Monsey, H., & de Louvois, J. (1996). LACOTS/PHLS study of the microbiological quality of doner kebab meat. Kebab Report 3rd Final Report, 1-15.
- [29] Williamson, K., Allen, G., & Bolton, F. (2001). Report of the greater Manchester/Lancashire/PHLS liaison group survey on the microbiological examination of doner kebabs from takeaway food shops. Manchester, UK.
- [30] Abdalla, H. O. A., & Supervisor, A. E. A. E. F. (2020). Microbiological Characteristics Of Shawarma From Different restaurant In Khartoum State And Hygienic Awareness Of The Workers (Doctoral dissertation, Sudan University Of Science & Technology).
- [31] Ibrahim, H., Hassan, M., Amin, R., Shawky, N., & Elkoly, R. L. (2018). The Bacteriological Quality Of Some Chicken Meat Products. Benha Veterinary Medical Journal, 35(1), 50-57.
- [32] JORADP N°39 (2017). Arrêté interministériel du 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires JORADP N°39.
- [33] Lopašovský, L., Terentjeva, M., Kunová, S., Zeleňáková, L., & Kačániová, M. (). Microbiological quality of ready-to-eat foods produced in Slovakia. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2021, 31-35.
- [34] Cagri-Mehmetoglu, A. (2018). Food safety challenges associated with traditional foods of Turkey. Food Science and Technology, 38, 1-12.
- [35] Rizkiana Fitri, P. (2019). Identifikasi salmonella sp. pada daging kebab dan personal hygiene pada pedagang kebab di sekitar masjid agung an-nur pekanbaru (doctoral dissertation, poltekkes kemenkes riau).
- [36]. Refregier-Petton, J., Rose, N., Denis, M., & Salvat, G. (2001). Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Preventive veterinary medicine, 50(1-2), 89-100.
- [37] Andrzejewska, M., Szczepańska, B., Śpica, D., & Klawe, J. J. (2015). Trends in the occurrence and characteristics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry meat in Northern Poland. Food Control, 51, 190-194.
- [38] Cardinale, E., Gros-Claude, P., David, J., Tall, F., Cisse, M., Guèye, E. H. F., & Salvat, G. (2003). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal.
- [39] Royden, A., Christley, R., Jones, T., Williams, A., Awad, F., Haldenby, S., Wigley P. Rushton S & Williams, N. J. (2021). *Campylobacter* contamination t retail of halal chicken produced in the United Kingdom. Journal of Food Protection, 84(8), 1433-1445.
- [40]. D.E n°17-140, 2017. Décret exécutif n° 17-140 du 11 avril 2017 fixant les conditions d'hygiène et de salubrité lors du processus de mise à la consommation humaine des denrées alimentaires. (J.O n° 24 du 16 Avril 2017).

**Table 1: Physicochemical results of the studied samples (Fresh white meat, Marinade and Kebab)**

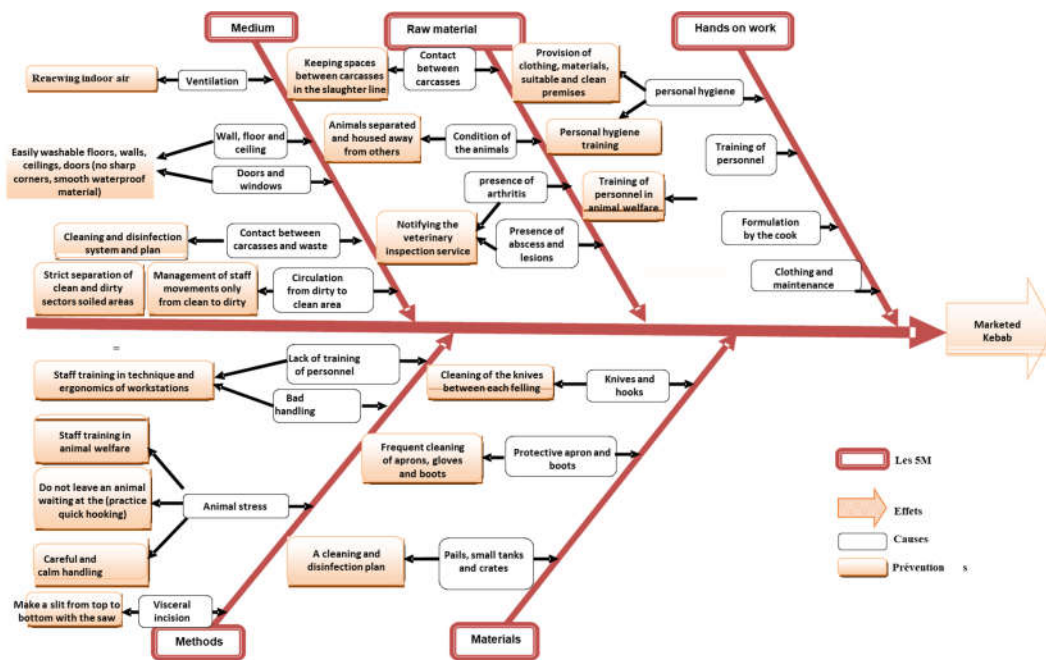
Parameters	White meat (Fresh) (E1)		Marinade (E2)		Kebab (E3)	
	Week 1	Week 2	Week 1	Week 2	Week 1	Week 2
pH	6,50	6,68	5,45	5,2	5,78	5,8
Dry matter (%)	23,34	24,18	29,51	26,4	44,34	49,34
Mineral matter (%)	1	1,9	2,4	3,5	3	1,6

**Table 2: *Campylobacter* species identification of the strains studied**

The strain	White meat (Fresh) (E1)	Marinade (E2)	Kebab Week 1	Kebab Week 2
Corresponding species	<i>Campylobacter Jejuni</i>	<i>Campylobacter Coli</i>	<i>Campylobacter Hyaintestinalis</i>	<i>Campylobacter Hyaintestinalis</i>
Percentage of confirmation (%)	100	99,4	93	83,5



**Figure 1: Microscopic observation of a presumptive *Campylobacter* isolate from white meat (A), marinated meat (B) and Kebab (C) samples studied after Gram staining (x12500).**



**Figure 2: Ishikawa diagram applied in our study**



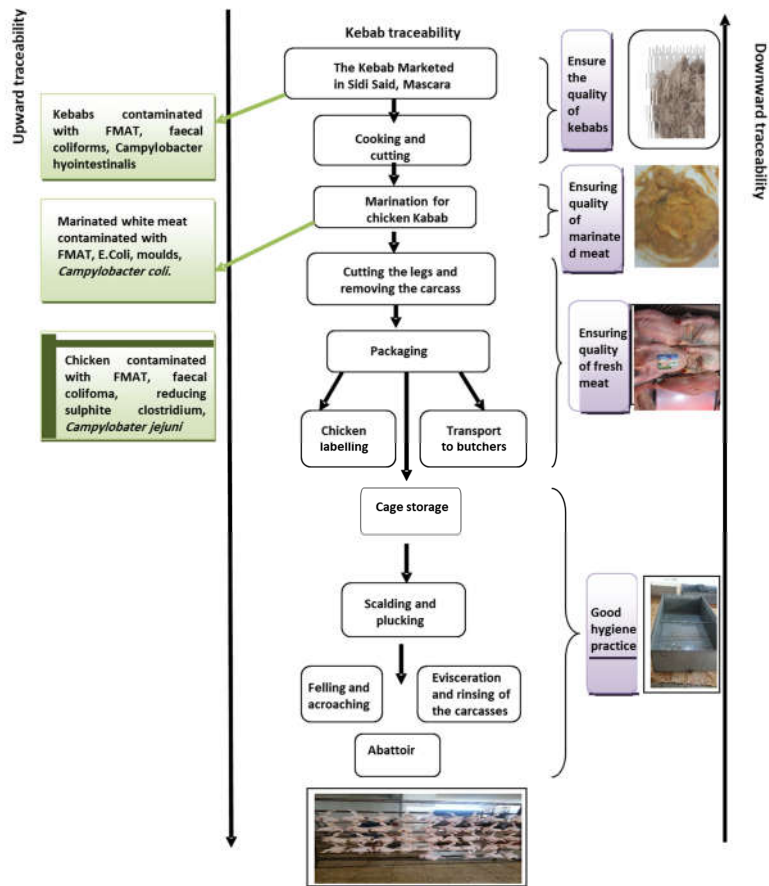


Figure 3: Kebab traceability (kebab to fresh white meat)

# ISOLATION AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MYXOBACTERIA FROM ALGERIAN SOIL

Fatma Zohra BENBELKHIR<sup>1\*</sup>, Nadja BENABDALLAH<sup>2</sup>, Omar MESSAOUDI<sup>2,3</sup>

*1 Laboratory of Biology: Application in Health and Environment, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, Med-Boudiaf University of M'sila, 28000, M'sila, Algeria.*

*2 Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Amar Telidji, 03000, Laghouat, Algeria.*

*3 Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment, Faculty of SNV-STU-Ex Imama Biomedical Complex, Abou Bekr Belkaïd University, 13000, Tlemcen, Algeria.*

*\*Corresponding author: [fatma.benbelkhir@univ-msila.dz](mailto:fatma.benbelkhir@univ-msila.dz)*

## ABSTRACT

Among the microorganisms commonly found in soil, myxobacteria are Gram-negative bacteria with medical importance due to their rich secondary metabolism and predatory ability. In the context of research for new bioactive compounds from microbial origin, this work aims to isolate, purify and characterize myxobacteria from the soil. The isolation and purification process yielded a total of 44 isolates from four samples of date palm rhizosphere soil collected from different Saharan areas of Algeria (El-Menia, Ain Saleh, Ghardaïa and Tamanrasset); among which the largest yield was from Ghardaïa. The morphological characterization revealed that these are bacilli forming fruiting bodies of different colors (white, yellow, orange, brown, transparent and pink) and giving swarming colonies on solid medium which is characteristic of myxobacteria. This research proves their existence in Algerian soil for the first time.

**Keywords:** Soil, Isolation, Myxobacteria, Fruiting bodies.

## 1. INTRODUCTION

The emergence of microbial resistance in recent years, as well as the development of chronic cardiovascular, neuronal, cancer and autoimmune diseases have emphasized an urgency, and pushed scientists to launch searches for discovering new bioactive substances. Secondary metabolites synthesized by natural producers are the origin of about 40% of human medication; of which 50% are bacterial and fungal [1,2]. In addition to bacteria of the genus *Bacillus*, *Pseudomonas* and actinomycetes, myxobacteria are a promising alternative for secondary metabolite production with unusual modes of action against a broad spectrum of eukaryotic and prokaryotic cells [3,4]. These Gram-negative bacteria, belonging to the class Deltaproteobacteria, exhibit unique characteristics such as the formation of spore-bearing fruiting bodies and movement by gliding; both processes are controlled by intercellular communication [4,5]. Another important character is that they are micropredators that feed on other microorganisms (bacteria, yeasts...); whose predatory activity is provided by enzymes as well as bioactive metabolites that are the source of their great interest [4,6,7].

According to Garcia et al [4] rare or entirely new strains can be discovered by targeting isolated or unexplored environments in the tropical and subtropical zones, « We believe that many more rare and wholly novel strains remain to be discovered, by specifically targeting as yet unexplored and isolated environments in tropical and subtropical zones. The warm climate in these regions may support myxobacterial diversity, and thus it seems very likely that novel strains will be found ». These regions are home to a high diversity of myxobacterial species [8].

Therefore, in order to find new bioactive substances, this work aims to isolate myxobacterial strains from the arid Algerian desert soil. The choice is oriented towards the rhizosphere of date palm as it is not exploited for this type of bacteria on the one hand, and on the other hand because it is rich in highly competitive microbial life, which increases the chance to have new strains that produce new bioactive metabolites.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Sampling

#### 2.1.1. Collection

For sampling, the rhizosphere of date palm was chosen based on observations of Reichenbach and Dworkin [9], which indicate that the best isolation results and yield of myxobacteria are given by soils rich in higher organisms, and by plant rhizospheric samples. Four rhizospheric soil samples of the date palm are collected from different areas located in the Algerian Sahara during December 2019 and January 2020 (Figure 1).

The samples are taken according to the method of Reichenbach and Dworkin [9]. Indeed, the first five centimeters of soil are removed with a spatula, then samples are taken and placed in plastic bags.

#### 2.1.2. Treatment

The samples must be dried at room temperature, to remove vegetative forms of microorganisms [9]. Then a sieving must be performed using a sieve with pores of 250  $\mu\text{m}$  diameter to eliminate large granules, as well as plant debris.

### 2.2. Isolation

For isolation of cellulolytic myxobacteria, the standard filter paper method is applied [10]. The mineral medium ST21 is used with cellulose as sole carbon source. It is prepared from two solutions, solution A: 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.002% yeast extract or 1% baker's yeast, 1.0% agar makes up in about two-thirds of the water volume in distilled water; solution B: 0.1%  $\text{KNO}_3$ , 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.02%  $\text{FeCl}_3$ , 0.01%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  make up in the remaining water volume. Each solution is adjusted to  $\text{pH} \approx 7.2$  before sterilization. They are autoclaved separately, then combined after sterilization. To this mixture, 1 mL of trace element solution is added [10]. The medium is supplemented with Cycloheximide at 50 mg/L to inhibit fungal growth [11].

Cellulose is used in the form of autoclaved small pieces of filter paper (Whatman 1  $\text{cm}^2$ ) applied to the agar surface at a rate of 3 to 4 pieces per plate. On each piece, a small amount of dry soil is placed. Then the incubation is performed at 30  $^\circ\text{C}$ . Starting from the third day, the plates are checked regularly under a stereo microscope (x20 and x40 magnification) for fruiting body formation [11].

### 2.3. Purification

The media used were Water-agar [0.15%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.15%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 Mm HEPES, 1mL/L vitamin solution (Schlegel), 1.8% agar], and VY/2 [10 mL/L baker's yeast, 0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mg/L vitamin B12, 50 Mm HEPES, 1.6% agar] with  $\text{pH} \approx 7.2$ . The Water-agar is used in early purification steps with dead *Escherichia coli* cells prepared as an autoclaved suspension and matted to the medium surface. While VY/2 is used in the later stages where the strains become less contaminated [11].

The first purification step consists of transferring the fruiting body fragments from isolation plate to the purification medium using a very fine-headed injection needle (1 mL syringe) that can be sterilized and flambéed each time. The sharp needle head allows for a gentle pricking of the fruiting body observed under a stereo microscope at x20 or x40 magnification [10,11]. Subsequent steps consist of successive subculturing until obtaining pure colonies. After several subcultures the strain purity is checked under microscope.

### 2.4. Morphological characterization

The characterization of isolates is based on highlighting the main typical morphological criteria of myxobacteria including: fruiting body formation, swarm colony aspect and non-motile bacilli.

## 3. RESULTS

### 3.1. Isolation and purification

Samples of date palm rhizosphere soil were collected from four desert areas of Algeria that share the same character of an arid climate. The isolation and purification process gave a total of 44 isolates observed directly in isolation plates (Table 1). The most significant yield was from area C with 14 isolates, while areas A, B, and D gave close results with 9, 10, and 11 isolates respectively.

### **3.2. Morphological characterization**

All the organisms analyzed in this work have a bacillary or stem shape under the light microscope, and a swarming aspect on agar (movement by gliding) in addition to the formation of fruiting bodies which are typical of myxobacteria.

#### **3.2.1. Fruiting bodies**

Fruiting bodies are formed and observed in the isolation plates by stereo microscope (x20 or x40 magnification). They are generally orange, white, yellow, brown, transparent and rarely light pink or cream and dark orange with a domed spherical shape. The most dominant color is white with 12 isolates, followed by transparent with 9 isolates, orange and yellow with the same number of 7 isolates, brown and light pink with 4 isolates, and finally dark orange with only one isolate (**Figure 2**). The consistency of these structures is sometimes soft, solid, somewhat solid or burst when pricked with a needle (**Figure 3**). They start to appear from the 8<sup>th</sup> day of incubation until the 20<sup>th</sup> day.

#### **3.2.2. Colony on solid medium**

The colonies are mostly transparent with some light pink and orange. They form radial swarms on the medium surface (**Figure 4**).

#### **3.2.3. Microscopic aspect**

Under a light microscope (x1000 magnification), the vegetative cells appear as thin bacilli or rods with more or less tapered ends in the shape of a cigar, boat or a needle (**Figure 5**).

## **4. DISCUSSION**

The difference in yield of each area is explained by the difference in soil characteristics and composition, pH, humidity and organic matter content, which play an important role in the existence and density of microbial populations. In general, myxobacteria exist in the soil at a density of 2000, 76000, 80000 and even 450000 cells in 1 gram of soil [8].

In comparison to further researches, the total yield of myxobacteria in our samples was significant. Indeed 44 isolates from 4 samples is considerable compared to the results of Charousova et al [12], who could isolate 45 strains from 10 forest, agricultural and alpine soil samples from Slovakia. On the other hand, the comparison of our results with those of Zhao et al [13] shows the productivity of rhizospheric soil in general, and of the date palm rhizosphere in particular. Zhao et al isolated 50 strains from 22 rhizosphere soil samples collected from the botanical gardens in China. These results corroborate the finding of Reichenbach and Dworkin [9] which indicates that the best results and yields of myxobacteria are given by plant rhizospheric samples, which justifies our choice of date palm rhizosphere for myxobacterial isolation.

Direct isolation of myxobacteria from soil is often problematic because of the accompanying difficulties [14]. Among these difficulties we found fungal contamination which must be eradicated by using Cycloheximide fungicide at a concentration of 50 mg/L, but even with this high concentration fungal mycelia appear after a long incubation period (often after the second week).

The results obtained confirm the efficiency of the filter paper method, and it is necessary to underline that this method does not allow isolating only cellulolytic myxobacteria, but also micropredators because the microorganisms existing in the soil can serve as prey for them [10,12]. It is therefore clear that the isolates we obtained are not all cellulolytic.

Morphological characterization of our isolates indicates the presence of typical and unique criteria of myxobacteria (fruiting bodies, swarm colonies and non-motile bacilli). Indeed, further studies in this sense prove that bacteria showing these criteria belong to the order Myxococcales [8,10,15,16].

## **5. CONCLUSION**

Due to the unique traits of predation, social lifestyle, formation of fruiting bodies and spores as well as high C+G content, myxobacteria have emerged as a promising alternative of natural compounds from

microbial origin. They synthesize structurally diverse secondary metabolites that show unique modes of action against a broad spectrum of eukaryotic and prokaryotic cells.

Unexplored environments in tropical and subtropical areas such as the Algerian desert may contain rare and novel myxobacterial strains. Therefore, the main aim of this research was the isolation and characterization of myxobacterial strains.

A total of 44 pure isolates was obtained from four rhizosphere soil samples of date palm collected from different Saharan areas of Algeria. Based on the results, the best yield is given by Ghardaïa area, indeed 14 isolates among the 44 are recovered from which. This is due to the differences in soil characteristics, such as pH, humidity and organic matter content, which have a direct relationship with the density of myxobacteria. The isolation method applied allowed to have cellulolytic myxobacteria as well as micropredators.

Morphological characterization of the isolates revealed that they are bacillary shaped bacteria, forming fruiting bodies of different colors (white, orange, yellow...etc.) and giving swarming colonies on solid medium which is characteristic of myxobacteria. The total yield of our samples is significant compared to the results of later researches, which confirms the productivity of the Algerian arid soil in general and the rhizosphere soil in particular. Indeed, this research proves myxobacterial existence and diversity in Algerian soil for the first time.

As perspectives, we propose to complete the following steps:

- Test of the antagonistic activity.
- Production of metabolites in liquid media and extraction.
- Test of the extracts' activities against different bacteria, yeasts, molds and eukaryotic cell lines.
- Molecular identification of interesting isolates.
- HPLC-MS analysis of active extracts to detect new compounds and NMR to elucidate the structure.

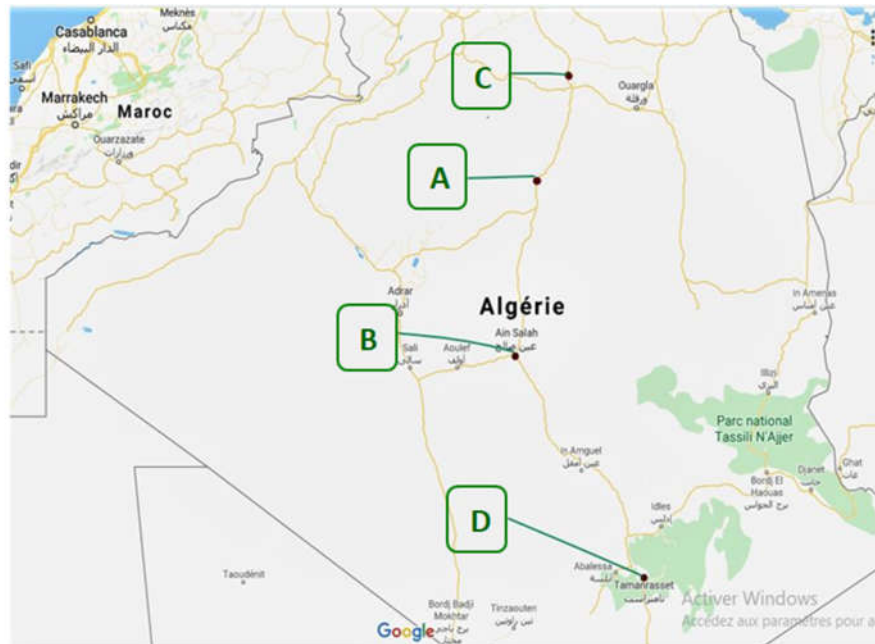
## REFERENCES

- [1] Demain AL. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;52:455–63. <https://doi.org/10.1007/S002530051546>.
- [2] Preethi Kathirvel. Secondary metabolites. India : Darshan publishers; 2021.
- [3] Reichenbach H. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001;27:149–56. <https://doi.org/10.1038/SJ.JIM.7000025>.
- [4] Garcia RO, Krug D, Müller R. Chapter 3 Discovering Natural Products from Myxobacteria with Emphasis on Rare Producer Strains in Combination with Improved Analytical Methods. *Methods Enzymol* 2009;458:59–91. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04803-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04803-4).
- [5] Dworkin M. Research on the Myxobacteria: Past, Present, Future. In: Engene Rosenberg, editor. *Myxobacteria*, Springer, New York, NY; 1984, p. 221–45. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8280-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8280-5_11).
- [6] Rosenberg E, Varon M. Antibiotics and Lytic Enzymes. In: Engene Rosenberg, editor. *Myxobacteria*, Springer, New York, NY; 1984, p. 109–25. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8280-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8280-5_5).
- [7] Karamanos Y, Singer M, Sogaard-Andersen L. 25th International Conference on the Biology of the Myxobacteria. *Mol Microbiol* 1999;31:1863–9. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1999.01318.X>.
- [8] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24:403–27. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2000.TB00548.X>.
- [9] Reichenbach H, Dworkin M. The Myxobacteria. In: Albert Balows, Hans G. Trüper, Martin Dworkin, Wim Harder, Karl-Heinz Schleifer, editors. *The Prokaryotes*, Springer, New York, NY; 1992, p. 3416–87. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_26).
- [10] Shimkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H. The Myxobacteria. In: Albert Balows, Hans G. Trüper, Martin Dworkin, Wim Harder, Karl-Heinz Schleifer, editors. *The Prokaryotes*, Springer, New York, NY; 2006, p. 31–115. [https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8\\_3](https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_3).

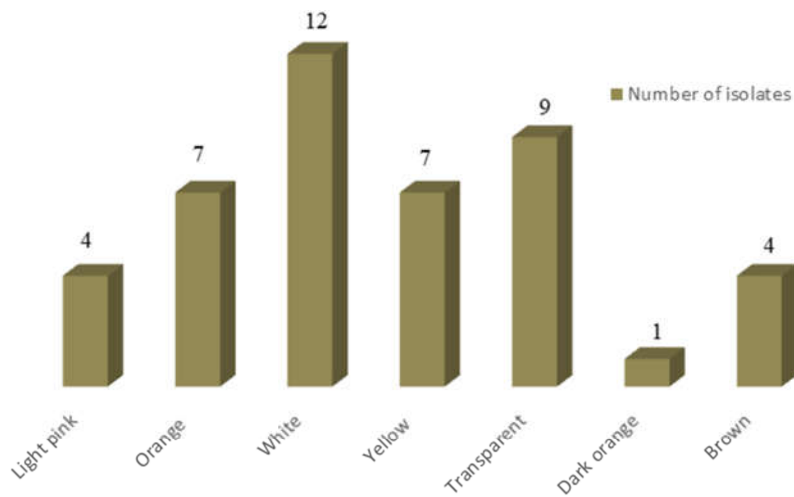
- [11] Mohr KI, Stechling M, Wink J, Wilharm E, Stadler M. Comparison of myxobacterial diversity and evaluation of isolation success in two niches: Kiritimati Island and German compost. *Microbiologyopen* 2016;5:268–78. <https://doi.org/10.1002/MBO3.325>.
- [12] Charousová I, Steinmetz H, Medo J, Javoreková S, Wink J. Soil myxobacteria as a potential source of polyketide-peptide substances. *Folia Microbiol* 2017;62:305–15. <https://doi.org/10.1007/S12223-017-0502-2>.
- [13] Zhao Z, Zhang X, Tan Z, Guo J, Zhu H. [Isolation and identification of cultivable myxobacteria in the rhizosphere soils of medicinal plants]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2013;53:657–68.
- [14] Reichenbach H. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001;27:149–56. <https://doi.org/10.1038/SJ.JIM.7000025>.
- [15] Dworkin M. Biology of the Myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* 1966;20:75–106. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.20.100166.000451>.
- [16] Reichenbach H. Myxococcales. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, editors. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.*, vol. 2 part C. seconde ed, Springer; 2005, p. 1059–71. <https://doi.org/10.1177/001872086000200109>.

**Table 1: Number of myxobacterial isolates obtained from the sampling areas.**

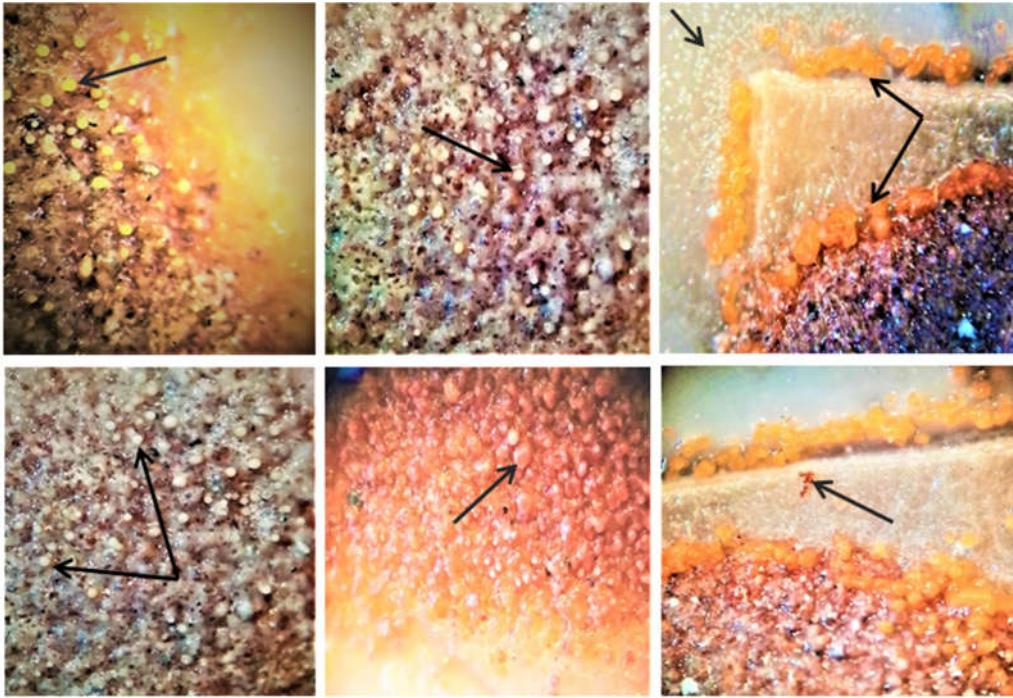
Isolation area	A : El-Menia	B : Ain Salah	C : Ghardaïa	D : Tamanrasset
Number of isolates	9	10	14	11



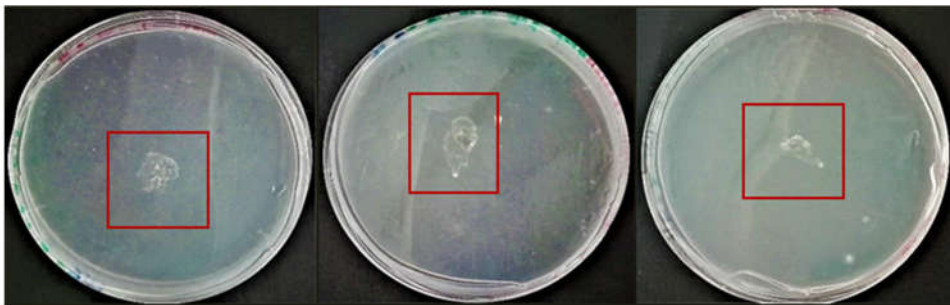
**Figure 1: Geographical map showing sample collection areas (Google maps); A : El-Menia ; B : Ain Salah ; C : Ghardaïa ; D : Tamanrasset**



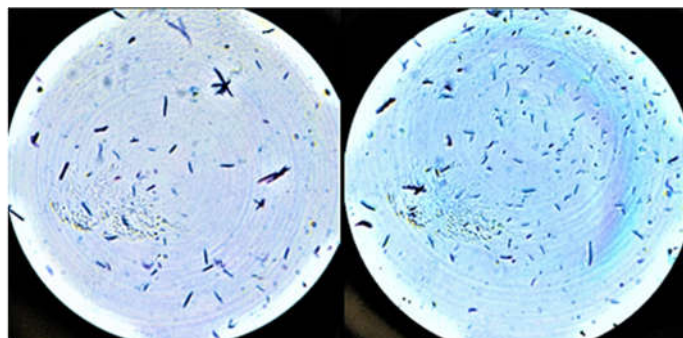
**Figure 2: Number of myxobacterial isolates according to fruiting body color**



**Figure 3: Direct observation of myxobacterial fruiting bodies by stereo microscope at x20 magnification**



**Figure 4: Appearance of myxobacterial colonies on Water-agar medium**



**Figure 5: Fresh microscopic observation of vegetative cells of myxobacterial isolates stained with methylene blue**



# SELECTION DE BACTERIES PGPR POUR AMELIORER ET AUGMENTER LA PRODUCTIVITE DE LA FEVE

Rim Tinhinen MAOUGAL<sup>1,2</sup>, Maya KECHID<sup>1,2</sup>, Abdelhamid DJEKOUN<sup>2</sup>

*1 Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), Département de Biotechnologie alimentaire. Université Frères Mentouri, Constantine 1, Algérie.*

*2 Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie végétale. Université Frères Mentouri, Constantine1, Algérie.*

*Auteur correspondant : Rym.maougal@umc.edu.dz*

## RESUME

Face à une augmentation de la population mondiale la planète est confrontée à un problème de sécurité alimentaire et l'agriculture n'aura pas d'autre choix que d'augmenter la production pour suivre le rythme et donc augmenter l'utilisation des engrais chimiques qui présentent des effets négatifs autant sur l'environnement que sur la santé humaine. Parmi les solutions proposées l'utilisation des rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes. Elles jouent également un rôle important dans le maintien de l'équilibre du sol, parmi ces bactéries, il y a celles qui ont montré leur capacité à favoriser la croissance des plantes : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Dans notre travail on a caractérisé 110 souches isolées dans la région de Constantine à partir de 5 variétés de fève. La caractérisation phénotypique et biochimique a montré que la plupart des isolats sont de couleur crème, légèrement élevé, plats et opaque, de gram<sup>-</sup>, catalase<sup>+</sup> et oxydase<sup>-</sup>, de forme Bacille. Les résultats obtenus nous ont orientés vers des groupes taxonomiques différents (*rhizobium Pseudomonas bacillus* etc.). L'évaluation du potentiel PGPR des bactéries (phytostimulation, biofertilisation et biocontrôle), a montré que 100% des bactéries sont capable de produire l'auxine avec la concentration la plus élevée (177,77µg/ml) pour l'isolat 6, que plus de 50% des isolats sont capables de produire l'azote, l'ammoniac et de minéraliser le phytate. Ces caractères PGPR sont un effet direct sur la croissance des plantes de cinq variétés de la fève et peuvent nous servir à sélectionner les bactéries les plus performantes pour des tests d'inoculations.

**Mots-clés** : sécurité alimentaire, promotion de croissance, fève, rhizosphère, caractères PGPR

## 1. INTRODUCTION

Les terres cultivables méditerranéennes sont de plus en plus soumises à la sécheresse et la faible disponibilité en phosphore ce qui crée un environnement fragile et instable pour la production [1]. Des bactéries ayant la capacité de contribuer à la tolérance des plantes aux différents changements environnementaux ont été décrites [2]. Ces bactéries sont définies comme favorisant la croissance des plantes (PGPR pour Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et peuvent exercer des modifications physiologiques sur la plante qui leur permet de mieux gérer les environnements difficiles avec des mécanismes directs/indirects citons l'augmentation de la longueur et de la densité des racines (production d'hormones), l'impact sur le métabolisme systémique des plantes, la phytoprotection microbienne (production de sidérophores) ainsi que d'autres mécanismes auxquels les bactéries PGPR participent comme la capacité à améliorer la disponibilité de l'azote et la solubilisation des phosphates, tous liés à l'augmentation de la disponibilité des nutriments dans le sol [3]. De nombreuses études ont porté sur ces mécanismes et sur la manière dont ils contribuent à améliorer les performances des plantes [4-7].

Au cours des dernières décennies, les pratiques agricoles ont été concentrées sur l'optimisation des rendements en augmentant la fertilisation. Cependant, une utilisation excessive provoque des lessivages, une pollution des ressources en eau et des émissions de gazes dans l'atmosphère avec des conséquences sur l'environnement et la santé humaine [8]. Des recherches ont été menées sur l'utilisation de ces bactéries PGPR en agriculture pour améliorer le rendement de légumes, céréales et arbres fruitiers [9-13].

La famille des *Fabaceae* est la troisième plus grande famille parmi les angiospermes et la deuxième après les *Gramineae* en termes d'importance pour l'homme [14] notamment dans les pays méditerranéens et en chine. Ces plantes sont les plus importantes sources de protéines et d'huile pour les humains et les

animaux et enrichissent le sol en azote. Les principales légumineuses à graines cultivées en Algérie sont le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la fève (*Vicia faba*), le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) et les lentilles (*Lens culnaris*).

La production mondiale de la fève reste relativement faible par rapport à la production mondiale des autres légumineuses à graines [15]. Et les principaux programmes de sélection de la fève comprennent le rendement, la résistance/ tolérance aux stress biotiques et abiotiques et l'adaptation à l'environnement et le développement de nouvelles techniques peuvent aider à accélérer la sélection d'un couple bactérie /plante efficient.

L'objectif principal de ce travail est l'isolement, la caractérisation et la sélection de souches performantes à utiliser comme biofertilisant potentiel de la fève et en particulier sur l'efficacité d'utilisation de l'azote et du phosphore ; l'isolement des bactéries a été effectué à partir de la rhizosphère de la culture pour étudier les mécanismes chez les souches locales en soulignant leurs similitudes et les différences attribuées à leur morphologie et à leurs traits bénéfiques pour les plantes.

## **2. MATERIEL ET METHODES**

### **2.1 Prélèvement des échantillons**

Cinq variétés de fève (Aquadulce, Hystal, Herst, Ghalla ainsi que la variété locale Maltais) cultivées dans la région d'Ibn Badis, Constantine (Algérie) ont été sélectionnées pour cette étude. Sur chaque variété les racines ont été lavées avec du tampon PBS et la solution obtenue a été diluée et déposée sur boîte de Petri sur milieu LB [16,17]. Le milieu a été incubé pendant 48 heures à 28 °C. 110 isolats bactériens ayant une apparence morphologique sur le milieu ont été purifiés par stries sur le même milieu.

### **2.2 Caractérisation phénotypique et biochimique**

La morphologie des colonies des isolats a été étudiée, notamment la forme, la consistance, l'élévation, la surface, l'opacité et la pigmentation. La réaction de Gram a été réalisée comme décrit par Vincent et Humphrey [18]. Le test de la cytochrome oxydase a été effectué à l'aide de bandelettes disponibles dans le commerce et la production de catalase a été réalisée en ajoutant une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la colonie bactérienne sur une lame de verre. L'effervescence indiquait l'activité catalase.

### **2.3 Criblage *in vitro* des rhizobacteries pour différentes activités favorisant la croissance des plantes**

Les isolats ont été criblés pour leur solubilisation du phosphate, leur production d'auxine AIA, leur production d'ammoniac et leur capacité à fixer l'azote.

Les isolats ont été testés pour la solubilisation du phosphate sur milieu Pikovskaya Agar [19]. Les bactéries ont été incubées à 20 °C pendant 5-7 jours. La zone de solubilisation a été déterminée par la formation d'un halo autour des colonies.

La capacité à produire de l'AIA a été détectée selon la méthode décrite par Pattern et Glick [20] ; ou les isolats ont été cultivés dans un milieu TSB (Trypton Soy Broth) complété par du tryptophane, après centrifugation le surnageant a été mélangé avec du réactif de Salkowski et les bactéries produisant de l'AIA ont été identifiées par réaction colorimétrique (couleur rose). La quantification de la production de l'AIA par chaque bactérie a été mesurée par spectrophotomètre à 535 nm selon la méthode décrite par Gordon and Weber [21].

La capacité des souches à produire de l'ammoniac a été évaluée par la méthode de Cappucino et Sherman [22]; ou son accumulation a été détectée par ajout du réactif de Nessler ou l'apparition de couleur allant du jaune au brun indique le degré de production d'ammoniac.

L'aptitude des bactéries à fixer l'azote atmosphérique a été déterminée en évaluant la croissance de la colonie bactérienne dans un milieu sans N (Burk's N free) [23], selon les protocoles de Wilson et Knight [24] et Park [25]. Toute croissance bactérienne sur ce milieu démontre une capacité à fixer l'azote.

### 3. RESULTATS

#### 3.1 Dénombrement des bactéries cultivables de la rhizosphère de la fève

Le dénombrement des bactéries isolées à partir de la rhizosphère des cinq variétés de la fève est présenté dans la figure 1. Les variétés étudiées ont montré des densités de la communauté bactérienne rhizosphérique cultivable significativement différentes et que cette communauté était significativement plus élevée chez la variété Ghalla avec  $8,7 * 10^6$  UFC/g de sol comparativement aux autres variétés étudiées.

#### 3.2 Caractérisation phénotypique des bactéries

La figure 2 représente les résultats de la caractérisation préliminaire des isolats. Les morphotypes bactériens ont été sélectionnés sur la base de la couleur, des caractéristiques morphologiques, de la morphologie des colonies (élévation, opacité, consistance). Les bactéries présentaient une grande variation morphologique. Toutes les bactéries avaient une surface lisse (données non montrées), le maximum des bactéries obtenues étaient blanches (35 %), lisses (62, 5 %), opaques (57, 5 %), convexes (37, 5 %) comme indiqué dans la figure 2.

Les cellules bactériennes ont montré une réaction Gram-négative et Gram-positives, en outre les bactéries Gram-positives représentaient la majeure partie de la population (tableau 1). Les isolats testés étaient également positifs au test de mobilité et étaient de formes bâtonnets même si l'on trouve des Cocci et des coccobacilles.

Les autres caractéristiques évaluées au long du criblage étaient l'activité oxydase ou une réponse positive à l'oxydase a été trouvé chez 35 % des isolats testés et ce qui concerne la réponse à  $H_2O_2$ , l'activité catalase a été détectée chez la plupart des isolats bactériens (87,5 %).

#### 3.3 Potentiel PGPR des isolats

Tous les isolats ont montré une activité PGPR significative comme indique dans le tableau 2. Les isolats ont été criblés pour la solubilisation du phosphate sur la gélose PVK, 20 isolats sur les 40 testés ont montré le développement d'une zone de solubilisation du phosphore très nette. Sur les 40 isolats bactériens testés une grande partie (67,5 %) a été capable de produire de l'ammoniac, un autre trait important des PGPR qui influence indirectement la croissance des plantes.

Tous les isolats bactériens ont produit une hormone favorisant la croissance des plantes à savoir l'AIA (tableau 2), la gamme de production était de 10 à 175  $\mu\text{g/ml}$  (figure 3) parmi tous les isolats, l'isolat 6 a produit le taux le plus élevé d'AIA (175  $\mu\text{g/ml}$ ) comparativement à l'isolat 68 qui a présenté le taux le plus bas (13  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 4. DISCUSSION

Les PGPR colonisent les racines des plantes et favorisent la croissance et le développement des plantes par divers mécanismes. Le mécanisme exact par lequel les PGPR stimulent la croissance des plantes n'est pas clairement connu, bien que plusieurs mécanismes tels que la production de phytohormones, la suppression des organismes nuisibles, l'activation de la solubilisation du phosphate et la promotion de l'absorption des nutriments minéraux soient généralement considérés comme impliqués dans la promotion de la croissance des plantes [26,27]. Il existe de nombreux articles sur les avantages et le dépistage des PGPR dans les plantes cultivées, en particulier le blé, le riz, le maïs, mais peu sur la fève.

Dans cette étude, des bactéries bénéfiques ont été isolées de la rhizosphère de la fève à Constantine, Algérie. Les bactéries isolées ont été criblées pour différentes activités de promotion de la croissance des plantes et caractérisées par des tests phénotypiques et biochimiques. La réponse positive à l'oxydase qui a été trouvée peut-être due au métabolisme oxydatif de certaines bactéries du sol, en ce qui concerne la réponse à  $H_2O_2$ , nous avons trouvé que les isolats étaient principalement catalase-positif et ce trait a suggéré leur métabolisme aérobie ou aéro-tolérant.

Cependant ces tests phénotypiques et biochimiques d'identification et de caractérisation bactérienne ne peuvent être utilisés que dans une certaine mesure pour distinguer les souches bactériennes, mais ne

peuvent pas distinguer celles qui sont étroitement liées. 20 isolats ont montré une zone de solubilisation du phosphore sur le milieu PVK. Il a été signalé que les concentrations les plus élevées de bactéries solubilisant le phosphore sont généralement trouvées dans le sol de la rhizosphère par rapport au sol non rhizosphérique [28].

L'AIA est l'une des phytohormones les plus importantes et fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes. Le potentiel des isolats bactériens à produire de l'AIA indique leur capacité à être utilisés comme régulateurs de croissance [29], il a été signalé que la production d'AIA par les PGPR peut varier selon les espèces et les souches, et qu'elle est également influencée par les conditions de culture, le stade de croissance et la disponibilité du substrat [30]. Dans notre étude la plupart des isolats bactériens étaient positifs pour la production d'AIA.

Une autre caractéristique importante des PGPR est la production d'ammoniac qui influence indirectement la croissance des plantes. Tous les isolats ont été capables de produire de l'ammoniac. Tous les isolats bactériens de la présente étude sont capables de produire de la catalase. Les souches bactériennes présentant une activité catalase doivent être très résistantes au stress environnemental, mécanique et chimique. Un certain nombre d'études suggèrent que les PGPR améliorent la croissance, l'émergence des graines, le rendement des cultures, et contribuent à la protection des plantes contre certains pathogènes et ravageurs [31-35].

De multiples activités de promotion de la croissance des plantes ont été rapportées par d'autres chercheurs

## 5. CONCLUSION

Dans la présente étude il a été mis en avant des isolats qui semblent être des PGPR efficaces qui ont pu solubiliser le phosphore inorganique, produire de l'AIA, produire de l'ammoniac, produire de l'oxydase et la catalase. La présence de l'un des traits PGPR testés *in vitro* ne garantit pas qu'un isolat particulier soit un PGPR, et leur absence ne garantit pas qu'il ne le soit pas

Ce type d'étude est nécessaire car l'utilisation de PGPR comme inoculant ou biofertilisants est une approche efficace pour remplacer les engrais chimiques. D'autres tests sont nécessaires pour établir les traits définitivement associés aux PGPR, en particulier dans les sols non stériles.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Melle LAADJABI C pour son aide active dans les analyses.

## REFERENCES

- [1] Rayan J, Singh M, Pala M. Long term cereal-based rotation trials in the Mediterranean region: Implications for cropping sustainability. *Adv. Agron.* 2008; (97): 273–312.
- [2] Vejan P, Abdullah R, Tumirah K, Ismail S, Boyce AN. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* 2016; (21), 573.
- [3] Bashan Y, De-Bashan LE. Plant growth-promoting. *Encycl. Soils Environ*; 2005; (1) 103–115.
- [4] Yadav AN, Verma P, Singh B, Chauhan VS, Suman A, Saxena AK. Plant Growth Promoting Bacteria: Biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. *Adv. Biotechnol. Microbiol.* 2017; (5): 555–671.
- [5] Di Benedetto NA, Corbo MR, Campaniello D, Cataldi MP, Bevilacqua A, Sinigaglia M, Flagella Z. The role of Plant Growth Promoting Bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: A focus on wheat. *Aims Microbiol.* 2017; (3):413–434.
- [6] Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* 2018; (206) :131–140.
- [7] Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Boyce A.N. Role of plant growth promoting Rhizobacteria in agricultural sustainability—A review. *Molecules.* 2016; (21): 1–17.

- [8] Zahid M, Abbasi K, Hameed S, Rahim N. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Front. Microbiol.* 2015 ;(6), 207.
- [9] Jorquera M, Inostroza NG, Lagos LM, Barra PJ, Marileo LG, Rilling JI, Campos DC, Crowley D, Richardson AE, Mora ML. Bacterial community structure and detection of putative plant growth-promoting rhizobacteria associated with plants grown in Chilean agro-ecosystems and undisturbed ecosystems. *Boil. Fertil. Soils* 2014; (50): 1141–1153.
- [10] Naqqash T, Hameed S, Imran A, Hanif MK, Majeed A, Van Elsas JD. Differential Response of Potato Toward Inoculation with Taxonomically Diverse Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Front. Plant Sci.* 2016; (7): 144.
- [11] Bharti N, Pandey SS, Barnawal D, Patel VK, Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Sci. Rep.* 2016, (6): 1–16.
- [12] Husen E, Wahyudi AT, Suwanto A, Saraswati R. Soybean seedling root growth promotion by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing pseudomonads. *Indones. J. Agric. Sci.* 2016, (10): 19–25.
- [13] Karlidag H, Es itken A, Turan M, Sahin F. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Sci. Hortic.* 2007, (114): 16–20.
- [14] Graham PH, Vance CP. Legumes importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003, (131): 872–877.
- [15] FAOSTAT. Production—Crops. Available online: <http://faostat.fao.org> 2010 (accessed on 2 May 2012).
- [16] Jossi M, Fromin N, Tarnawski S, Kohler F, Gillet F Aragno, M, Hamelin J. How elevated pCO<sub>2</sub> modifies total and metabolically active bacterial communities in the rhizosphere of two perennial grasses grown under field conditions *FEMS microbiology ecology*.2006; 55 (3): 339-350.
- [17] Maougal RT, Brauman A, Plassard C, Abadie J, Djekoun A, Drevon JJ. Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *European Journal of Soil Biology*.2014; (62): 8-14
- [18] Vincent JM, Humphrey B. Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 1970, (63): 379–382.
- [19] Johri BN, Sharma A, Viridi JS. Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*2003, (84):49–89
- [20] Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Aug; 68(8):3795-801.
- [21] Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 1951 Jan;26(1):192-5.
- [22] Cappucino JC, Sherman N. *Microbiology: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Benjamin/Cumming Pub. Co., New York, 1992
- [23] Hartono Jumadi O. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik Pengeksresi Amonium Pada Tanah Pertanaman Jagung (*Zea mays* L.) dan Padi (*Oryza sativa* L.) Asal Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan. *Jurnal Sainsmat*, 2014.Vol. III No. 2. FMIPA Universitas Negeri Makassar: Makassar.
- [24] Wilson PW, Knight SC. *Experiments in bacterial physiology* Minneapolis, Minn: Burgess Publishing Co, USA, 1952; pp. 49.
- [25] Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, et al. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.*2005 ; 160 (2) : 127-133.

- [26] Glick B. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Microbiol.* 1995; (41):109-117.
- [27] Lalande R, Bissonnette N, Coutlée D, Antoun H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil.* 1989; (115): 7-11.
- [28] Reyes V A, Valduz Z. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from the rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant Soil.* 2006; (287): 69-75.
- [29] Majeed A, Abbasi MK, Hameed S, Imran A and Rahim N. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Front. Microbiol.* 2015 ; (6):198.
- [30] Mirza M S, Ahmad W, Latif F, Haurat J, Bally R, Normand P, Malik K A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant Soil.* 2001; (237):47-54.
- [31] Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan S M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea L.*) by application of plant growth- promoting rhizobacteria. *Microbio. Res.* 2004. (159) :371-394.
- [32] Herman MAB, Nault BA, Smart CD. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protect.* 2008, (27):996-1002.
- [33] Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopath.* 2004, (94):1259-1266.
- [34] Kokalis-Burelle N, Kloepper JW, Reddy M S. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Appl. Soil Ecol.* 2006, (31):91-100.
- [35] Minorsky PV. On the inside. *Plant Physiol.* 2008, (146): 323- 324.

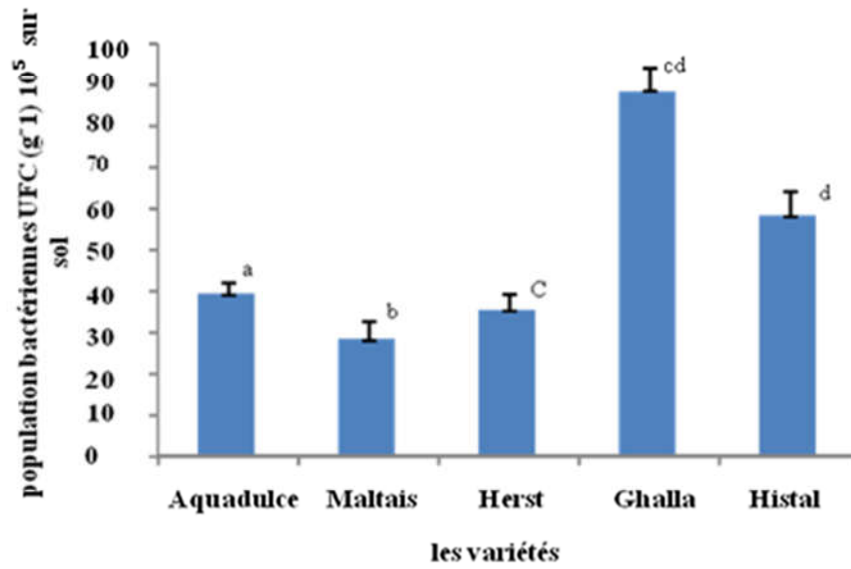


Figure 1 dénombrement des bactéries cultivables dans la rhizosphère des variétés de fève

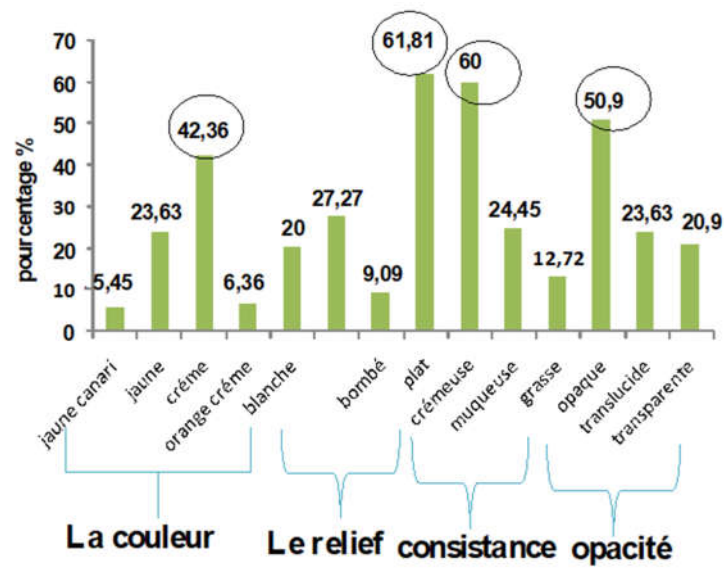


Figure 2 caractérisation morphologique des isolats de la rhizosphère de la fève

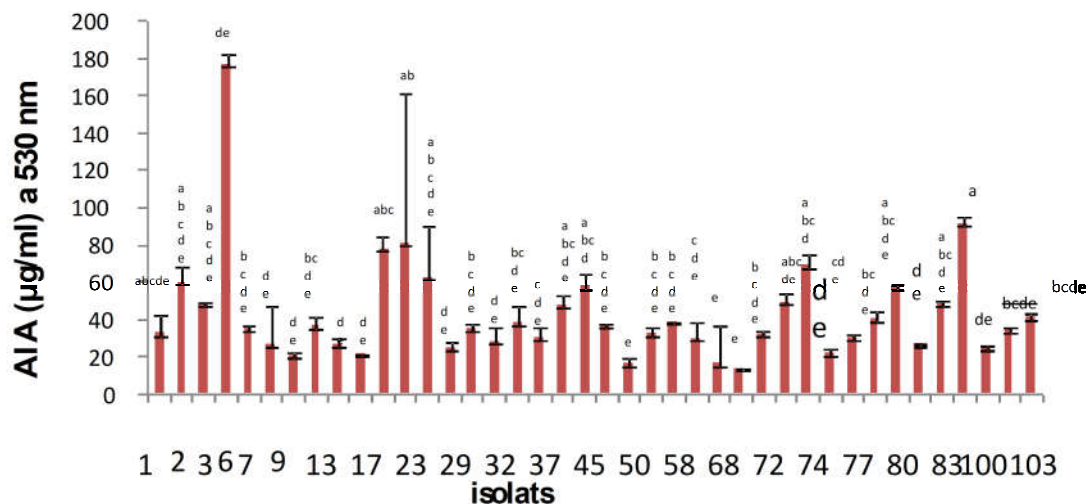


Figure 3 Production de l'Acide indole acétique (AIA) chez les isolats de la rhizosphère de la fève

Tableau 1 : Caractérisation microscopique des bactéries isolées à partir de la rhizosphère de la fève

Code d'isolat	Réaction de Gram	Forme des cellules	Mobilité	Code d'isolat	Réaction de Gram	Forme des cellules	Mobilité
1	-	Bacille	Très mobile	50	-	Cocobacille	Mobile
2	-	Bacille	Très mobile	56	-	Cocci	Peu mobile
3	-	Bacille	Très mobile	58	-	Bacille	Très mobile
6	+	Bacille	Très mobile	61	-	Bacille	Très mobile
7	-	Bacille	Très mobile	68	-	Cocobacille	Mobile
9	-	Bacille	Très mobile	70	-	Bacille	Très mobile
13	-	Bacille	Très mobile	72	-	Cocci	Peu mobile
15	-	Bacille	Très mobile	73	-	Bacille	Très mobile
17	-	Bacille	Très mobile	74	-	Cocobacille	Mobile
19	-	Bacille	Très mobile	75	-	Cocci	Peu mobile
23	-	Cocci	Peu mobile	77	-	Cocci	Peu mobile
24	-	Cocci	Peu mobile	79	-	Bacille	Très mobile
29	-	Cocci	Peu mobile	80	-	Cocci	Peu mobile
31	+	Cocobacille	Mobile	82	-	Cocobacille	Mobile
32	-	Bacille	Très mobile	83	-	Cocci	Peu mobile
35	-	Bacille	Très mobile	92	-	Cocci	Peu mobile
37	-	Cocobacille	Mobile	100	-	Bacille	Très mobile
38	-	Cocobacille	Mobile	101	-	Bacille	Très mobile
45	+	Cocobacille	Mobile	103	-	Bacille	Très mobile
46	-	Cocobacille	Mobile	110	-	Bacille	Très mobile



**Tableau 2 : caractéristiques favorisant la croissance des plantes chez les isolats de la rhizosphère des plantes**

Code d'isolat	Solubilisation P	Production Ammoniac	Détection d'azote	Code d'isolat	Solubilisation P	Production Ammoniac	Détection d'azote
<b>1</b>	-	-	+	<b>50</b>	-	+	+
<b>2</b>	+	-	-	<b>56</b>	+	+	+
<b>3</b>	+	-	-	<b>58</b>	+	+	+
<b>6</b>	-	+	+	<b>61</b>	+	+	+
<b>7</b>	-	±	+	<b>68</b>	+	- (vert)	-
<b>9</b>	-	-	+	<b>70</b>	-	+	-
<b>13</b>	-	-	-	<b>72</b>	-	- (vert)	+
<b>15</b>	+	+	+	<b>73</b>	+	+	+
<b>17</b>	+	+	+	<b>74</b>	+	±	+
<b>19</b>	+	+	+	<b>75</b>	-	+	-
<b>23</b>	-	+	+	<b>77</b>	-	- (vert)	+
<b>24</b>	+	+	+	<b>79</b>	+	+	-
<b>29</b>	-	±	+	<b>80</b>	-	±	+
<b>31</b>	-	+	+	<b>82</b>	-	±	+
<b>32</b>	-	-	-	<b>83</b>	+	±	+
<b>35</b>	-	+	-	<b>92</b>	+	-	-
<b>37</b>	+	+	+	<b>100</b>	+	±	+
<b>38</b>	+	+	+	<b>101</b>	+	-	-
<b>45</b>	-	+	+	<b>103</b>	-	-	+
<b>46</b>	-	±	+	<b>110</b>	+	-	+

# UTILISATION DE L'EXTRAIT AQUEUX DE *NIGELLA SATIVA* POUR INHIBER LES DERMATOPHYTES

Fatima Zohra BOUOUDEN<sup>1\*</sup>, Souâd AKROUM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université de Jijel. Algérie.

*Auteur correspondant : bououdenfatimaz@gmail.com*

## RESUME

Les dermatophytoses sont des infections fongiques du cuir chevelu et des cheveux. Elles sont très répandues et contagieuses. Elles peuvent être attribuées à une mauvaise hygiène capillaire qui fournit un environnement favorable pour la croissance et le développement des microorganismes. Ces infections sont très difficiles à traiter par les antifongiques ; de ce fait, nous avons essayé dans cette étude de trouver des extraits naturels capables d'inhiber les champignons pathogènes afin de remplacer les traitements actuels. Pour cela, nous avons isolé des dermatophytes des cheveux et du cuir chevelu de quelques personnes qui avaient des mycoses. Ensuite, nous avons testé sur les champignons obtenus l'activité antifongique de l'extrait aqueux de *Nigella sativa in vitro* en utilisant trois méthodes différentes. D'après les résultats obtenus, quatre espèces ont été isolées et identifiées comme étant *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* et *C. glabrata*. Les moisissures *M. canis* et *T. rubrum* étaient les plus abondantes chez les patients. L'extrait aqueux de *N. sativa* avait une bonne activité contre tous les champignons isolés et en particulier *M. canis*, qui était l'espèce la plus sensible.

**Mots-clés :** Dermatophytes, isolement, *Nigella sativa*, extrait, activité antifongique.

## 1. INTRODUCTION

Les dermatophytoses sont des mycoses superficielles qui touchent la peau et les phanères. Elles sont causées par des champignons filamenteux dits dermatophytes, qui appartiennent aux genres *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton*<sup>1-2</sup>. De même, nous pouvons avoir d'autres champignons qui causent des mycoses superficielles identiques, comme *Candida* et *Aspergillus*<sup>3</sup>. Ces mycoses sont répandues et contagieuses et elles sont dues principalement à un manque d'hygiène ou bien une contagion. En effet, la sueur et le sébum favorisent l'installation des dermatophytoses et favorisent surtout leur développement<sup>4</sup>. Les traitements de ces infections sont assez longs et contraignants pour les patients<sup>5-7</sup>. D'où la nécessité de rechercher un moyen alternatif naturel pour traiter ces mycoses.

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques remonte à des temps très anciens<sup>8</sup>. *Nigella sativa* a été utilisée depuis des années pour traiter différentes maladies grâce à son potentiel pharmacologique puissant<sup>9</sup>. Par exemple, en dermatologie, elle est utilisée pour traiter l'alopecie, l'eczéma et l'acné. En effet, cette plante peut être considérée comme un agent antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobien, immunomodulateur, anticancéreux, neuroprotecteur, cardioprotecteur, antidiabétique, gastro-protecteur, hépato-protecteur et antihypertensif. Mais il faut signaler que son utilisation est jusqu'à présent médicinale, c'est à dire qu'elle n'est pas encore prescrite comme médicament antifongique<sup>10-11</sup>. De plus, l'origine de son activité est jusqu'à maintenant méconnue.

Dans ce travail, nous avons testé l'activité antifongique *in vitro* de l'extrait aqueux des graines de *N. sativa* sur cinq champignons qui ont été isolés de chez des patients atteints de dermatophytoses, par trois méthodes différentes : la méthode des puits, la culture sur gélose contenant l'extrait et enfin la culture en milieu liquide contenant l'extrait.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Origine des *Candida*

Le laboratoire d'analyses médicales du Dr. BOUKROUCHE O. (Jijel, Algérie) nous a fourni les levures *Candida albicans* et *C. glabrata* qui étaient isolées à partir de patients atteints de dermatophytoses.

## 2.2. Isolement et identification des dermatophytes

Les squames et les cheveux cassés ont été prélevés de la zone d'alopecie chez des patients atteints de teigne par raclage à l'aide d'une curette et une pince stériles<sup>12</sup>. Ensuite, ils ont été ensemencés sur la gélose Sabouraud contenant la cycloheximide. L'incubation s'est faite à 27°C pendant 21 jours. L'identification des moisissures isolées était basée sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des mycéliums et des structures de reproduction obtenus<sup>13</sup>.

## 2.3. Préparation des suspensions fongiques

L'activité antifongique *in vitro* a été évaluée sur cinq champignons : *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* et *C. glabrata*. Ces derniers ont été cultivés dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose Sabouraud avec cycloheximide. Ensuite, une concentration de 10<sup>7</sup> (UFC/mL) de suspensions fongiques a été préparée avec une solution saline tamponnée au phosphate<sup>14</sup>.

## 2.4. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux a été préparé par macération des graines de *N. sativa* dans de l'eau distillée pendant 24 heures sous agitation, suivie d'une évaporation à sec avec l'évaporateur rotatif. Ensuite, une concentration de 1 mg/mL de l'extrait brut a été récupérée. Les dilutions nécessaires ont été préparées avec de l'eau distillée afin d'obtenir des concentrations qui allaient de 5 µL/mL à 100 µL/mL<sup>14</sup>.

## 2.5. Activité antifongique testée par la méthode des puits

Cette méthode consistait à introduire différentes concentrations préalablement préparées de l'extrait aqueux de *N. sativa* dans des puits de 6 mm de diamètre qui ont été réalisés à l'aide d'une pipette Pasteur à la surface d'une gélose à l'extrait de malt. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 25 °C pendant 72 heures pour les moisissures et à 30 °C pendant 24 heures pour les levures. Les diamètres de la zone d'inhibition ont été calculés et les résultats exprimés en concentration minimale inhibitrice (CMI), correspondant à la faible concentration de l'extrait pouvant inhiber les espèces étudiées<sup>14</sup>.

## 2.6. Activité antifongique testée par culture sur gélose contenant l'extrait

Elle consistait à cultiver les champignons sur une gélose qui contenait l'extrait étudié. Tout d'abord, la gélose à l'extrait de malt fondue a été mélangée convenablement avec 1 mL de la dilution de l'extrait aqueux étudié. Une fois la gélose était solide, l'ensemencement s'est fait par touche. Ensuite, les moisissures et les levures ont été incubées à 25 °C pendant 7 jours et à 30 °C pendant 24 heures, respectivement.

La lecture s'est basée sur la présence ou l'absence de croissance : la présence de croissance indiquait que la concentration de l'extrait était insuffisante pour inhiber les champignons, contrairement à une absence de croissance qui indiquait que l'extrait était actif contre ces derniers<sup>15</sup>.

## 2.7. Activité antifongique testée par culture en milieu liquide contenant l'extrait

Différentes concentrations de l'extrait aqueux ont été ajoutées dans un tube à essai qui contenait 5 mL du bouillon Sabouraud. Ensuite, les tubes ont été ensemencés et le mélange a été incubé à 28 °C pendant 7 jours pour les moisissures et à 30 °C pendant 24 heures pour les levures. La concentration des spores des champignons a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 630 nm<sup>16</sup>.

## 3. RESULTATS

### 3.1. Identification des champignons

L'observation macroscopique de la première moisissure a permis de caractériser une moisissure noire, d'aspect granuleux et entourée d'une marge blanche.

Sous microscope, nous avons observé un mycélium hyalin et septé qui portait des sporophores marron dressées et des têtes aspergillaires globuleuses surmontées de conidies marron, ornementées et disposées en chaînette (**Figure 1**). Ces caractéristiques nous ont permis de démontrer qu'il s'agissait d'*A. niger*.

Selon le même principe, nous avons caractérisé la morphologie des autres moisissures et nous les avons identifiées comme étant *M. canis* et *T. rubrum*.

### 3.2. Activité antifongique testée par la méthode des puits

Les résultats ont montré que l'extrait aqueux de *N. sativa* été actif sur toutes les espèces étudiées, notamment sur *M. canis* qui s'est révélée être l'espèce la plus sensible. D'un autre côté, *C. glabrata* était l'espèce la plus résistante. Les plus faibles CMI étaient celles de *M. canis*, *T. rubrum* et *C. albicans* (Tableau 1).

### 3.3. Activité antifongique testée par culture sur gélose contenant l'extrait

Pour *A. niger*, nous avons observé que la concentration de 35 µL/mL a donné une présence de croissance, à savoir la présence du mycélium et des structures de reproduction. Ces derniers étaient absents lorsque nous avons utilisé une concentration de 40 µL/mL. Et avec 45 µL/mL, nous n'avons obtenu aucune croissance de la moisissure. La CMI était donc de 45 µL/mL (Figure 2). Selon le même principe, nous avons déterminé les CMI de tous les champignons et nous avons remarqué que notre extrait avait une activité sur toutes les espèces étudiées (Tableau 2).

### 3.4. Activité antifongique testée par culture en milieu liquide contenant l'extrait

Les résultats de cette méthode ont montré que l'extrait aqueux des grains de nigelle a permis une inhibition de la croissance avec une diminution remarquable de la charge mycélienne et des structures de reproduction chez tous les champignons étudiés, et notamment chez *M. canis* (Figure 3). Les espèces les plus sensibles étaient : *M. canis*, *T. rubrum* suivi par *C. albicans* et *A. niger*. Néanmoins, *C. glabrata* était l'espèce la plus résistante à chaque fois (Tableau 3).

## 4. DISCUSSION

À la lumière des résultats obtenus dans cette étude, nous avons remarqué que pour les trois méthodes utilisées, nous avons obtenu les mêmes résultats, à savoir que l'extrait aqueux de *N. sativa* avait une activité sur les champignons testés. Notamment sur *M. canis* qui s'est révélée comme étant l'espèce la plus sensible. Suivie par *T. rubrum*, *C. albicans*, *A. niger* et en dernier lieu *C. glabrata*. Évidemment, *C. glabrata* était l'espèce la plus résistante à chaque fois. D'après les recherches antérieures, l'extrait aqueux de cette plante avait déjà été testé pour son activité contre les *Candida* à l'origine des candidoses chez l'être humain<sup>17</sup>. Par contre, nous n'avons trouvé aucun travail qui portait sur l'activité de cet extrait sur les moisissures utilisées dans ce travail. De plus, d'autres études ont mis en évidence l'effet antifongique de *N. sativa* sur d'autres champignons y compris *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *C. krusei* et *Penicillium citrinum*<sup>18-21</sup>. En effet, selon certaines investigations, la présence de molécules bioactives, principalement, la thymoquinone était à l'origine de l'activité antifongique de *N. sativa*<sup>22</sup>. Effectivement, ceci a été confirmé par plusieurs chercheurs<sup>20,22-25</sup>. De plus, selon d'autres recherches, nous avons constaté que les dermatophytes démontraient de plus en plus de résistance vis-à-vis des médicaments actuellement utilisés comme antifongiques principalement, les azoles et les échinocandines<sup>26</sup>. Sur la base des résultats de ce travail, nous pouvons supposer que l'extrait aqueux de *N. sativa* peut être utilisé comme un moyen alternatif naturel pour traiter les dermatophytoses.

## 5. CONCLUSION

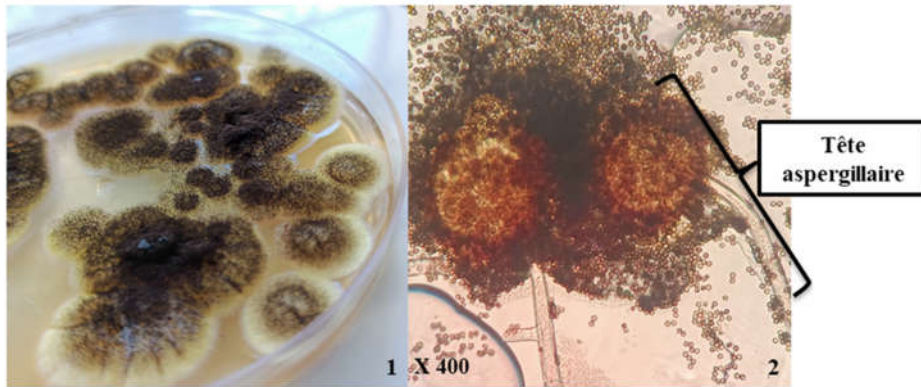
Les cinq espèces utilisées dans cette étude ont été isolées à partir des patients atteints de mycoses superficielles. Elles ont été identifiées comme étant *M. canis*, *T. rubrum*, *C. albicans*, *A. niger* et *C. glabrata*. Les résultats de l'activité antifongique ont démontré que l'extrait aqueux de *N. sativa* était capable d'inhiber tous les champignons testés, et ce avec les trois méthodes utilisées.

De ce fait, ces résultats pourraient suggérer que l'extrait aqueux de la nigelle pourrait être utilisé pour le traitement des dermatophytoses humaines. Néanmoins, d'autres études *in vivo* demeurent primordiales pour valider son activité et déterminer la voie d'administration qui donnera les meilleurs résultats.

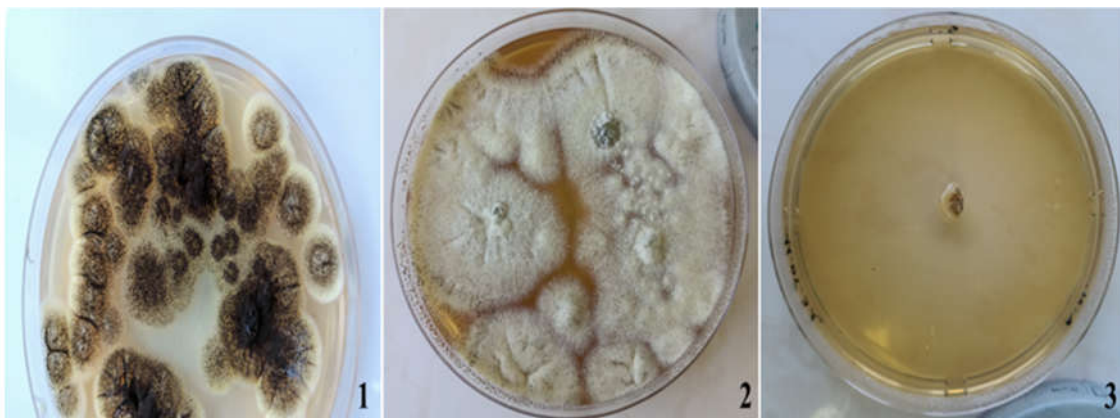
## REFERENCES

1. Williams TJ, Harvey S, Armstrong-James D. Immunotherapeutic approaches for fungal infections. *Curr Opin Microbiol.* 2020, 58:130-137. doi: 10.1016/j.mib.2020.09.007.
2. Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.* 2020, 16(10):e1008921. doi: 10.1371/journal.ppat.1008921.
3. Moubasher AH, Abdel-Sater MA, Soliman Z. Incidence and biodiversity of yeasts, dermatophytes and non-dermatophytes in superficial skin infections in Assiut, Egypt. *J Mycol Med.* 2017, 27(2):166-179. doi: 10.1016/j.mycmed.2017.01.005.
4. Alter SJ, McDonald MB, Schloemer J, Simon R, Trevino J. Common Child and Adolescent Cutaneous Infestations and Fungal Infections. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2018;48(1):3-25. doi: 10.1016/j.cppeds.2017.11.001.
5. Pihet M, Le Govic Y. Reappraisal of Conventional Diagnosis for Dermatophytes. *Mycopathologia.* 2017, 182(1-2):169-180. doi: 10.1007/s11046-016-0071-y.
6. Nilsson K, Friberg M, Rollman O, Tano E. Impact of prolonged storage of clinical samples at 4°C on the recovery of dermatophytes by culture or PCR analysis. *J Mycol Med.* 2019, 29(1):1-6. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.01.009.
7. Burstein VL, Beccacece I, Guasconi L, Mena CJ, Cervi L, Chiapello LS. Skin Immunity to Dermatophytes: From Experimental Infection Models to Human Disease. *Front Immunol.* 2020, 2(11):605644. doi: 10.3389/fimmu.2020.605644.
8. Maleš Ž, Drvar DL, Duka I, Žužul K. Application of medicinal plants in several dermatovenerological entities. *Acta Pharm.* 2019, 69(4):525-531. doi: 10.2478/acph-2019-0045.
9. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. A Review on Possible Therapeutic Effect of *Nigella sativa* and Thymoquinone in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2018, 17(6):412-420. doi: 10.2174/1871527317666180702101455.
10. Yimer EM, Tuem KB, Karim A, Ur-Rehman N, Anwar F. *Nigella sativa* L. (Black Cumin): A Promising Natural Remedy for Wide Range of Illnesses. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019, 12:1528635. doi: 10.1155/2019/1528635.
11. Hannan MA, Rahman MA, Sohag AAM, Uddin MJ, Dash R, Sikder MH, Rahman MS, Timalisina B, Munni YA, Sarker PP, Alam M, Mohibullah M, Haque MN, Jahan I, Hossain MT, Afrin T, Rahman MM, Tahjib-Ul-Arif M, Mitra S, Oktaviani DF, Khan MK, Choi HJ, Moon IS, Kim B. Black Cumin (*Nigella sativa* L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients.* 2021, 13(6):1784. doi: 10.3390/nu13061784.
12. Araya S, Tesfaye B, Fente D. Epidemiology of Dermatophyte and Non-Dermatophyte Fungi Infection in Ethiopia. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2020, 13:291-297. doi: 10.2147/CCID.S246183.
13. Long S, Carveth H, Chang YM, O'Neill D, Bond R. Isolation of dermatophytes from dogs and cats in the South of England between 1991 and 2017. *Vet Rec.* 2020, 187(10):e87. doi: 10.1136/vr.105957.
14. Akroum S. Antifungal activity of *Camellia sinensis* crude extracts against four species of *Candida* and *Microsporum persicolor*. *J Mycol Med.* 2018, 28(3):424-427. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.06.003.
15. Cheruiyot SE, Muturi M, Bii C. Antifungal activities of *Camellia sinensis* crude extract on selected pathogenic and mycotoxic Fungi. *J Bacteriol Mycol.* 2015, 2 :1070–80. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.06.003.

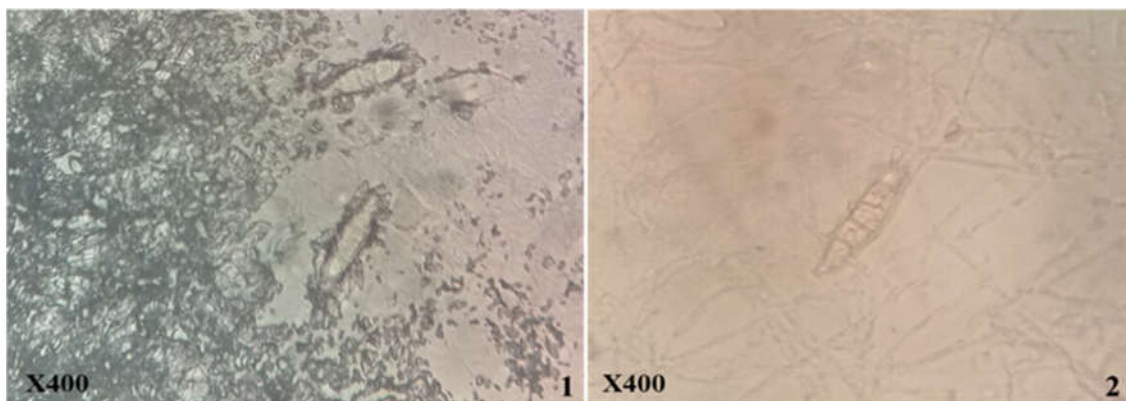
16. Davaadorj M, Ser-Od T, Al-Wahabi A, Kokubu E, Inoue T. Effect of Mongolian Herbal Tea on Growth of *Candida albicans*. Bull Tokyo Dent Coll. 2019, 60(1):61-66. doi: 10.2209/tdpublication.2018-0021.
17. Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH. The *in vivo* antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. Phytother Res. 2003, 17(2):183-6. doi: 10.1002/ptr.1146.
18. Khosravi AR, Minooeianhaghighi MH, Shokri H, Emami SA, S M A, Asili J. The potential inhibitory effect of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* essential oils on the growth of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus*. Braz J Microbiol. 2011, 42(1):216-24. doi: 10.1590/S1517-838220110001000027.
19. Hassanien MF, Assiri AM, Alzohairy AM, Oraby HF. Health-promoting value and food applications of black cumin essential oil: an overview. J Food Sci Technol. 2015, 52(10):6136-42. doi: 10.1007/s13197-015-1785-4.
20. Mahmoudvand H, Sepahvand A, Jahanbakhsh S, Ezatpour B, Ayatollahi Mousavi SA. Evaluation of antifungal activities of the essential oil and various extracts of *Nigella sativa* and its main component, thymoquinone against pathogenic dermatophyte strains. J Mycol Med. 2014, 24(4): e155-61. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.06.048.
21. Barashkova AS, Sadykova VS, Salo VA, Zavriev SK, Rogozhin EA. Nigellothionins from Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seeds Demonstrate Strong Antifungal and Cytotoxic Activity. Antibiotics (Basel). 2021, 10(2):166. doi: 10.3390/antibiotics10020166.
22. Fatima Shad K, Soubra W, Cordato DJ. The role of thymoquinone, a major constituent of *Nigella sativa*, in the treatment of inflammatory and infectious diseases. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2021, 48(11) :1445-1453. doi : 10.1111/1440-1681.13553.
23. Aljabre SH, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. J Ethnopharmacol. 2005, 101(1-3):116-9. doi: 10.1016/j.jep.2005.04.002.
24. Sarkar C, Jamaddar S, Islam T, Mondal M, Islam MT, Mubarak MS. Therapeutic perspectives of the black cumin component thymoquinone : A review. Food Funct. 2021, 12(14) :6167-6213. doi : 10.1039/d1fo00401h.
25. Özdal Zincir Ö, Özdal U, Ünlü Ö, Demirci M, Katiboğlu AB, Egil E, Altan Şallı G. Synergistic effect of thymoquinone and nystatin in the treatment of oral candidiasis; an *in vitro* study. Odontology. 2022, 110(2):330-337. doi: 10.1007/s10266-021-00667-4.
26. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. Nat Rev Dis Primers. 2018, 4:18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26.



**Figure 1 : Caractérisation d'*Aspergillus niger*.  
Observation macroscopique (1) et microscopique (2).**



**Figure 2 : Résultats de l'activité antifongique sur boîte de Pétri de l'extrait aqueux de *N. sativa* sur *A. niger*. Absence d'activité avec 35 µL/mL (1), faible activité avec 40 µL/mL (2), CMI fixée à 45 µL/mL (3).**



**Figure 3 : Résultats de l'activité antifongique en milieu liquide sur *M. canis*. Abondance du mycélium et des structures de reproduction avec 10 µL/mL de l'extrait (1), diminution de la charge mycélienne avec 15 µL/mL de l'extrait (2).**

**Tableau 1 : Résultats de l'activité antifongique (méthode des puits) de l'extrait aqueux de *N. sativa* sur les champignons étudiés (exprimés en  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).**

	<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. glabrata</i>
CMI	30	40	45	50	60

**Tableau 2 : Résultats de l'activité antifongique sur gélose contenant l'extrait aqueux de *N. sativa* (exprimés en  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).**

	<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. glabrata</i>
CMI	25	35	40	45	55

**Tableau 3 : Résultats de l'activité antifongique en milieu liquide contenant l'extrait aqueux (exprimés en  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).**

	<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. glabrata</i>
CMI	20	30	35	35	55



# VALORISATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE CERTAINES ESPECES VEGETALES SAHARIENNES SUD-EST ALGERIEN

Samira FETNI<sup>1\*</sup>, Nabil BERTELLA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Département de pharmacie, Faculté des sciences médicales, Université de Batna2, 05000, Algérie

<sup>2</sup> Institut des sciences agronomiques et vétérinaires, Université de Batna1, Algérie

\* Auteur correspondant : [s.fetni@univ-batna2.dz](mailto:s.fetni@univ-batna2.dz)

## RESUME

*Solanum pseudocapsicum* L. (Solanaceae) et *Calicotome villosa* (Poir.) Link (Fabaceae) sont des plantes très utilisées dans la médecine traditionnelle en Algérie. Notre étude vise à démontrer des bases scientifiques de l'activité antibactérienne des feuilles de *S.pseudocapsicum* et des fleurs de *C.villosa*, plantes médicinales qui semblent être efficaces contre les infections bactériennes. Nous avons préparés différents extraits par l'utilisation de solvants à polarité croissante. Nos dosages ont montré que l'extrait aqueux est le plus riche en polyphénols pour *S.pseudocapsicum* alors que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes cas de l'extrait chloroformique de *C.villosa*. Les extraits issus de ces plantes ont été testés sur la croissance bactérienne, in vitro de dix souches ATCC par la technique de diffusion sur l'agar. Les résultats ont révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle de *S.pseudocapsicum* et l'extrait chloroformique de *C.villosa* ont une activité antibactérienne dose-dépendante sur les souches bactériennes étudiées. Notons, l'action des extraits aqueux des deux plantes citées qui ont donné les meilleures valeurs antibactériennes sur les souches bactériennes utilisées. Ainsi, ces extraits peuvent être une ressource indéniable pour la mise au point de phyto-médicaments contre les infections bactériennes.

**Mots clés :** *Solanum pseudocapsicum* L., *Calicotome villosa* (Poir.) Link, polyphénols, flavonoïdes, gentamicine, effet antibactérien.

## 1. INTRODUCTION

Les régions sahariennes constituent des vastes étendues géographiques occupant une bonne partie du globe terrestre. Elles sont réputées par leur faible biodiversité, et leurs difficiles conditions pour la vie humaine. En outre, au niveau du globe terrestre, les déserts peuvent être froids (déserts de l'Asie centrale) ou chauds (continents africain, asiatique, et américain), ce qui crée des conditions difficiles d'installation des êtres vivants (animaux et végétaux). En zones sahariennes, la végétation des zones arides, en particulier est très clairsemée et a en général un aspect nu et désolé. Les arbres sont aussi rares que dispersés et les herbes n'y apparaissent que pendant une période très brève de l'année, quand les conditions deviennent favorables [1]. De même, les espèces végétales désertiques vivent généralement en conditions climatiques draconiennes et par conséquent, elles possèdent un système d'adaptation très particulier aux conditions environnementales sahariennes [2]. Par ailleurs, les espèces végétales ont toujours été indispensables tant pour l'alimentation, les soins de santé, la construction que pour la purification de l'air et de l'eau. L'ensemble des services rendus par la biodiversité végétale en font un élément essentiel pour l'humanité. Cela est particulièrement vrai pour les plantes médicinales qui sont largement utilisées par les humains. Elles constituent ainsi une richesse culturelle et naturelle propre à chacune des communautés et aux territoires qu'elles occupent. Ce constat est d'autant plus vrai qu'on soit en régions à climat précaire, comme au Sahara par exemple [3].

Dans ce contexte, la caractérisation phytochimique et l'étude des activités biologiques des espèces végétales sahariennes constitue aujourd'hui l'un des plus importants défis pour la recherche scientifique sur les plantes médicinales. Compte tenu de la forte dépendance qui existe entre les conditions écologiques de développement des espèces végétales et leurs particularités phytochimiques, notamment l'activité biologique, la caractérisation écologique des sites de collecte des espèces étudiées serait indispensable pour toute interprétation des résultats prévisibles.

L'Algérie possède de nombreuses espèces endémiques susceptibles de fournir des extraits végétaux, utilisées dans différents domaines pour leurs propriétés thérapeutiques et organoleptiques, notamment odorantes (parfumerie, cosmétique), pharmaceutiques (aromathérapie), gustatives (additifs alimentaires)

ou encore comme sources d'isolats pour les hémisynthèses [4-6]. Depuis l'antiquité, les extraits volatils des plantes aromatiques sont l'objet de recherche en raison de leurs propriétés biologiques [7-9]. En effet, les plantes contiennent, selon leurs organes (feuilles, tiges, racines, fleurs...), des substances dotées de propriétés antimicrobiennes et antiparasitaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes...). Elles possèdent des propriétés biologiques (acaricides, insecticides, bactéricides, fongicides,...) et ont fait l'objet d'études phytochimiques et biologiques [10-11].

Les antibiotiques ont été largement utilisés en traitement et en prévention des infections bactériennes en médecine humaine et vétérinaire depuis les années 40 [12]. Cependant leurs utilisations abusives ont rapidement entraîné l'apparition de phénomène de résistances aux activités antibiotiques [13] ; l'usage d'antibiotiques, à des fins curatives, a été suivi par un développement de résistance des bactéries opportunistes ou pathogènes chez les individus infectés [14]. Les organismes internationaux recommandent uniquement l'usage des antibiotiques à des fins thérapeutiques et ne prescrivent leur utilisation qu'à des usages de préventions des maladies [15]. Des alternatives aux antibiotiques ont été développées, à partir d'extraits de plantes, de manière à renforcer l'immunité des êtres humains ou à inhiber la croissance des bactéries indésirables [16].

Notre travail consiste à rechercher de nouvelles molécules naturelles dotées d'activités biologiques et/ou pharmacologiques. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à évaluer l'activité microbienne de deux plantes médicinales : *Solanum pseudocapsicum* L. et *Calicotome villosa* (Poir.) Link. Ces plantes sont, en effet, très utilisées en médecine traditionnelle.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Réactifs chimiques

Tous les réactifs, étalons et solvants de qualité analytique proviennent de Sigma-Aldrich (Allemagne et Espagne) et de Merck Darmstadt (Allemagne).

### 2.2. Matériel végétal

Les feuilles de *Solanum pseudocapsicum* et les fleurs de *Calicotome villosa* ont été collectées dans la région d'Ouled Djellal (Wilaya de Biskra) le mois de juin 2015. Elles ont été séchées à température ambiante pendant 3 jours et broyées en poudre.

### 2.3. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans le présent travail proviennent de cinq laboratoires publics et privés de la wilaya de Constantine, et de l'Université de Tlemcen. Elles sont largement observées dans diverses pathologies humaines. Ces bactéries sont souvent multi résistantes aux antibiotiques et responsables d'infections plus ou moins graves. Elles sont conservées dans le milieu MHB (Muller Hinton Broth) additionné de 10% (V/V) de glycérol à -20°C. Il s'agit des :

- Bactéries à Gram-positif : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 33862.
- Bactéries à Gram-négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 43972, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 et *Citrobacter freundii* ATCC 34015.

### 2.4. Extraction des flavonoïdes

La préparation des extraits à partir de *S.pseudocapsicum* et *C.villosa* a été effectuée selon la méthode de Markham (1982) qu'est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques [17]. L'extraction des flavonoïdes de nos plantes est effectuée à partir de la matière sèche broyée (100 g) par le méthanol (85%). Le mélange subit une agitation pendant une nuit à 4°C puis on le laisse quelques temps pour sédimenter, on obtient un culot et un surnageant, ce dernier est filtré à travers la laine de verre. Le culot subit une deuxième extraction (méthanol/eau). Les deux filtrats sont combinés, filtrés puis soumis à une évaporation à basse pression à 40°C, permettant ainsi d'obtenir un extrait brut (EBr). 50 ml de la phase aqueuse subit une lyophilisation puis conservé à -20°C, le reste sera délipidé par de l'hexane

jusqu'au l'absence total de la couleur, l'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (EHx). La phase inférieure est décantée par le chloroforme en donnant une fraction organique (ECh), et enfin par l'acétate d'éthyle pour donner la fraction de l'acétate d'éthyle (EAc). Le raffinat qui en résulte représente la fraction aqueuse (EAq) résiduelle qui est également soumise à un séchage et conservés avec les autres extraits. Les différentes fractions récoltées sont ensuite évaporées à sec à 40°C dans l'évaporateur avec la pesée des extraits afin de déterminer leur valeur en matière sèche ainsi que le rendement d'extraction et les cinq fractions ont été conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

### **2.5. Dosage des polyphénols**

Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon la méthode de Fast-Blue BB [18]. Ce dosage permet d'apprécier le contenu polyphénolique total d'un échantillon donné par une réaction directe avec une interaction entre les fonctions phénoliques et le sel de Fast Blue formant un complexe stable. Les extraits ont été préparés à une concentration de 0.25 mg/ml. La réaction commence en ajoutant 150 µl/puits d'extraits dans la plaque 96 puits, puis mélangé avec 15 µl/puits de Fast Blue (0.01% v/v H<sub>2</sub>O) et 15 µl/puits de NaOH (5% v/v H<sub>2</sub>O). Ensuite, la plaque a été incubée pendant 120 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été lue à 420 nm avec un lecteur de microplaques multi mode BioTek Synergy HT (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA), et les données ont été acquises et traitées à l'aide du logiciel Gen5™ de BioTek (BioTek Instruments Inc.). Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant une solution standard d'acide gallique (0.6-0.025 mg/ml) et exprimée en µg d'équivalents d'acide gallique (GAE)/mg d'extrait. L'équation obtenue pour la courbe d'étalonnage de l'acide gallique était  $y = 1.0117x + 0.0012$  (R = 0.999).

### **2.6. Dosage des flavonoïdes**

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. La méthode consistait à ajouter 1 ml d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm [19]. La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 µg/ml) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait). L'équation obtenue pour la courbe d'étalonnage de la quercétine était  $y = 0.0241x + 0.0110$  (R = 0.997).

### **2.7. Activité antibactérienne**

Les tests antimicrobiens ont été effectués sur une gamme de germes couramment responsables de diverses pathologies en utilisant la méthode des disques. Une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 McFarland (absorbance de 0.08-0.13 à 625 nm) est préparée à partir d'une culture jeune (18 heures). Un inoculum de cette suspension est ensemencé sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller Hinton (MH). Des disques de papier Wattman n°03 de 6 mm de diamètre stérilisés et imprégnés de 10 µl d'extraits (100 mg/ml) ont été déposés sur la gélose. Dans les mêmes conditions, des disques imprégnés avec de l'eau distillée et le DMSO sont utilisés comme témoins négatifs et l'agentamicine est utilisée comme témoin positif. La lecture a été faite après la diffusion des extraits à 4°C/3h et après 24 heures d'incubation à 37°C [20]. L'activité antimicrobienne des extraits est observée par la présence d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extrait et les résultats sont exprimés en millimètre (mm).

### **2.8. Analyse statistique**

Les résultats des tests effectués in vitro sont exprimés en moyenne ± SD. La différence entre le contrôle positif et les extraits est déterminée par le test t de *Student* pour les comparaisons et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05. La comparaison des moyennes est déterminée grâce au logiciel SPSS version 20.00.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Rendement d'extraction et dosage des composés phénoliques

Le tableau 1 montre que l'EBr de *C.villosa* représente le rendement le plus élevé en comparaison avec EAq et ECh suivi par EAc. Il ressort de cette étude que, l'EBr de *C.villosa* a donné un rendement plus élevé (42.58%) que celui obtenu avec le l'EBr du *S.pseudocapsicum* (28.97%). Cette différence est probablement due à la nature de la plante utilisée, car les conditions de l'extraction (solvants, température et temps) sont les mêmes pour les deux plantes.

Comme le montre le tableau 2, les extraits EAc et EBr des feuilles de *S.pseudocapsicum* et des fleurs *C.villosa* sont plus riches en phénols totaux. La détermination des taux de flavonoïdes révèle que l'ECh du *S.pseudocapsicum* est le plus riche suivi par l'EBr. Par contre, l'EAq de *C.villosa* représente la fraction la plus pauvre, l'EAc est la plus riche en flavonoïdes suivis par l'ECh et l'EBr.

La solubilité des composés phénoliques est régie par leur nature, qui peut varier de simples substances aux composés fortement polymérisées et par la polarité des solvants et la méthode utilisée [21-22]. Selon Aliero et al. (2007), l'extraction des composés phénoliques est influencée par leur solubilité dans le solvant utilisé et la polarité de ce dernier joue un rôle dans l'accroissement de la solubilité phénolique [23]. De même, Kim et al. (2008), ont noté que la température peut agir sur l'extraction d'un composé donné en modifiant son coefficient de diffusion ou sa solubilité dans le solvant [24]. Aussi, ils ont remarqué une diminution de la quantité d'anthocyanines extraites à des températures supérieures à 40°C qui peut être attribuée à leur dégradation à des températures élevées. Ces multiples paramètres à optimiser rendent difficile l'élaboration d'un procédé d'extraction approprié à tous les composés phénoliques des plantes [18-19]. Dans notre cas, avant de procéder à l'extraction, nous avons d'abord séché le matériel végétal à l'air libre et à l'abri de la lumière comme préconisé par Cherkaoui-Tangi et al. (2008), afin d'éviter la dégradation de certains composés phénoliques sous l'effet des hydrolases qui peuvent exister dans le matériel végétal frais [25]. Par la suite, la matière sèche retenue est réduite en poudre fine. Selon Chikhi et al. (2014) et Badami et al. (2005) la granulométrie de la poudre est un paramètre important dans la mesure où la réduction de la taille des particules augmente la surface de contact avec le solvant [26-27]. Le criblage des activités antimicrobiennes des plantes se fait après des extractions brutes aqueuses ou alcooliques qui peuvent être suivis de diverses méthodes d'extraction organiques [28]. Tous les composants antibactériens des plantes de structure aromatique ou composés organiques saturés, sont souvent obtenus par une extraction initiale par l'éthanol ou le méthanol [29]. Les composés phénoliques tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité antioxydante des plantes [30].

#### 3.2. Activité antimicrobienne

D'après le tableau 3, les extraits ECh et EAc du *S.pseudocapsicum* semblent avoir l'effet inhibiteur le plus élevé. Ces extraits ont une activité inhibitrice sur presque la totalité des souches. En effet, ces deux extraits ont induit des zones d'inhibition d'un diamètre qui varie entre 6 et 27 mm. Ces effets sont faibles par rapport à ceux obtenus avec l'antibiotique standard utilisé, à savoir la Gentamicine, qui a donné des diamètres d'inhibition de 14.5 à 36 mm. De ces résultats, il ressort également que l'EAq du *S.pseudocapsicum* a induit des effets inhibiteurs entre 0.5 mm et 11 mm envers neuf souches testées. L'EAq du *S.pseudocapsicum* a montré une activité inhibitrice envers la croissance de 3 souches de *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les extraits les plus actifs sont l'EAc sur *Salmonella enterica* et *Proteus mirabilis* avec des zones d'inhibitions respectifs de 27 et 23 mm, l'ECh sur les souches de *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli* avec des zones d'inhibitions de 16, 15 et 14 mm, respectivement et l'EBr sur *Acinetobacter baumannii* avec une bonne zone d'inhibition de 12 mm. Ces différences peuvent être expliquées par le taux élevé en principe actif antibactérien (Tableau 3).

L'évaluation de l'effet antibactérien des extraits de *C.villosa* montré que l'activité antibactérienne exhibée par l'EAq et ECh est plus importante que celle obtenue avec les autres extraits. Cependant, l'EAc

a inhibé plus de souches bactériennes que l'EBr, qui a donné une inhibition de la croissance de *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (zones d'inhibitions de 19 et 21 mm, respectivement).

Ces différences semblent indiquer que les extraits ECh et EAq ont un taux plus élevé ou avec plus de principes actifs antibactériens que les autres extraits. Il est à noter que dans la présente recherche, les extraits les plus actifs sont: l'EAq et ECh sur la totalité des souches (zone d'inhibition de 07 et 34 mm, respectivement), Cet effet est plus considérable que celui obtenu avec l'antibiotique standard à savoir la Gentamicine qui a donné un diamètre d'inhibition de l'ordre de 15 à 36 mm. L'ECh a présenté une forte activité antibactérienne sur *Proteus mirabilis* (34 mm) et sur *Pseudomonas aeruginosa* (31 mm) en comparaison avec la Gentamicine qui donne des zones de 29 et 27 mm, (Tableau 3).

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Elkhamlichi et al. (2017) qui ont signalés une forte sensibilité de quelques souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (27 mm) à l'huile essentielle *C.villosa* [31]. Conformément à nos résultats l'étude de Chikhi et al. (2014), ont montré l'efficacité des extraits éthanolique des parties aérienne de la plante *C. villosa* contre *S.aurus* avec une zone d'inhibition de 10 mm [26]. L'étude de l'activité antimicrobienne d'autre partie de *C. villosa* (les grains et les gousses) par Giuseppe et al. (2001) ont montré la grande sensibilité de la souche *E.coli* contre les extraits méthanoliques de ces deux parties ayant un pouvoir antimicrobien non négligeable [32]. Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *S. pseudocapsicum* sont similaires à ceux trouvés dans la littérature [33-38]. L'étude menée par Rawani et al. (2013) ont rapportés que les extraits de *S. pseudocapsicum* possèdent une bonne activité antibactérienne contre les souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus blanc*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* [39]. L'absence de l'activité antibactérienne pourrait s'expliquer par la résistante développée de quelques souches qui réagissent différemment à divers extraits. Ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe ; cettedernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre les bactéries de Gram négatives deviennent actives [40-41]. Il semble que ces souches se révèlent résistantes à un très grand nombre d'extraits [42]. La plus grande résistance des souches à Gram positive de *Staphylococcus aureus* vers les extraits peut être expliquée par la structure de paroi hétérogène de la bactérie. Les bactéries Gram négatives possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram (+), le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polysidiques [31-32]. En revanche chez les bactéries à Gram (-), le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et de lipopolysaccharides [33-34]. L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'elles puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (Antibiotiques). La résistance des bactéries à Gram négative aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules à franchir la membrane externe [43-44].

#### 4. CONCLUSION

L'étude des plantes médicinales représente une stratégie universelle pour la découverte de nouveaux médicaments car elle permet d'accéder à une source importante de molécules à potentiel thérapeutique dans le cas de nombreuses pathologies. Pour valoriser les vertus thérapeutiques des plantes médicinales locales, nous nous sommes intéressés à l'étude de deux plantes endémiques en Algérie, le *S. pseudocapsicum* et la *C. Villosa*. Dans la présente étude, nous avons choisi d'évaluer l'activité antimicrobienne des fractions extraites des différentes parties de ces deux plantes. D'après les résultats obtenus dans cette recherche, les extraits ECh et EAc des deux plantes sont plus actifs vis-à-vis de l'inhibition des souches bactériennes. Une corrélation significative entre la teneur en polyphénols et en

flavonoïdes et l'activité antibactérienne des extraits a été observée, mais ceci n'exclue en aucun cas la contribution d'autres composés.

## REFERENCES

- [1]. Palici, F.I. Liktör-Busa, E. Zupkó, I. Touzard, B. Chaieb, M. Hohmann, J. 2015. Study of in vitro antimicrobial and antiproliferative activities of selected saharan plants. *ActaBiologicaHungarica*. 66 (4): 385-394.
- [2]. Ozenda, P. 2004. Flore et végétation du Sahara. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 621 p.
- [3]. Quezel, P. 1978: Analysis of the Flora of Mediterranean and Saharan Africa. - *Annals of the Missouri Botanic Garden* 65: 479-534. & Santa, S. 1962-1963: Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions désertiques méridionales. Tome et II. - Centre National de la Recherche Scientifique. France, Paris 7, 1170 p.
- [4]. Papaefthimiou, D. Papanikolaou, A. Givanoudi, S. Kanellis, A.K. Falara, V. Kostas, S. 2014. Genus *Cistus*: a model for exploring glabdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Frontiers in Chemistry*. 2 : 35.
- [5]. Pottier-Alapetite, G. 1979-1981: Flore de la Tunisie. Angiospermes Dicotylédones: apétales dialypétales - gamopétales. Première et deuxième partie. - Ouvrage publié 148 par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture - Tunisie, 1190 p.
- [6]. Quezel, P. Santa, S. 1963. In: Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales CNRS, Paris. 1-2 : 600-601.
- [7]. Quezel, P. 1978 : Analysis of the Flora of Mediterranean and Saharan Africa. - *Annals of the Missouri Botanic Garden* 65: 479-534. & Santa, S. 1962-1963: Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions désertiques méridionales. Tome et II. - Centre National de la Recherche Scientifique. France, Paris 7, 1170 p.
- [8]. Ratnam, D.V. Ankola, D.D. Bhardwaj, V. Sahana, D.K. and Kumar, M. N. V. R. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 113 (3): 189-207.
- [9]. Rédei, D. Forgo, P. Molnár, J. Szabó, P. Zorig, T and Hohmann, J. 2012. Jatrophanediterpenoids with multidrug resistance-modulating activity from *Euphorbia mongolica* Prokh. *Tetrahedron*. 68(4) : 8403-8407.
- [10]. Parsaeimehr, A. Sargsyan, E and Javidnia, K. 2010. A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of *Ephedra*. *Molecules*. 15(3) : 1668-1678.
- [11]. Palici, I.F. Liktör-Busa, E. Zupkó, I. Touzard, B. Chaieb, M. Urbán, E. Hohmann, J. 2015. Antimicrobial and antiproliferative activities of some North African desert plants. International Congress and Annual Meeting of the Society-for-MedicinalPlant-and-Natural-Product-Research (GA Budapest, HUN (2015-08-23 - 27).
- [12]. Moraga, A.R. Aragandona, J. Mota, B. Perez, J. Verde, A. Fajardo, J. Gomez-Navarro, J. Castillo-Lopez, R. Ahrazem, O and Gomez-Gomez, L. 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum taxa* (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *Journal of Ethnopharmacology*. 148 (1) : 287-296.
- [13]. Ali-Shtayeh, M.S. YaghmourReem, M.R. Faidi, Y.R. Salem, k. Al-Nuri, M.A. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the *Palestinian area*, *Journal of Ethnopharmacology*. 60: 265-271.
- [14]. Rojas, R. Bustamante, B. Bauer, J. Fernández, I. Albán, J. Lock, O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*. 88:199-204.

- [15]. Mwambete, K. D. 2009. The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: a tanzania medicinal plant, *Afr. Health Sci.* 9 (1):34-39.
- [16]. Mada, S. B. Garba, A. Mohammed, H. A. Muhammad, A. Olagunju, A. and Muhammad, A. B. 2013. Antimicrobial activity and phytochemical screening of aqueous and ethanol extracts of *Momordica charantia* L. leaves. *J. Med. Plants Res.* 7(10) : 579-586.
- [17]. Markham KR.1982. Techniques of flavonoid identification (Chapitre 1 et 2). London: *Academic Press*.pp. 1-113.
- [18]. Fetni, S. Bertella, N. Ouahab, A. Miguel, J. Fernandez, S.D.P. 2020. Composition and biological activity of the Algerian plant *Rosa canina* L. by HPLC- UV-MS. *Arab J. Chem.* 13(1) :1105-1119.
- [19]. Fetni, S. Bertella, N. Ouahab, A. 2020. LC-DAD/ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in *Rosa canina* L. and Its Protective Effect in cells. *Biomedical Chromatography.* 34(12).
- [20]. Min, B. R. Pinchak, W. E. Merkel, R. Walker, S. Tomita, G. and Anderson, R. C. 2008. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens, *Scientific Research and Essays.* 3 (2): 66–73.
- [21]. Shrishailappa, B. Reddy, S. Kumar, E.P. Vijayan, P. Suresh, B. 2003. Anti-tumour activity of total alkaloid fraction of *Solanum pseudocapsicum*. *Phytotherapy.* 17: 1001-1004.
- [22]. Inta, A. Shengji, P. Balslev, H. Wang, P. Trisonthi, C. 2008. A comparative study on medicinal plants used in Akha's traditional medicine in China and Thailand, cultural coherence or ecological divergence? *Journal of Ethnopharmacology.* 116: 508–517.
- [23]. Aliero, A.A. Asekun, O.T. Grierson, D.S. Afolayan, A.J. 2007. Volatile components from the roots of *Solanum pseudocapsicum*. *Journal of Medicinal Food.* 10: 557–558.
- [24]. Kim, S. Yu, J.M. Lim, H.T. Wang, H.Y. 2008. Chemical composition of floral essential oils of five potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. *Journal of Applied Biological Chemistry.* 51: 177-178.
- [25]. Cherkaoui-Tangi, K. Lachkar, M. Wibó, M. Morel, N. Gilani, A.H. Lyoussi, B. 2008. Pharmacological studies on hypotensive, diuretic and vasodilator activities of chrysin- glucoside from *Calycotome villosa* in rats. *Journal of Phytotherapy Research.* 22(3): 356-361.
- [26]. Chikhi, I. Allali, H. Bechlaghem, K. Fekih, N. Muselli, A. Djabou, N. El Amine Dib, M. 2014. Assessment of in vitro antimicrobial potency and free radical scavenging capacity of the essential oil and ethanol extract of *Calycotome villosa* subsp. intermedia growing in Algeria. *Asian Pacific Journal of tropical Disease.* 7: 356-362.
- [27]. Badami, S. Prakash, O. Dongre, S.H. & Suresh, B. 2005. In-vitro antioxidant properties of *Solanum pseudocapsicum* leaf extracts. *Indian Journal of Pharmacology.* 37(4): 251-252.
- [28]. Gislene, G.F. Nascimento, J.L. Paulo, C.F. Guliana, L.S. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz J Microbiol.* 31: 247-256
- [29]. Jeyasankar, A. Premalatha, S. Rani, S.J. 2012. Bio-efficacy of *Solanum pseudocapsicum* L. (Solanaceae) against black cutworm, agrotis ipsilon hufnagel (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Biol. Sci.* 12: 174–179.
- [30]. Arulappa, R.X. & Ilango, K. 2012. In-vivo study of antioxidant activity of *Tephrosia spinosa* (L.f) pers in rats. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences,* 1(3): 850-855.
- [31]. Elkhamlichi, A. El hajaji, H. Alami, A. El Bali, B. Lachkar, M. 2017. Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of seeds and pods extracts of *Calycotome villosa* subsp. intermedia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 7 (04): 192-198.
- [32]. Giuseppe, L. Filippo, C. Donatella, G. Delia, D. Raffaello, P. Leonardo, B. 2001. Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves. *Elsevier Journal of IL FARMACO.* 4(10): 433-436.

- [33]. Marchese, A. Shito, G.C. 2001. Resistance patterns of lower respiratory tract pathogens. in Europe. *Int J Antimicrob Agents*. 16: 25-29.
- [34]. Bassett, I.J. Mundro, D.B. 1985. The biology of Canadian weeds: *Solanum ptycanthum*Dun, *S. nigrum* L. and *S.sarrachoides*Sendt. *Can J Plant Sci*. 65: 401-414.
- [35]. Berlyn, G.P. Miksche, J.P. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, p.326.
- [36]. Boericke, W. 1927. Pocket Manual of Homeopathic Materia Medica (9th ed.). Boericke and Runyon, New York, p. 598.
- [37]. Dayang, F.B. Razinah, S. Paden, M. 2005. Antimicrobial activities of ethanol and ethyl acetate extracts from the fruits of *Solanum torvum*. *ApplBiol (Malays)*. 34: 31-36.
- [38]. Gislene, G.F. Nascimento, J.L. Paulo, C.F. Guliana, L.S. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz J Microbiol*. 31: 247-256.
- [39]. Rawani, A. Ghosh, A. Chandra, G. 2013. Mosquito larvicidal and antimicrobial activity of synthesized nano-crystalline silver particles using leaves and green berry extract of *Solanum* (Solanaceae:Solanales). *Acta Trop*. 128: 613–622.
- [40]. Aouicha, E. Ali, E.A. Hanane, E.H. Brahim, E.B. Hassan, O. Mohammed, L. Phytochemical constituents from the seeds of *villosa subsp* . *J Arabian .King Saud University* .In press. Doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.03.005
- [41]. El Antri, A. Lachkar, N. El Hajjaji, H. Gaamoussi, F. Lyoussi, B. El Bali, B. Morel, N. 2010. Structure elucidation and vasodilator activity of methoxyflavonols from *Calycotomevillosa subsp. intermedia*. *Arabian Journal of Chemistry*. 3(3):173–178.
- [42]. Jeyasankar, A. Premalatha, S. Rani, S.J. 2012. Bio-efficacy of *Solanum pseudocapsicum* L. (Solanaceae) against black cutworm, *agrotisipsilonhufnagel* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Biol. Sci*. 12: 174–179.
- [43]. Shahriar, M. Hossain, M.I. Sharmin, F.A. Akhter, S. Haque, M.A. &Bhuiyan, M.A. 2013. In-vitro antioxidant and freeradical scavenging activity of *Withaniasomnifera* root. *IOSR Journal of Pharmacy*. 3(2): 38- 47.
- [44]. Bellik, Y. 2014. Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiberofficinale* Roscoe. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4(1): 40-44.



**Tableau 1. Taux d'extraction des fractionsextraites des plantes étudiées.**

Extraits	Taux d'extraction (%)	
	<i>Fleurs C. villosa</i>	<i>Feuilles S. pseudocapsicum</i>
EBr	42.58±0.13	28.97±1.12
EAq	21.01±0.92	9.80±1.63
EAc	8.79±0.60	5.66±0.15
ECh	12.36± 0.33	10.91±1.32

**Tableau 2. Teneurs en polyphénols totaux (µg EAG/mg MS) et en flavonoïdes (µg EQ/mg MS) des différents extraits obtenus.**

Extraits	<sup>1</sup> Polyphénols(µg EAG/mg MS)		<sup>2</sup> Flavonoïdes (µg EQ/mg MS)	
	<i>C. villosa</i>	<i>S. pseudocapsicum</i>	<i>C. villosa</i>	<i>S. pseudocapsicum</i>
EBr	211.36 ± 0.12	98.69 ± 0.39	69.15 ± 0.62	20.64 ± 0.20
EAq	253.58 ± 0.23	131.58 ± 0.26	33.83 ± 0.14	18.36 ± 0.11
EAc	82.36 ± 0.56	45.90± 1.22	53.47 ± 0.03	27.12 ± 0.10
ECh	115.69 ± 0.31	34.65 ± 0.13	84.20 ± 0.12	22.10 ± 0.23

1. µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait, 2. µg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait. Les valeurs représentent la moyenne ± SD de trois essais.

**Tableau 3.** Activité antibactérienne des extraits de feuilles du *S.pseudocapsicum* et fleurs de *C.villosa* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.

Souches	Zone d' inhibition (mm)								
	<i>S. pseudocapsicum</i>				<i>C. villosa</i>				ATB
	EBr	ECh	EAc	EAg	EBr	ECh	EAc	EAg	GEN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	07±0.0	09±0.0	22±0.4	05±0.1	15±0.2	09±0.1	16±0.0	10±0.2	27±0.5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	14±0.0	06±0.0	08±0.2	0	09±0.0	10±0.2	0	16±0.4
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 43972	-	16±0.3	27±0.2	07±0.1	11±0.0	11±0.0	12±0.0	09±0.0	35±0.6
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	12±0.0	11±0.0	14.5±0.1	6.5±0.1	09±0.1	12±0.3	09±0.1	11±0.1	24±0.5
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 34015	-	7.5±0.1	18±0.4	03±0.1	09±0.2	08±0.0	08±0.1	09±0.1	31±0.5
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	-	15±0.0	23±0.3	06±0.1	10±0.2	09±0.0	12±0.2	-	29±0.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	07±0.1	10±0.1	19.5±0.4	05±0.0	-	-	-	15±0.2	32±0.3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	-	-	17±0.2	-	16±0.1	13±0.0	20±0.4	12±0.1	36±0.4
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	-	07±0.0	-	0.5±0.0	08±0.0	11±0.1	09±0.1	-	15±0.6
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	-	-	12.5±0.4	11±0.2	-	09±0.1	10±0.1	-	14.5±0.0

ATB : Antibiotique testé, GEN : Gentamicine. (Chaque valeur représente la moyenne±SD de trois essais).

# ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE QUELQUES EXTRAITS AQUEUX DE PLANTES MEDICINALES

Idir MOUALEK<sup>1\*</sup>, Karim BARIZ<sup>1</sup>, Hillal SEBBAN<sup>1</sup>, Amine MSELA<sup>1</sup>, Karim HOUALI<sup>1</sup>.

*1 : Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.*

*\*Auteur correspondant: moualek\_idir@yahoo.fr*

## RESUME

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de quelques plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle de l'Algérie.

Les plantes étudiées (*Rosa canina*, *Rosa sempervirens*, *Arbutus unedo*, *Malva sylvestris* et *Citrus limon*) sont d'intérêt médicinal au regard des nombreuses études rapportées par la littérature spécialisée et de nombreuses molécules bioactives qui rentrent dans la composition des différentes parties de ces plantes.

L'activité antibactérienne des extraits aqueux des différentes plantes a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque, vis-à-vis de 08 souches bactériennes de référence

Les résultats obtenus sont très disparates et varient d'une plante à l'autre. La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés par la littérature reste difficile en raison de plusieurs variables comme la technique utilisée, la quantité et la concentration d'extrait appliquée sur les disques. De plus, l'évaluation de ces derniers en termes de sensibilité et de résistance des souches reste impossible, car il n'existe pas de norme à l'image de celle utilisée pour les antibiotiques.

La littérature fait état de nombreux travaux qui mettent en relief le rôle prépondérant des plantes et plus particulièrement des fractions phénoliques en tant qu'agents antibactériens efficaces [1]. Ils sont impliqués dans l'inhibition des enzymes extracellulaires et de la phosphorylation oxydative [2].

La somme des résultats obtenus au cours de cette étude montre clairement que les extraits aqueux des plantes étudiées possèdent un potentiel antibactérien important et constituent une source potentielle de molécules bioactives et ainsi constituent une alternative thérapeutique aux antibiotiques.

**Mots clés :** Plantes médicinales / feuilles /Extrait aqueux/ Activités antibactérienne.

## 1. INTRODUCTION

Les molécules bioactives issues des végétaux, en raison de leurs multiples activités biologiques, suscitent actuellement un intérêt particulier dans les domaines sanitaire, agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Le regain d'intérêt en thérapeutique pour ces biomolécules est motivé par le fait qu'elles présentent des effets secondaires limités ou inexistant comparativement aux molécules synthétiques qui en plus de causer de nombreux effets secondaires indésirables présentent des limites thérapeutiques. L'exemple le plus marquant est l'émergence de bactéries multi-résistantes en raison de l'utilisation abusive des antibiotiques rendant difficile la maîtrise des infections bactériennes et constitue un problème de santé publique important à l'échelle mondiale. Ces dernières posent un réel danger pour la santé humaine et motivent ainsi l'orientation de la recherche scientifique vers de nouvelles molécules d'origine végétale [3].

Face à cette situation alarmante, la recherche scientifique se tourne vers les plantes qui constituent une réserve intarissable en molécules bioactives naturelles. De nombreuses études *in vitro* menées sur le potentiel antibactérien des composés phénoliques les ont confirmés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes avec des spectres d'activités variables.

Dans cette optique, dans notre travail nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux des feuilles de 05 plantes (*Arbutus unedo*, *Rosa canina*, *Rosa sempervirens*, *Malva sylvestris* et *Citrus limon*) a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque, vis-à-vis de 08 souches bactériennes de référence qui sont : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus*

ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogene* ATCC 15313, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Matériel végétal

Les feuilles des différentes plantes ont été collectées en décembre 2022 dans la région de Larbaâ Nath Irathen (36° 38' 12" nord, 4° 12' 24" est). Le choix de la zone d'échantillonnage est motivé par son éloignement de la route et de toute exploitation agricole. Dix arbres sains sont sélectionnés pour chaque plante et échantillonnés aux quatre expositions de la couronne. Les feuilles sont prélevées au milieu du rameau et transportées dans des filets. Une fois triées et lavées à l'eau distillée, celles-ci sont séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière puis broyées.

#### 2.1.2. Souches bactériennes

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des feuilles des différentes plantes étudiées est évaluée sur les souches suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogene* ATCC 15313, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Le choix de ces souches est motivé par leur large impact pathologique dû à leur pouvoir pathogène. Celles-ci proviennent de la collection de l'unité de microbiologie appliquée du laboratoire de recherche en biochimie analytique et biotechnologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des cinq plantes est évaluée par la méthode de diffusion en milieu solide [4] vis-à-vis de huit souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogene* ATCC 15313, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300)

Les souches bactériennes sont préalablement revivifiées en milieu BHIB (24h à 37°C), isolées en colonies par la méthode des stries sur milieu Mueller Hinton, puis réincubées à 37°C pendant 24 h sur le même milieu.

Une ou plusieurs colonies sont prélevées pour réaliser une suspension standardisée dans l'eau physiologique (106- 108 UFC/ml, à 620 nm, Do= 0,08 à 0,1). De nouvelles boîtes sontensemencées à partir de cet inoculum par écouvillonnage. Des disques de papier Whatman n°1 de 6 mm de diamètre, stériles, sont déposés à la surface du milieu Mueller Hinton puis chargés de 15 µl des extraits aqueux à la concentration de 50mg/ml.

Les disques des contrôles négatifs (imprégnés d'eau distillée) et des contrôles positifs (antibiotique de référence gentamicine 10µg/disque) sont placés à la surface de ces boîtes puis le tout est préincubé 30 minutes sur paillasse à température ambiante puis incubé à 37°C pendant 24h. Les résultats correspondants aux diamètres des zones d'inhibition produites autour des disques sont exprimés en millimètre.

## 3. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus (tableau 1) font état de zones d'inhibitions comprises entre  $7.3 \pm 0.5$  et  $18.3 \pm 2$  mm et sont présentés dans le tableau suivant.

Dans notre étude nous pouvons scinder les bactéries de références utilisées en deux groupes. Les bactéries Gram positif dont fait partie : *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Staphylococcus aureus*

ATCC 43300 et les bactéries Gram négatif dont fait partie : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311

Au regard des résultats présentés dans le tableau 1, les extraits aqueux de feuilles des plantes étudiées à la concentration de 50 mg/ml, présentent une activité antibactérienne vis-à-vis de la majorité des bactéries testées.

L'analyse de ces résultats montre clairement un effet plus important de ces extraits sur les bactéries Gram positif.

En effet, l'absence de zone d'inhibition pour tous les extraits dans les boîtes test ensemencées avec *Escherichia coli* ATCC 25922 traduit sa résistance aux extraits étudiés.

Des résultats similaires sont enregistrés pour *Malva Sylverstris* et *Cistrus limo*, (vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Listeria monocytogene* ATCC 15313) ainsi que *Rosa canina* (vis-à-vis de *Proteus mirabelis* ATCC 35659).

Pour les autres extraits, les résultats enregistrés restent disparates et vont de  $7.3 \pm 0.5$  et  $18.3 \pm 2$  mm pour les différentes souches de référence testées.

Il existe dans la littérature peu d'études sur l'effet antibactérien de l'extrait aqueux des feuilles des plantes étudiées, ce qui rend difficile la comparaison de nos résultats.

La variation des diamètres des zones d'inhibition en plus d'être impacté par le micro-organisme, la plante (genre, partie utilisée, variations génétiques etc.) et le potentiel antibactérien des substances bioactive de l'extrait, elle l'est aussi par la capacité de diffusion dans le milieu gélosé de ces dernières [5,6,7,8]. Le potentiel antibactérien de l'extrait étudié dépend de sa teneur en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes et tanins [9,10]. En effet, la littérature fait état de nombreux travaux qui mettent en relief le rôle prépondérant des tanins en tant qu'agents antibactériens efficaces [1]. Ils sont impliqués dans l'inhibition des enzymes extracellulaires et de la phosphorylation oxydative [2].

Les flavonoïdes considérés comme la fraction la plus active des polyphénols, agissent en synergie avec divers antibiotiques [11] et sont impliqués dans l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique [12] ainsi que des fonctions des membranes cytoplasmiques [13,14].

Les flavonoïdes antibactériens pourraient avoir plusieurs sites d'action. Une de leurs actions moléculaires est de former des complexes avec des protéines par des liaisons non spécifiques telles que la liaison hydrogène et hydrophobes. Leur mode d'action antimicrobienne peut être lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire. Les flavonoïdes lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes [15,16].

L'effet le plus observé et décrit dans la littérature des flavonoïdes est leur inhibition de la chaîne de transport des électrons respiratoires bactériens et que leur site d'inhibition se trouve entre la CoQ et le cytochrome C [17]. L'inhibition des micro-organismes par les composés phénoliques peut être due à plusieurs facteurs comme, la privation du fer, les liaisons hydrogènes réalisées avec des protéines vitales comme les enzymes microbiennes [18].

La déstabilisation de la membrane externe des micro-organismes Gram négatif, ainsi que les interactions avec la membrane cellulaire pourraient être l'un des mécanismes spécifiques derrière l'action antibactérienne par ces composés [19]. De plus, ils sont capables de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbiens, tels que la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte, l'inhibition de la formation de biofilms, la neutralisation des toxines bactériennes et la synergie avec les antibiotiques [11].

#### 4. CONCLUSION

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la dynamique des travaux de recherche en santé et biomolécules actives. L'objectif assigné a été de vérifier le potentiel antibactérien des feuilles de cinq plantes collectées dans la région de Tizi-Ouzou.

La forte variabilité des diamètres d'inhibition enregistrés, indique clairement la différence dans la réponse des différentes souches vis-à-vis des extraits; celle-ci est en relation avec le type d'extrait, sa concentration effective, son coefficient de diffusion et le type de souches.

L'inhibition de la croissance de la majorité des souches testées, mis à part *Escherichia coli* ATCC 25922, indique la possible utilisation de ces extraits comme antibactérien et justifie l'utilisation des plantes étudiées en médecine traditionnelle.

## REFERENCES

1. Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumou, C., & Bougoudogo, D. (2006). Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Médical*, 21(1): 18-24.
2. Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1): 21-40.
3. Billing, J., & Sherman, P. W. (1998). Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology*, 73(1), 3-49.
4. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
5. Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F., & Aouni, M. (2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharmaceutical biology*, 45(5), 421-428.
6. Carneiro, A. L. B., Teixeira, M. F. S., Oliveira, V. M. A. D., Fernandes, O. C. C., Cauper, G. S. D. B., & Pohlit, A. M. (2008). Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 31-38.
7. Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 473-478.
8. Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C., & Antunes, M. D. (2014). *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules*, 19(10), 15799-15823.
9. Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A. P., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Natural product research*, 26(16), 1558-1560.
10. Dib, M. E. A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N., & Tabti, B. (2013). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(4), 381-385.
11. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
12. Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., & Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and biophysical research communications*, 306(2), 530-536.
13. Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1147(1), 132-136.
14. Scazzocchio, F., D'auria, F. D., Alessandrini, D., & Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161(4), 327-333.
15. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
16. Mishra, A. K., Mishra, A., Kehri, H. K., Sharma, B., & Pandey, A. K. (2009). Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(1), 9.

17. Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48(1), 125-129.
18. Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
19. Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.

**Tableau 1 : Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait aqueux en mm.**

	Souche	Antibiotique Gentamicine 10 µg	<i>Arbutus unedo</i> mm	<i>Rosa canina</i> mm	<i>Rosa sempervirens</i> mm	<i>Malva sylvesteris</i> mm	<i>Cistrus limon</i> mm
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	30.3 ± 0.05	0	0	0	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	34 ± 0.1	14 ± 1	7.3 ± 0,5	10.3 ± 0,6	0	0
	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311	25.6 ± 0.05	7.3 ± 0,5	9± 0.5	9± 0.5	0	0
Gram (+)	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	26 ± 0.15	12.3 ± 0,5	16.6±0.6	14 ± 1	11 ± 1	11 ± 0
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	10± 1	11 ± 0	17.6± 0.6	0	13 ± 1	12.3 ± 0,5
	<i>Listeria monocytogene</i> ATCC 15313	7 ± 0	10.3 ± 0,6	11 ± 1	10.3 ± 0,6	0	0
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	30.7 ± 0.06	11 ± 1	0	11 ± 1	10.3 ± 0,6	12 ± 0.6
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	30.6 ± 0.06	17.3 ± 0,6	14 ± 1	12 ± 0.6	13 ± 1	18.3 ± 2

# PHYTOCHEMICAL SCREENING AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *SPIRULINA PLATENSIS* FOX BEHATAM OF TAMANRASSET PROVINCE OF SOUTH ALGERIA

Serra DJAABOUB<sup>1,2\*</sup>, Saif GOURI<sup>1,3</sup>, Salima ABDELAZIZ<sup>1</sup>, Khadidja FELLAH<sup>1,2</sup>

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature and Life, Mohamed Tahri University, BP 417. 08000. Bechar, Algeria

<sup>3</sup> Laboratory of the Valorization of Plant Resources and Food Security in Semi-arid Areas of South West Algeria, Bechar, Algeria

<sup>4</sup> Laboratory of sustainable management of natural resources in arid and semi-arid areas. Naama. Algeria

\*Corresponding author: [djaaboub.serra@univ-bechar.dz](mailto:djaaboub.serra@univ-bechar.dz)

## ABSTRACT

*Spirulina* has been recognized as a safe food complement and an important source of phytotherapeutic secondary metabolites. The objective of this study aims to determine the phytochemical components of Tamanrasset autochthon strain *S. platensis* FOX BEHATAM and analyze the antifungal potential of some of its selective and aqueous extracts against common phytopathogens. The results reveal that *S. platensis* FOX BEHATAM was riche on several bioactive molecules (alkaloids, flavonoids, saponins, sterols, terpenoids, Steroide, O-heteroside, C-heteroside, and free quinone). Saponin had the most potent effect against tested fungi (87.5% against *F. graminearum*). In addition, *F. graminearum* was the sensitive strain and *A. parasiticus* was the resistant one. Besides, the macerate aqueous extract exhibited the best percentage of inhibition of mold growth (73.40% - 92.90%). Finally, we suggest that *S. platensis* FOX BEHATAM can provide a safe and sustainable source of food spoiling preservative.

**Keywords:** *Spirulina*, Tamanrasset district (Algeria), phytochemical screening, food spoiling, biocontrol

## 1. INTRODUCTION

Food spoiling remains the main problem that affects strategic cultures around the world, notably in Algeria. Therefore, the rapid increase in the need to control fungal contamination requires the exhaustive use of chemical fungicides [20-21] that induce fungal resistance [22], influence negatively the sustainability of agroecosystems, and affect human safety [21]. For these reasons, researchers suggested biological control as a friendly alternative issue. In this regard, *Spirulina* was recently more attractive because of its ubiquity in nature and its various advantageous effects. Although various research studied the antimicrobial activity of *Spirulina*, they focused mainly on crude organic extracts [21-24], or polyphenols and peptides components. Hence, the present study emphasizes the antifungal activities of saponins, alkaloids, genins, heterosids, and three aqueous extracts of *S. platensis* FOX BEHATAM original from Tamanrasset, south Algeria, towards some of the most problematic fungi.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Algal material

*Spirulina platensis* FOX BEHATAM was provided from the Tamanrasset province of southern Algeria. It was cultivated by Dr. HIRI A. by traditional method using HIRI's medium (NaHCO<sub>3</sub>: 16g/L, NaCl: 1g/L, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.1g/L, FeSO<sub>4</sub>: 0.01g/L, MgSO<sub>4</sub>: 0.1g/L, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0.5g/L, CaCl<sub>2</sub>: 0.1g/L, CO(NH<sub>2</sub>): 2g/L). Algal samples were collected in April 2016, dried in the share for 20 days, grounded, and stored in a closed sterile container until use.

### 2.2. Phytochemical screening

Phytochemical components were determined on different extracts using standard methods as described in the literature, by Nemlin and Brunel [1]. 5 g of the powder of *Spirulina* was macerated three times with 15 mL of diethyl-ether for 15 min. The extracts were filtered and concentrated. It was labeled appropriately, as diethyl-ether extract. The marc was then, macerated two times in 15 mL of methanol using the same above protocol. The obtained extract was labeled as methanol extract. For aqueous extract,



5 g of powder was infused in 50 mL of distilled water. After shaking for 15 min, the extract was filtered and labeled as aqueous extract.

– ***Test for free alkaloids***

10 ml of each organic extract (diethyl-ether and methanol) of *Spirulina* powder were evaporated to dryness. Residues were dissolved in 1.5 mL of HCl 2% and then, treated with two drops of Mayer's reagent and/or Wagner reagent. Turbidity and formation of creamy white precipitate were considered as evidence for the presence of free alkaloids [2-3].

– ***Test for flavonoids***

For each extract (5 mL), a small quantity of magnesium ribbon was added, and then, followed by the drop-wise of concentrated hydrochloric acid and 1 mL of iso-amyl alcohol. Colors varying from orange to red indicated flavones, red to crimson indicated flavonols, and crimson to magenta indicated flavonones [3-4].

– ***Test for tannins***

5 mL of each extract was treated with 2 drops of 2% FeCl<sub>3</sub> reagent. After agitation, the blue-black color and precipitate show the presence of gallic tannins, and the blue-green color and precipitate indicate the presence of catechic tannins [4-5].

– ***Test for anthracenosides***

15 mL of 10% HCl was added to 25 mL of methanol extract. The mixture was refluxed for 30 min and cooled. After that, the mixture was extracted three times with 15 mL of diethyl-ether and then, evaporated. The residue was treated with 2 mL of hot water and some drops of 10% NH<sub>4</sub>OH. The appearance of red-orange color revealed the presence of anthracenosides [3].

– ***Test for anthocyanins***

A few drops of ammoniac were added to 5 mL of water extract. The blue color reflects the presence of anthocyanins<sup>6</sup>.

– ***Test for saponins***

A total of 2 g of *Spirulina* powder were decocted in 100 mL of distilled water in a moderate boiling water bath for 30 min. After filtration, the final volume was adjusted to 100 mL. Different volumes were taken (1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL,.....10 mL) and completed to 10 mL of distilled water. Each tube was shaken vigorously for 15 s for a stable persistent froth. After 15 min, the persistent emulsion upon 1 cm indicates the presence of saponins [3,7].

– ***Test for coumarins***

3 mL of the diethyl-ether extract was evaporated to dryness. The residue was dissolved in 1 mL of hot distilled water. After cooling, the extract was divided into two parts, one as a reference, and to the second test tube, 0.5 mL of 25% NH<sub>4</sub>OH was added. The intensity fluorescence under UV light ( $\lambda_{max}$ = 365 nm) indicates the presence of coumarins [3].

– ***Test for sterols and triterpenes***

i) For sterols, we added 2 mL of acetic anhydride to 0.5 mL methanol extract with 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The color changed from violet to blue or green signifying the presence of steroids.

ii) For terpenoids, 5 mL of each extract was diluted in 2 mL of chloroform, and 3 mL of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was carefully added to form a layer. A reddish-brown coloration of the interface indicates the presence of terpenoids.

– ***Test for anthraquinones***

i) Free anthraquinones: 0.5 g of *Spirulina* powder was boiled with 5 mL of chloroform for 3 min; after filtration, the filtrate was shaken with 5 mL of chloroform. To 1 mL of chloroform extract, we added 1 mL of 10% NH<sub>4</sub>OH (or KOH). The red color indicates the presence of free anthraquinones [8].

- ii) O-heterosids anthraquinones: the chloroformic residue was mixed with 10 mL of distilled water and 1 mL of HCl. The mixture solution was boiled in water bath for 15 min. 5 mL was shaken with 5 mL of chloroform. The organic layer was added to 1 mL of diluted NH<sub>4</sub>OH. The presence of O-heterosids anthraquinones is demonstrated by the dark red color.
- iii) C- heterosids anthraquinones: the chloroformic residue was mixed with 10 mL of distilled water and 1 mL of 10% FeCl<sub>3</sub>. After boiling in a water bath for 30 min, we added 5 mL of chloroform. After shaking, the chloroformic layer was mixed with 1mL of dilute NH<sub>4</sub>OH. The moderate dark red color indicates the presence of genins C- heterosids.

– **Test for free quinones**

The diethyl-ether extract was treated with a few drops of NaOH 1/10. The presence of the free quinones was confirmed when the aqueous layer changed to yellow, red, or purple [8].

– **Test for reducing compounds**

1 mL of water extract was mixed with 1 mL of Fehling's solutions. After heating, the appearance of burgundy red precipitate designates the presence of reducing compounds [3,9].

– **Test for starch**

The water extract was treated with the starch reagent. A blue-purplish color indicated the presence of starch [3].

– **Test for emodols**

The dry etheric extract was diluted in 1 mL of 25% ammonia solution. A cherish-red solution indicated the presence of emodols [3].

### **2.3. Antifungal activity of *Spirulina platensis* FOX BEHATAM**

#### **2.3.1. Moulds strains**

Five pathogenic fungi were used, namely *Aspergillus parasiticus* CBS100926T and *A. alliaceus* provided by Pr. Amar RIBA, Boumerdes University, *A. flavus*, *A. niger*, and *Fusarium graminearum* were provided by the Research Laboratory of Valorisation of plant resource and food Security in Semi-Arid areas of Tahri Mohamed University of Bechar. Algeria.

#### **2.3.2. Crude aqueous extracts**

– **Infused extract (5%)**

5 g of *Spirulina* powder was infused in 100 mL of distilled water and boiled for 15 min. After filtration, the extract was completed to 100 mL with distilled water.

– **Decocted extract**

1 g of *Spirulina* powder was contacted with 50 mL of distilled water. The mixed solution was boiled in a moderate water bath for 30 min. after filtration, the decocted extract was adjusted to 50 mL water.

– **Macerate extract**

20 g of *Spirulina* powder was mixed with 100 mL of distilled water for 24 hours under agitation. After that, the mixture was filtered and concentrated with a rotavapor.

#### **2.3.3. Selective extracts**

– **Saponins**

A total of 50 g of *Spirulina* powder was mixed with 250 mL of 20% ethanol. The mixture was kept in a water bath at 55°C for 4 H; this step was carried out two times. After filtration, the solution was evaporated to 80 mL, and subjected to a series of liquid-liquid extraction. The first one consists of adding 20 mL of diethyl-ether and shaking vigorously. The purification process was repeated two times. Then, the separated aqueous phase, in turn, was extracted with 3×40 mL of n-butanol. The combined n-butanol extracts were washed twice with 20 mL of sodium chloride solution (5%). After evaporation, the samples were dried in the oven to a constant weight.

#### – **Total alkaloids**

20 g of *Spirulina* powder was extracted by 200 mL of diethyl-ether for 3 H using the soxhlet. The residue was contacted with 40 mL of ammoniac (0.5N) for 8 H. After that, the alkaline powder was extracted by 250 mL of dichloromethane using the soxhlet for 3 to 4 H. Then, the obtained extract was mixed with 150 mL of sulfuric acid (0.5N), and the pH of the solution was adjusted to 9. The mixture was extracted 3×150 mL with chloroform. The organic layer was dehydrated by filtration with anhydride sodium and then, evaporated to dryness.

#### – **Flavonosids**

20 g of *Spirulina* powder was mixed with 180 mL of acetone/water (50:50, v/v) for 4 hours using a reflux system. The obtained extract was filtered, and then the acetone was removed by a rotary evaporator. The aqueous layer was extracted respectively, 2x50 mL with petroleum ether, 3x50 mL with diethyl-ether, and 3x80 mL with diethyl-acetate.

#### – **Selective component yield**

The different selective content was calculated as a percentage by the following equation [3] **Yield (%)** =  $m_0/m_1 \times 100$ , where  $m_0$  and  $m_1$  was the mass in grams of the evaporated dry residue and of the initial dry *Spirulina* powder respectively.

### **2.3.4 Antifungal activity**

The determination of mycelial inhibition was appraised by using the agar diffusion method. 1 mL of each tested crude and selective extract (**Table 1**) was added to 19 mL of PDA<sub>a</sub> medium. Afterward, a mycelial disc (6mm) was inoculated in the center of the Petri dish and incubated at 25±2°C for 7 days. The blank was distilled water for crude extract and DMSO 10% for selective extracts. The antifungal index was calculated by the following formula [12]: **I** =  $[1 - (D_a/D_b)] \times 100$ , where  $D_a$  and  $D_b$  are the diameters (mm) of the growth zone in the test and in control, respectively.

### **2.4 Data analysis**

It was performed by SPSS Statistics 22 software. The data were subjected to factorial ANOVA. A probability of p-value < 0.05 was considered as a criterion of significant differences.

## **4. RESULTS**

### **4.1 Phytochemical screening**

Phytochemical investigation showed that *Spirulina platensis* FOX BEHATAM is rich in alkaloids, flavonoids, saponins, sterols, terpenoids, Steroide, O-heteroside, C-heteroside, and free quinone (**Table 2**).

#### **4.2.1 Selective extracts**

According to the results summarized in (**Table 3**), we suggested that saponins exhibited the best inhibitory activity on fungal growth; the higher percentage was 87.5% against *F. graminearum*, and a good effect against *A. flavus* and *A. niger* with 27.8% and 31.31% respectively at 144 mg/mL, and 33.33% against *A. alliaceus* at 3.6 mg/mL. However, alkaloids, genins, and heterosids were more effective at 35 mg/mL, 90 mg/mL, and 185 mg/mL respectively. On the other hand, all of the selective fractions stimulated the growth of *A. parasiticus*. The factorial ANOVA analysis revealed the significance of the interaction between fungal strain and selective extract (**Figure 1**), and also between fungal strain and concentration of selective extract (**Figure 2**). Thus, it is clear that the mycelial growth of mold depends mainly on the nature of the selective fraction and on its concentrations. We noted that no inhibition was seen in DMSO 10% negative control.

#### **4.2.2 Water extracts**

The obtained result (**Figure 3**) reveals that the macerate aqueous extract was the most potent for all of the tested molds. The higher inhibitory activity was between 73.40% and 92.90%. In addition, the infused extract was more effective against *A. niger* (73.10%), *A. flavus* (65.80%), and *A. alliaceus*

(60.50%). Nevertheless, decocted extract provided a lower activity against all fungal strains varying from 8% to 15.70%.

## 5. DISCUSSION AND CONCLUSION

This study aimed to evaluate the antifungal activity of the main phyto-components of *S. platensis* FOX BEHATAM from Tamanrasset, south Algeria. Indeed, *Spirulina* was chosen because of its phytotherapeutic and nutritional benefits for humans [12-13]. It is clear from the results, summarized above, that the saponins gave the highest biological activity. The results cleared also, that *F. graminearum* was more sensitive strain, followed by *A. flavus*, and *A. niger*. On contrary, *A. parasiticus* and *A. alliaceus* were more resistant. Indeed, several scientific researchers were in agreement with the present findings [14-16]. Coşoveanu et al., studied in 2010, the antifungal effects of *Spirulina platensis* extracts against several molds. They demonstrated that all the tested isolates were sensitive, especially, *F. roseum* Fr 101 [14]. In the same year, these authors evaluated the biological activity of *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus sp. S. platensis* and *Ecklonia maxima* against *F. roseum*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata*, *A. dauci*, *A. longipes*, *Trichoderma viride*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, and *Penicillium expansum*. The results exhibit that *S. platensis* inhibits mycelial growth by 50% to 90% [15]. Ben Hlima et al., (2019), proved that *Spirulina* could inhibit the panel of fungal strains, particularly *Fusarium* genus [16]. Similarly, Al-Ghanayem stated the sensitivity of *F. oxysporum* followed by *A. flavus* and *A. niger* to *S. platensis* organic extract [17]. The inhibition capacity of *Spirulina* could be explained by the secondary metabolites that have antifungal properties [17], notably, polyphenols along with polysaccharides that inhibit mycelial growth, or directly by destroying the living structures of fungi [18]. Indeed, the ability to produce antimicrobial substances is important not only as a defensive instrument for alga but also as a good source of new bioactive compounds for pharmaceutical use.

Besides, in our investigation, we found that the macerate aqueous extract was comparatively more effective. That must be due to conditions, specifically temperature, and extraction method. Thus, the hot temperature may destroy the sensitive bioactive component. On other points, it is expected that organic solvents are more potent to extract a large number of bioactive constituents compared to water [14,19].

In conclusion, we suggest that *S. platensis* FOX BEHATAM may act as a promising natural antifungal agent. In fact, it can be utilized as an alternative to chemical fungicides and contribute at the same time, to preserving the quality and safety of strategic culture and also, human health.

## REFERENCES

- [1]. Nemlin J, Brunel JF. Fascicule de Travaux Pratiques de Matière Médicale (3<sup>ème</sup> année), Département de Pharmacognosie, Laboratoire de Phytologie, Faculté de Pharmacie, Université Nationale de Côte d'Ivoire. 1995.
- [2]. Harborne JB. Phytochemical methods. 3<sup>rd</sup> edition, Chapman and Hall, London (1978).
- [3]. Benmehdi H, Hasnaoui O, Benali O, Salhi F. Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of *Chamaerops humilis* L. J. Mater. Environ. Sci. 2012; 3 (2): 320-237.
- [4]. Vijayakumari B, Sasikala V, Radha SR. Paramilitary phytochemical screening of the various extracts of *Rotula aquatica* LOUR. World J. Pharm. Pharm. Sci. 2011; 2(6): 6371-6380.
- [5]. Segelman AB, Farnsworth NR, Quimbey MD. 1969. Lloydia; 32:52.
- [6]. Mamyrbékova-Békro JA, Konan KF, Békro YA, Gabin M. Bi D, Zomi Bi TJ, Mambo V, Boua BB. Phytocompounds of the Extracts of Four Medicinal Plants of Côte d'Ivoire and Assessment of their Potential Antioxidant by Thin Layer Chromatography. Eur. J. Sci. Res. 2008; 24 (2): 219-228.
- [7]. Kapoor LD, Singh A, Kapoor SL, Srivastava SN. 1969 Lloydia; 32:297.
- [8]. Rizk AM. Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia. 1982; 52(2): 35-42.

- [9]. Okwu DE. Phytochemicals, vitamins, and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 2005; 1(4):375-381.
- [10]. Imran M, Khan H, Shah M, et al. Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 2010; B 11: 973–980. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000173>
- [11]. Chang ST, Wang SY, Wu CL, Chen PF, and Kuo YH. Comparison of the fungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) Heartwood. *Holzforschung.* 2000; 54: 241-245.
- [12]. Belay A, Ota Y, Miyakawa K, and Shimamatsu H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.* 1993; 5: 235-241.
- [13]. Usharani G, Srinivasan G, Sivasakthi S, and Saranraj P. Antimicrobial Activity of *Spirulina platensis* Solvent Extracts Against Pathogenic Bacteria and Fungi. *Adv. Biol. Res.* 2015; 9 (5): 292-298. <https://10.5829/idosi.abr.2015.9.5.9610>.
- [14]. Coşoveanu A, Axîne O, Iacomi B. Antifungal activity of macroalgae extracts. *UASVM Bucharest, Series A, Vol. LIII, 2010a.*
- [15]. Coşoveanu A, Axîne O, Iacomi B. Indolocarbazoles from a blue-green alga belonging Antifungal activity of macroalgae extracts. *Scientific to the Nostocaceae. Antibiotic. Series A. Agronomy.* 2010b; 43: 1236-1239.
- [16]. Ben Hlima HB, Bohli T, Kraiem M, Ouederni A, Mellouli L, Michaud P, Abdelkafi S, Smaoui S. Combined Effect of *Spirulina Platensis* and *Punica Granatum* Peel Extracts: Phytochemical Content and Antiphytopathogenic Activity. *Appl. Sci.* 2019; 9, 5475. <https://doi.org/10.3390/app9245475>.
- [17]. Al-ghanayem AA. Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* extracts against certain pathogenic bacteria and fungi. *Adv. Biores.* 2017; 8: 96-101.
- [18]. Bajpai VK. Antimicrobial bioactive compounds from marine *algae*: A mini-review. *Indian J. Geomar. Sci.* 2016; 45: 1076-1085.
- [19]. Sivakumar J, and Santhanam P. Antipathogenic activity of *Spirulina* powder. *Recent res. sci. technol.* 2011; 3(4): 158-161.
- [20]. Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, Kohli SK, Yadav P, Bali AS, Parihar RD, Dar OI, Singh K, Jasrotia S, Bakshi P, Ramakrishnan M, Kumar S, Bhardwaj R, Thukral AK. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 2019; 1 (11): 1-16. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>.
- [21]. Schmid B, Coelho L, Schulze PSC, Pereira H, Santos T, Maia IB, Reis M, J Varela J.. Antifungal properties of aqueous microalgal extracts. *Bioresour. Technol.* 2022.18. 101096. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101096>
- [22]. Puvaneswari S, and Lakshmanan R. Efficacy of *Spirulina platensis* on fish pathogens. *J. Xian Univ. Archit. Technol.* 2020; XII (XI): 200-215.
- [23]. Oltu I, Cepoi L, Rudic V, Rudi L, Chiriac T, Valuta A, and Codreanu S. Current Research and New Perspectives in Antifungal Drug Development. In: Donelli, G. (eds) *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health.* Adv. Exp. Med. Biol. 2019. 1282. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_453](https://doi.org/10.1007/5584_2019_453).
- [24]. Alshuniaber MA, Krishnamoorthy R, AlQhtani WH. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds from *Spirulina* against food-borne bacterial pathogens. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021; 28: 459-464.

**Table 1: Concentrations (mg/mL) of crude and selective extracts**

	Saponins	Alkaloïdes	Genines	Heterosids	Infused	decocted	macerate
CSE <sup>a</sup>	144	35	90	185	50	50	50
10 <sup>-1</sup>	14.4	3.5	9	18.5	/	/	/
10 <sup>-1</sup> (1/2)	7.2	1.8	4.5	9.3			
10 <sup>-1</sup> (1/4)	3.6	0.88	2.3	4.8			

a : Crude selective extract

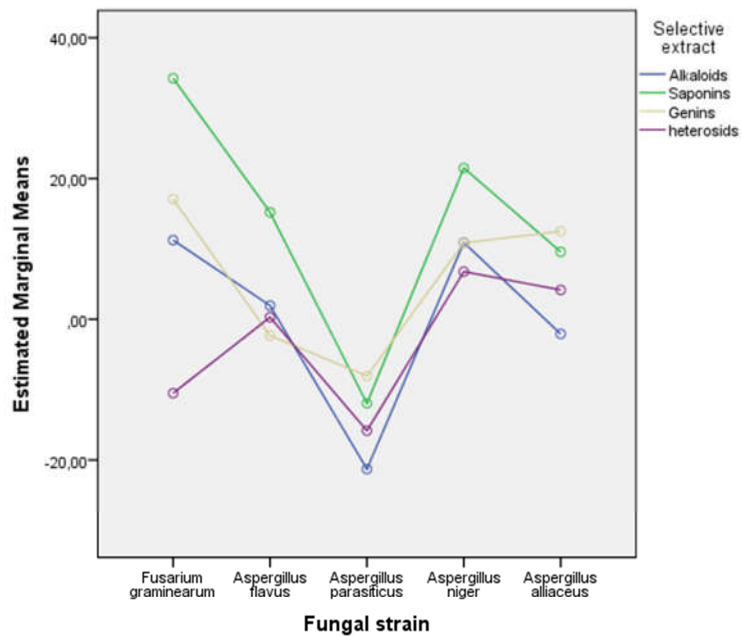
**Table 2: Phytochemical screening of extracts from *S. platensis* FOX BAHATAM**

Phytochemical compounds	Diethyl-ether extract	Methanol extract	Water extract
Alkaloïds	++	++	-
Flavonoïds	/	/	++
Tannins	-	+	/
Anthracenosides	-	/	/
Anthracyanosides	-	/	/
Saponins	/	/	+++
Coumarins	-	/	/
Sterols	+++	/	/
Terpenoids	-	/	/
Steroids	/	+++	/
Anthraquinone	-	/	/
O-heterosid	+	/	/
C-heterosid	+	/	/
Free quinone	++	/	/
Reducing compounds	/	/	-
Starch	/	/	-
Emodols	-	/	/

(+): present; (-): absent; (/): not realised.

**Table 3: Antifungal indices of selective extract of *S. platensis* FOX BEHATAM**

Fungal strain	Selective extract	Concentration			
		CSE	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup> (1/2)	10 <sup>-1</sup> (1/4)
<i>F. graminearum</i>	Alkaloids	16,25	16,25	12,5	0
	Saponins	87,5	47,5	35	0
	Genins	37	25	6,25	0
	Heterosids	25	6,25	-8,25	-65
<i>A. flavus</i>	Alkaloids	7,77	4,85	0	-4,85
	Saponins	27,8	12,62	12,62	7,77
	Genins	2,91	0	-4,36	-7,77
	Heterosids	4,85	2,91	0,97	-7,57
<i>A parasiticus</i>	Alkaloids	-25,5	-23	-20	-16,67
	Saponins	-16,67	-14,44	-11,11	-5,56
	Genins	-5,6	-5,56	-10	-11,11
	Heterosids	-26,67	-15,56	-11,11	-10
<i>A niger</i>	Alkaloids	14,55	13,6	9,09	6,36
	Saponins	31,81	18,18	18	18
	Genins	18	11,8	9,09	4,55
	Heterosids	18	6,36	2,72	0
<i>A alliaceus</i>	Alkaloids	-8,33	0	0	0
	Saponins	0	0	5	33,33
	Genins	33,33	16,67	0	0
	Heterosids	-8,33	8,33	8,33	8,33



**Figure 1. Interaction Fungal strain × Selective extract**

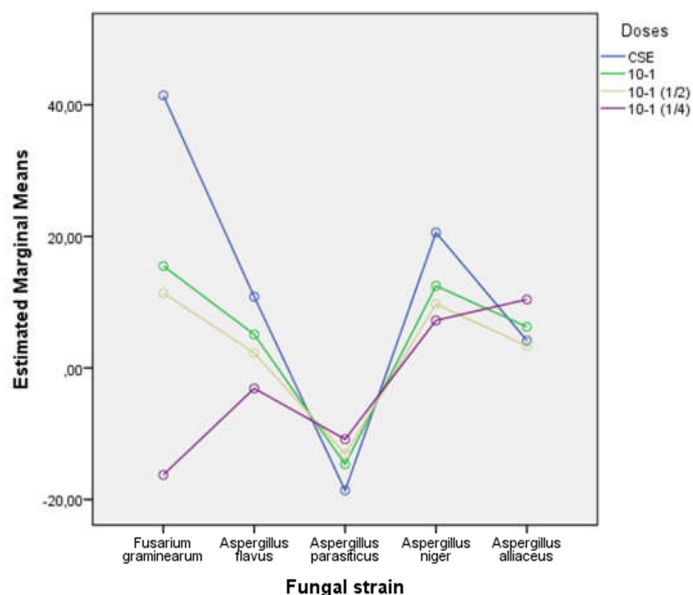


Figure 2: Interaction Fungal strain × Concentration of Selective extract.

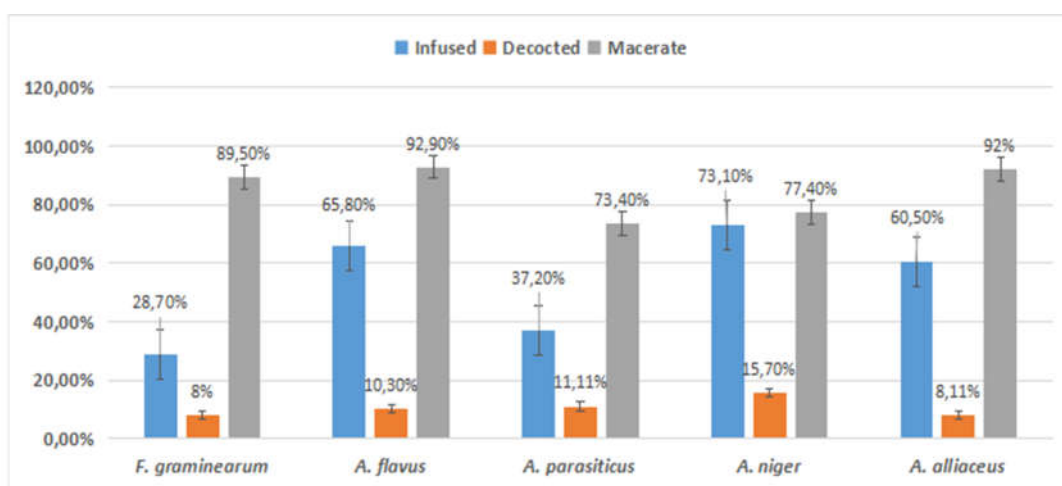


Figure 3: Antifungal effect of aqueous extracts against tested molds



# ESSAI IN VITRO DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *THYMUS VULGARIS* ET DE L'EXTRAIT DE *PISTACIA LENTISCUS* VIS-A-VIS D'*ERWINIA AMYLOVORA* AGENT CAUSAL DU FEU BACTERIEN DU POIRIER ET *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* AGENT CAUSAL DE TUBERCULOSE DE L'OLIVIER

Sihem ZIRI<sup>1</sup>, Khadija REGUIEG<sup>2</sup>, Yamina ABDI<sup>1</sup> et Nassira MADANI<sup>3</sup>

1 : Laboratoire de production et protection des végétaux dans la région de Chlef. FSNV, UHBC, Ouled Fares-Chlef, Algérie.

2 : Laboratoire de Biologie Moléculaire, Génomique et Bioinformatique. FSNV, UHBC, Hay Assalam (El Boukaa)-Chlef, Algérie.

3 : Station Régionale de la protection des Végétaux de Chlef. Medjadja-Chlef, Algérie.

Corresponding author: Emails: [s.ziri@univ-chlef.dz](mailto:s.ziri@univ-chlef.dz)

## RESUME

*Erwinia amylovora* agent causal du feu bactérien du poirier et *Pseudomonas savastanoi* agent causal de tuberculose de l'olivier, des espèces bactériennes de quarantaine provoquant des bactérioses végétales. Dans le but d'améliorer des méthodes alternatives de lutte contre ces deux fléaux, nous avons effectué une évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (HE) de *Thymus vulgaris*, obtenue par la méthode d'entraînement à la vapeur, et de l'extrait de *Pistacia lentiscus*, obtenu par la méthode de soxhlet, par le biais de l'aromatogramme. L'analyse de l'huile essentielle par CG-SM révèle la présence de deux composés majoritaires, le Carvacrol, avec une area de 63.69% et un deuxième, le Thymol, avec une area de 5.80%. L'huile essentielle du Thym et l'extrait éthanolique du pistachier lentisque avaient une activité antibactérienne appréciable sur *E. amylovora* et *P. savastanoi*. Les zones d'inhibitions obtenues sur *E. amylovora*, varient suivant les différentes concentrations de 6mm à 20mm avec une valeur maximale de 15mm pour l'extrait du *P. lentiscus* et 20mm pour l'huile essentielle de *T. vulgaris*. Les zones d'inhibitions obtenues sur *P. savastanoi*, varient suivant les différentes concentrations de 14mm à 22mm avec une valeur maximale de 17mm pour l'extrait du *P. lentiscus* et 22mm pour l'huile essentielle de *T. vulgaris*.

**Mots clés :** *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Thymus*, *Pistacia*, antibactérien, huile essentielle.

## 1. INTRODUCTION

Les maladies des plantes causées par des bactéries sont l'un des problèmes majeurs de la culture de plusieurs produits agricoles. À l'heure actuelle, la gestion rapide et efficace des maladies des plantes et de la contamination microbienne dans plusieurs pays est généralement obtenue grâce à l'utilisation de pesticides et d'antibiotiques synthétiques [1]. L'utilisation de pesticides est l'une des composantes de la fabuleuse augmentation du rendement observée au cours des dernières décennies. Cette utilisation de produit chimique qui compromettait la sécurité pour l'homme et l'environnement était considérée comme inévitable ; pose actuellement des problèmes et leur impact a certainement été insuffisamment estimé [2]. Parmi les différentes approches proposées pour réduire l'utilisation des pesticides conventionnels, l'exploitation à des fins phytosanitaires de résidus végétaux, souvent peu valorisés, soulève un intérêt grandissant auprès des scientifiques [3].

*Erwinia amylovora* agent causal du feu bactérien du poirier et *Pseudomonas savastanoi* agent causal de tuberculose de l'olivier; sont deux pathogènes bactériens de quarantaine, provoquant des dégâts affectant la productivité de leurs hôtes sur le point qualitatif et/ou quantitatif. Les dommages causés par *Pseudomonas savastanoi* se traduisent par une moindre vigueur des arbres et par une baisse de la production d'olives. La maladie peut affecter également la qualité organoleptique des olives et de l'huile [4]. *Erwinia amylovora* (Burrill) est une maladie bactérienne très destructrice et économiquement importante qui peut décimer les vergers de pommiers et de poiriers en une seule saison [5]. L'objectif de ce travail est d'identifier les composants majoritaires de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de

tester les effets antibactériens de l'huile essentielle de thym et l'extrait éthanoïque du *Pistacia lentiscus* sur les deux bactéries.

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Collecte des plantes**

Les plantes de *Thymus vulgaris* et *Pistacia lentiscus* ont été récoltées dans le début du mois d'Avril de l'année 2021, de différents endroits de la forêt de Bissa, dans la wilaya de Chlef en Algérie, qui se situe dans l'étage bioclimatique subhumide avec un hiver doux. La partie aérienne de *T. vulgaris* a été utilisée à l'état frais par contre les feuilles du pistachier lentisque ont été séchées à l'air libre sous l'ombre puis broyées en poudre fine.

### **2.2. Extraction de l'huile essentielle de *T. vulgaris***

L'huile essentielle de thym a été obtenue par entraînement à la vapeur de 5kg de de la partie aérienne de la plante de *T. vulgaris* fraîche dans un dispositif bricolé avec un autoclave et une chambre de refroidissement ou condensateur (figure 1).

### **2.3. L'obtention de l'extrait de *P. lentiscus***

Il est obtenu par extraction au soxhlet (figure 2), d'une quantité de poudre de feuilles de lentisque séchées dans 500ml d'Ethanol, l'extraction se fait en plusieurs cycles jusqu'à ce que la coloration de la cartouche portant la poudre devient claire ou décolorée.

### **2.4. Analyse de l'huile essentielle de *T. vulgaris***

L'analyse de l'huile essentielle de *T. vulgaris* s'est effectuée à l'aide de la Chromatographie en phase gazeuse ou GC/MS, l'identification des composés de l'huile essentielle a été faite en se référant à leurs temps de rétention ainsi que leurs areas en pourcentage.

### **2.5. Préparation des dilutions**

Pour l'extrait de *P. lentiscus*, à partir de l'extrait éthanoïque obtenu, les doses à tester ont été préparées par dilution dans le solvant organique, l'Ethanol, à des concentrations de D1 :25%, D2 :50%, D3 :75% et D4 :100% par rapport à la solution mère. Pour l'essence de *T. vulgaris*, à partir de l'huile essentielle obtenue, les doses à tester sont préparées par dilution dans le Twin 80, pour obtenir les concentrations suivantes : D1 :25%, D2 :50%, D3 :75% et D4 :100%

### **2.6. Tests de l'activité antibactérienne**

Les souches bactériennes de référence utilisées pour les tests ont été obtenues par l'intermédiaire de la station régionale de protection des végétaux de Chlef. A l'aide d'un emporte-pièce stérile on creuse des puits de 6 mm sur la gélose déjàensemencée par la bactérie et on verse 50 $\mu$ L de chacune des dilutions dans un puits séparément, sauf pour le puits central (témoin négatif) contenant l'eau distillée stérile. On laisse diffuser dans la gélose pendant 1h (c'est la technique de l'aromatogramme).

## **3. RESULTATS ET DISCUSSION**

L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse, met en évidence la présence d'un composé principal, le Carvacrol, avec une area de 63.69% et un deuxième, le Thymol, avec une area de 5.80% (Tableau 1).

En 2006, Bouhdid et al ont effectué une étude dont l'analyse par CG-SM de *T. vulgaris* effectuée par, révèle la présence de trois composés majoritaire : Thymol avec une area de 36.58%, P-Cymene avec 16.51% et le  $\gamma$ -Terpinène avec 13.70% d'area [6].

L'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne par le biais de l'aromatogramme ou la méthode des puits, qui permet de mesurer le diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne causée par la présence des huiles essentielles [7]. La lecture des résultats s'effectue après 24h incubation à 28°C.

L'activité antibactérienne in vitro de l'HE., de *Thymus vulgaris* et l'extrait éthanoïque du *Pistacia lentiscus* vis-à-vis d'*Erwinia amylovora* par le biais de l'aromatogramme et la méthode des puits (figure 1), nous a permis de mesurer des diamètres d'inhibition moyens.

Nous avons constaté que les diamètres d'inhibition variaient suivant les différentes concentrations de 6 mm à 20 mm; avec une valeur maximale de 15mm pour l'extrait du *P. lentiscus* et 20mm pour l'huile essentielle de *T. vulgaris* (Tableau 2).

L'activité antibactérienne in vitro de l'HE., de *Thymus vulgaris* et l'extrait éthanoïque du *Pistacia lentiscus* vis-à-vis de *Pseudomonas savastanoi* par le biais de l'aromatogramme et la méthode des puits (figure 2), nous a permis de mesurer des diamètres d'inhibition moyens.

En ce qui concerne *P. savastanoi*, aussi les zones inhibées varient suivant les différentes concentrations de 14mm à 22mm avec une valeur maximale de 17mm pour l'extrait du *P. lentiscus* et 22mm pour l'huile essentielle de *T. vulgaris*. (Tableau 3).

D1 et D2 de l'extrait et de l'HE, montrent une meilleure activité que les dernières dilutions vis-à-vis des deux bactéries avec une inhibition de plus de 20mm pour D1 et plus de 18mm pour D2 de l'HE et plus de 12mm pour D1 et plus de 14mm pour D2 de l'extrait.

*Pseudomonas savastanoi* manifeste une sensibilité à l'HE légèrement supérieure à celle d'*Erwinia amylovora* et l'inverse par rapport à l'extrait éthanoïque du lentisque. Les résultats obtenus par traitement avec l'huile essentielle obtenue par entraînement à la s'avèrent plus efficaces que l'extrait de lentisque, le travail de Belkhir en 2012 a enregistré la même efficacité [8]. Ainsi l'étude d'Amrouni et al en 2014, met en évidence l'effet inhibiteur du carvacrol et thymol extraits de Thym sur les souches de *Pseudomonas* [9].

#### 4. CONCLUSION

L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse, met en évidence la présence d'un composé principal, le Carvacrol, avec une area de 63.69% et un deuxième, le Thymol, avec une area de 5.80%.

Ce travail met en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de l'extrait éthanoïque du *Pistacia lentiscus* vis-à-vis d'*Erwinia amylovora* et *Pseudomonas savastanoi* avec des résultats appréciables d'une inhibition de plus de 20mm pour D1 et plus de 18mm pour D2 de l'HE et plus de 12mm pour D1 et plus de 14mm pour D2 de l'extrait.

L'activité antibactérienne de l'HE du thym peut être due à la présence du composé chimique « le Carvacrol » qui constitue plus 63%.

#### REMERCIEMENTS

Nous remerciant vivement le personnel de l'Institut National de la Protection des Végétaux de Chlef pour son aide à l'obtention des souches bactériennes de référence d'*Erwinia amylovora* et de *Pseudomonas savastanoi*.

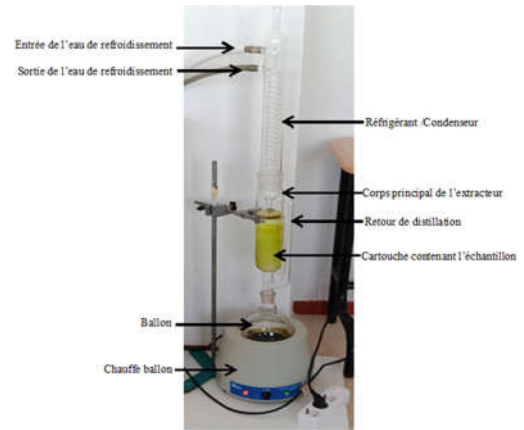
#### REFERENCES

1. Bouaichi A., Benkirane R., Habbadi K., A. Benbouazza A. et Achbani E.H., 2015. Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Pseudomonas savastanoi* pv. causal agent of olive knot. Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS, Volume 8, Issue 12 Ver. II (Dec. 2015), PP 41-45.
2. Boufares K., Hassani A., et Alem A.S., 2019. Essential oil composition and antimicrobial activities of some Cupressaceae species from Algeria against two phytopathogenic microorganisms. J. Crop Prot. (2019) Vol. 8 (2); 12p.
3. Rguez, S.N., Djébali I.B., Slimene G., Abid M., Hammemi S., Chenenaoui S., Bachkouel M., Daami-Remadi R.K. et Hamrouni-Sellami I., 2018. *Cupressus sempervirens* essential oils and their major compounds successfully control postharvest grey mould disease of tomato. Ind. Crop Prod. 123: 135-141.
4. Le Verge S., 2019. L'Olivier - les fiches techniques de France Olive, La Bacteriose. Centre Technique de l'Olivier, 2p.

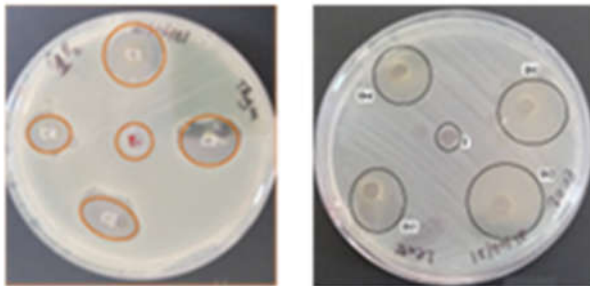
5. Wilson M., Epton, H.A.S. et Sigeo D.C., 1989. *Erwinia amylovora* Infection of Hawthorn Blossom. II. The Stigma. *J. Phytopathol.*, 127: PP.15–28.
6. Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S. et Abrini J., 2006. *Thymus* essential oils: chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et Environnement; Congrès International de Biochimie*. Agadir, 09-12 Mai. PP. 324-327.
7. Meena M.R. et Sethi V., 1994. Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *Journal of Food Science and Technology Mysore*: 31, 68- 70.
8. Belkheir M.B., Bertouche S., Sahraoui N., Hellal A. et Boutekdjiret C., 2012. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus pallescens* extraite par un procédé assisté par micro-ondes. The Second edition of the international Congress: "Microbial Biotechnology for Development" (MICROBIOD 2, MAROC).
9. Amrouni S., Touati M., Hadeif Y. et Djahoudi A., 2014. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénèmase Phytothérapie. Springer-Verlag France DOI 10.1007/s10298-014-0842-x.



**Figure 1: Dispositif d'extraction de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris***



**Figure 2: Montage soxhlet**



**Figure 3: Aspect inhibiteur de l'HE de *T. vulgaris* (à droite) et l'extrait de *P. lentiscus* (à droite) sur *Erwinia amylovora***



**Figure 4 : Aspect inhibiteur de l'HE de *T. vulgaris* (à droite) et l'extrait de *P. lentiscus* (à droite) sur *Pseudomonas***

**Tableau 1: constituants chimiques majoritaires de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* analysée par CG-SM.**

Composés chimiques	Temps de rétention (RT)	Pourcentage (A%)
P-Cymene	14.38	0.41
Linalool L	25.35	1.33
Terpinen-4-ol	23.10	0.73
B-Caryophyllene	23.26	0.81
Estragole	25.07	1.12
Ar-Curcumene	29.01	1.34
Anethole	31.63	0.71
Caryophyllene Oxyde	37.88	0.80
Methyleugenol	38.20	0.58
Spatulenol	40.91	0.58
P-Cymen-8-ol	41.44	0.30
Eugenol	41.58	1.70
Thymol	41.78	5.80
P-Cymen-7-ol	42.10	0.25
Carvacrol	42.35	63.69

**Tableau 2: Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de l'extrait de *Pistacia lentiscus* vis-à-vis d'*Erwinia amylovora***

Dose	D1 : SM	D2 : 75%	D3 : 50%	D4 : 25%
HE de <i>T. vulgaris</i>	20 mm	20 mm	18.5 mm	13.5 mm
Extrait éthanoïque de <i>P. lentiscus</i>	12.33 mm	15 mm	9.33 mm	6 mm

**Tableau 3: Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de l'extrait de *Pistacia lentiscus* vis-à-vis de *Pseudomonas savastanoi***

Dose	D1 : SM	D2 : 75%	D3 : 50%	D4 : 25%
HE de <i>T. vulgaris</i>	22 mm	18.25 mm	15 mm	8.5 mm
Extrait éthanoïque de <i>P. lentiscus</i>	17 mm	14.25 mm	13.66 mm	14 mm

# EFFET DE QUELQUES SUBSTANCES BIOLOGIQUES SUR QUELQUES SOUCHES BACTERIENNES ET FONGIQUES

**TERBECHE R.<sup>1</sup>, GHARBI <sup>2</sup>., RAHLI F<sup>3</sup>., KHALFA A. <sup>4</sup>., BERREBBAH ALIOUA A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire de Toxicologie Environnement et Santé (LATES), Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Département du vivant et de l'environnement, Université des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf-Oran, Algérie

<sup>2</sup>Laboratoire de Toxicologie Environnement et Santé (LATES), Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Département de Biotechnologie, Université des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf-Oran, Algérie

<sup>3</sup>Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Biologie, Faculté Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ahmed Ben Bella, Algerie. Ecole Supérieure des Sciences Biologiques d' Oran. Algerie

<sup>4</sup> Laboratoire de Nutrition Clinique et Métabolique, Université Ahmed Ben Bella-Oran1, Algérie. Département d'Agroalimentaire, Université de Belhadj Bouchaib-Ain Temouchent, Algérie

Auteur correspondant : [rymeterbeche@yahoo.fr](mailto:rymeterbeche@yahoo.fr)

## RESUME

Le présent travail est une contribution à l'évaluation de l'effet antimicrobien de trois échantillons de molécules chimiques synthétisées : A1, A2 et A3. Les trois échantillons de molécules: sont testés sur six souches microbiennes (deux souches bactériennes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Deux champignons pathogènes : *Rhodotorula rubra* et *Candida albicans*. Deux champignons phytopathogènes : *Fusarium sp* et *Alternaria sp*).

Notre travail est basé sur l'évaluation de l'effet antibactérien et antifongique par la technique d'aromatogramme.

Les résultats obtenus montrent l'impact de ces molécules sur la sensibilité microbienne. Cet effet inhibiteur a été constaté pour les trois échantillons testés, avec des différences d'un échantillon à un autre et d'une souche microbienne à une autre.

Nous avons constaté que deux échantillons de molécules testées ont montré deux types d'effets antimicrobiens : un effet bactériostatique par les molécules A1 et A2 (sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), et aussi un effet fongistatique de ces molécules A1 et A2 vis-à-vis des souches testées : (*Candida albicans* , sur *Fusarium sp*.et sur *Alternaria sp*.)

Tandis que la 3ème molécule A3 a un effet antifongique sur: *Candida albicans* et *Fusarium sp*. *Rhodotorula rubra* a présenté une résistance pour les 3 molécules.

**Mots clé :** molécules chimiques- pouvoir antimicrobien- taux d'inhibition- Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

## 1. INTRODUCTION

Avant l'invention du microscope, peu de scientifiques soupçonnaient l'existence de formes de vie tellement petites qu'elles seraient invisibles à l'œil nu. Dans l'antiquité, Aristote avait formulé l'idée d'une transmission invisible de certaines maladies mais il ne put en apporter la preuve. De même, au XVI siècle, Von Hutten et Paracelse affirmèrent l'existence de germes vivants invisibles, mais leurs idées n'eurent guère de succès. La notion de contagion n'était pas acquise et les règles d'hygiène élémentaire que nous pratiquons aujourd'hui de façon automatique étaient inexistantes. Les épidémies étaient alors fréquentes et meurtrières.

Aujourd'hui l'homme a compris que les micro-organismes faisaient partie intégrante des écosystèmes et que leur présence était parfois indispensable au renouvellement ou à l'entretien de l'environnement. En revanche, il est en lutte permanente contre de nombreux champignons et bactéries pathogènes et phytopathogènes, susceptibles de provoquer des maladies pour l'être humain, pour le bétail et pour les récoltes nécessaires à son alimentation.

Après avoir découvert ce monde microscopique et notamment les effets potentiellement dévastateurs de certains micro-organismes, l'humanité s'est engagée dans une lutte permanente, avec des moyens considérables afin de garantir sa survie et sa pérennité face à ce danger.

Les moyens déployés dans la lutte antimicrobienne se présentent sous différentes formes : de la surveillance à la désinfection, en passant par la recherche et la prévention auprès des populations dites "à risques".

Une bactérie est un micro-organisme unicellulaire, dépourvu de noyau, à structure très simple. Certaines bactéries sont intégrées dans notre système digestif et ne sont pas pathogènes, elles forment le microbiote. D'autres peuvent être pathogènes, et parfois même mortelles. Les infections bactériennes sont traitées par antibiothérapie<sup>1</sup>.

Les champignons sont des eucaryotes (pourvu de noyau) pluricellulaires ou unicellulaires (Macromycètes et micromycètes). Beaucoup de micromycètes ont été découverts grâce au microscope. Pour les uns, grâce à leurs propriétés métaboliques intéressantes pour les activités humaines (fermentations et conservation des aliments par exemple). Pour les autres du fait des dégâts occasionnés aux végétaux (phytopathogènes), aux animaux ou aux humains (Pathogènes)<sup>2</sup>.

Nous avons effectué une étude consistant à tester le pouvoir antimicrobien de certaines molécules chimiques sur deux souches bactériennes, deux souches fongiques pathogènes et deux souches fongiques phytopathogènes, en utilisant la méthode d'aromatogramme.

La méthode de l'ensemencement consiste à introduire des micro-organismes dans un milieu de culture favorable à leurs proliférations dans le but de les isolés et de les étudier. Nous avons utilisé cette méthode lors de notre travail pour observer et étudier les effets de certaines molécules sur des champignons et sur des bactéries.

Notre travail s'inscrit dans le vaste domaine d'études de la lutte antimicrobienne. En effet, plusieurs études similaires à la nôtre ont été effectuées partout dans le monde, mais avec des combinaisons de molécules et de bactéries ou champignons différentes. Chaque étude apporte alors une pierre à l'édifice de la lutte antimicrobienne.

Dans le cadre de notre projet, nous avons une étude sur les molécules biologiques actives synthétisées au niveau du laboratoire de chimie organique de l'université Ahmed ben Bella Oran et qui sont d'origine naturelle (Safran et Curcumun), ces molécules sont testées pour savoir si elles peuvent potentiellement avoir un effet antimicrobien sur deux souches bactériennes et deux souches fongiques pathogènes et deux autres phytopathogènes, en utilisant la méthode d'aromatogramme.

## **2. MATERIEL ET METHODES**

### **2.1. Échantillonnage**

Notre étude est portée sur 3 molécules chimiques synthétisées au niveau du laboratoire de chimie organique de l'université Ahmed Ben Bella d'Oran 1, nous avons testé leurs effets sur des souches bactériennes ATTC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (fournit par l'institut pasteur d'Algérie annexe d'Oran) et sur des champignons pathogènes (*Rhodotorula rubra*, *Candida albicans*)(isolées et identifiées au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie annexe d'Oran). Nous les avons aussi testés ces molécules sur des champignons phytopathogènes (*Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*) de la mycothèque de notre laboratoire que nous avons isolées et identifiées.

### **2.2. Repiquage**

Les souches sont repiquées sur leurs milieux adéquats pour avoir des cultures jeunes

### **2.3. Dilution**

Chaque molécule a été diluée dans le solvant DMSO. Une solution mère a été préparée 10<sup>5</sup> ppm. Des dilutions ont été faites à 50 ppm, 100ppm, 200 et 400ppm, les calculs ont été fait selon la formule  $C1V1=C2V2$ .

### **2.4. Lutte chimique**

Chaque molécule a été diluée dans le solvant DMSO (Diméthylsulfoxy). Une solution mère a été préparée à une concentration de 10<sup>5</sup> ppm. Des dilutions ont été ensuite faites à partir de cette molécule, pour arriver à des concentrations de 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, et 400 ppm.



### 2.4.1. Test des souches : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentrations minimales Fongicides (CMF)

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de concentration minimales CMI d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure <sup>3</sup>. Car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé. Ces méthodes peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne in vitro contre les bactéries et les champignons <sup>4</sup>. La CMI peut être déterminée par la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui inhibera la croissance visible du microorganisme testé <sup>5,6</sup>.

#### ➤ La méthode des disques

L'ensemencement des bactéries a été réalisé sur gélose Mueller HINTON à partir de la dilution 10<sup>6</sup> de *Staphylococcus aureus* et de *Escherichia coli*, à fin de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

L'ensemencement des souches fongiques a été réalisé sur Gélose Sabouraud à partir de la dilution décimale 10<sup>6</sup> de *Rhodotorula rubra* et *Candida albicans*.

Des disques en papiers stériles, imbibés des différentes concentrations des molécules A1, A2 et A3 ont été déposés sur chacune des boîtes de pétri contenant les bactéries et levures à tester (Figure 1). L'incubation des bactéries se fait à 37° pendant 72h. L'incubation des levures se fait à 28° pendant 2 à 7 jours.

#### ➤ La méthode des puits

Un fragment mycélien de chaque champignon phytopathogène (culture jeunes de 10 jrs) a été déposé sur gélose PDA, et des puits ont été réalisés afin d'y déposer les différentes concentrations de molécules A1, A2 et A3, pour voir l'inhibition et déterminer la Concentration Minimale Fongicide (CMF) (figure 2). L'incubation se fait à 28° pendant 10 à 14 jours.

### 2.4.2. Calcul du taux d'inhibition

La lecture des résultats est réalisée à J14 selon le modèle proposé, en mesurant les deux diamètres perpendiculaires des colonies et la moyenne des 3 répétitions. Le taux d'inhibition est ensuite calculé selon la formule suivante :  $TI = [T - Dc / T] \times 100$

TI = Pourcentage d'inhibition.

T = Diamètre du témoin.

Dc = Diamètre de l'isolat testé à une concentration déterminée.

## 3. RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1. Détermination de la CMI et de la CMF



Les observations macroscopiques sur les figures 3, 4, 5 et 6 montrent que l'efficacité de nos molécules chimiques varie d'une espèce à une autre.

### 3.2. Détermination du taux d'inhibition

Plusieurs ralentissements de croissance ont été identifiés ce qui montre une sensibilité des microorganismes et une efficacité de certaines molécules, contrairement à d'autres microorganismes qui sont résistants à ces mêmes molécules (figures 7 et 8).

- *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* présentent une sensibilité pour les molécules 1 et 2 contrairement à la molécule 3 pour laquelle elles présentent une résistance.
- *Candida albicans* présente une sensibilité pour les trois molécules contrairement à *Rhodotorula rubra* qui présente une résistance contre les 3 molécules.
- *Fusarium sp.* présente une sensibilité pour les trois molécules par contre *Alternaria sp.* a une sensibilité pour les molécules 1 et 2 et elle est résistante pour la molécule 3.

### 3.3. Efficacité des molécules

28%		molécule 1
90%		molécule 2
11.4		molécule 3

#### 4. CONCLUSION

Dans la présente étude, nous avons caractérisé trois échantillons de molécules chimiques synthétisées. Ces trois échantillons sont testés sur six souches microbiennes (deux souches bactériennes, deux champignons pathogènes, et deux champignons phytopathogènes).

L'objectif de ce travail a été basé sur l'évaluation de l'effet antibactérien et antifongique sur les micro-organismes afin de savoir s'il présente une résistance ou une sensibilité.

Au terme de ce travail qui ouvre plusieurs perspectives de recherche il serait intéressant d'approfondir les investigations sur les souches afin de déterminer leur mécanisme d'action direct et indirecte, identifier les métabolites actif à effet inhibiteur, et connaître l'efficacité des molécules et leur résistance.

#### REMERCIEMENTS

Un grand merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail et à tout le comité organisateur du « séminaire microbiologie BEJAIA » à leur tête Pr TOUATI. MERCI

#### REFERENCES

1. **Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012).** *Defining the human microbiome. Nutrition reviews*, 70(1), 38-44.
2. **Wheelis, M. (2011).** *Principles of modern microbiology. Jones & Bartlett Publishers*, 120-126.
3. **Rios, J., Recio, M., Villar, A. (1988).** Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology* 23, 127-149
4. **Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.
5. **Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A C. (2007).** *Antimicrobial susceptibility testing protocols. Crc Press.*
- 6 **Das, K., Tiwari, R., Shrivastava, D. (2010).** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research* 4, 104-111.

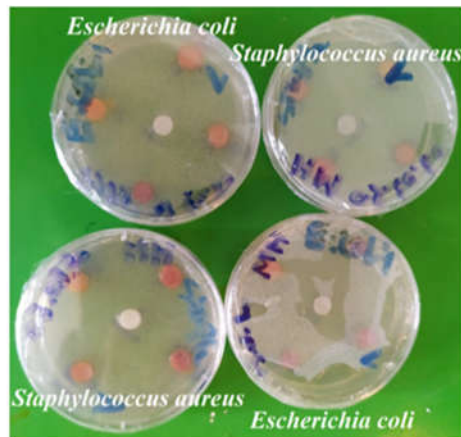


Figure 1: Méthode des disques



Figure 2: Méthode des puits

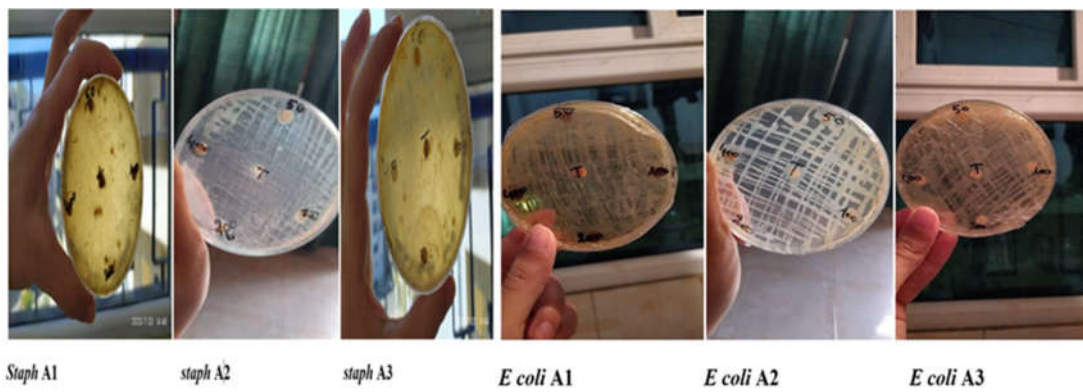


Figure3 : Observation macroscopique du test de lutte chimique des molécules A1, A2 et A3 sur *Staphylococcus aureus* et *E.coli*

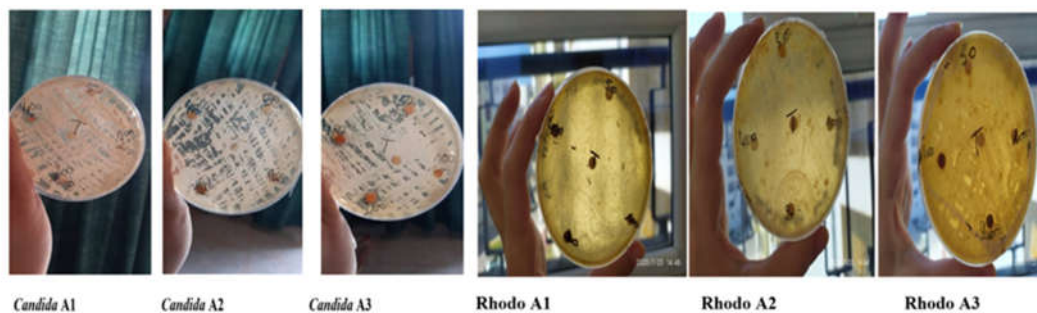


Figure 4: Observation macroscopique du test de lutte chimique des molécules A1, A2 et A3 sur les champignons pathogènes: *Candida albicans* et *Rhodotorula rubra*

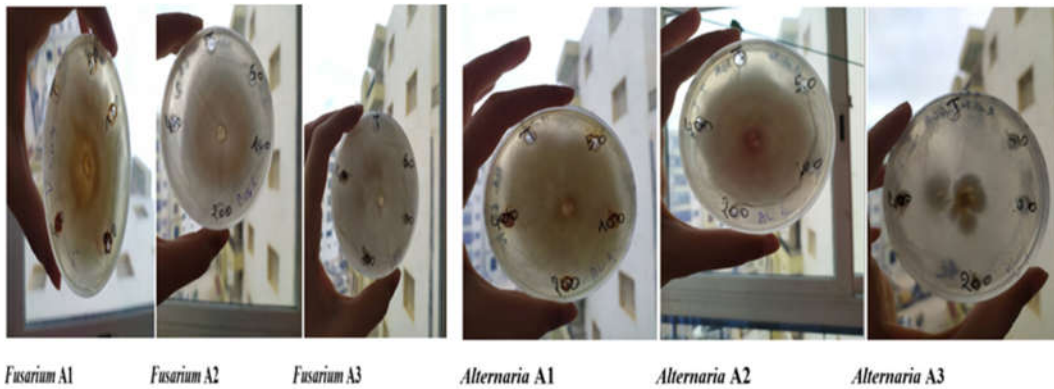


Figure 5: Observation macroscopique du test de lutte chimique des molécules A1, A2 et A3 sur les champignons phytopathogènes: *Fusarium sp.* et *Alternaria sp.*

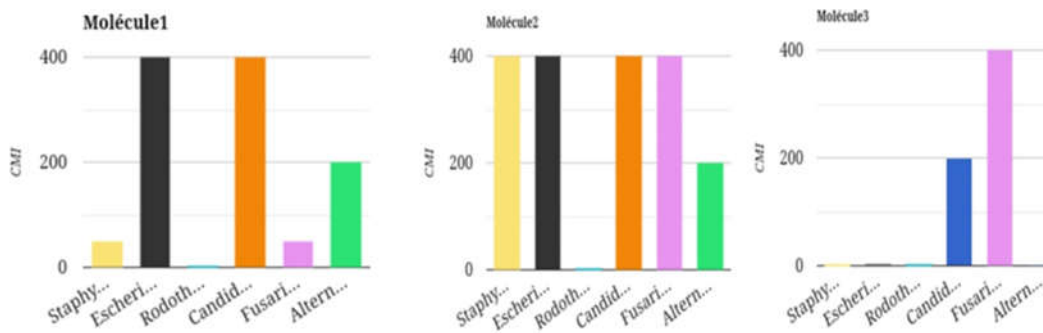


Figure 6 : Détermination de la CMI et de la CMF

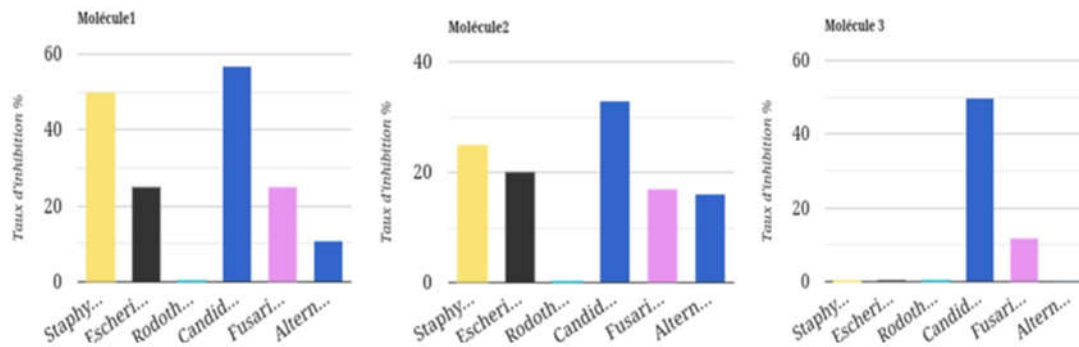
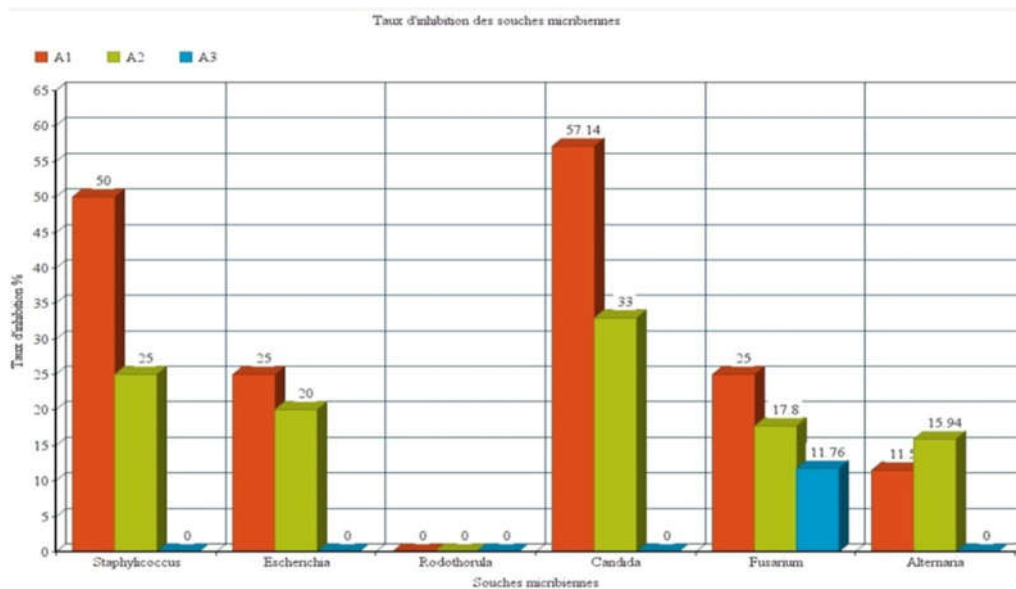


Figure 7: Détermination du taux d'inhibition de chaque molécule



**Figure 8: taux d'inhibition global**

**Tableau 1: Résultats de l'effet des molécules chimiques sur les bactéries (CMI et pourcentage d'inhibition).**

	Molécules	CMI en ppm	Taux d'inhibition
<i>Staphylococcus</i>	A1	50	50%
	A2	400	25%
	A3	Pas d'inhibition	Le champignon a poussé normalement par rapport au témoin
<i>E coli</i>	Molécules	CMI	Taux d'inhibition
	A1	400	25%
	A2	400	20%
	A3	Pas d'inhibition	Le champignon a poussé normalement par rapport au témoin

**Tableau 2: Résultats du test des molécules chimiques sur des champignons pathogènes pour l'homme (CMI et pourcentage d'inhibition)**

	Molécules	CMI (ppm)	Taux d'inhibition
<i>Candida albican</i>	1	200 et 400	57,14%et 28,57%
	2	400	33,3%
	3	Très légère a 200	50%
<i>Rhodotorula rubra</i>	Molécules	CMI (ppm)	Taux d'inhibition
	1	Pas d'inhibition	le champignon a bien poussé comparer au témoin
	2	Pas d'inhibition	le champignon a bien poussé comparer au témoin
	3	Pas d'inhibition	le champignon a bien poussé comparer au témoin

**Tableau 3: Résultats des molécules chimiques sur des champignons phytopathogènes (CMI et pourcentage d'inhibition) après 14 jours d'incubation**

<i>Fusarium sp</i>	Molécules	CMI (ppm)	Taux d'inhibition
	1	50	25%
	2	400	17,80%
	3	400	11,76%
<i>Alternaria sp</i>	Molécules	CMI(ppm)	Taux d'inhibition
	1	200	11,5%
	2	200	15,94%
	3	Pas poussée	Pas poussée

ISBN 978-9931-9910-1-4



9 7 8 9 9 3 1 9 9 1 0 1 4





**SARAHMED** Editions  
Route de targua Ouzemmour, Bejaia, Algérie

